

Aus dem Institut für
Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. K. Schrör

**Welche Rolle spielt das C-reaktive Protein
bei der Regulation
der B₂-Bradykininrezeptor-Expression
und der Entstehung von Angioödemem?**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Huu Quang Le

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. Kojda

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Homey

Meiner verstorbenen Schwester
Maria Diem Loc
und
meinem verstorbenen Bruder
Giuse Huu Phuoc
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Ziele dieser Untersuchung.....	4
2 Literaturübersicht	5
2.1 Das Angioödem.....	5
2.1.1 Formen des Angioödems.....	5
2.1.2 Formen des Nicht-allergischen Angioödems	6
2.1.3 Epidemiologie des AÖ	6
2.1.3.2 Erworbenes Angioödem (AAE).....	7
2.1.3.3 RAAS-Blocker-induziertes Angioödem	7
2.1.4 Lokalisationen des Angioödems	8
2.1.5 Symptome des Angioödems.....	9
2.1.6 Marker für das AÖ	11
2.1.7 Trigger für das AÖ	14
2.1.8 Diagnostik des Angioödems.....	19
2.1.9 Differentialdiagnosen des Angioödems	21
2.1.10 Therapie des Angioödems.....	24
2.2 Die Rolle des Bradykinins und des Kallikrein-Kinin-Systems bei der Entstehung des Angioödems	28
2.2.1 Hintergrund	28
2.2.2 Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems (KKS).....	28
2.2.3 Lokalisation.....	29
2.2.4 Interaktion des KKS mit dem RAAS	30
2.2.5 Geschichtlicher Exkurs zur funktionellen Bedeutung des RAAS aus evolutionärer Sicht 31	
2.2.6 Medikamentöse Beeinflussungsmöglichkeiten des Kallikrein-Kinin-Systems	32
2.3 Bradykinin.....	34

2.3.1 Initiierung der Bradykinin-Produktion.....	35
2.3.2 Gefäßerweiterung/-entspannung durch Bradykinin	37
2.3.3 (Gefäßentspannungs-)Signalkaskade bei der Bindung von Bradykinin an den Bradykinin-Rezeptor II (BKR-2) von Endothelzellen	38
2.3.4 Tiermodelle zum Thema Bradykinin und Gefäßentspannung	39
2.3.5 Metabolismus des Bradykinin.....	41
2.3.6 HAE-Schlüsselmediator Bradykinin	41
2.3.7 Bradykininrezeptoren	42
2.3.8 Pharmakologische Blockade der B ₂ -Rezeptoren und Studien zu B ₂ -Rezeptor- Knockout-Mäusen	47
2.4 Rolle der Akute-Phase-Proteine und des C-reaktiven Proteins bei der Entstehung des Angioödems	49
2.4.1 Akute-Phase-Proteine.....	49
2.4.2 Das C-reaktive Protein	50
2.4.3 Pentamerisches CRP	52
2.4.4 Monomeres CRP	58
3 Material und Methoden	62
3.1 Puffer und Lösungen	62
3.2 Methoden.....	63
3.2.1 Zellkulturarbeiten	64
3.2.2 Ultrafiltration.....	70
3.2.3 Reinheitsprüfung des CRP-Retentats	71
3.2.4 Inkubation des Zellkulturen mit CRP	73
3.2.5 Molekularbiologische Methoden.....	73
3.2.6 Biochemische Methoden	83
3.2.7 Berechnung und Statistik	85
4 Ergebnisse	86
4.1 Zellkulturen	86
4.1.1 Kultur des humanen Plattenepithelkarzinoms (DU-SCC 2)	86
4.1.2 Kultur der humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC).....	86
4.1.3 Kultur der porcinen Aortenendothelzellen (PAEC).....	87
4.2 Reinheitsprüfung des CRP-Retentats	88

4.2.1 Überprüfung der CRP-Reinheit mittels eines Photometers.....	88
4.2.2 Überprüfung der vasorelaxierenden Wirkung des ungereinigten CRP.....	91
4.3 Einfluss von CRP ^{+/+} auf die B2-Rezeptor-mRNA-Expression via RT-PCR	92
4.4 Einfluss von CRP ^{-/-} auf die B2-Rezeptor-mRNA-Expression via RT-PCR	94
4.5 Quantifizierung der B2-Rezeptor-mRNA-Expression via RT quantitative PCR.....	95
4.5.1 Absolute Quantifizierung	95
4.5.2 Relative Quantifizierung	97
4.6 Einfluss von CRP ^{+/+} auf die endotheliale B2-Rezeptor Expression via Western Blot.	100
4.7 Einfluss von CRP ^{-/-} auf die endotheliale B2-Rezeptor-Expression via Western Blot..	102
5 Diskussion	104
5.1 Einleitung in die Diskussion	104
5.2 Evaluation der Resultate der CRP ^{+/+} /CRP ^{-/-} -Wirkungen auf die Gefäße im Organbad	105
5.3 Aktueller Stand der Forschung zum Thema: Wirkungen des Konservierungsstoffs Natriumazid oder des CRP?	106
5.4. Diskussion der Resultate der Untersuchungen zu zeit- und konzentrationsabhängigen Stimulationswirkungen des CRP ^{+/+} /CRP ^{-/-} auf die BKR-2-Expression der Endothelzellen	110
6 Zusammenfassung.....	124
7 Literatur	126
8 Curriculum vitae.....	134
9 Danksagung.....	135

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
Anti-B ₂ R P Ab	Polyklonale Antikörper (polyclonal antibodies) des B ₂ R
Anti-B ₂ R M Ab	Monoklonale Antikörper(monoclonal antibodies) des B ₂ R
AÖ	Angioödem
Brad-B ₂ -Rez-f	Bradykinin-B ₂ -Rezeptor f (Primer-Sequenzen des Schweins und der humanen Nabelschnur)
Brad-B ₂ -Rez-r	Bradykinin-B ₂ -Rezeptor r (Primer-Sequenzen des Schweins und der humanen Nabelschnur)
cAMP	Cyclo-Adenosinmonophosphat
cDNA	(complementary DNA) mittels RT von mRNA kopierte cDNS
cGMP	„second-messenger“ cyclisches Guanosinmonophosphat
C1-Inhibitor	C1-Esterase-Inhibitor
cPLA ₂	zytosolische Phospholipase A ₂
C1q	Untereinheit des Komplementproteins C1
CRP	C-reaktives Protein
mCRP	monomeres CRP
pCRP	pentameres CRP
CRP ^{+/+}	CRP von Calbiochem mit 0,05 % igem NaN ₃
CRP ^{-/-}	Gereinigtes CRP ohne 0,05 % iges NaN ₃
C _T	Schwellenzyklus (cycle treshold value)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP Mix	enthält 4 NTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DU-SCC 2	Humane Plattenepithelkarzinom-Zellen
ECGS/ H	Endothelial Cell Growth Supplement / Heparin
FAM	Reporter-Fluoreszenzfarbstoff
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
hbFGF	human basic Fibroblast Growth Factor
hEGF	human Epidermal Growth Factor
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
kDa	Kilodalton (Masseneinheit für das Molekulargewicht)

Abkürzungsverzeichnis

λ	Wellenlänge des Lichts
MEM	Eagle's Minimum Essential Medium
MGB	Minor Groove Binder
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
n	Stichprobe des Umfanges n zur Errechnung des SEM
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte (1 OD entspricht 25 μ g RNA/ml)
p	(stat.) Abk. für (Irrtums-)Wahrscheinlichkeit (probability)
PAEC	Porcine Aortenendothelzellen (porcine aortal endothelial cells)
pg	Pikogramm
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PI-PLC	phosphatidylinositspezifische Phospholipase C
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA, PKC, PKG	Proteinkinase A/C/G
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Quencher
r ²	Quadrat des Korrelationskoeffizienten
rpm	Drehzahl der Zentrifuge pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RT-Puffer	Reverse Transkriptase Puffer
RW1-Puffer	Extraktionskit RNeasy (QUIAGEN); Zusammensetzung nicht bekannt
SDS	Natrium-Duodecyl-Sulfat (sodium duodecyl sulfate)
SDS-PAA	SDS-Polyacrylamid
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris Buffered Saline)
TBST	TBS mit x % Tween
TBSTM	TBST mit x % Milch
TM1 bis TM7	Transmembran-Domänen 1-7
t-PA	Gewebe-Plasminogen-Aktivator. (tissue-plasminogen-activator)

1 Einleitung

Angioödeme sind Schwellungen der Mukosa und/oder Submukosa der Haut, die die Atmung beeinträchtigen können und potentiell lebensbedrohlich sind (Bas et al., 2007). Der gegenwärtige „state of the art“ bei der Diagnostik und Therapie des Angioödems ist durch wichtige ungelöste Fragen und die Gefahr fehlerhafter Entscheidungen im klinischen Alltag zutreffend charakterisiert:

Weder gibt es gegenwärtig einen veröffentlichten Algorithmus für die Diagnose und Therapie noch gibt es eine evidenzbasierte Behandlung dieser Erkrankung (Bas, Hoffmann, Kojda 2009, Vorwort G. Kojda).

Im klinischen Alltag ist man konfrontiert mit einem Patienten mit einer erstmaligen Schwellungsepisode, deren Ursache unbekannt ist. Oft ist der Patient nicht in der Lage, die eingenommenen Medikamente zu nennen oder besitzt keinen Medikamentenausweis, aus dem ein potentiell ursächliches Medikament abgeleitet werden kann (Hoffmann et al., 2009).

Ein weiteres Problem ist, dass erst nach beträchtlichen Verzögerungen Patienten häufig korrekt diagnostiziert werden als hereditäres Angioödem (HAE) und die Patienten häufig fehldiagnostiziert werden als allergisches Angioödem (*Angioödem im folgenden abgekürzt als AO*), akutes Abdomen oder sonstige Diagnosen.

Bei der Diagnose des C1-INH-Mangels ist mit Blick auf die abschätzbaren therapeutischen Konsequenzen eine korrekte Diagnose des Angioödems von essentieller Bedeutung (Kreuz et al., 2009).

Wenn die Eltern eines HAE-Kindes nicht frühzeitig und zureichend über die Diagnose informiert werden, können unnötige Operationen wie Appendektomie bei intraabdominellen Ödemen die mögliche fatale Folge sein. Dieser Punkt kann nicht deutlich genug betont werden, weil unnötige Operationen sogar ausgeführt worden sind, obwohl die Eltern die Diagnose HAE, aber nicht die möglichen Manifestationen dieser Erkrankung kannten (Bas et al., 2007). Bis zu 34 % der (HAE-)Patienten werden unnötigen chirurgischen Prozeduren unterzogen wie Appendektomie oder explorativer Laparotomie wegen des fehlenden Wissens über die klinische Symptomatik des HAE.

Weitere Unsicherheiten sind, dass sich Patienten mit C1-INH-Mangel im Allgemeinen genauso mit dem typischen Laborwert auch während symptomfreier Intervalle präsentieren und z.B. die verbleibende Aktivität des C1-INH (bei HAE Typ II) nicht mit der Häufigkeit oder Schwere der Symptome korreliert.

Ein erworbenes AÖ (AAE) mit erworbenem C1-INH-Mangel ist klinisch nicht unterscheidbar von einem solchen mit hereditärem C1-INH-Mangel (HAE)

Das Alter der Erstmanifestation beim hereditären Angioödem ist unter 10 Jahre bei etwa 50% der Patienten, jedoch haben zu diesem Zeitpunkt nur etwa 13% eine korrekte Diagnose (Kreuz et. al., 2009).

Die gegenwärtige Pharmakotherapie des nichtallergischen Angioödems ist nicht zufriedenstellend, erfordert deshalb die Identifizierung effektiver Substanzen in klinischen Studien (Bas et al., 2007).

Patienten unter ACE-Inhibitor (ACEI)-Therapie wie auch solche mit kongenitalem C1-Inhibitor (C1-INH)- Mangel zeigen erhöhte Bradykinin-Plasma-Konzentrationen (Bas et al., 2009).

Auf der Suche nach möglichen Triggerfaktoren für das Angioödem sind Bradykinin und Akute-Phase-Proteine und ihre Wirkungen auf Gefäße Gegenstand intensiver Forschung und somit auch Ausgangspunkt meiner Experimente gewesen. Der Diskussionsstand lässt sich an dieser Stelle am besten so kurz zusammenfassen, indem ich aus einer Veröffentlichung meines Kollegen Dr. Bas u. a. unseres Instituts (Bas et al., 2007) die folgenden Überlegungen und Ergebnisse zitiere:

„Es könnten Vermutungen darüber angestellt werden, dass eine Vielzahl endogener Faktoren die Angioödem-induzierenden biologischen Aktivitäten des Bradykinins im Gleichgewicht halten. Andere Faktoren könnten im Gegensatz dazu eine Gewebeumgebung erzeugen, die diese Balance unterbricht und ein Angioödem induziert. Da viele der genannten Triggerfaktoren mit der Aktivierung von Entzündungskaskaden assoziiert sind, scheint es viel versprechend zu sein, eine Verbindung zwischen Plasmamarkern für Entzündung und der Entwicklung eines AÖ zu suchen. Kürzliche Forschungsergebnisse können Licht auf solche potentiellen Triggerfaktoren werfen.

In einer Kohorte von 43 männlichen und weiblichen Nicht-HAE-Patienten, die an einer Attacke eines akuten Angioödems (AA) litten, nahmen 25 ACE-Inhibitoren ein und ihre Attacke wurde vollständig zum Rückgang gebracht nach Absetzen des Medikaments, wohingegen weitere 18 Fälle keine physikalischen, biochemischen oder genetischen Zeichen aufwiesen, die die Klassifikation ihrer Attacke erlaubte und die deshalb der Gruppe der idiopathischen

AÖ (IAE) zugeordnet wurden. Die Bestimmung der Akute-Phase Proteine während der akuten AÖ-Attacke zeigte eindrucksvolle Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen. Patienten unter ACEI-Behandlung hatten ins Auge fallende signifikant erhöhte Plasma-Level des CRP und des Fibrinogens.

Es sollte hinzugefügt werden, dass bei all diesen ACEI-behandelten Patienten die Level der Akute-Phase-Proteine auf Normalwerte zurückkehrten, wie sie 3 bis 6 Monate nach der Attacke gemessen wurden. Weiterhin zeigte die Bestimmung der Akute-Phase-Proteine bei 21 kardiovaskulären Patienten unter ACEI-Behandlung, die niemals ein Angioödem erlebt hatten, ebenso normale Werte.

Eine nachfolgende Laboruntersuchung zeigte nicht nur potente in vitro Vasodilatationseffekte des Fibrinogens in humanen Arterienringen, sondern auch eine starke Potenzierung des vasodilatorischen Effekts von Bradykinin.

Zusammengenommen könnten diese Resultate hinweisen auf einen Beitrag von Entzündungsprozessen zur Pathophysiologie des Angioödems. Jedoch ist es noch nicht klar, ob oder ob nicht Akute-Phase-Proteine Angioödeme wirklich auslösen“ (Bas et al., 2007).

Klinische Beobachtungen haben enthüllt, dass nicht alle Patienten mit hohen BK-Plasma-Konzentrationen auch ein Ödem entwickeln. Nur 0.5% der ACEI-Patienten leiden an einem Angioödem. Dieser Befund zeigt deutlich, dass auch andere Faktoren bei der Entwicklung des Angioödems eine Rolle spielen müssen. In diesem Kontext ist es bemerkenswert, dass Patienten mit erhöhten BK-Plasma-Konzentrationen häufig Ödeme entwickeln während oder direkt nach einer Operation oder bei entzündlichen Zuständen. Als Grund hierfür können wir eine Wechselwirkung zwischen Akute-Phase-Proteinen und chronisch erhöhtem BK in Betracht ziehen.

Dementsprechend muss angenommen werden, dass die Entwicklung eines AÖ ein multikausales Phänomen ist, bei dem eine Serie von Faktoren zusammenwirken muss. Eine erhöhte Plasma-BK-Konzentration allein ist nicht ausreichend, um ein AÖ auszulösen. Jedoch, wenn weitere Faktoren wie Akute-Phase-Proteine und vermutlich Zytokine anwesend sind, haben wir mehrere Bedingungen für die Entwicklung eines AÖ gleichzeitig zur Hand (Bas et al., 2009).

Zur weiteren Klärung solcher Fragen soll nun mit meinen Untersuchungen an Endothelzellen in dieser Dissertation ein weiterer Beitrag geleistet werden, ein Mosaikstein hinzugefügt werden zur Beantwortung der Titelfrage dieser Arbeit, welche Rolle das C-reaktive Protein bei der Regulation der B₂-Bradykininrezeptor-Expression und der Entstehung von Angioödem spielt.

1.1 Ziele dieser Untersuchung

Diese Doktorarbeit konzentriert sich auf die folgenden Ziele:

1. Klärung der Rolle des CRP mit Konservierungsstoff Natriumazid (CRP^{+/+}) und des gereinigten CRP (CRP^{-/-}) auf die Induktion der Bradykinin-B₂-Rezeptor-Expression meiner untersuchten Gefäßendothelzellproben
2. Prüfung der Gefäßrelaxationswirkungen der beiden genannten CRP-Zubereitungen im Organbad
3. Prüfung zeit- und konzentrationsabhängiger Stimulationswirkungen des CRP^{+/+}/CRP^{-/-} auf die Bradykinin-B₂-Rezeptor-Expression mit den notwendigen Methoden wie PCR, Western Blot usw. an Gefäßendothelzellproben verschiedener Herkunft
4. Diskussion der Rolle von Verunreinigungen des kommerziell erhältlichen CRP und der Möglichkeit spontaner Dissoziation des CRP, wie sie aktuell in der Literatur geführt wird
5. Diskussion meiner Ergebnisse angesichts des aktualisierten Forschungsstandes betreffend CRP, Angioödem und Bradykininwirkungen und die Einflüsse möglicher Signalkaskaden
6. Darstellung und Diskussion neuer therapeutischer Ansätze und Durchbrüche bei medikamentösen Optionen zur Behandlung des AÖ und der Fragestellung, welches neue Licht diese und damit zusammenhängende Tierversuche und klinischen Ergebnisse werfen auf die Klärung von Zusammenhängen bei der Genese des AÖ und des Einflusses der Gefäßwirkungen von Bradykinin und des Einflusses von Akute-Phase-Proteinen, besonders CRP, hierbei.

2 Literaturübersicht

2.1 Das Angioödem

2.1.1 Formen des Angioödems

Einfachheitshalber werden Angioödeme klassifiziert in solche mit genetischen Ursachen und erworbenen Formen. Eine andere Möglichkeit ist, zwischen allergischen und nicht allergischen zu unterscheiden, d. h. IgE-vermittelten bzw. nicht-IgE-vermittelten Angioödem.

Folgende Angioödeme gibt es:

1. Angioödem bei Urtikaria (ca. 50 % der Angioödeme)
2. Hereditäres AÖ: selten; von der Ätiologie her autosomal-dominant erbliche Erkrankung durch Mangel eines C1-Esterase-Inhibitors (C1-INH). Die Einteilung erfolgt nach Genese des Mangels:
 - a) Typ I: geringe Produktion von C1-INH
 - b) Typ II: Bildung eines defekten, inaktiven C1-INH
 - c) Typ III: proteingebundener C1-INH
3. Erworbenes AÖ durch C1-INH-Mangel i. R. von lymphoproliferativen oder Autoimmunkrankheiten (Typ I) oder idiopathisch (Typ II); Diagnose: erniedrigter C1- u. C4- Spiegel, verminderte C1-INH-Aktivität
4. AÖ bei lymphoproliferativen Erkrankungen mit normalem C1-INH-Spiegel
5. Physikalisch (durch Druck oder Vibration) verursachtes AÖ
6. AÖ als UAW der ACE-Hemmer
7. Episodisches AÖ mit Hypereosinophilie
8. Carboxypeptidase-N-Mangel (erworben od. familiär) (Pschyrembel 261. Aufl.)

2.1.2 Formen des Nicht-allergischen Angioödems

Das nichtallergische Angioödem kann durch erbliche Disposition verursacht oder iatrogenen Ursprungs sein und in 5 verschiedene Typen unterteilt werden (Abb. 1): Hereditäres (HAE), Erworbenes (AAE), RAAS-Blocker-induziertes (RAE), Pseudoallergisches (PAE) und Idiopathisches Angioödem (unbekannte Ursache, IAE). Bradykinin spielt eine Schlüsselrolle bei den meisten nicht-allergischen AÖ (Bas et al., 2009).

Forms of non-allergic Angioedema				
IAE	PAE	RAE	HAE	AAE
Inducers				
largely unknown (chronic urticaria)	Drugs NSAR	Drugs ACEI, AT-1-blockers	Inheritance C1 INH deficiency	Acquired Lymphoma
Mediators				
Unknown	Cysteinyl-leukotrienes	Bradykinin	Bradykinin	Bradykinin
Drug Treatment				
Corticosteroids Epinephrin (inhaled)	Corticosteroids Epinephrin (inhaled)	Current options: C1-INH, Epinephrin (inhaled), Corticosteroids New drugs: Icatibant, Ecallantide, rhC1-INH		

Abb. 1: Formen des Angioödems (Abb. zit. aus Bas et al., 2007)

2.1.3 Epidemiologie des AÖ

2.1.3.1 Hereditäres Angioödem (HAE)

Die Prävalenz des hereditären AÖ kann nicht exakt festgestellt werden infolge der vermutlich großen Anzahl unbekannter oder fehldiagnostizierter Fälle (Kreuz et. al., 2009). Bei Menschen mit HAE führt der heterozygote C1-INH-Mangel zu einer autosomal-dominanten Vererbung mit einer geschätzten Inzidenz von 1:50000, wobei es keine Unterschiede gibt - die ethnischen Gruppierungen oder das Geschlecht betreffend (Bas et al., 2007).

Die meisten der leidenden Patienten (ca. 85%) zeigen einen quantitativen Defekt (HAE Typ I) infolge reduzierter Synthese des C1-INH mit der daraus resultierenden Reduktion der C1-INH-Aktivität und des C1-INH-Antigen-Levels (Kreuz et. al., 2009). Eine Sonderform stellt das HAE Typ III dar. Hier ist die C1-INH-Aktivität und -Konzentration normal. Ursächlich liegt hier ein genetischer Defekt des Faktor 12 (Hageman-Faktor) vor, wodurch der hemmende Effekt auf die Bradykininbildung vermindert ist (Bas et al., 2010a).

48 – 50% der HAE-Patienten sind von einer oder mehreren Episoden des laryngealen Ödems im Verlauf ihres Lebens betroffen (Kreuz et. al., 2009).

Das hereditäre Angioödem (HAE) wurde lange Zeit als Krankheit des Erwachsenenalters angesehen. Jedoch haben Longitudinalstudien über mehr als 20 Jahre an mehr als 340 Patienten aus 120 Familien dokumentiert, dass fast 40% aller Patienten ihre erste Attacke vor dem 5. und 75% vor dem 15. Lebensjahr durchmachen. Die frühesten Manifestationen wurden sogar im Säuglingsalter beschrieben.

Dagegen kommen nur 35% aller Diagnosen während der Kindheit zustande. Zwei Drittel der kindlichen Patienten erleben subkutane Schwellungen an den Gliedmaßen und im Gesicht, 50-75% der Patienten leiden an gastrointestinalen Symptomen und etwa 10-25% potentiell lebensbedrohliche Kehlkopfödeme können vorkommen (Ramakers, Niehues 2009).

2.1.3.2 Erworbenes Angioödem (AAE)

Während der hereditäre C1-INH-Mangel (HAE) schon als seltene Erkrankung betrachtet worden ist, wird der erworbene C1-INH-Mangel (AAE) noch seltener entdeckt. In einer untersuchten größeren Patientenpopulation mit C1-INH-Mangel belief sich der Anteil von AAE auf ungefähr 4 % (Kreuz et. al., 2009).

2.1.3.3 RAAS-Blocker-induziertes Angioödem

2.1.3.3.1 ACEI AÖ

Obwohl die Behandlung mit ACEI in der Regel gut toleriert wird, hat sie bekannte UAW. Die häufigste Nebenwirkung ist Husten (88,2%), gefolgt von symptomatischer Hypotension (4,1 %), AÖ oder Anaphylaxis (1,3 %), und Dysfunktion der Nieren (1%) (Bas et al., 2010b).

Die durch ACEI induzierte Inzidenz des RAE wurde innerhalb einer großen Bandbreite veranschlagt und ist wahrscheinlich Folge von Rassenunterschieden. Z. B. wird bei weißen Kaukasiern die Häufigkeit des ACEI-vermittelten Angioödems mit einer Bandbreite zwischen 0,1% und 0,7% angegeben, während die schwarzen Menschen eine viel größere Empfänglichkeit zeigen. Tatsächlich fand eine kürzliche Meta-Analyse, die die Nebenwirkungen von Medikamenten untersuchte, die in der kardiovaskulären Medizin eingesetzt werden, ein relatives Risiko von 3.0 für die Entwicklung eines ACEI-induzierten Angioödems bei Schwarzen, verglichen mit Weißen (Gainer et al., 1996). Basierend auf geschätzten 6,5 Millionen Verwendern von ACEIs in Deutschland und bei einer durchschnittlichen Frequenz des

Angioödem von 0,3% kann das Auftreten von näherungsweise 20000 Fällen eines ACEI-induzierten Angioödems erwartet werden. Da die kalkulierte Inzidenz an 1:4000 herankommt, demonstriert sie so, dass ACEI-induzierte Angioödeme, die die Mehrzahl der RAEs repräsentieren, viel häufiger zu sein scheinen als HAE (Bas et al., 2007).

Bei etwa 20% (ca. 7000) dieser Patienten entwickelt sich ein schwerwiegendes Angioödem, das einen stationären Aufenthalt nötig macht. Bei wiederum etwa 20% dieser Fälle entwickelt sich nach Beobachtungen einer Studie ein lebensbedrohliches Angioödem der oberen Atem-Schluck-Straße, mit der Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Betreuung (zum Teil mit Intubation und/oder Tracheotomie) (Bas et al., 2010a).

Wird bei der Vasodilatation durch ACEI durch ein Kombinationspräparat ACE- und NEP-Hemmer über das Ziel hinausgeschossen, zeigen sich mehr Angioödeme, das ist die Kehrseite der Medaille: Kombinierte Inhibitoren der neutralen Endopeptidase und des ACE wie Omapatrilat zeigen eine Zunahme um das vierfache bei Angioödemem verglichen mit dem ACEI Enalapril (Bas et al., 2007; Aktories et. al. 2009).

2.1.3.3.2 AT-1-Blocker-AÖ

Interessanterweise scheinen auch AT-1-Blocker RAE zu induzieren, aber mit einer geringeren Häufigkeit als ACEIs und diese Einschätzung konnte durch große klinische Studien abgesichert werden (Bas et al., 2007).

2.1.3.4 Pseudoallergisches Angioödem (PAE)

Für die Epidemiologie desjenigen Angioödems, das durch pseudoallergische Reaktionen auf Medikamente verursacht wird, gibt es keine Daten (Bas et al., 2007).

2.1.4 Lokalisationen des Angioödems

Angioödeme treten vorrangig auf an Augenlidern, Lippen, Zunge, oraler und pharyngaler Mukosa und der Genitalregion (Hartmann 2009), können prinzipiell aber an jeder Lokalisation des Körpers auftreten. Obwohl Ödeme in der Gesichtsregion für ein deformiertes Erscheinungsbild sorgen, verursachen sie normalerweise keine Probleme (Hoffmann et al., 2009). Da im Gegensatz zu HAE-Angioödemem ACEI-Angioödeme fasst ausschließlich an der Kopf- und Halsregion auftreten, muss eine lebensbedrohliche Gefahr infolge des Befalls der

oberen Atemwege in Betracht gezogen werden (Bas et al., 2009). Zum Thema Prädispositionsstellen finde ich in Böckers „Pathologie“ (Böcker et al., 2008) die Bezeichnung „teigige, tiefe, oft groteske Schwellungen in Regionen mit lockerem Bindegewebe (Gesichts- und Genitalhaut, Mundschleimhaut)“, Saxena spricht davon, dass sie nicht gleichmäßig am Körper verteilt sind (Saxena et al., 2010).

Für das HAE gilt: Während Hautödeme in jedem Teil des Körpers angesiedelt sein können, befällt das Ödem der mukösen Membranen am häufigsten GIT oder Larynx. Abhängig von der Lokalisation und Ausdehnung des Ödems können unterschiedliche Symptomprofile entstehen (Kreuz et al., 2009).

Seltene Manifestationen des HAE können das Palatinum, die Zunge, Muskeln, Gelenke, Nieren und Ösophagus einschließen. Das thorakale Angioödem ist noch strittig, aber es gibt Hinweise, dass einige Patienten an vorübergehender pleuritischer Symptomatik leiden. Ein Ödem der Schleimhaut-Membran der Harnblase kann Symptome eines akuten Harnwegsinfekts imitieren. Ein Angioödem des Zentralnervensystems, das sich als transiente Aphasie darstellen kann, mit Schläfrigkeit und anderen neurologischen Symptomen, ist erst kürzlich als mögliche Manifestation eines HAE akzeptiert worden (Kreuz et al., 2009).

2.1.5 Symptome des Angioödems

Angioödeme manifestieren sich als plötzlich auftretende umschriebene feste elastische Schwellungen der tiefen Dermis und der Subcutis. Als Faustregel kann gelten, dass AÖ nicht mit Juckreiz assoziiert sind, aber von Schmerz und brennenden Empfindungen begleitet werden (Hartmann 2009). Juckreiz und Quaddelbildung sind üblicherweise richtungsweisend für ein allergisches Ödem (Bas et al., 2010a). Das Hereditäre AÖ als rezidivierendes ist charakterisiert durch Hautödeme oder solche der mukösen Membranen (Kreuz et al., 2009).

2.1.5.1 Symptome der Patienten mit AA des oberen aerodigestiven Traktes (Zunge, Zungengrund, Pharynx, Larynx)

Diese umfassen Fremdkörpergefühl, undeutliche Sprache, Schwierigkeiten in der Artikulation, Schluckprobleme (Dysphagie), Schmerzen beim Schlucken (Odynophagie), möglicherweise auch trockenen Husten, Hypersalivation, Heiserkeit und Probleme beim Einatmen (inspiratorischer Stridor) (Hoffmann et al., 2009).

2.1.5.2 Symptome der Patienten mit einem HAE

Während Hautödeme in jedem Teil des Körpers angesiedelt sein können, befällt das Ödem der mukösen Membranen am häufigsten den GIT oder Larynx. Abhängig von der Lokalisation und Ausdehnung des Ödems können unterschiedliche Symptomprofile entstehen (Kreuz et al., 2009) wie Schwellungen v. a. im Gesicht u. an den Extremitäten, Kopfschmerz, Bauchschmerz, Übelkeit u. Erbrechen und Erstickungsgefahr beim Larynxödem (Pschyrembel 261. Aufl.). Die klinischen Schweregrade des hereditären Angioödems (HAE) bezüglich Lokalisation, Häufigkeit und Ausdehnung der Angioödeme zeigen uns Beweise für eine breite inter- und intraindividuelle Variabilität. Dementsprechend sind die Beschränkungen, die der Patient erlebt infolge seiner Krankheit, auch höchst variabel.

Gelegentlich können sogar Patienten, meistens Männer, praktisch sogar asymptomatisch bleiben bis weit ins hohe Alter. Es gibt jedoch viele Patienten, die die schwerwiegendsten Symptome 2- bis 3-mal pro Woche erleben. Diese Patienten repräsentieren etwa 10 – 15 % von einer untersuchten Patientenpopulation (Kreuz et al., 2009).

Abgesehen von dem krampfartigen Bauchschmerz sind die Attacken bei Kindern gewöhnlich milder und weniger häufig als bei Erwachsenen (Ramakers, Niehues 2009).

2.1.5.2.1 Kutanes Ödem

91% der Patienten mit hereditärem Angioödem leiden an einem Ödem der Haut. Häufig betroffene Körperteile sind das Gesicht, Hände, Füße, Genitalien und Hals. Weniger häufig sind ganze Gliedmaßen, Gesäß oder der Rücken betroffen. Ausschließlich periorbitale oder periorale Ödeme kommen bei HAE nur selten vor. Angioödeme der Haut können in verschiedene Körperpartien abwandern, zeitweise verschiedene Lokalisationen der Schwellungen gleichzeitig involvieren. Eine gleichzeitige oder nacheinander folgende gastrointestinale oder laryngeale Beteiligung können beobachtet werden. Ödeme der Haut entwickeln sich gewöhnlich langsam über mehrere Stunden und dauern für ca. 2 – 5 Tage an. Bei Fällen eines großen Hautödems kann auch Spannungsschmerz auftreten. Das kutane Angioödem beim HAE ist charakteristischerweise nichtjuckend und nichtrötend. Die betroffenen Hautpartien sind in Bereich der Subcutis und tieferen Hautschicht anzutreffen, im Gegensatz zur Urtikaria, bei der das Ödem die obere Hautschicht befällt (Kreuz et al., 2009).

2.1.5.2.2 Gastrointestinales Ödem

Eine Beteiligung des GIT in Form eines Bauchwandödems ist eine akute, meist höchst ernste klinische Situation, von der ca. 73% der Patienten betroffen sind. Die Symptome entsprechend denen eines Ileus oder Subileus. Die Mehrzahl der abdominalen Attacken zeigen einen schweren Verlauf mit intensivem, typischerweise kolikartigem Schmerz. Erbrechen begleitet 73% der abdominalen Attacken, Diarrhoen 41%. Volumenmangel infolge eines akuten Aszites ist häufig anzutreffen in Verbindung mit dem gastro-intestinalen Ödem und kann in bis 4% der Episoden zum Kollaps führen.

Die Diagnose des intestinalen Ödems kann durch Ultraschall abgesichert werden, welcher nämlich das Bauchwandödem und den begleitenden Aszites visualisieren kann (Kreuz et al., 2009). Die abdominalen Beschwerden (des kindlichen HAE) können sehr ausgeprägt sein und sich wie ein akutes Abdomen präsentieren und zur Durchführung einer Appendektomie führen. In solchen Fällen von häufigen abdominalen Symptomen kann eine Abdomen-Sonographie nützliche diagnostische Informationen liefern. Hierbei kann ein Ascites festgestellt werden, 80% der Ultraschallbilder zeigen Ödeme des GIT (Ramakers, Niehues 2009).

2.1.6 Marker für das AÖ

2.1.6.1 Vor der Entstehung

Viele Patienten beschreiben typische Prodromalsymptome: ein lokales Spannungsgefühl, ein Kribbeln wie auch generelle Symptome wie Durst, Müdigkeit und Gereiztheit. Gelegentlich kann, lokalisiert meistens am Oberkörper, ein nichtjuckender Hautausschlag beobachtet werden vor der Manifestation des Angioödems (Kreuz et al., 2009). Nach früheren Angioödemattacken befragt, gaben 28 Patienten einer Studie (14m, 14w.) an, daß Schwellungen des oropharyngealen Bereichs zumindest einmal bereits schon vor der Aufnahme in die Klinik aufgetreten waren. Der Zeitpunkt des Auftretens lag zum Teil mehrere Tage und Wochen, im längsten Fall sogar mehr als 10 Jahre zurück (Wahbe LJ 2005).

Mögliche Auslöser des AÖ waren bei einem Patienten einer weiteren Studie eine zwei Tage zuvor erfolgte Krampfaderverödung, bei einem Patienten eine Niereninsuffizienz, dreimal ein grippaler Effekt. In 4 Fällen blieb die auslösende Ursache unklar. Bei einem Patienten wurde durch die Krampfaderverödung vermutlich das Gerinnungs- und Fibrinolysesystem aktiviert. Bei dem niereninsuffizienten Patienten führte die zugrundeliegende, histologisch gesicherte Vaskulitis wohl zu einer Aktivierung des klassischen Komplementweges. Bei drei weiteren

Patienten wurde möglicherweise die Komplementkaskade durch einen grippalen Infekt aktiviert. Letztendlich resultierte in diesen 5 Fällen aus einer Aktivierung von Plasmaenzymen eine Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems. Bei 4 Patienten blieb, wie in den meisten in der Literatur berichteten Fällen, die Pathophysiologie der Auslösung des ACE-Hemmer-induzierten Angioödems unklar (Leuwer, Krause 1998).

2.1.6.2 Während des Angioödems

Das Angioödem tritt bei Patienten mit HAE häufig spontan auf, ohne irgendwelche erkennbaren Auslöserfaktoren. Der durchschnittliche Zeitraum zwischen Beginn und maximaler Ausdehnung des laryngealen Ödems bei Patienten mit HAE ist ca. 8 Stunden mit einer Schwankungsbreite von 3 – 48 Stunden. Deshalb sollte gewöhnlicherweise ausreichend Zeit für therapeutische Interventionen bestehen, obwohl die Behandlung nichtsdestoweniger sobald als möglich initiiert werden sollte (Kreuz et al., 2009). Bei etwa 20-30% der Kinder (mit einem HAE) ist ein nichtjuckendes generalisiertes Exanthem vor und während der Attacken beschrieben worden (Ramakers, Niehues 2009).

Bei Patienten, die sich mit einem Kehlkopfödem präsentieren, führt die intravenöse Injektion von 500-1000 Einheiten pd- C1-INH-Konzentrat zu einem rapiden Symptommrückgang. Die Zeit bis zum Einsetzen der Linderung beträgt normalerweise 20-60 Minuten (Kreuz et al., 2009).

C1-INH-Konzentrat als Akuttherapie für das laryngeale oder gastrointestinale Ödem: Als Regel kann gelten, dass die Infusion binnen 30-60 Minuten zu einer deutlichen Verbesserung der Beschwerden führt. Im Falle eines unbefriedigenden klinischen Ansprechens nach einer Stunde kann die Dosis wiederholt eingesetzt werden. Das vollständige Verschwinden aller Symptome und klinischen Erscheinungen kann bis zu 24-48 Stunden dauern (Ramakers, Niehues 2009).

Behandlung des gastrointestinalen Ödems: Die Durchschnittsdauer der Attacken ist nach der Verabreichung von pd-C1-INH-Konzentrat signifikant verkürzt, die Zeit bis zum Einsetzen der Erleichterung beträgt in einigen Fällen nur 10 Minuten (Kreuz et al., 2009).

Kurzzeitige periprozedurale Prophylaxe vor Interventionen, die Anfälle auslösen könnten bei HAE-Patienten: Im Verlauf von invasiven oder Operations-Eingriffen kann ein Angioödem auch entstehen, nicht nur in der operierten Körperregion, sondern auch in jedem anderen Körperteil einschließlich GIT und Larynx. Deshalb ist vor Intubation, chirurgischen oder invasiven Prozeduren eine Ersatztherapie mit 500-1000 Einheiten C1-INH indiziert. Dies gilt auch

für Dentalbehandlungen, da diese zu fatalen Larynxödemen führen können. Ausreichend C1-INH-Konzentrat sollte auch zur Hand sein für mögliche weitere Dosen (Kreuz et al., 2009).

2.1.6.3 Nach einer AÖ-Attacke

Wenn akute erworbene Angioödeme, durch IgE-vermittelte Allergien ausgelöst, mit intravenös applizierten Glukokortikoiden und H1-Antihistaminika behandelt werden, bilden sich die AÖ normalerweise in wenigen Minuten zurück. Da das akute AÖ oft über mehrere Tage besteht, gibt es die Erfahrung, dass nach einer kurzzeitigen Besserung nach der intravenösen Behandlung AÖ und Nesselsucht zurückkehren können. Erfahrungen zeigen, dass bei zusätzlicher oraler Gabe von Glukokortikoiden und Antihistaminika sich die Anzahl der Patienten, die sich in der Notfallambulanz wiedervorstellen – sogar mit noch ausgeprägterem AÖ – und deshalb ins Krankenhaus eingewiesen werden müssen, merklich verringert (Hartmann 2009). Die Vermeidung wohlbekannter Auslösefaktoren kann auch die Manifestationstendenz (des HAE) beeinflussen. Weiterhin kann die Therapie der begleitenden Erkrankungen die Frequenz der Episoden reduzieren.

Mit Blick auf die potentiell lebensbedrohliche Natur der Erkrankung sollten alle (HAE-) Patienten mit einem individuell geeigneten Vorrat zu Hause an C1-INH-Konzentrat ausgestattet werden oder es sollte ein jeweils sofortiger Zugang zu C1-INH-Konzentrat in Notfall-Situationen gesichert sein (Kreuz et al., 2009).

Generell erhalten Patienten mit einer Vorgeschichte schwerer lebensbedrohlicher Attacken oder Patienten, die mehr als eine Attacke pro Monat durchmachen, eine Langzeitprophylaxe. Limitierungen sind die hohen Kosten und die Notwendigkeit regelmäßiger Infusionen (Ramakers, Niehues 2009).

Von entscheidender Bedeutung ist umfassende Information und Aufklärung für die Eltern, Patienten, Hausärzte und das Krankenhaupersonal über die Erkrankung. Die Patienten sollten Notfall-Identifikations-Ausweise erhalten. Patienten mit häufigen oder schweren Attacken sollten einen Notfall-Vorrat von C1-INH-Konzentrat zuhause haben und, wenn nötig, sollten die Eltern für die Selbstbehandlung instruiert werden. Mögliche für die Patienten spezifische Auslösefaktoren sollten bei den Aktivitäten des täglichen Lebens in Betracht gezogen werden. Dadurch können unnötige invasive Prozeduren vermieden werden und potentiell lebensbedrohliche Komplikationen wie das Kehlkopfödem bewältigt werden (Ramakers, Niehues 2009).

2.1.7 Trigger für das AÖ

Nach unserem gegenwärtigen Wissensstand scheinen besonders drei Proteine eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des AÖ zu spielen: Histamin, Bradykinin und Substanz P. In der Literatur werden auch noch dem Fibrinogen, Serotonin und Prostaglandin eine Rolle hierbei zugeschrieben. Während das histaminerge AÖ v.a. mit allergischer Reaktion assoziiert ist, werden die nicht-allergischen Formen durch BK und Substanz P gefördert (Bas et al., 2009).

2.1.7.1 Triggerfaktor ACEI

Die „Nebenwirkung“ Akutes Angioödem ist charakteristisch besonders für die Gruppe der ACEI, sogar nach jahrelanger Anwendung (Hoffman et al., 2009). Es manifestiert sich nahezu ausschließlich mit Schwellungen im Kopf-Hals-Bereich (Bas et al., 2010a). ACEI können die Manifestationsschwelle für die Ödembildung herabsetzen, mutmaßlich verursacht durch die damit assoziierte erhöhte Serum-Bradykinin-Konzentration (Kreuz et al., 2009). Inhibitoren des ACE bedingen unvermeidlich sowohl eine Abnahme Angiotensin II wie auch eine Erhöhung der Bradykinin-Plasma-Level (Bas et al., 2010c).

Die molekularen Mechanismen möglicher Triggerfaktoren sind weitgehend unbekannt. Eine Ausnahme ist der Einsatz von ACEI bei HAE-Patienten, der das Plasma- und Gewebebradykinin weiter erhöht. Deshalb ist es nicht überraschend, dass HAE Patienten besonders empfindlich auf ACEI reagieren mit einer Zunahme der Attackenfrequenz. Ein ähnlicher Mechanismus steuert möglicherweise Angioödem-Attacken bei kardiovaskulären Patienten ohne HAE.

Jedoch bleiben bedeutsame Fragen, die geklärt werden müssen. Z. B., warum entwickeln nur < 1% der Patienten, die ACEIs nehmen, ein AÖ, während die Bradykinin-Level bei allen ACEI-Patienten erhöht sind? Weiterhin, was ist der Grund dafür, dass einige Patienten ein AÖ entwickeln wenige Tage nach dem Beginn der ACEI-Therapie, während andere ihre erste Attacke nach Jahren ereignisloser Behandlung haben (Bas et al., 2007)?.

Diese Beobachtungen zeigen, dass weitere Faktoren anwesend sein müssen für die Entwicklung eines Kinin-induzierten Angioödems und dass diese wenigstens eine triggernde Funktion haben müssen. Besonders im Falle des ACEI-Angioödems sind die fundamentalen Pathomechanismen bis jetzt nicht geklärt worden. Bei den Untersuchungen an unserem Institut traten AÖ im Durchschnitt 3 Jahre nach dem Beginn der medikamentösen Therapie auf, mit auch einem Patienten, der ein AÖ nach 11 Jahren Einnahme des Medikaments entwickelte

(Bas et al., 2009). Diese substanzielle Verzögerung kann betrachtet werden als ein bedeutender Grund für die Nichtidentifizierung von späteren AÖ als Medikamenten-Nebenwirkung. Die klinische Bedeutung, die in der Enthüllung des pathogenen Mechanismus bei ACEI-induzierten AÖ liegt, rührt her von der dringenden Notwendigkeit, prädiktive Marker zu identifizieren für die Entwicklung dieser potentiell lebensdrohlichen Medikamenten-Nebenwirkung (Bas et al., 2010c).

2.1.7.2 Triggerfaktor Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten

Auch Angiotensin II-Rezeptor-Antagonisten können zu ausgeprägten Angioödem-Symptomen bei HAE-Patienten führen (Kreuz et al., 2009).

2.1.7.3 Triggerfaktor AT-1-Rezeptor-Blocker

Beobachtungen und klinische Fallberichte zeigen, dass Angiotensin I-Rezeptor-Blocker (AT I-Rezeptor-Blocker = Sartane) nicht automatisch als die erste Wahl eines Ersatz-Antihypertensivums angesehen werden können. Patienten, die an einem AÖ gelitten haben und einen ACEI genommen haben, laufen Gefahr, ein Sartan-induziertes Angioödem zu entwickeln (Abb. 2). Große Fall-Kontrollstudien mit ACEIs und Sartanen haben aufgedeckt, dass auch Sartane eine nicht unbeträchtliche AÖ-Rate (0.3%) zeigen. Der exakte Mechanismus ist noch unerforscht, aber die ersten Funde liefern Hinweise auf eine mögliche Verbindung mit BK. Der Studie von Campbell und anderen zufolge verursacht auch Losartan eine Zunahme der BK-Werte. Deshalb sind noch klärende Forschungen notwendig, um den Pathomechanismus endgültig zu bestimmen (Bas et al., 2009).

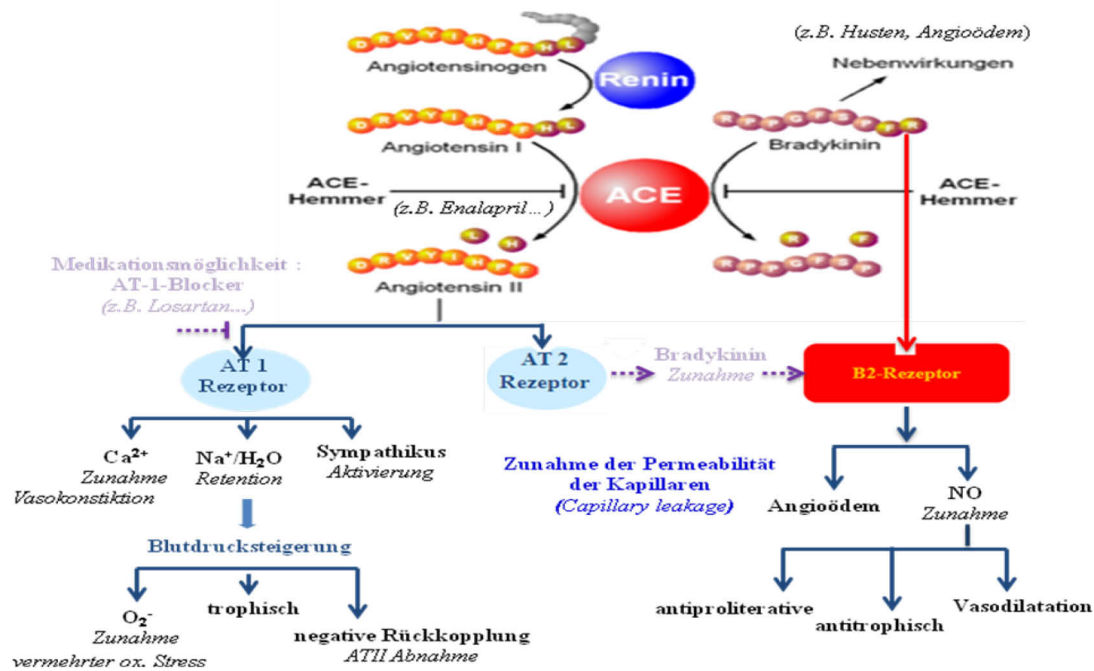


Abb. 2: Die pathophysiologischen Wirkungen des Angiotensins II sowie die Rolle von Bradykinin bei Entstehung bzw. Entwicklung des Angioödems während der ACEI-Therapie.

2.1.7.4 Triggerfaktor (andere) Medikamente und Nahrungsmittel

Auslöser sind häufig Nahrungsmittel, Nahrungszusatzstoffe oder Arzneimittel: z.B. ACE-Hemmer, β -Adrenozeptorenblocker, Acetylsalicylsäure, Histamin-freisetzende Pharmaka und der Lipasen-Inhibitor Orlistat (Mutschler et al. 2008; Aktories et al., 2009). In einem Fragebogen einer Düsseldorfer Dissertation zum Thema ACEI-Angioödem wurden Antibiotika, nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) und Omeprazol benannt, in einigen Fällen waren mehrere Medikamente (Analgetika, Antibiotika sowie Antipyretika) gleichzeitig erstmalig eingenommen worden (Wahbe 2005).

Auch der Konsum von Cannabis und Kokain ist in der Literatur beschrieben worden als Auslöser für Ödeme im HNO-Bereich (Acoceba 2010).

Andere Erkrankungen, wie z. B. das Leberzellkarzinom und die Leberzirrhose, können ebenfalls mit einer erniedrigten C1-INH-Plasmakonzentration einhergehen (Bas et al., 2010a).

2.1.7.5 Triggerfaktor für AÖ: Erkrankungen

Begleiterkrankungen wie z.B. *Helicobacter pylori*-Infektionen können auch zu erhöhten Manifestationen von (HAE-)Angioödemen führen (Kreuz et al., 2009). Patienten mit *Helicobacter pylori*-Infektionen scheinen anfälliger für die Symptome zu sein und die Ausrot-

tung kann zu einem Rückgang der Frequenz und Schwere der Attacken führen, besonders in den Eingeweiden (Ramakers, Niehues 2009). Das AAE tritt häufig auf in Verbindung mit der Bildung von Autoantikörpern gegen C1-INH, lymphoproliferativen Erkrankungen, außerdem selten mit soliden Tumoren und anderen Erkrankungen, und kann auch entstehen ohne eine nachweisbare zugrunde liegende Erkrankung. Das klinische Angioödem kann gelegentlich sogar der Diagnose der zugrunde liegenden Erkrankung viele Jahre vorausgehen (Kreuz et al., 2009).

2.1.7.6 Triggerfaktoren beim HAE

Typischerweise können Infektionen, Erschöpfung wie auch negativer und positiver emotionaler Stress zu häufigeren und schwereren Angioödemten prädisponieren (Kreuz et al., 2009). Spezielle Symptome sind Infektionen der oberen Atemwege bei Kindern mit HAE (Ramakers, Niehues 2009). Es ist auch aus dem klinischen Alltag bekannt, dass schwere körperliche Arbeit, Traumata, Operationen wie z. B. zahnärztliche Prozeduren, Infektionen und sogar einige endoskopische Untersuchungen (ÖGD) oder Intubation eine Angioödem-Episode provozieren können. Bei vielen Patienten sind sogar leichte mechanische Irritationen ausreichend, um eine lokale Schwellung auszulösen (Kreuz et al., 2009). In allen diesen obengenannten begleitenden Zuständen kann man eine Erhöhung von Entzündungsfaktoren beobachten. Teilweise gibt man Patienten mit einer Prädisposition fürs Angioödem, wie z.B. HAE-Patienten, prophylaktisch C1-INH-Konzentrat vor einer geplanten Operation (Bas et al., 2009).

2.1.7.7 Triggerfaktor Hormone

Bei Frauen kann die Manifestationstendenz (für AÖ) höher sein durch physiologische Hormonfluktuationen wie Ovulation, Menstruation und Schwangerschaft, wie auch die Gabe von Östrogenen, die orale Kontrazeptiva enthalten, wie auch in der Hormonersatztherapie (Kreuz et al., 2009). Mit dem Erreichen der Pubertät können Schwere und Frequenz der Attacken (eines kindlichen HAE) zunehmen; bei Mädchen kann die Menstruation Attacken auslösen (Ramakers, Niehues 2009).

In Mutschlers „Arzneimittelwirkungen“ ist gar vom bevorzugt bei jüngeren Frauen auftretenden Angioödem die Rede (Mutschler et al., 2008).

Das Hereditäre Angioödem ohne C1-INH-Mangel (HAE Typ III): Charakteristischerweise sind in den betroffenen Familien fast ausschließlich Frauen erkrankt und die Prädisposition des AÖ wird berichtet im Zusammenhang mit der Exposition von Östrogenen (Kreuz et al., 2009).

2.1.7.8 Triggerfaktoren aus Patientensicht

Von Patienten selbst mit HAE sind zahlreiche Faktoren berichtet worden, die sie als Trigger oder Induktoren eines AÖ wahrgenommen haben. Diese umfassen Kälteexposition, mechanisches Trauma, Gewebekompression, langes Sitzen oder Stehen, einige Nahrungsmittel (z.B. Eier), Infektionen, Begleiterkrankungen, Kontakt mit Pestiziden oder Chemikalien - entweder direkt oder via neuer Produkte oder Kleidungsstücke - Aufregung/Stress und einige Medikamente wie z. B. ACEI und Östrogene. Diese anekdotischen Berichte sind jedoch niemals systematisch erforscht worden und scheinen von den individuellen Charakterisierungen der Patienten abhängig zu sein (Bas et al., 2007).

2.1.7.9 Triggerfaktor Endotoxin via Bradykininbildung bei der Sepsis

Eine pathophysiologische Substanz, die geeignet ist, Kontaktaktivierung in vivo zu initiieren, ist Endotoxin und es gibt gute Gründe, anzunehmen, dass die Kontaktaktivations-Kaskade beim septischen Schock aktiviert wird und dass die beobachteten Symptome teilweise infolge der Bildung von Bradykinin zustande kommen. Das Pooling von Flüssigkeit ausserhalb des Vaskularbaums und die dazugehörige Hypotension sind Beispiele für Abnormitäten, die mit dem septischen Schock assoziiert sind und die typischerweise den Zytokinen zugerechnet werden, aber auch von der Generierung von Bradykinin abhängig sein können (Kaplan 2009).

2.1.7.10 Bradykinin und das CRP als Triggerfaktor

Die Rolle von Akute-Phase-Proteinen, besonders CRP, sowie der Bradykininwirkungen als mögliche Triggerfaktoren für das AÖ ist in der Einleitung (S. 2f) bereits im Detail besprochen worden. Weitere Details und Schlussfolgerungen zu diesem Thema werden in der Schlußdiskussion (S. 108ff) im Einzelnen zur Sprache kommen.

2.1.8 Diagnostik des Angioödems

Die Unterscheidung des bradykinininduzierten Angioödems vom allergischen Angioödem ist ausschlaggebend für eine erfolgreiche Behandlung. Gegenwärtig gibt es keinen veröffentlichten Algorithmus für die Diagnose und Therapie dieser Erkrankung (Bas, Hoffmann, Kojda 2009, Vorwort G. Kojda).

2.1.8.1 Diagnose des Akuten Angioödems des oberen Aerodigestivtrakts

Zunächst sind differentiadiagnostisch weitere Untersuchungen notwendig, um andere Gründe wie Fremdkörper, Tumor oder Entzündung auszuschließen (Hoffmann et al., 2009).

Vorsichtsmaßnahmen/Sorgfaltspflichten beim weiteren diagnostischen Vorgehen: Der Mundraum kann inspiziert werden durch eine Lichtquelle und einen Zungenspatel. Larynx und Pharynx sollten von einem HNO-Spezialisten untersucht werden. Ausgedehnte Manipulationen in dieser Region sollen vermieden werden, um mögliche Verschlimmerungen des AA zu vermeiden. Man sollte die atraumatische flexible Endoskopie mit transnasalem Zugang vorziehen. Nachteile sind die hohen Kosten des optischen Geräts und die Notwendigkeit für ein spezielles Training hierfür. Wenn der Verdacht des Vorliegens eines akuten Angioödems fortbesteht, sollte die Untersuchung nur fortgesetzt werden, wenn die Möglichkeiten zur Intubation und Tracheotomie in erreichbarer Nähe sind. Zusätzlich ist als weitere Behandlung eine Überwachungs-, Intensivstation oder sogar eine im Operationssaal mit Sauerstoff, EKG und Blutdruck-Überwachung angezeigt (Hoffmann et al., 2009).

2.1.8.2 Diagnose-Schwerpunkte AA

Für die Diagnose des akuten AÖ muss ein Schwerpunkt gesetzt werden auf die Fallgeschichte und spezifische Laborwerte, die auf diese Geschichte Bezug nehmen, z.B. Allergie-Tests für AÖ nach Nahrungsmittelverzehr oder Entzündungsparameter bei einer infektiösen Genese (Hartmann 2009).

2.1.8.3 Diagnose-Schwerpunkte bei chronischen AÖ

Bei chronischem AÖ ist eine umfangreiche systematische Diagnostik mit detaillierter Fallgeschichte, Differential-BB, BSG, CRP, Anti-Streptolysin-Titern, Helicobacter-Serologie,

autologem Serum-Test, antinuklearen Antikörpern, Schilddrüsen-Antikörpern und einer dreiwöchigen Ausschluss-Diät angezeigt (Hartmann 2009). Sogar heute noch werden viele Patienten mit einem hereditären Angioödem (HAE) an der ersten Anlaufstelle nicht korrekt diagnostiziert (Bas, Hoffmann, Kojda 2009, Vorwort G. Kojda). Bei klinisch verdächtigen Fällen beruht die Diagnose auf der Bestimmung der C1-INH-Konzentration und Funktion im Plasma und der Messung der C4-Konzentration (Abb. 3). Der normale Bereich des C1-INH für Erwachsene ist im Alter von drei Monaten fast erreicht. In Nabelschnurblut beläuft sich die C1-INH-Funktion auf ca. 70% des normalen Erwachsenen-Wertes. Die Werte für C4 in der Kindheit scheinen größeren Fluktuationen unterworfen zu sein, so dass ihr diagnostischer Wert zweifelhaft ist. Bei Abwesenheit einer Familienanamnese ist die Diagnose (des kindlichen HAE) oft verzögert, manchmal bis zur 2. oder 3. Dekade (Ramakers, Niehues 2009).

	Laborparameter	Monovetten
<i>Akutes Angioödem</i>	Elektrolyte	Serum
	Leberwerte	
	CRP	
	TSH	
	ACE-Serumaktivität	Serum
	Quick, aPTT, INR, Fibrinogen, C1-Inhibitor-Aktivität	Citrat
	Kleines Blutbild	EDTA
	Allergiediagnostik: Tryptase, ggf. spez. IgE	Serum
<i>Angioödem-Diagnostik nach Abklingen des Ödems</i>	Elektrolyte	Serum
	Leberwerte	
	(falls nicht vorher abgenommen)	
	CRP	
	ACE-Serumaktivität	Serum
	C1-Inhibitor-Antigen	Zitrat
	C1-Inhibitor-Aktivität, Faktor-12-Aktivität	
	Kleines Blutbild, Differentialblutbild	EDTA
	Rheumadiagnostik: ANA, ANCA, ENA: (SSB-AK, SSA-AK, SLL-70-AK, anti-Zentromer)	Serum
	C1q, C4	Serum
	Allergiediagnostik: Tryptase, ggf. spez. IgE	Serum
	Schilddrüsenwerte: T3, T4, TSH, Schilddrüsen-Autoantikörper	Serum
	Bei Bedarf genetische Analyse (HAE Typ III)	EDTA
	ACE = Angiotensin Converting Enzym; ANA = antinukleärer Antikörper; ANCA = antineutrophile zytoplasmatische Antikörper; aPTT = aktivierte partielle Thrombolastinzeit; CRP = C-reaktives Protein; ENA= extractable nuclear antigen; HAE= hereditäres Angioödem; TSH = thyroidstimulierendes Hormon	

Abb. 3: Aktuelle Laboruntersuchungsempfehlungen (Abb. zit. aus Bas et al., 2010a).

2.1.9 Differentialdiagnosen des Angioödems

Einer der wichtigsten Schritte bei der Diagnostik des Angioödems besteht darin, das allergische vom nicht-allergischen zu unterscheiden (Abb. 4) und von anderen Pathologien wie Infektionen, Entzündungen, Tumoren und Erkrankungen der Glandulae salivariae majores.

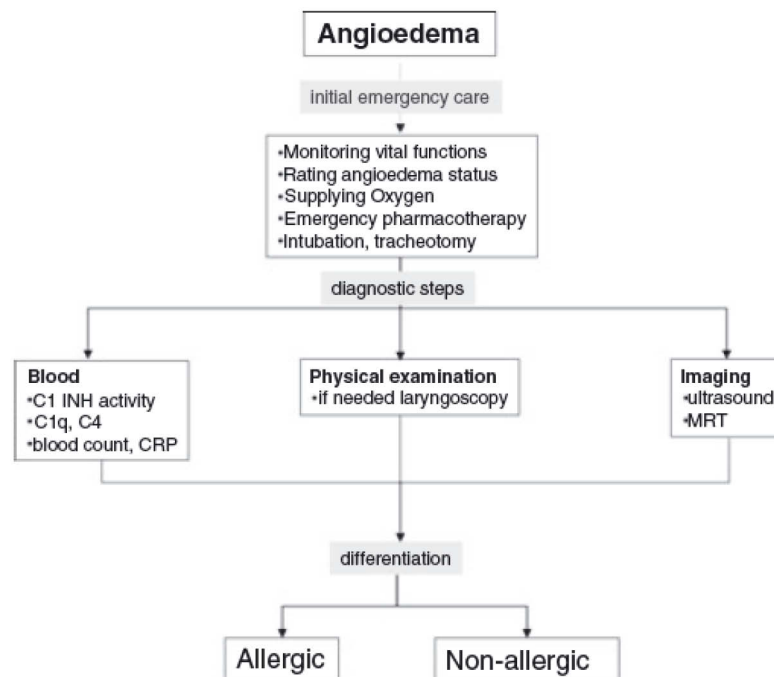


Abb. 4: Algorithmen für Diagnose vom Angioödem (Abb. zit. aus Bas et al. 2007)

Weiterhin sollten seltene Gegebenheiten wie Morbus Crohn des Mundes oder der Lippen, Fazialzellulitis und das Vena-cava-superior-Syndrom ausgeschlossen werden (Bas et al., 2007). Einige Beispiele für Differentialdiagnosen (des kindlichen HAE) sind Urtikaria, Insektenstiche, Pseudokrupp, Aspiration, Gastroenteritis, Appendizitis und Invagination (Ramakers, Niehues 2009). Weitere mögliche Differentialdiagnosen eines Angioödems sind Ligatur der Vena jugularis interna, Abnahme des osmotischen Drucks im Plasma aufgrund einer Niereninsuffizienz, Obstruktion des Lymphabflusses nach Ligatur des Ductus thoracicus und Zunahme der Kapillarpermeabilität von Proteinen, wie sie bei Diabetes und Lupus E. vorkommt. Weiterhin sollten die Patienten untersucht werden auf Epiglottitis, Hypothyreodismus mit Myxödem-Infiltration und granulomatöser Infiltration bei Sarkoidose und Melkersson-Rosenthal-Syndrom (Alcoceba 2010).

Andere zum Teil sehr seltene Ursachen einer Schleimhautschwellung sollten immer mit in Erwägung gezogen werden, wie z.B. rheumatische Erkrankungen (Kollagenosen, Vaskulitiden), Tumoren im Kopf-Hals-Bereich, Speicheldrüsenprozesse (Steine, Zysten), Entzündungen der Zähne und des Unterkiefers, Gesichtspflekmone und Abszesse, Folgen einer onkologischen Strahlentherapie.

Sehr selten können auch Folgen einer Essstörung (Bulimie) zu anhaltenden Schwellungen der Ohrspeicheldrüsen führen, die gelegentlich als Angioödeme der Wangen missgedeutet werden können.

Hierbei kommt es wahrscheinlich durch wiederholtes Erbrechen zu einer metabolischen Störung mit beidseitiger Schwellung der Ohrspeicheldrüsen.

In die Routinediagnostik eines Angioödems sollte auch die Prüfung der Rheumawerte erfolgen, da nicht selten chronisch rezidivierende Ödeme im Gesichtsbereich im Rahmen von Kollagenosen (z.B. Sjögren-Syndrom) und Vaskulitiden vorkommen können (Bas et al., 2010a).

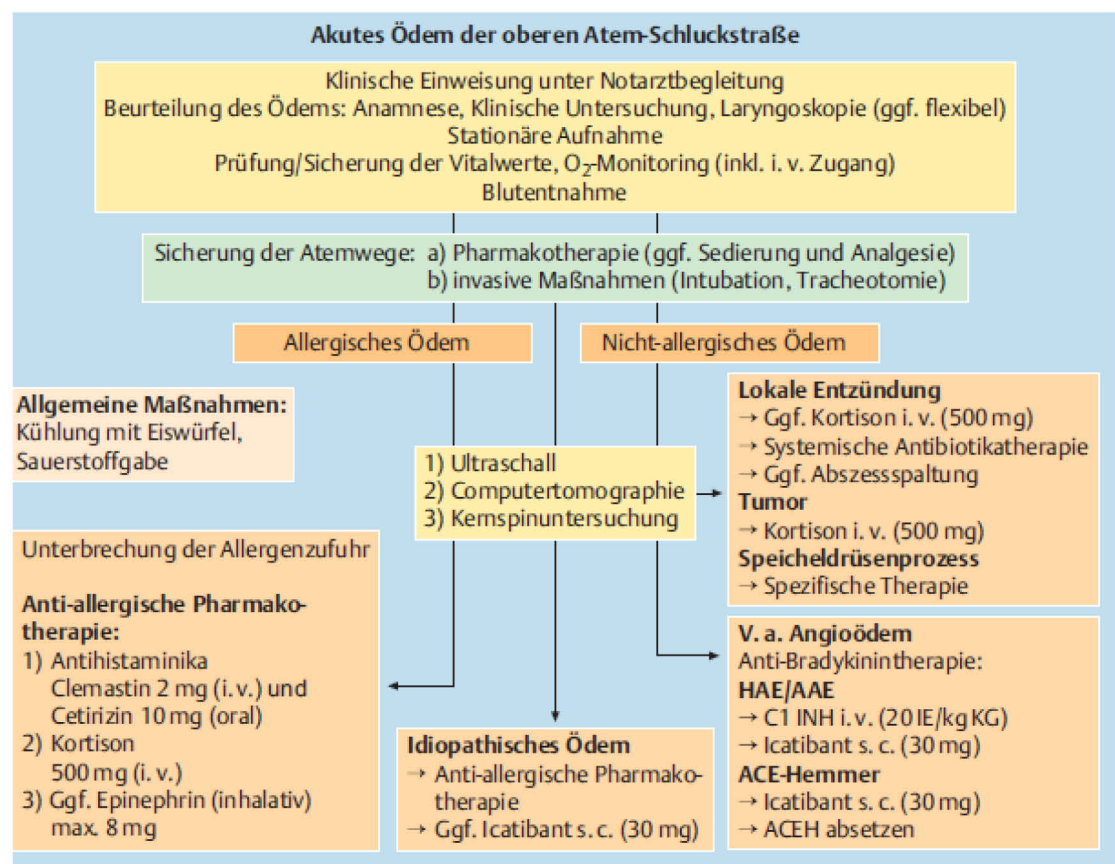


Abb. 5: Überblick über die diagnostischen/differentialdiagnostischen Behandlungsoptionen (Abb. zit. aus Bas et al., 2010a)

2.1.10 Therapie des Angioödems

2.1.10.1 Allgemeine Leitlinien

Da viele der erworbenen AÖ in Kombination mit Urtikaria auftreten, sind die Therapieempfehlungen vergleichbar mit den Leitlinien für die Behandlung der spontanen Urtikaria (Hartmann 2009). Wenn der Auslöser des AA identifiziert werden kann (z.B. Medikament oder Nahrungsmittel), muss dies abgesetzt werden oder ersetzt durch ein alternatives Agens. Für den häufigen Fall eines AA unbekannter Genese muß man eine Breitspektrumtherapie anwenden.

Akute Angioödeme sollten zunächst intravenös mit Glukokortikoiden und H1-Antihistaminika behandelt werden, wonach sie sich normalerweise in wenigen Minuten zurückbilden. Es sollte angemerkt werden, dass intravenös applizierte Antihistaminika langsam injiziert werden sollten. Antihistaminika gehören zur Standardtherapie für chronische histaminerge Schleimhautschwellungen, die durch Allergien verursacht werden. Die Anwendung von Antihistaminika für akute, nicht-urtikarielle Mukosaschwellungen ist in klinischen Studien jedoch nicht ausreichend belegt (Hoffmann et al., 2009). In schwerwiegenden Fällen mit akutem Atemnotsyndrom und einer Anaphylaxie ist außerdem die Gabe von Norepinephrin (Noradrenalin) notwendig.

Da das akute AÖ oft über mehrere Tage besteht, gibt es die Erfahrung, dass nach einer kurzzeitigen Besserung nach der intravenösen Behandlung AÖ und Nesselsucht zurückkehren können. Demzufolge kann die zusätzliche Gabe von oralen Glukokortikoiden notwendig sein, weil bei zusätzlicher oraler Gabe von Glukokortikoiden und Antihistaminika sich die Anzahl der Patienten merklich verringert, die sich in der Notfallambulanz wiedervorstellen – sogar mit noch ausgeprägterem AÖ – und deshalb ins Krankenhaus eingewiesen werden müssen. In Fällen von Nicht-Ansprechen oder nur geringfügigem Ansprechen sollte zuerst das Antihistaminikum gewechselt werden. In Fällen, in denen der Wechsel des Antihistaminikums nicht erfolgreich war, ist der nächste Schritt, der von Urtikaria-Spezialisten empfohlen wird, die Dosis auf das 3- bis 4-fache heraufzusetzen, obwohl die offizielle Zulassung hierfür bisher fehlt (off-label-use). Mögliche Nebenwirkungen sind, dass bei Dosissteigerung selbst bei modernen Substanzen von einem zunehmenden Sedationseffekt auszugehen ist wie auch von einer Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeit und der Akkumulation von Cytochrom-P450-verstoffwechselten Abbauprodukten (Kreuz et al., 2009).

Falls möglich, sollten in Fällen von **chronischen Angioödem** Glukokortikoide vermieden werden. Meistens bieten sie nur kurzzeitige Linderung, müssen dann erneut verabreicht wer-

den, möglicherweise in höheren Dosen und führen zu zunehmenden Nebenwirkungen. Ausnahmen sind akute Verschlimmerungen, z.B. begleitet von Zungen- oder Pharynxschwellungen. Die Behandlung in solchen Fällen sollte die gleiche sein wie für akute AÖ: zuerst hohe Dosen für 2 bis 3 Tage und dann schrittweise Reduktion für 5 bis 10 Tage.

Cyclosporin A in Kombination mit Antihistaminika ist als Alternative zu empfehlen für die Langzeitbehandlung eines schwer betroffenen Patienten. Besonders Patienten mit einer Autoimmunpathogenese und einem positiven autologen Serumtest können von Cyclosporin A profitieren. Jedoch sind die Nebenwirkungen nicht unbeträchtlich. Deshalb sollten Blutdruck- und Nierenwerte regelmäßig überwacht werden. Dapson und Hydroxychloroquin eignen sich für einige Patienten mit Autoimmun-Angioödem, während zu Alternativen wie Montelukast, Doxepin, Ketotifen, Sulfasalazine, Tacrolimus, Methotrexat, Interferon, Plasmapheresis und intravenöse Immunglobuline nur individuelle Fallberichte oder unkontrollierten Studien vorliegen. (Kreuz et al., 2009).

2.1.10.2 Therapie des hereditären Angioödems

Bei der Behandlung des hereditären Angioödems können drei therapeutische Prinzipien unterschieden werden: Die Handhabung akuter Attacken, Langzeitprophylaxe und periprozedurale kurzzeitige Prophylaxe (Kreuz et al., 2009).

Therapie mit C1-INH-Konzentrat: Gegenwärtig ist in Deutschland das pasteurisierte, aus Plasma gewonnene (pd) C1-INH-Konzentrat Berinert P (CSL Bering) als die Therapieoption erster Wahl für die Behandlung von akuten Angioödem-Episoden bei Patienten mit C1-INH-Mangel zugelassen (Kreuz et al., 2009). „Offlabel“ wird es auch beim AAE angewendet (Bas et al., 2010a). Kortikosteroide und Antihistaminika sind bei Angioödem infolge C1-INH-Mangel nicht effektiv (Kreuz et al., 2009). Bei Patienten mit einer behandlungsbedürftigen AÖ-Attacke wenigstens einmal im Monat kann nach einem angemessenen Trainingsprogramm eine Selbstbehandlung zu Hause mit C1-INH-Konzentrat begonnen werden, wenn sie mental und physisch in der Lage sind, diese Behandlung auszuführen. Ziele der Therapie zu Hause sind die Reduktion von Hospitalisationsperioden und von Abwesenheit von Arbeit oder Schule. Der wichtigste Vorzug der Selbstbehandlung ist die Verkürzung der Zeit zwischen Symptombeginn und Therapiestart (Kreuz et al., 2009).

Individuelle Ersatztherapie (IRT): Bei Patienten mit einem klinisch schweren HAE und 1-3 Angioödemattacken pro Woche ist eine individuelle Ersatztherapie (IRT) mit pd-C1-INH-Konzentrat angezeigt. Dies Behandlungsregime gründet sich auf die sofortige Injektion von

pd-C1-INH-Konzentrat bei den ersten Anzeichen einer Angioödemattacke und wird als Therapie zu Hause ausgeführt. Dies führt zu einer signifikanten Reduktion der Frequenz der Attacken und einer signifikanten Verbesserung der Lebensqualität dieser Patienten (Kreuz et al., 2009).

Langzeitprophylaxe für das Hereditäre Angioödem mit Androgenen:

Patienten mit häufigen Attacken (> 1 schwere Attacke/Monat) können eine Angioödem-Prophylaxe mit attenuierten Androgenen (z. B. Danazol) und Antifibrinolytika, entsprechend den Internationalen Richtlinien, erhalten (Kreuz et al., 2009). Androgene sollten in der Kindheit mit Vorsicht eingesetzt werden und müssen engmaschig überwacht werden wegen möglicher Komplikationen in Bezug auf Wachstum und Entwicklung (Ramakers, Niehues 2009). Wenn C1-INH-Konzentrat nicht greifbar ist, sind Androgene die Substanzen zweiter Wahl. Androgene sind effektivere Substanzen für die Langzeitprophylaxe und werden nur von geringen Nebenwirkungen begleitet bei kurzzeitigem Einsatz. Deshalb sind sie den Antifibrinolytika vorzuziehen. Tranexamsäure schließlich kann gegeben werden, wenn die Verwendung von Androgenen kontraindiziert ist (Ramakers, Niehues 2009).

Der Einsatz alkylierter Androgene oder von Tranexamsäure in einigen Ländern beruht weniger auf deren überzeugender Wirksamkeit bei der Behandlung akuter Angioödeme, sondern auf der dort fehlenden Verfügbarkeit von Icatibant bzw. C1-INH (Bas et al 2010a).

Zu AAE Typ III (d.h. mit normalem Level und normaler Funktion von C1-INH) wird neuerdings ein Behandlungserfolg mit einem TNF α -Blocker beschrieben (Rottem 2010).

2.1.10.3 Neue therapeutische Ansätze

Nachdem seit über 30 Jahren klinische Erfahrung mit dem etablierten C1-INH-Konzentrat besteht aufgrund seiner Wirksamkeit bei der Linderung der Symptome des HAE, haben jetzt **zwei neue Zubereitungen des C1-INH** kürzlich die Phase 3 klinischer Studien abgeschlossen. Rhucin® ist eine rekombinante Form des humanen C1-INH, der erzeugt und geerntet wird aus der Brustmilch von Kaninchen. Cinryze®, eine Form von C1-INH-Konzentrat, die aus dem Plasma durch Nanofiltration aufgereinigt wird, hat vielversprechende Resultate in klinischen Versuchen ergeben. Cinryze® ist kürzlich zugelassen worden in den USA für die Prophylaxe gegen Angioödem-Attacken bei adoleszenten und erwachsenen Patienten mit Angioödem (Bork 2009).

Ecallantide (Kallikrein-Inhibitor DX-88), ein spezifischer, potenter, reversibler Inhibitor des Plasma-Kallikreins, hat sich als effektiv erwiesen in der Therapie akuter Schwellungs-

Attacken des HAE und ist seit Dezember 2009 in den USA zugelassen. Dieser active-site-Titrant von geringem Molekulargewicht inaktiviert Plasmakallikrein in der Weise, dass es nicht länger HK (HMWK) abbaut, um Bradykinin zu erzeugen und die Feedback-Aktivierung des Faktor XII durch Plasma-Kallikrein blockiert. Ecallantide wird durch subkutane Injektion verabreicht (Kaplan 2010).

Icatibant ist ein synthetisches Decapeptid, das seine ähnliche Struktur wie Bradykinin hat, jedoch fünf nicht-proteinogene Aminosäuren enthält [D-arginine, L-hydroxyprline, L-(2-theinyl)alanine, D-1,2,3,4-tetrahydro-3-isoquinolinecarbonyl, L-2 α ,3 β ,7 $\alpha\beta$)octa-hydro-1H-indole-2-carbonyl]. Es ist stabil und wird durch bradykininspaltende Enzyme abgebaut wie z.B. Carboxypeptidase N (oder kininase I) und Angiotensin-converting Enzyme (oder kininase II) (Bas et al., 2010b). Es bindet an den B₂-Rezeptor und blockiert Bradykinin so in seiner Funktion. Dieser Wirkstoff hat sich als effektiv erwiesen in der Behandlung akuter Schwellungsattacken und ist für diese Indikation in Europa und Brasilien zugelassen worden, nicht jedoch in den USA (Kaplan 2010).

Obwohl die ursächliche Rolle des Bradykinins bei ACEI-induziertem Angioödem bis jetzt noch nicht vollständig geklärt worden ist, gibt es eine wissenschaftliche Begründung für den Einsatz von BKR-2-Blockern beim ACEI-induzierten AÖ (Bas et al., 2010b).

2.2 Die Rolle des Bradykinins und des Kallikrein-Kinin-Systems bei der Entstehung des Angioödems

2.2.1 Hintergrund

Die Entdeckung des Kallikrein-Kinin-Systems kann zurückdatiert werden auf Arbeiten von 1909, als Abelous und Bardier in der Lage waren, den hypotensiven Effekt von Urin (mit hohem Kiningehalt) zu bestimmen. In den 1920ern und 1930ern isolierten Frey, Kraut und Werle eine hypotensive Substanz in Urin (hochmolekulares Kininogen) und fanden eine vergleichbare Substanz im Speichel, Plasma und einer Vielzahl von Geweben (Rosenkranz et al., 2009).

Aus evolutionärer Sicht zeigen Kinine außerordentlich konservierte Sequenzen und werden mit nur geringen Modifikationen in allen großen Säugetier-Klassen gefunden (Adams 2009). Das Kallikrein-Kinin-System ist definiert als eine endogene metabolische Kaskade, die verantwortlich ist für die Produktion vasoaktiver Kinine wie Bradykinin. Das Kallikrein-Kinin-System wird aktiviert durch eine Anzahl von Stimuli wie z.B. Gewebsschädigung, allergische Reaktion, virale Infektion und andere entzündliche Vorgänge. Diese Vorgänge lösen die Aktivierung einer proteolytischen Kaskade aus, deren Ergebnis die Produktion von Kininen ist. Das Kallikrein-Kinin-System ist Gegenstand intensiver Forschung und es konnte gezeigt werden, dass es eine bedeutsame Rolle sowohl bei physiologischen wie auch bei pathologischen Prozessen spielt, inklusive Bronchokonstriktion, Schmerzempfindung, Entzündung, Schmerzrezeption und Kardioprotektion und vaskulärer Permeabilität (Rosenkranz et al., 2009).

2.2.2 Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems (KKS)

Die Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems beinhalten den Faktor XII (Hageman Faktor) des Kontaktssystems, Kininogene mit hohem und niedrigem Molekulargewicht (HMWK bzw. LMWK), Kallikrein und sein Vorläufer Präkallikrein und Kinine, bestehend aus Bradykinin, Kallidin und Methionyl-Lysyl-Bradykinin (Abb. 6 und Abb. 7) (Rosenkranz et al., 2009).

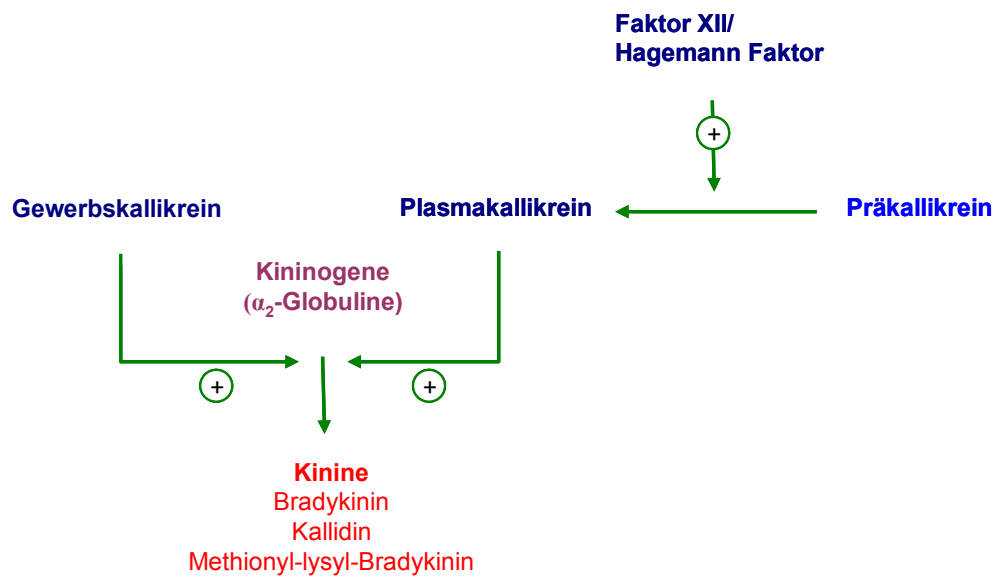


Abb. 6: Schematische Darstellung der Bildung der Kinine durch enzymatische Abspaltung.

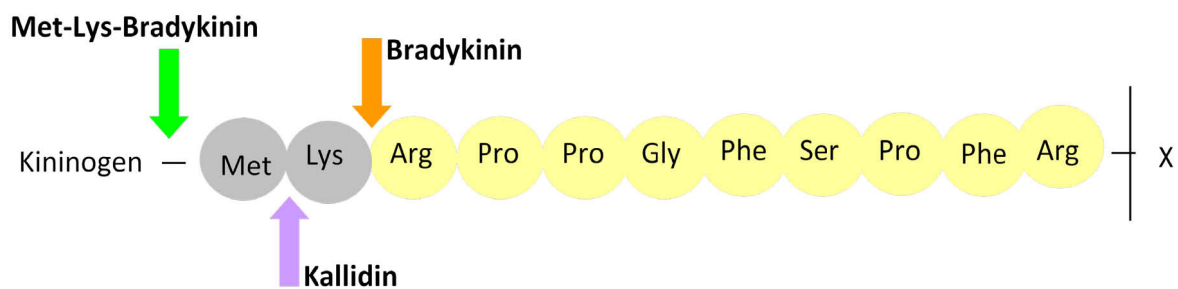


Abb. 7: Unterschiedliche Aminosäurenketten von Bradykinin, Kallidin und Methionyl-lysyl-Bradykinin nach enzymatischer Abspaltung des Kininogens durch Aminopeptidasen.

2.2.3 Lokalisation

Kinine werden typischerweise lokal freigesetzt, entweder durch Gewebe-Kallikreine, die in spezifischen Geweben exprimiert werden oder als Plasma-Kallikreine, die vor allen in den Blutgefäßen vorkommen (Adams 2009). Kinine können betrachtet werden als lokale, parakrin/autokrin wirkende Gewebeshormone, d.h., die Aktivität tritt auf an oder in unmittelbarer Nachbarschaft der Bindungsstelle der Bindung. Der Transport in den Blutgefäßen zu anderen Lokalisationen der Aktivität ist von geringer Relevanz infolge des rapiden Metabolismus durch Kininasen. In vaskulärem System sind die Enzyme auf der Endothelmembran, ACE (Kininase II), Carboxypeptidase M (Kininase I), Aminopeptidase P und die neutrale

Endopeptidase verantwortlich für die Degradation des Bradykinins. In diesem Prozess spielt ACE die entscheidende Rolle und ist für bis zu 75% des Bradykinin-Metabolismus im Plasma verantwortlich (Gohlke 2009).

Gewebe-Kallikrein (EC 3.4.21.35) ist kodiert vom Gen KLK1, welches beim Menschen auf Chromosom 19q13.2-13.4 und in der Maus auf Chromosom 7 lokalisiert ist (Adams 2009). Es wird exprimiert in verschiedenen Geweben wie Nieren, Blutgefäßen, Pankreas, Darm, Speicheldrüsen, Milz, Nebenniere und auf Neutrophilen (Bas et al., 2007).

2.2.4 Interaktion des KKS mit dem RAAS

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist von eminenter Bedeutung auf kardio-vaskulärem Gebiet (Abb. 8), da aus zahlreichen Studien bekannt ist, dass es eine Interaktion zwischen dem RAAS und KKS gibt. Die funktionale Interaktion zwischen den Systemen basiert auf der Fähigkeit des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE), von dem Vorläufer Angiotensin I Angiotensin II zu bilden, wie auch der Fähigkeit, Kinine, besonders Bradykinin, zu inaktiven Peptiden abzubauen (Adams 2009). Aus kardiovaskulärer Sicht kann das KKS gedacht werden als Antagonist der Effekte des RAAS und steht in enger Wechselbeziehung zu diesem (Bas et al., 2007).

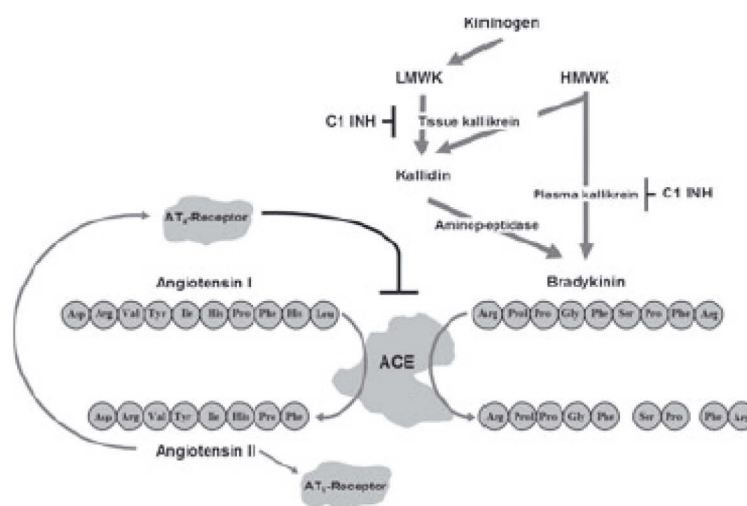


Abb 8: Schematische Darstellung der Verbindung zwischen RAAS und KKS (Abb. zit. aus Bas et al., 2007)

2.2.5 Geschichtlicher Exkurs zur funktionellen Bedeutung des RAAS aus evolutionärer Sicht

Brilla, CG: Pathogenetische Bedeutung des Mineralokortikoids Aldosteron beim Bluthochdruck; Entwicklung und Wandel zum kardiovaskulären Risikofaktor

„Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist eines der ältesten »Recyclingsysteme« der Natur. Es entwickelte sich im Zeitalter des Perms vor 280 Mio. Jahren, als es während der Evolution, mit dem Übergang von Amphibien zu Landtieren, notwendig wurde, Salz und Wasser zu konservieren. Dies war von existenzieller Bedeutung, wenn der Zugang zu Salz und Wasser eingeschränkt war. Das RAAS entwickelte sich zum bedeutendsten Kompensationsmechanismus für die Wasser- und Salzkonservierung, im Wesentlichen vermittelt durch das mineralokortikoide Hormon Aldosteron, das damit das eigentliche Effektorhormon dieses alten biochemischen Systems darstellt. Das RAAS wird immer dann aktiviert, wenn die renale Perfusion z.B. durch Volumenmangel eingeschränkt ist. Das Schlüsselenzym des RAAS, Renin, wird vom juxtaglomerulären Apparat der Nieren synthetisiert und an den Kreislauf abgegeben. Die juxtaglomerulären Zellen der Niere können jedoch nicht unterscheiden, warum der renale Perfusionsdruck abgenommen hat, sondern reagieren in allen Fällen in uniformer Weise.

Eine Aktivierung des RAAS erfolgt deshalb ebenso bei verschiedenen pathophysiologischen Zuständen, die mit einer renalen Minderperfusion einhergehen, jedoch nichts mit Volumen- oder Salzverlust zu tun haben. Bei Patienten mit hämodynamisch signifikanter Nierenarterienstenose kommt es z.B. zu einer Aktivierung des RAAS, obwohl weder Wasser- noch Salzhaushalt eingeschränkt sind. Die Folgen sind eine RAAS-bedingt zunehmende Wasser- und Salzüberladung des Körpers mit der Entwicklung eines exzessiven Hochdrucks.

Bei Auftreten einer Herzinsuffizienz, die über ein herabgesetztes Herzminutenvolumen die renale Perfusion beeinträchtigt, kommt es ebenfalls zu einer Stimulation des RAAS mit zunehmender Volumenretention, obwohl das funktionseingeschränkte Herz schon primär nicht in der Lage ist, das angebotene Blutvolumen mit einem adäquaten Schlagvolumen zu bewältigen. Diese ungewollte intravaskuläre Volumenexpansion einhergehend mit einem Anstieg des systemischen Gefäßwiderstandes hat für das funktionsgestörte Herz mit seinen vergrößerten Herzsäumen deletäre Folgen. Ein während der Evolution entwickeltes hochpotentes, den Volumen- und Salzhaushalt regulierendes System hat sich somit gegen die Erfordernisse des Gesamtorganismus gewendet. Damit ist das mineralokortikoide Hormon Aldosteron wie das

vasokonstriktorisches Oktapeptid Angiotensin II zu einem kardiovaskulären Risikofaktor geworden. Dies wurde eindrucksvoll an einer Studie mit Patienten mit schwerer chronischer Herzinsuffizienz belegt, in der Verstorbene im Vergleich zu Überlebenden signifikant höhere Plasmaaldosteronspiegel aufwiesen“ (Rosenthal, Koch 2004).

2.2.6 Medikamentöse Beeinflussungsmöglichkeiten des Kallikrein-Kinin-Systems

Medikamente, die auf das Kallikrein-Kinin-System Wirkung ausüben, können dies entweder, indem sie auf die Produktion oder den Metabolismus von Bradykinin wirken, oder indem sie Auswirkungen haben auf die Bindung von Bradykinin an den Bradykinin-Typ II-Rezeptor (Rosenkranz et al., 2009).

Inhibition der Bradykinin-Produktion: Aprotinin und DX-88/Ecallantide® inhibieren die Produktion von Bradykinin, indem Sie als Kallikrein-Antagonisten fungieren.

Blockierung des Bradykinin-Metabolismus: Im Gegensatz dazu vermehren ACEI die Bradykinin-Konzentrationen, indem sie seinen Metabolismus blockieren.

Blockierung der Bradykinin/ Bradykinin-Typ II- Rezeptor-Bindungsmöglichkeit:

Schließlich findet Icatibant, ein potenter, selektiver und spezifischer Bradykinin-Typ II- Rezeptor-Antagonist, eine Verwendung bei der Behandlung des Bradykinin-vermittelten Hereditären Angioödems, indem es die pathophysiologischen Wirkungen blockiert, die von der Erhöhung der Bradykinin-Level bei diesen Patienten herrühren (Rosenkranz et al., 2009).

2.2.6.1 Antagonisten des Kallikrein-Kinin-Systems

Dies sind Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)-Inhibitoren, Kallikrein-Inhibitoren, Aprotinin und DX-88 (Ecallantide) und der BK2-Rezeptor-Antagonist Icatibant (Firazyr®) (Rosenkranz et al., 2009).

Aprotinin ist ein Serpin aus 58 Aminosäuren, isoliert aus Rinderlungen, welches einige Mediatoren der Entzündungsantwort, Fibrinolyse und Trombinbildung inhibiert. Während Aprotinin eine besonders hohe Affinität zu Kallikrein aufweist, ist die Inhibition von Plasmin und anderen Faktoren der Koagulation wahrscheinlich verantwortlich für seine Effektivität bei der Verhinderung von exzessiven Blutungen. Deshalb ist Aprotinin angebracht für den prophylaktischen Gebrauch, um präoperative Blutverluste und die Notwendigkeit von Bluttransfusionen zu reduzieren bei Patienten mit Herz-Lungen-Maschine im Verlauf von Koro-

nararterien-Bypass-Transplantations-Chirurgie (CABG). Aprotinin-Verabreichung ist mit einigen schwerwiegenden Risiken verbunden, und zwar fatale anaphylaktische/anaphylaktoide Reaktionen und Nierenversagen. Oktober 2007 wurde die BART-Studie gestoppt (BART-Studie 2007). Es sollte die Wirksamkeit und Sicherheit von Aprotinin, Aminocaprinsäure und Tranexamsäure an ca. 3000 Hochrisiko-Patienten, die einer Herz-Operation unterzogen wurden, verglichen werden. Abgebrochen wurde sie, nachdem eine vorläufige Analyse einen Trend in Richtung einer Zunahme der 30-Tage-Sterblichkeit, unabhängig von der Ursache, assoziiert mit Aprotinin, nahelegte (Rosenkranz et al., 2009).

Kallikrein-Inhibitor DX-88 (Ecallantide®) ist ein rekombinantes Peptid aus 60 Aminosäuren, basierend auf der ersten Kunitz-Domäne des humanen lipoproteinassoziierten Koagulations-Inhibitors, der die reaktive Bindungsstelle des Aprotinins repräsentiert. In drei klinischen Phase- 2-Studien (EDEMA 0, EDEMA1 und EDEMA2) wurden alle Typen von Anfällen des hereditären Angioödems erfolgreich behandelt, entweder durch intravenöse oder subkutane Verabreichung von DX-88. DX-88 hat 2 klinische Studien der Phase 3 vollendet (EDEMA3 und EDEMA4), die gezeigt haben, dass DX-88 einer Placebo-Behandlung überlegen ist. Obwohl DX-88 soweit erfolgversprechende Resultate bei der Behandlung von HAE-Anfällen gezeigt haben, haben Berichte von ernsten medikamentenbezogenen Nebenwirkungen Bedenken über die Sicherheit und Verträglichkeit aufkommen lassen (Rosenkranz et al., 2009).

Icatibant ist ein synthetisches Dekapeptid mit einer ähnlichen Struktur wie Bradykinin. Es enthält 5 nicht-proteinogene Aminosäuren, die das Präparat stabilisieren, da sie ihm Resistenz verleihen gegen Degradierung durch zwei bradykininspaltende Haupt-Enzyme, Carboxypeptidase und ACE. Es ist ein selektiver und spezifischer Antagonist der BKR-2, der nicht mit BKR-1 interagiert oder mit Rezeptoren anderer Peptide (z.B. Angiotensin II, Substanz P und Neurokinin A).

Mehrfach gesicherte Evidenzen belegen, dass Bradykinin der Schlüsselmediator für die HAE-assoziierte Vasodilatation und erhöhte vaskuläre Permeabilität ist. Erhöhte vaskuläre Permeabilität nämlich, die charakteristisch ist für C1-INH-Knockout-Mäuse, kann durch Icatibant umgekehrt werden. Darüber hinaus ist Icatibant in der Lage, die Bradykinin-induzierte Vasodilatation bei Menschen zu inhibieren. Demzufolge repräsentiert die Blockierung der BKR-2 auf Endothelzellen einen logischen Ansatz bei der Behandlung des HAE. Icatibant wurde in Phase 2- und Phase 3-Studien für die Behandlung von akuten Anfällen des HAE (Typ I und Typ II) bewertet, wo es sich als sicher und effektiv erwies (Rosenkranz et al., 2009).

Zurzeit ist Icatibant in der EU zur symptomatischen Behandlung von HAE-Angioödem bei Erwachsenen zugelassen. Seit der Marktzulassung wurden „offlabel“ auch einzelne Patienten (n = 12) mit einem ACE-Hemmer-induzierten Angioödem behandelt. Icatibant führte hier schnell (durchschnittlich < 1 Stunde) zu einer raschen Symptomverbesserung. Vor allem bei der Therapie des RAE ist durch die Einführung des synthetischen Bradykinin-Antagonisten Icatibant erstmals eine spezifische Pharmakotherapie verfügbar, deren Stellenwert jedoch in klinischen Studien noch belegt werden muss (Bas et al., 2010a).

2.3 Bradykinin

Bradykinin, das Endprodukt der Plasma-Kallikrein-Kinin-Kaskade (Abb. 9), (Rosenkranz et al., 2009), ein potenter Vasodilatator, inhibiert das Wachstum von glatten Muskelzellen und nimmt teil an antithrombotischen, profibrinolytischen und antiarteriosklerotischen Prozessen (Gohlke 2009). Bradykinin kommt im Gewebe und im Plasma ubiquitär vor (Bas et al., 2010a).

Bradykininbildung bezieht sich auf eine Vielfalt anderer inflammatorischer und nicht-inflammatorischer Beschwerden, die Allergische Rhinitis, Asthma, Anaphylaxis, Pankreatitis, Endotoxischen Schock, Bluthochdruck, Koronararteriendurchblutung, Ischämische Kardiomyopathie und Morbus Alzheimer einschließen (s. S.85 in Kaplan 2009).

Bradykinin (BK) ist der Prototyp der Kinine, ein Oligopeptid, das sich aus 9 Aminosäuren zusammensetzt. Zusätzlich gibt es Amino-Terminus-verlängerte Formen von Bradykinin wie Kallidin (Lys-BK) oder T-Kinin (Ile-Ser-BK), die auch physiologisch vorkommen (Adams 2009).

Kallikrein ist eine Serinprotease, die im Plasma zirkuliert in ihrer inaktiven Form als Präkallikrein, welches zu 80-90 % mit HMWK Komplexe bildet. Faktor XIIa spaltet Präkallikrein, bildet dabei aktives Kallikrein, welches, im Gegenzuge, HMWK abspaltet, um das Nonapeptid-Hormon Bradykinin freizusetzen (Rosenkranz et al., 2009).

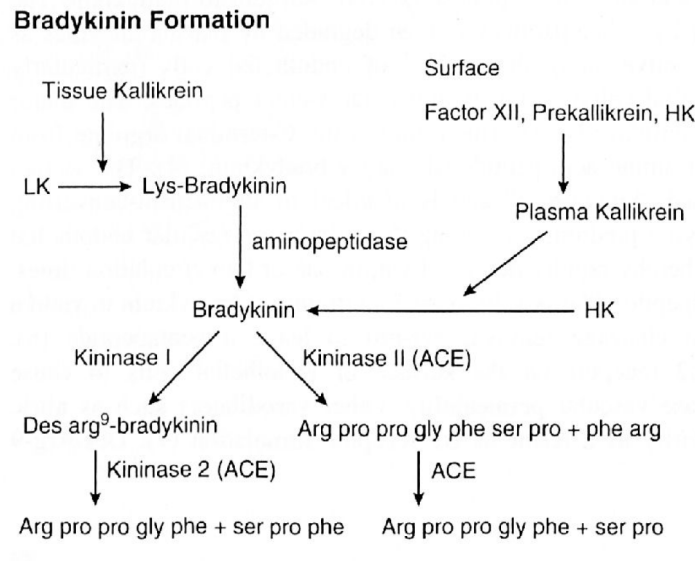


Abb.9: Stoffwechselwege der Bildung und des Abbaus von Bradykinin (Abb. zit. aus Kaplan 2009)

2.3.1 Initiierung der Bradykinin-Produktion

Die Initiierung der Bradykinin-Produktion soll mit dem Kontakt von Plasma mit einer negativ geladenen Oberfläche beginnen, die zur Bindung und Autoaktivierung von Faktor XII zu Faktor XIIa führt. Es sollte jedoch angemerkt werden, dass die Relevanz von diesem Mechanismus in vivo unklar bleibt, weil keine solche Oberfläche identifiziert werden konnte (Rosenkranz et al., 2009). Die Signal-Kaskade wird in vitro aktiviert durch Bindung von Faktor XII und ein Komplex aus Präkallikrein und HMWK an initiiierende Oberflächen (z.B. Silikate, Endotoxin und Harnsäure-Kristalle).

In vivo jedoch kann ein Trauma der Endotheloberfläche oder andere Gewebe die initiiierenden Oberflächen zur Verfügung stellen (d.h. negativ geladene Proteine), die den Faktor XII aktivieren und die Faktor XII-abhängigen Signalkaskaden initiieren (Kaplan 2010). Natürlich vorkommende Polysaccharide sind effektive Aktivatoren, wenn sie stark sulfatiert sind und zu diesen gehören Heparin und Chondroitinsulfat E. Faktor XII Autoaktivierung kann zu einem geringeren Grad katalysiert werden durch Dermatansulfat, Keratin Polysulfat oder Chondroitinsulfat C (Kaplan 2009).

Die verschiedenen Interaktionen der wesentlichen Bestandteile (Abb. 10), die für die Bildung von Bradykinin gebraucht werden, sind in Abb. 9 zu sehen. Der initiiierende Schritt ist eine geringe Autoaktivierung von Faktor XII. Wenn dieser jedoch einmal in Gang gesetzt und

Die Biologie von Faktor XII, Präkallikrein und HK in physiologischen wie auch in pathologischen Prozessen kann Beziehungen haben zu Entzündung, zur Kontrolle der Mikrovaskulatur und möglicherweise zur Fibrinolyse, eher als zur Homöostase oder pathologischen Blutungen (Kaplan 2009).

Es konnte auch demonstriert werden, dass der Faktor XII zur langsamen Autoaktivierung in der Lage ist, wenn er an Endothelzellen gebunden ist und das der Zusatz von Kallikrein gebundenes HMWK aufschließen kann, um dabei Bradykinin freizusetzen mit einer Rate, die proportional der Kallikrein-Konzentration ist. Der endgültige Bradykininlevel war abhängig von der Menge von gebundenem HMWK. Daraus folgt, dass die Aktivierung der Kaskade entlang der Endotheloberfläche auftritt in einer Art und Weise analog derjenigen, die man bei der Kontaktaktivierung des Plasmas sieht. Bradykinin, das gebildet wird, kann dann mit dem B₂-Rezeptor der Endothelialzellen interagieren, um die vaskuläre Permeabilität zu erhöhen. Bradykinin kann auch kultivierte Endothelzellen stimulieren, dabei Gewebe-Plasminogen-Aktivator, Prostaglandin I₂ (Prostacyclin) und Thromboxan A₂ sezernieren und auf diesem Wege die Thrombozytenfunktion modulieren und die lokale Fibrinolyse stimulieren (Kaplan 2009).

2.3.2 Gefäßerweiterung/-entspannung durch Bradykinin

Das vaskulär hochaktive Peptid Bradykinin ist ein potenter Erweiterer der Blutgefäße mit Hilfe des intrazellulären NO-Signalwegs und in der Lage, die Permeabilität der Gefäßwände zu erhöhen (Bas et al., 2009). Die hauptsächliche vaskuläre Aktivität von BK entsteht durch die BK-B₂-Rezeptoren der endothelialen Zellen. Bei diesem Prozess induziert BK eine Vasodilatation auf dem Wege des NO-Signal-Wegs und kann so die Permeabilität der Kapillaren verändern (Capillary leakage). Deshalb scheint BK eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung vieler AÖ zu spielen. Jedoch bleibt es unklar, warum die Erhöhung der BK-Plasma-Werte – die schätzungsweise 7 Millionen Patienten (allein in Deutschland) unter ACE-Inhibitor-Therapie betreffen – nur zu wenigen AÖ führen (Bas et al., 2009).

2.3.3 (Gefäßentspannungs-)Signalkaskade bei der Bindung von Bradykinin an den Bradykinin-Rezeptor II (BKR-2) von Endothelzellen

Die Bradykinin-Rezeptoren gehören zur der Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, wenn Bradykinin an den BKR-2-Rezeptor bindet, wird Phospholipase C (PLC) aktiviert durch eine Ankopplung an verschiedene G-Proteine (G_a , G_i), die aktivierte PLC spaltet im Gegenzuge Diacylglycerol (DAG) und Inositol-Tri-Phosphat von Phospholipiden ab. IP_3 fungiert als second messenger für, auf der einen Seite, die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum und, auf der anderen Seite, die Aktivierung von Phospholipase A_2 (PLA_2) durch Proteinkinase C und den mitogen-aktivierten Proteinkinase-Signal-Weg (MAPK). Die aktivierte PLA_2 setzt schließlich Arachidonsäure frei. Dieser Schritt stellt den die Syntheserate begrenzenden Schritt der Prostacyclin-Synthese dar. Auf der anderen Seite führt die vermehrte Freisetzung von internen Speichern zu einer Aktivierung von Ca^{2+} -sensitiver, endothelialer NO-Synthase (e-NOS) und zur Produktion erhöhter Werte von NO. Diese zwei Mechanismen (Prostaglandin-Synthese und erhöhte Werte von NO) führen schließlich zur Entspannung der Gefäße (Abb. 11).

Neben der oben beschriebenen Signalübertragung via IP_3 -Aktivierung wurden andere Signalwege in der Literatur beschrieben, die zu einer Bradykinin-induzierten Erhöhung der eNOS-Aktivität führen. In Endothelzellen aktiviert Bradykinin auch die Komponenten des JAK/STAT-Signal-Wegs, die in den Caveolae lokalisiert sind. Hier phosphorylieren Tyrosinkinasen die STAT-Proteine der JAK-Familie, welche im Gegenzuge die Transkription gewisser Gene spezifisch regulieren. Zusätzlich haben Bae und Mitarbeiter in Zellkultur-Experimenten an bovinen Aorten-Endothelzellen eine Proteinkinase A-abhängige, Bradykinin-induzierte Phosphorylierung und Aktivierung von endothelialer NO-Synthase entdeckt (Adams 2009).

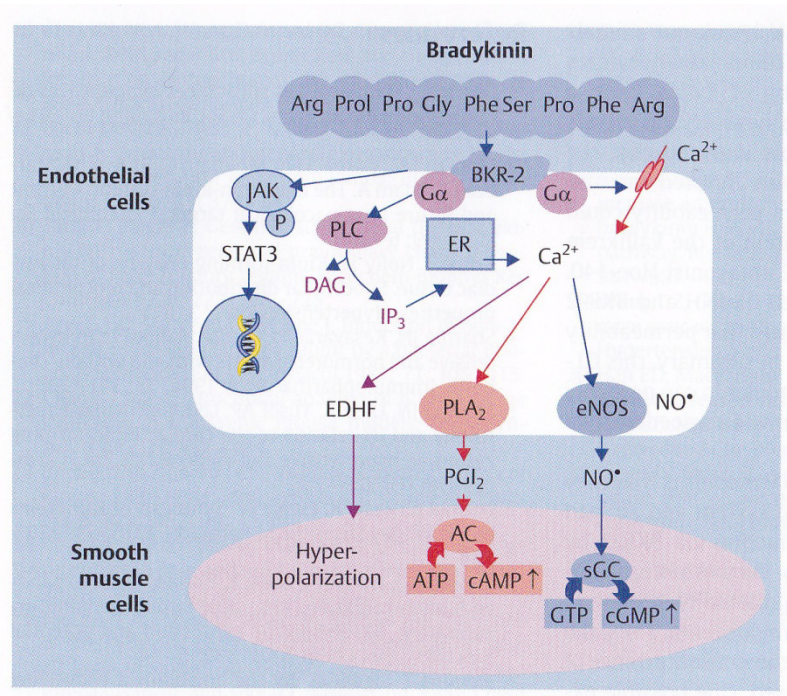


Abb. 11: Signaltransduktion von Bradykinin in Endothelzellen (Abb. zit. aus Adams 2009)

2.3.4 Tiermodelle zum Thema Bradykinin und Gefäßentspannung

2.3.4.1 Tiermodell für die Gefäßentspannung durch erhöhte Produktion von Bradykinin

Das erste Modell wurde von Chao und Mitarbeitern 1996 beschrieben, bei dem es sich um eine transgene Maus handelt, die Gewebe-Kallikrein entweder unter dem Einfluss von Albumin oder einem Metallothionein-Promoter exprimiert. Diese Tiere sezernieren Kallikrein ins Plasma und zeigen 10 – 40 fach erhöhte Konzentrationen. Diese Mäuse waren chronisch hypotensiv, jedoch konnte dies eliminiert werden, indem man die Tiere entweder mit Aprotinin, einem spezifischen Inhibitor von Gewebe-Kallikrein, oder mit Hoe-140, einem spezifischen BKR2-Blocker, behandelte. Dies war der erste Hinweis in vivo, dass eine erhöhte Produktion von Bradykinin und seine Wirkung auf BKR-2 zu einem reduzierten Blutdruck führte (Adams 2009).

2.3.4.2 Tiermodell für die Gefäßentspannung durch Überexpression von BKR-2

Ein anderes Tiermodell wurde 1997 durch Wang und Mitarbeiter beschrieben. In diesem Modell wurde der BKR-2 in allen Geweben unter der Kontrolle eines RSV-Promotors überexprimiert. Wie erwartet zeigten diese Tiere signifikante Blutdruckreduktion im Ver-

gleich zu gesunden Wild-Typ-Tieren. Wie in den anderen Tiermodellen konnte der herabgesetzte Blutdruck behandelt werden durch Verabreichung von Hoe-140. Dieses Modell unterstützt auch das Ergebnis, das die Überexpression von BKR-2 und seine Signal-Übertragung an der Reduktion des Blutdrucks teilhaben (Adams 2009).

2.3.4.3 Tiermodell C1-INH-Knockout-Tiere: ihre erhöhte vaskuläre Permeabilität ist BKR-2-abhängig

Das dritte Modell, das aus der gegenwärtigen Literatur beschrieben werden muß, macht Gebrauch von der Beobachtung, dass die Beseitigung des C1-INH mit der Entwicklung eines Hereditären Angioödems verbunden ist. Von einem phänotypischen Blickpunkt aus entwickeln C1-INH-Knockout-Tiere keinerlei auffallende Abnormitäten. Nach der Injektion von Evans-Blau jedoch, einer Technik, mit der die Permeabilität von Gefäßen untersucht werden kann, entdeckten die Autoren, dass die Knockout-Tiere eine erhöhte vaskuläre Permeabilität aufwiesen. Diese Zunahme der Permeabilität konnte eliminiert werden, wenn man den Kallikrein-Inhibitor DX-88 oder den BKR-2-Antagonisten Hoe-140 verabreichte. Wenn Mäuse mit sowohl einer C1-INH- wie auch BKR-2-Defizienz erzeugt wurden, konnte die vaskuläre Permeabilität nicht mehr festgestellt werden. Zusammengefaßt zeigt dies C1-INH-KO-Modell, das Bradykinin wahrscheinlich an der Entwicklung des Angioödems via BKR-2 beteiligt ist (Adams 2009).

2.3.4.4 Tiermodell B2-R-Knockout Mäuse: Bradykinin und Hirnödem

Zu Bradykinin und BKR-2-Knockout Mäuse: BKR-2^{-/-}-Mäuse hatten signifikant weniger Hirnödeme (B^{-/-} 51% gegenüber Wildtypmäusen, 24 h; $P < 0.001$), geringeres Kontusionsvolumen (BKR-2-KO-Mäuse 50% gegenüber WT 24 h und 7 Tage nach Controlled Cortical impact (CCI); $P < 0.05$), und ein besseres funktionelles Ergebnis 7 Tage nach einer traumatischen Hirnverletzung (TBI) verglichen mit WT-Mäusen ($P < 0.05$). Die dargestellten Resultate zeigen, dass Bradykinin und seine B2-Rezeptoren eine kausale Rolle bei der Hirnödembildung und dem Zelltod nach einer traumatischen Hirnverletzung (TBI) spielen (Trabold 2010).

2.3.5 Metabolismus des Bradykinin

Bradykinin wird durch endogene Metalloproteasen effektiv metabolisiert (Abb. 12), und zwar Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), Carboxypeptidase N (CPN), Amino-peptidase P (APP) und Dipeptidylpeptidase IV. Bradykinin wird durch Carboxypeptidase N (CPN) abgespalten an der C-terminalen Peptidbindung, um dann des-Arg⁹-Bradykinin zu bilden, ein Agonist des Bradykinin-Typ 1- Rezeptors. Im Gegensatz dazu ist natives Bradykinin ein Agonist sowohl der Bradykinin Typ I-Rezeptoren wie auch der Typ II- Bradykin-Rezeptoren. Die Rate des Metabolismus ist rapide und Bradykinin hat in vivo eine Halbwertszeit von weniger als einer Minute (Rosenkranz et al., 2009).

In jüngster Zeit jedoch wurde die Rolle des ACEs beim Metabolismus des Bradykinins untersucht. Studien mit einem spezifischen BK2-Rezeptor-Inhibitor, Icatibant, zeigten, dass der Bradykinin-Antagonismus die antihypertensiven Effekte von ACEIs abmilderte bei akuter Medikamenten-Verabreichung, aber nicht, wenn beide Medikamente gleichzeitig bei chronischer ACEI-Verabreichung gegeben wurden. Weiterhin unterstreicht die Beobachtung, dass 0.1 – 0.7% der Patienten, die mit ACEIs behandelt wurden, eine bradykininvermittelte Form des Angioödems erleben, die vermutliche Rolle von Bradykinin bei der Vermittlung dieser klinisch relevanten Nebenwirkung von ACEI (Rosenkranz et al., 2009; Bas et al., 2006).

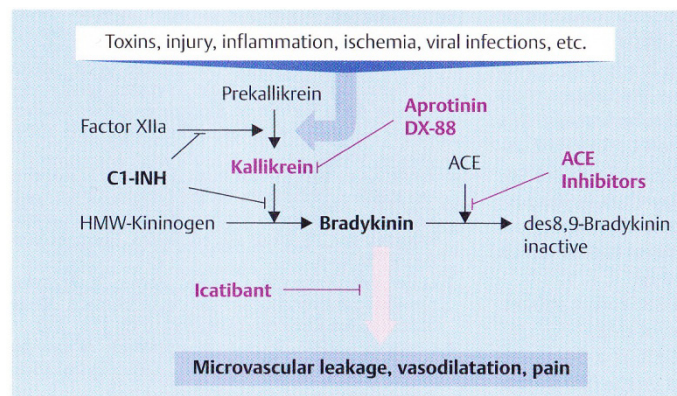


Abb. 12: Schematische Darstellung des BK-Metabolismus und der Beeinflussung durch Antagonisten (Abb. zit. aus Rosenkranz et al., 2009)

2.3.6 HAE-Schlüsselmediator Bradykinin

C1-INH-Mangel führt zu einer Erhöhung der Faktor XII- und Kallikrein-Aktivität, die schließlich zu einer Überproduktion von Bradykinin führt. Es gibt eine hinreichende Evidenz, dass Bradykinin der Schlüsselmediator der Symptome des HAE ist. HAE-Patienten zeigen

eine zwei- bis zwölffache Zunahme der Bradykinin-Level während ihrer Anfälle. Da Bradykinin ein bedeutender Vermittler der mikrovaskulären „leakage“ ist, kann dies die Ödembildung während der HAE-Anfälle erklären. Schlüssel-Symptome des akuten HAE-Anfalls sind Hautschwellung, Schwellung der Submukosa im GIT, die zu abdominalen Schmerzen, Übelkeit und Erbrechen führen, und ein laryngeales Ödem, das möglicherweise lebensbedrohlich sein kann (Rosenkranz et al., 2009).

2.3.7 Bradykininrezeptoren

Die Effekte vieler biologisch bedeutender Substanzen wie z.B. der Peptidhormone werden typischerweise durch Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren vermittelt (Abb. 13). Dies gilt auch für die Kinine, die an spezifische Kinin-Rezeptoren binden, die auf zahlreichen Zelltypen in den verschiedensten Organen exprimiert werden. Kinin-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelt und gehören zu der Familie der „seven-transmembrane“-Rezeptoren. Die sieben Transmembran-Domänen ordnen sich zu einer Tasche (siehe die Abb. 14). Pharmakologische Untersuchungen wie auch Expressionsklonierungs-Studien haben nun zur Identifikation von zwei unterschiedlichen Rezeptoren für das wichtigste Kinin, Bradykinin, geführt. Die Chromosomen-Kartierung identifizierte die Lokalisation von Bradykinin-Rezeptor I (BKR-1) auf Chromosom 14q32 und Bradykinin-Rezeptor II (BKR-2) auf Chromosom 14q31 – q32.2. Das humane BKR-2-Gen besteht aus drei Exons, wobei das Gen-Produkt, bestehend aus 391 Aminosäuren, nur von Exon 3 kodiert wird (Adams 2009). Weiterhin unterscheiden sich die 2 Bradykinin-Rezeptoren auch vom Grad der Expression auf der Oberfläche. BKR-1 wird normalerweise nicht konsekutiv auf Zellen exprimiert, sondern wird eigentlich erst in ausreichender Menge nach Gewebeschädigung synthetisiert. Im Gegensatz dazu wird der BKR-2 konstitutiv exprimiert in zahlreichen Gewebetypen, aber er kommt hauptsächlich auf Endothelzellen, Zellen der glatten Muskulatur, Fibroblasten, Mesangiumzellen, einige Neuronalzellen, Astrozyten und vielkernigen Neutrophilen vor. Die Homologie auf der Aminosäuren-Ebene zwischen diesen beiden Rezeptoren-Typen beläuft sich auf 36%. Zusätzlich zu den pharmakologischen Unterschieden von BKR-1 und BKR-2 unterscheiden sich die Rezeptoren auch mit Blick auf eine Desensibilisierung. Nach Bindung eines Agonisten an den BKR-2 wird dieser sehr schnell durch Serin- und Tyrosin- Phosphorylationsschritte desensibilisiert. Dies gilt für den BKR-1 nur in sehr geringem Maße und durch Agonisten vermittelte Phosphorylation konnte bis jetzt nicht entdeckt werden (Adams 2009).

extracellular loops

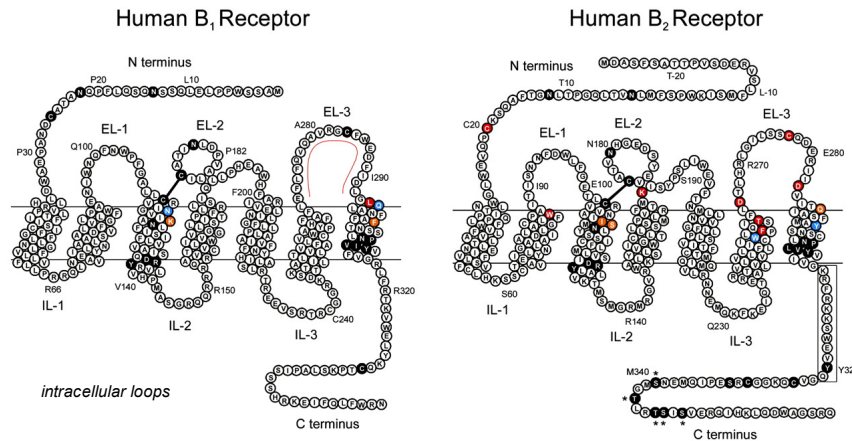


Abb. 13: Dargestellt ist der humane B1- und B2-Rezeptor. Jede der 353 Aminosäuren (B1) bzw. 391 Aminosäuren (B2) ist durch einen Kreis dargestellt. Die Peptidkette durchquert die Membran siebenmal. Der Amino-Terminus ragt in den Extra-, der Carboxy-Terminus in den Intrazellulärraum. Die sieben Transmembran-Domänen ordnen sich zu einer Tasche. In dieser Tasche in der Membran werden kleine Liganden gebunden: Die Bindungsstelle des Agonisten ist rot, die des Antagonisten blau und die des sowohl agonistisch als auch antagonistisch wirkenden Liganden orange gekennzeichnet. Sternchen an einigen Aminosäuren im Intrazellulärraum deuten Serin und Methionin an, die phosphoryliert werden können; dadurch wird der Rezeptor desensibilisiert. EL, Extrazellulärschleifen; IL, Intrazellulärschleifen (Abb. zit. aus Leeb-Lundberg 2005).

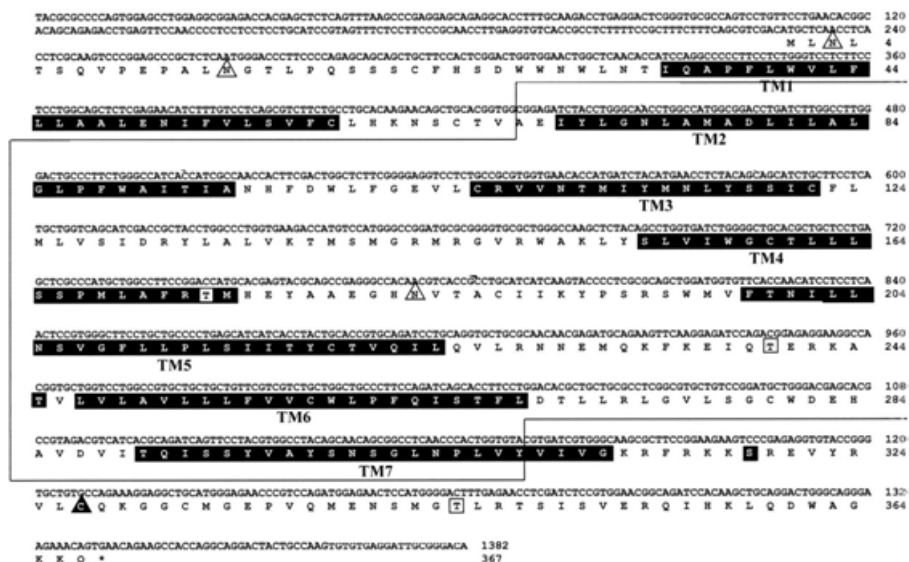


Abb. 14: Dargestellt sind die DNS-Sequenz und die dazugehörigen Codogene von dem B₂-Rezeptor des Schweins. Die sieben Transmembran-Domänen, gekennzeichnet mit TM1 bis TM7, sind schwarz markiert. Die in dem schwarzen (Serin) und dem weißen (Threonin) Rechteck liegenden Aminosäuren stellen Orte der Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) bzw. die Proteinkinase C (PKC) dar, wogegen die Asparagin-Moleküle im weißen Dreieck und das Cystein im schwarzen Dreieck die Angriffspunkte für die N-Glykosylierung und die Palmitoylation darstellen (modifiziert nach Kimura et al., 2001).

Der B₂-Rezeptor, der konstitutiv in verschiedenen Zellen einschließlich vaskulären Endothelzellen synthetisiert wird, vermittelt die wichtigsten pharmakologischen Aktivitäten der Kinine. Einer der wichtigsten hämodynamischen Effekte des Bradykinins ist die Vasodilatation, die verursacht wird durch die Stimulation der endothelialen B₂-Rezeptoren in Arterien und Arteriolen mit der darauffolgenden endothelialen Freisetzung von NO oder Prostacyclin (PGI₂) (Gohlke 2009). Es scheint, dass die Aktivität von Bradykinin, die via AT₂-Rezeptor-Aktivierung vermittelt wird, weniger verantwortlich ist für den blutdrucksenkenden Effekt von AT₁-Rezeptor-Antagonisten und mehr für die herz- und gefäßschützenden Aktivitäten. Daher verhindert B₂-Rezeptor-Blockade bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung die Zunahme der flussabhängigen Gefäßerweiterung durch Candesartan. In menschlichen koronaren Mikroarterien ist die vaskuläre Konstriktion durch ANG II darüberhinaus erhöht durch die Blockade der AT₂-Rezeptoren. Dies ist ein klarer Beweis für die AT₂-Rezeptor-vermittelte vaskuläre Dilatation auch beim Menschen (Gohlke 2009). Die Tabellen 1 und 2 geben eine Zusammenfassung der Wirkungen bzw. klinischen Effekte der beiden Bradykinin-Rezeptoren an verschiedenen Organsystemen wieder (Gavras 1996; Goodman 1999; Forth 1992; Bönner 1994; D'Orleans-Juste 1989; Ignarro 1987).

B₂-Rezeptor	
Wirkung	Klinischer Effekt
Freisetzung autokriner/ parakriner Faktoren: NO, Prostaglandine, EDHF (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Faktor)	Vasodilatation, gesteigerte Gewebepерfusion antithrombotische Effekte antiproliferative Effekte
Gefäßmuskulatur-Relaxation	Vasodilatation Tonus-Regulation
Erhöhte Gefäßpermeabilität	Angioödem entzündliches Ödem
Freisetzung von Histamin aus Mastzellen	Angioödem entzündliches Ödem
Sensibilisierung der Atemwege	Husten Bronchokonstriktion allergische Rhinitis Asthma
Beeinflussung der Blut-Hirn-Schranke	Erhöhte ZNS-Penetration
Stimulation sensorischer Neurone (Nozizeption)	(Akuter)-Schmerz
Mobilitätssteigerung der Spermien Steigerung der Spermatogenese	Beeinflussung des männlichen Fortpflanzungssystems
Erhöhter Glukose-Transport in die Zelle	Erhöhte Insulin-Sensitivität verbesserte Glukose-Toleranz
Gewebeentzündung	Arthritis Kolitis Pankreatitis

Tab. 1: Darstellung der Wirkungen bzw. klinischen Effekte des B₂-Rezeptors an verschiedenen Organsystemen.

B₁-Rezeptor	
Wirkung	Klinischer Effekt
Wirkung an der glatten Muskulatur: Kontraktion oder Relaxation	Endotoxischer Schock
Makrophagen	Erhöhte Produktion von IL-1 und TNF α
Kardioprotektiver Effekt bei myokardialer Ischämie	Verbesserte myokardiale Reperfusion Verhinderung von Reperusionsarrhythmien Verbesserte myokardiale Kontraktion Positiver Einfluss auf Glukose-und Elektrolytstoffwechsel u.a.
Stimulation sensorischer Neurone	(Chronischer) Schmerz

Tab. 2: Darstellung der Wirkungen bzw. klinischen Effekte des B₁-Rezeptors an verschiedenen Organsystemen.

Folgende Abbildung 15 fasst noch einmal als Überblick die Vorgänge bei der Synthese und Degradation der Kinine in Blutgefäßen zusammen:

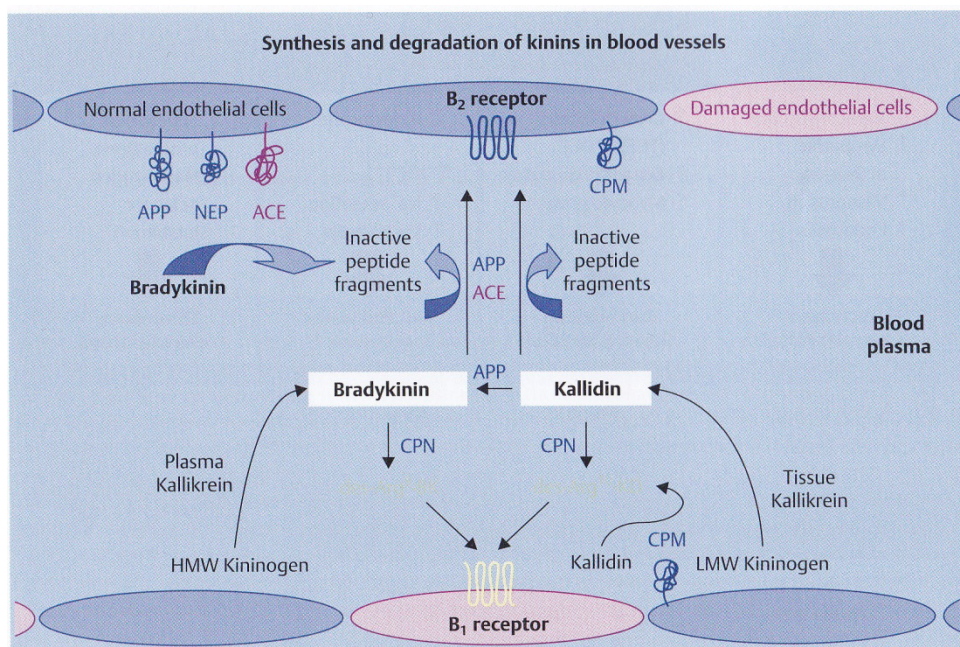


Abb 15: Synthese und Degradation der Kinine in Blutgefäßen (Abb. zit aus Gohlke 2009)

B₂-Rezeptoren werden in normalen Endothelzellen konstitutiv gebildet, während die Bildung von B₁-Rezeptoren nach Verletzungen initiiert wird. Bradykinin wird gebildet aus HMW-

Kininogen über Plasma-Kallikrein. Aus LMW-Kininogen wird Gewebe-Kallikrein zu Kallidin abgebaut, welches weiter via Aminopeptidase metabolisiert werden kann zu Bradykinin. Bradykinin und Kallidin können metabolisiert werden durch die Carboxypeptidasen N und M (= Kininase II) zu B₁-Rezeptor-Agonisten, nämlich des-Arg⁹-Bradykinin und des-Arg¹⁰-Kallidin. Im Blutplasma werden die Kinine hauptsächlich degradiert durch ACE und die Aminopeptidase P (APP) zu inaktiven Peptidfragmenten. Der Hauptteil der Kinin-Inaktivierung tritt am vaskulären Endothel auf durch APP, Neutral-Endopeptidase (NEP) und besonders ACE (Gohlke 2009).

2.3.8 Pharmakologische Blockade der B₂-Rezeptoren und Studien zu B₂-Rezeptor-Knockout-Mäusen

Die Entwicklung des B₂-Rezeptor-Antagonisten Icatibant repräsentiert einen Durchbruch in der Kinin-Forschung. Die Herz- und gefäßprotektiven Effekte von ACEI werden durch chronische Blockade der B₂-Rezeptoren komplett verhindert. Auch in Ratten mit Herzinfarkt und chronischer Herzinsuffizienz konnten die protektiven Effekte von ACEI durch Icatibant reduziert werden. Ein weiterer wichtiger Hinweis zur Relevanz von Bradykinin für die kardioprotektiven Effekte von ACEI ist die begrenzte kardioprotektive Response auf ACEI bei Bradykinin BKR-2-Knockout-Mäusen (Gohlke 2009).

2.3.8.1 Klinische Studien

Veränderungen der Bradykinin-Konzentration in Plasma und Urin von Patienten, die in ACEI-Behandlung sind, haben nicht eindeutig nachgewiesen werden können. Erhöhte Plasma-Konzentrationen von Bradykinin nach akuter und chronischer ACEI-Behandlung wurden, unter anderen, von Nussberger und Mitarbeitern bei normalen Probanden bestimmt. Durch pharmakologische Blockade der B₂-Rezeptoren bei den Patienten konnten die therapeutischen Effekte von ACEIs teilweise verhindert werden. Deshalb reduziert Icatibant den hypotensiven Effekt von Captopril und reduziert die ACEI-induzierte Zunahme von flussabhängiger und endothelvermittelter Gefäßerweiterung. Diese Resultate zeigen, dass auch in Menschen die Akkumulation endogener Kinine im Gefäßendothel eine bedeutsame Rolle spielt für die therapeutischen Effekte der ACEI (Gohlke 2009).

2.3.8.2 Tierexperimentelle Studien: Pharmakologische Blockade der B₂-Rezeptoren und Studien an AT₂- und B₂-Rezeptor-Knockout-Mäusen

Eine Beziehung zwischen der Stimulation von AT₂-Rezeptoren und dem Bradykinin-NO-System ist oft in experimentellen Studien gezeigt worden. Forschungen haben bestätigt, dass ANG II die NO-Produktion in Gefäßwänden erhöht und dass dieser Effekt sowohl durch die Blockade der B₂-Rezeptoren wie auch durch NO-Synthase aufgehoben werden kann. Ähnliche Ergebnisse erhielt man nach Überexpression von AT₂-Rezeptoren in Gefäßmuskelzellen. Die AT₂-Rezeptor-vermittelte Aktivierung von Enzymen ähnlich der des Kallikreins mit nachfolgender Bildung von Bradykinin ist als Mechanismus dafür postuliert worden. Die therapeutische Relevanz der AT₂-Rezeptor-vermittelten Synthese von Bradykinin bei der Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz und der akuten Myokardischämie ist oft in Tiermodellen festgestellt worden. Außer der Bildung von NO spielt auch die Synthese von PGI₂ eine besondere Rolle in diesem Prozess. Deshalb konnte in Schweinen mit Myokardischämie eine Verkleinerung der Infarktgröße durch AT₁-Rezeptor-Blockade wie auch durch Blockade von AT₂- und B₂-Rezeptoren erreicht werden und diese kann auch klein gehalten werden durch Inhibition der Cyclooxygenase. Im Falle von B₂- und AT₂-Rezeptor-Knockout-Mäusen mit chronischer Herzinsuffizienz verhinderte die Abwesenheit der Bradykinin-B₂-Rezeptoren oder entsprechend AT₂-Rezeptoren den günstigen therapeutischen Effekt der AT₁-Rezeptor-Blockade (Gohlke 2009).

2.4 Rolle der Akute-Phase-Proteine und des C-reaktiven Proteins bei der Entstehung des Angioödems

2.4.1 Akute-Phase-Proteine

Akute-Phase-Proteine sind vorwiegend in der Leber gebildete Plasmaproteine, deren Serumkonzentrationen im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion (vorübergehend) erhöht sind. Es sind bis auf CRP und Serum-Amyloid-A-Protein (Abk. SAA) Glykoproteine. Als Negativ-Akute-Phase-Proteine (Albumin, Präalbumin, Transferrin, HDL, LDL) werden Plasmaproteine bezeichnet, deren Serumkonzentrationen im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion (vorübergehend) vermindert sind (Pschyrembel 261. Aufl.).

Von besonderem Interesse in unserem Zusammenhang sind aus dieser Gruppe die beiden in der Einleitung schon genannten Proteine CRP und Fibrinogen. Ich ergänze deshalb hier zunächst die im Zitat von Bas u.a. gemachten zusammenfassenden Aussagen durch einige weitere Details von ihm und seinen Mitarbeitern zum Thema aus einer neueren Veröffentlichung:

In Organbadexperimenten mit menschlichen und tierischen vaskulären Gewebeproben haben wir entdeckt, dass Akute-Phase-Proteine auf der einen Seite selbst als Mediatoren für die Entwicklung des AÖ fungieren, auf der anderen Seite die BK-Wirkung bis zum 10-fachen verstärken können. NO-Aktivierung tritt dabei in rezeptorabhängiger Weise sowohl in Endothelzellen als auch in glatten Muskelzellen auf. Folgerungen: Diese Beobachtungen zeigen die Notwendigkeit für angemessene Vorsichtsmaßnahmen, sowohl prä- als auch postoperativ, wie auch bei Entzündungsperioden (Bas et al 2009).

Unsere Studien brachten ans Licht, dass Patienten (n=24) mit einem akuten ACEI-induziertem Angioödem merklich höhere Plasma-Konzentrationen der Akute-Phase-Proteine – C-reaktives Protein (CRP 4,4 mg/dl) und Fibrinogen (460 mg/dl) – während des Ödems aufwiesen. Kontroll-Untersuchungen nach dem Abklingen der Ödeme zeigten eine Rückkehr zu Normalwerten bei beiden Proteinen.

Diese Beobachtungen lassen uns annehmen, dass Akute-Phase-Proteine an der Entwicklung des Kinin-induzierten Angioödems teilhaben und nicht nur unspezifische Marker sind (Bas et al 2009).

Wir haben experimentelle Studien durchgeführt, um die Rolle der Akute-Phase-Proteine von Kinin-induzierten Angioödem zu klären. Aus diesem Grunde prüften wir die funktionellen Möglichkeiten von den zwei Akute-Phase-Proteinen an porcinen Koronargefäßen und humanen Arterien (Arteria mammaria interna) und Venen (Große Vena saphena) in Organbad-Experimenten. Unsere Hauptresultate bis jetzt sind, erstens, dass beide aktiven Phase-Proteine selbst funktionell aktiv sind und Gefäßerweiterung induzieren in einer konzentrationsabhängigen Weise. Die vasodilatativen Eigenschaften von Fibrinogen waren am stärksten besonders bei 450 mg/dl, genau die Plasma-Konzentration, die unsere Angioödem-Patienten während des AA zeigten. Zweitens haben wir entdeckt, dass beide Proteine in der Lage sind, die vaskulären Eigenschaften des Bradykinins signifikant (das 10-fache) zu verstärken. Die vollständige Klärung der Signalwege, die in diesen Prozess involviert sind, konnte noch nicht erreicht werden und ist noch Gegenstand gegenwärtig andauernder experimenteller Arbeit (Bas et al 2009).

Weiter scheinen Entzündungsfaktoren wie z.B. Thrombin und TNF-Alpha in der Lage zu sein, die endotheliale Permeabilität zu beeinflussen und teilweise sogar einen synergistischen Effekt zu haben. Die die vaskuläre Permeabilität verbessernden Effekte von Thrombin scheinen abzulaufen über Proteinase-aktivierende Rezeptoren (PAR) und zu einer intrazellulären Calcium-Zunahme zu führen. Diese experimentellen Ergebnisse in Verbindung mit klinischen Beobachtungen legen eine enge Beziehung zwischen Entzündung und Angioödem nahe. Entzündungsfaktoren können auf der einen Seite selbst die endotheliale Permeabilität verändern auf der anderen Seite die vaskuläre Wirkung von Bradykinin verstärken, wie wir beobachtet haben (Bas et al 2009).

2.4.2 Das C-reaktive Protein

Das C-reaktive Protein (CRP) wurde erstmals von Tillet und Francis im Jahre 1930 beschrieben. Dabei hatten sie festgestellt, dass dieses Protein an dem C-Polysaccharid der Pneumokokkenkapsel in Serum von Patienten mit akuten Pneumonien präzipitierte, und diese Präzipitatbildung fand bei akuten bakteriellen Erkrankungen statt, jedoch nicht bei Gesunden. Von nun an ist es eines der am umfangreichsten erforschten Plasmaproteine geworden. Etwa 11 Jahre nach der Entdeckung des CRP konnte das Protein von Avery et al. isoliert werden. Im Jahre 1965 konnten Hurlimann et al. in einer Studie an Rhesus-Affen und Kaninchen zeigen, dass die CRP-Synthese hauptsächlich in den Hepatozyten der Leber stattfindet. 12 Jahre danach wurde die Struktur des C-reaktiven Proteins von Osmand et al. entschlüsselt. Inzwi-

schen ist die Calcium-abhängige Bindung an den Phosphocholinresten des CRPs entdeckt worden (Volanakis 2001). Im Jahr 2005 wurde von Bas et al. beschrieben, dass erhöhte Akute-Phase-Proteine, besonders CRP, bei der Pathophysiologie des ACEI-induzierten Angioödems eine signifikante Rolle spielen. (Bas et al., 2005).

CRP ist ein uraltes Protein, das phylogenetisch mit keinem bekannten Mangel oder Protein-Polymorphismus bei Menschen hoch konserviert ist. Als Teil der Akute-Phase Reaktion steigt der Plasmalevel während Entzündungszuständen, eine Eigenschaft, die seit langem für klinische Zwecke ausgenutzt wurde.

Kürzlich haben einige prospektive klinische Studien unabhängig voneinander gezeigt, dass eine mäßige Erhöhung der Basis-CRP-Werte, wie sie durch „High-sensitivity Assays“ entdeckt wird, zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse voraussagen kann. Erhöhte pCRP-Werte sind in Verbindung mit chronischen Erkrankungen gebracht worden wie Bluthochdruck, dem metabolischen Syndrom und Typ II Diabetes bzw. dem ACEI-induzierten Angioödem (Eisenhardt et al. 2009).

CRP-Level von weniger als 1 mg/L werden als geringes Risiko betrachtet, 1 bis 3 mg/L als mittleres Risiko und > 3 mg/L werden als Hochrisiko betrachtet für die Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung (Pearson et al. 2003).

Als unspezifischer Entzündungsmarker eignet sich das pentamere CRP (pCRP) besonders gut zum Nachweis einer Akute-Phase-Reaktion wegen der hohen Halbwertszeit. So bleibt die Plasma-Halbwertszeit von 19 Stunden unter allen Bedingungen konstant und zeigt, dass der einzig entscheidende Faktor der zirkulierenden pCRP-Konzentration die Syntheserate ist.

Zahlreiche klinische Studien belegen, dass das Akute-Phase-Protein CRP einen unabhängigen aussagekräftigen Risikofaktor für die Prognose von kardiovaskulären Erkrankungen sowie der kardiovaskuläre Mortalität darstellt. 1982 zeigten Forscher, dass pCRP zusammen mit LDL abgelagert wird. Dies erbrachte erste Evidenz, dass das pCRP möglicherweise nicht nur ein Marker, sondern auch ein kausaler Faktor bei Gefäßerkrankungen ist. Diese Funde von de Beer haben kürzlich von Anderen bestätigt werden können, indem sie oxidiertes oder enzymatisch modifiziertes LDL einsetzten. Man fand außerdem, dass pCRP mit dem terminalen Komplement-Komplex C5b-9 in der Arterienwand zusammen auftritt. Andere Gruppen berichteten, dass das CRP zusammen mit klassischen Komplement-Komponenten in normalen Arterien wie auch in allen Stadien von humaner Atherosklerose detektiert werden kann. Unter seinen zahlreichen Eigenschaften als Marker wird CRP auch als Indikator für eine Sepsis angesehen (Povoa 1998).

CRP tritt in wenigstens zwei unterschiedlichen von der Konformation her eigenen Formen auf, natives pentamerisches (pCRP) und modifiziertes/monomerisches CRP (mCRP).

2.4.3 Pentamerisches CRP

2.4.3.1 Struktur- und Bindungsverhalten

Natives pentamerisches CRP ist ein stark lösliches Serumprotein der Pentraxin-Familie (Pentraxine: von griech.: Fünf Beeren) und besteht aus fünf identischen Polypeptid-Untereinheiten (Pentameren), welche durch nicht-kovalente Bindung zu einem zyklisch-symmetrischen Pentagon zusammengefügt sind und einen Außendurchmesser von 100 Å haben. Der Durchmesser der zentralen Poren liegt bei 30 Å (verschiedene Darstellungen in Abb. 16). Jede einzelne Untereinheit hat ein Molekulargewicht von etwa 24,9 kDa (siehe dazu CRP Molekulargewicht in Lit.-Liste) besteht aus 206 Aminosäuren und ist um eine Zentral-Pore angeordnet. Diese sind in der charakteristischen „Lektin-Faltung“ gefaltet, die aus einem zweischichtigen β -Faltblatt mit abgeflachter „Jelly Roll“-Struktur besteht (Shrive 1996; Eisenhardt et al. 2009).

Alle diese fünf Untereinheiten (Monomere) besitzen die gleiche Orientierung und jeweils zwei verschiedene gegenüberliegende Bindungsstellen. Die eine Seite dient der Erkennung von Phosphocholinresten, das gegenüberliegende Areal ist für Effekte auf das Komplementsystem verantwortlich. Die Erkennungsoberfläche beherbergt die fünf PCh-Bindungsstellen. Diese befinden sich allesamt in den Spalten, die sich durch die Faltung des Monomers ergeben. Die Bindung von Liganden, wie Phosphocholinen oder Galaktanen, erfolgt calciumabhängig. Die Calcium-abhängige Bindung bewirkt nach Komplexierung durch das CRP-Molekül eine Konformationsänderung des Proteins. In Abwesenheit von Calcium bindet CRP an Polykatione, z.B. Polylysine.

Phosphocholine besitzen dabei die größte Bindungsaffinität zu pCRP. Sie kommen, außer in Lipopolysacchariden von Bakterien und anderen Mikroorganismen, auch an der Außenseite vieler biologischer Membranen als polare Gruppe von Lecithin und Sphingomyelin vor. Dabei erfordert die Bindung von pCRP jedoch das Vorhandensein von Lysolecithinen oder das Wirken des in der Leber produzierten Enzyms Phospholipase A₂ (PLA₂), welches in der Lage ist, Phospholipide zu hydrolysieren. Die Wirksamkeit der humanen PLA₂ ist auf Phospholipide der inneren Zellmembran begrenzt und kommt erst durch den Austausch (Flip-Flop) der Phospholipide zwischen innerer und äußerer Zellmembran zustande. Der Membran-Flip-Flop findet in apoptotischen Zellen statt. Die Studien über pCRP-Level bei gesunden

normalen britischen Kaukasiern zeigten einen Mittelwert von 0.8 mg/L (Shine et al., 1981), jedoch wurden gewisse interethnische Differenzen bei den Basis-pCRP-Werten beobachtet. Etwa 50% der individuellen Varianz bei der Basis-pCRP-Konzentration ist genetisch hauptsächlich zurückführbar auf nicht-kodierende Polymorphismen im pCRP-Gen (Verzilli 2008), welches auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 lokalisiert ist.

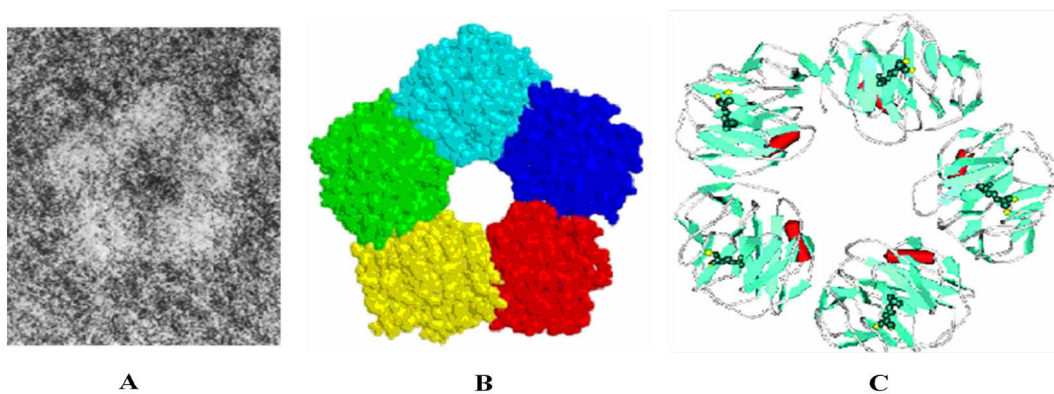


Abb. 16 A: Dargestellt ist das humane, native CRP, welches aus 5 Untereinheiten besteht und als zyklisch-pentamerisches CRP bekannt ist. Aufsicht mit 3.000.000-facher Vergrößerung im Elektronenmikroskop (Abb. zit. aus Osmand et al., 1977).

Abb. 16 B: Modelldarstellung von CRP, welches aus fünf Untereinheiten besteht und mit fünf verschiedenen Farben illustriert ist (de.wikibooks.org).

Abb. 16 C: Röntgen-Kristall-Struktur des CRP-Komplexes mit Phosphocholinen. Ca^{2+} -Ionen sind gelblich und Phosphocholine grünlich gekennzeichnet (Abb. zit. aus Thompson et al., 1999).

2.4.3.2 Synthese von pentamerem CRP

pCRP wird in Hepatozyten synthetisiert und katabolisiert. Als Bestandteil der Akute-Phase-Reaktion können Plasmalevel des pCRP bis zum 1000-fachen oder mehr binnen 24 bis zu 72 Stunden als Antwort auf Infektion, Entzündung und Gewebeschaden ansteigen (Pepys, Baltz 1983). Dieser merkliche und rapide Anstieg reflektiert hauptsächlich die Aktivität, die von regulierenden Substanzen in der Leber erzeugt wird. Die Induktion der Transkription wird vorrangig durch das Zytokin Interleukin 6 (IL-6) und, zu einem geringeren Grad, durch Interleukin- β und Tumor-Nekrose-Faktor α reguliert. Obwohl eine extrahepatische pCRP-Synthese in Neuronen, atherosklerotischen Plaques, Monozyten, Lymphozyten und Adipozyten berichtet worden ist, scheint es unwahrscheinlich, dass dies in beträchtlichem Masse den Plasmalevel beeinflusst (Eisenhardt et al. 2009).

Die Halbwertszeit von zirkulierendem pCRP, das von Hepatozyten katabolisiert wird, beträgt annäherungsweise 19-24 Stunden und ist nicht durch Entzündung oder Plasma-konzentration von pCRP betroffen.

2.4.3.3 Liganden und Rezeptoren des pentamerischen CRP

pCRP präzipitiert das C-Polysaccharid des Streptokokkus Pneumoniae, in welchem es Phosphocholin erkennen kann, ein Bestandteil der Teichonsäure der Pneumokokken-Zellwand (Volanakis, Kaplan 1971). Phosphocholin repräsentiert einen Hauptliganden des pCRP und wird von Bakterien-, Fungi- und eukaryontischen Zellen einschließlich Endothelzellen exprimiert. Jedoch müssen die Phosphocholin-Bindungsstellen erreichbar für das pCRP sein. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass pCRP nur mit aktivierten oder apoptotischen Zellen, aber nicht mit der Oberfläche von gesunden nicht-aktivierten Zellen interagiert. Obwohl Phosphocholin der erste definierte Ligand für pCRP war, konnten seitdem einige andere Liganden identifiziert werden (Du Clos 1996). pCRP bindet auch an kleine Ribonukleoprotein-Partikel und DNA-Komponenten. Devaraj und andere schlugen vor, dass die Hauptrezeptoren für pCRP auf humanen Leukozyten verschiedene Immunglobulin-Rezeptoren wie Fc γ -RIIa (CD 32) und Fc γ -RI (CD 64) sind, die auf diesem Wege Phagozytose vermitteln. Die zwei Immunrezeptoren gehören zu zwei Hauptklassen. Die erste dieser Klassen wird gewöhnlich als eine stimulatorische bezeichnet und ist charakterisiert durch eine assoziierte zytoplasmatische Immunrezeptor-Tyrosinbasierte Aktivierungsmotiv-Sequenz (ITAM), die Phagozytose, den oxidativen Burst und Zytokin-Sekretion vermittelt (Salmon,

Pricop 2001). Die zweite Klasse wird am besten durch die Präsenz einer Immunrezeptor-Tyrosinbasierten Inhibitionsmotiv-Sequenz (ITIM) beschrieben. Diese Gruppe reguliert die ITAM-vermittelte Aktivität negativ. Einige Gruppen haben gezeigt, dass die Steigerung der Phagozytose durch pCRP infolge seiner Interaktionen mit den Fc γ -Rs wahrscheinlich ist.

2.4.3.4 Pentamerisches CRP und Komplementsystem

Die hauptsächliche Funktion des pCRP besteht darin, pathogene und geschädigte Zellen zu erkennen und diese durch Aktivierung des Komplementsystems zu eliminieren. Aufgrund seiner vielseitigen Bindungsmöglichkeiten ist pCRP ein höchst sensibler Marker für entzündliches, geschädigtes Gewebe und zeigt eine enge Interaktion mit dem Komplementsystem. Wenn es an Phosphocholin gebunden ist, ist pCRP im Stande, den klassischen Komplement-Signal-Weg zu aktivieren (Abbildung 17). Die ligandengebundene pCRP-Interaktion mit C1q führt zur Bildung von C3-Konvertase, die als ein Auslöser für das Initialstadium der Komplement-Aktivierung, die C1-C4 umfasst, fungiert. Interessanterweise gibt es nur eine geringe Aktivierung der späteren Komplement-Proteine C5-C9, wobei letztere durch Immunkomplexe aktiviert werden. Der Unterschied zwischen der Immunaktivierung durch pCRP und derjenigen, die aus Antigen-Antikörper-Komplexen hervorgeht, ist vermutlich der Tatsache zu verdanken, dass gebundenes pCRP den Faktor H binden kann und auf dem Wege die Vervielfältigung auf dem alternativen Signalweg und die C5-Konvertasen reguliert. Übereinstimmend hiermit ist kürzlich ein zusätzlicher Mechanismus beschrieben worden, durch den pCRP die Komplement-Aktivierung limitieren kann. Li und andere (Li et al. 2004) berichteten eine erhöhte pCRP-induzierte Sekretion von 3 verschiedenen Komplement-Inhibitoren auf vaskulärem Endothelzellen (Decay-accelerating factor, Membrane Cofactor Protein und CD59), die starke Entzündungsantworten, die mit C5a und dem Membran-Angriffskomplex C5-C9 assoziiert sind, limitieren.

Zusammenfassend hat pCRP teil an der Wirtsverteidigung durch die Limitierung der Progression und Intensität der Entzündungseffekte, die durch die letzten Stufen der Komplement-Komponenten induziert werden (Eisenhardt et al. 2009).

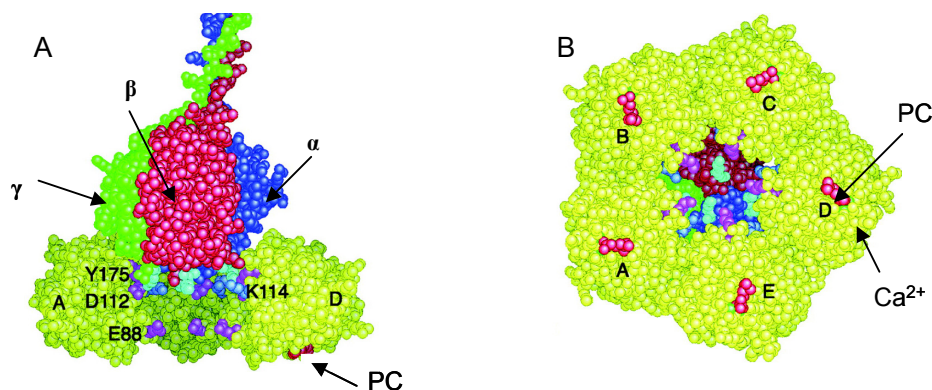


Abb. 17 A-B: Modelldarstellung zur Interaktion des CRP mit C1q-Komplement (modifiziert nach Gaboriaud et al.).

A: die Untereinheiten B und C wurde zur besseren Darstellung weggelassen. Module α , β und γ des C1q-Komplements, die zu den Untereinheiten A, B und C gehören, wurden blau, grün und rot gekennzeichnet. Die Lysine, die oben am Kopf des C1q-Komplements (Ala-173, Ala-200, Cys-170) liegen, und TyrB175 sind türkis dargestellt.

B: A-E stellen jeweils die Untereinheiten des CRP dar. Die Phosphocholine (PC) sind rot dargestellt, und das umliegende Ca^{2+} ist grün. **A, B:** Mutationen, welche die Komplement-Aktivierung (Glu-88, Asp-112, Tyr-175) beeinträchtigen, sind violett dargestellt, und die Mutationen, die zur Verstärkung der Komplement-Aktivierung (Lys-114) führen, haben eine blaue Farbe (Abbildung zit. aus Black et al., 2004).

2.4.3.5 Immunohistochemische Detektion des pCRP

pCRP heftet sich in der Blutbahn an Membranen von Mikroorganismen (Bakterien und Pilzen), beeinflusst das Komplementsystem und aktiviert Makrophagen und Endothelzellen. Die Abwehrfunktion des pCRPs beruht auf einer Bindung an Phosphocholine und einer Aktivierung der Komplementkaskade über das Komplement C1q, was schließlich zu einer Perforation in der Zellmembran und so zur Lyse der Zelle führt. Anschließend phagozytieren Makrophagen die opsonierten Zellfragmente. Das in die Blutbahn gelangte pCRP steigt nach einer Infektion rasch an. Es kann das 1000-fache des Normwertes annehmen, bevor es sich nach 4 bis 6 Tagen wieder normalisiert ($\leq 0,5$ mg/dl). Die Akute-Phase-Reaktion verursacht nicht nur den Anstieg von z.B. pCRP, Komplementfaktoren, Fibrinogen, Antiproteasen, Haptoglobin, Phospholipase A₂, sondern auch den Abfall bestimmter Plasmaproteine (z.B. Albumin,

Transferrin), was letztlich auf eine Veränderung der Synthese zurückgeführt wird (die Abb. 18).

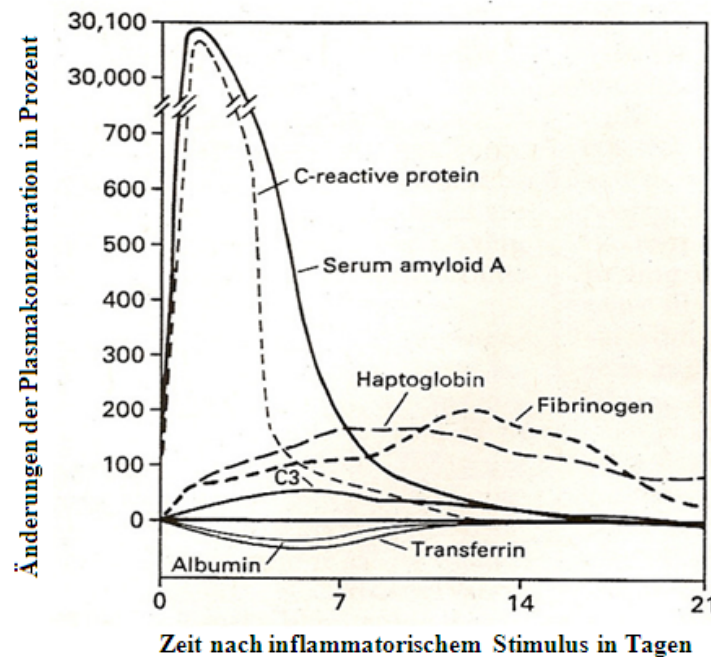


Abb. 18: Änderungen der Plasmakonzentrationen einiger Akute-Phase-Proteine nach inflammatorischem Stimulus (modifiziert nach Gitlin und Colten, 1987).

2.4.3.6 Pentamerisches CRP und NO

In aktuellen Studien wurde der Effekt von pCRP auf die endotheliale Dysfunktion in vivo untersucht. Die resultierenden Ergebnisse deuten auf einen Zusammenhang zwischen der NO-Verfügbarkeit und dem Serum-CRP hin. Spezifische Wirkungen von pCRP auf Endothelzellen und die Inkubation von Endothelzellen mit pCRP zeigte eine Abnahme von NO durch eine Herunterregulation der schützenden endothelialen NO-Synthetase.

Wie kürzlich berichtet, unterdrückte pCRP die endothelabhängige, stickoxid (NO)-vermittelte Gefäßerweiterung durch Aktivierung der p38-mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und NAD(P)H-Oxidase (Qamirani et al., 2005).

Im Jahr 2008 berichtete Oppermann in seiner Dissertationsarbeit, dass die vasorelaxierende Wirkung von CRP in kleinumigen Arterien endothelabhängig ist. Dieser Effekt scheint möglicherweise auf dem NO/cGMP-Signalweg zu beruhen (Oppermann 2009 S. 117).

Sternik u.a. im Jahr 2002 (Sternik et al., 2002) und Li u.a. hatten im Jahr 2004 (Li et al., 2004) beschrieben, dass das pCRP endothelunabhängige Gefäßentspannung vermittelt und Komplement-inhibierende Proteine in Endothelzellen heraufreguliert.

Ein kritischer Punkt in all diesen Studien ist der Gebrauch von kommerziell erhältlichen CRP-Präparationen, die Verunreinigungen wie Lipopolysaccharid und Natriumazid enthalten können, wobei das letztere gewöhnlich als Schutz vor Bakterien hinzugefügt wird. Einige Berichte legen nahe, dass einige der publizierten Effekte des CRP an Endothelzellen der Anwesenheit von Natriumazid, Lipopolysaccharid oder beiden zugerechnet werden können. Außer der Überprüfung auf Kontaminationen sollte man möglicherweise die pCRP-Präparationen auf Dissoziationsprodukte analysieren. Dauerhafte Lagerung des gereinigten CRP in Lösungen ohne Calcium wird in einer spontanen Konversion von pCRP zu mCRP enden. Wu und andere zeigten, dass in Abwesenheit von Calcium oder in der Gegenwart von Chelatbildnern wie EDTA eine spontane Dissoziation des CRP auftreten kann (Wu et al., 2003).

Zusammengenommen scheint pCRP, das frei von Kontamination mit Lipopolysaccharid, Natriumazid oder potentieller Kontamination mit Dissoziationsprodukten (mCRP) ist, weniger Entzündungseffekte oder sogar antiinflammatorisches Potential zu haben (Eisenhardt et al. 2009).

Verschiedene Tiermodelle und namentlich ein Experiment an Menschen haben die proinflammatorischen Effekte von pCRP geprüft. Nach der Infusion von pCRP in 7 gesunde Freiwillige wurde eine sofortige und deutliche Entzündungsreaktion beobachtet. Wenn kommerzielles pCRP eingesetzt wurde, konnte man nicht sagen, ob die provozierten Effekte infolge der Kontamination erfolgten oder ob die Reaktion von einer möglichen Dissoziation zu mCRP in vivo induziert wurde (Eisenhardt et al. 2009).

2.4.4 Monomeres CRP

2.4.4.1 Struktur- und Bindungsverhalten

Obwohl es postuliert worden ist, dass pCRP unter physiologischen Bedingungen sehr stabil ist und man nicht erwartet, dass es seine pentamerische Struktur ohne Denaturierung verliert, legt uns zunehmende Evidenz nahe, dass natives CRP in vivo einer Dissoziation seiner Untereinheiten in individuelle monomere Einheiten unterliegen kann. Zuerst beschrieben wurden wie in vitro Dissoziation von pCRP durch Potempa u.a. (Potempa et al., 1983, 1987) In Gegenwart von Urea-Chelation, Säure, Hitze oder bei direkter Immobilisierung auf Polystyrenplatten können Neo-Epitope, die Antigenität ausdrücken und sich unterscheiden

von nativen CRP-Epitopen, exprimiert werden. Man fand, dass die neue CRP-Konformation in der nativen Gel-Elektrophorese schneller wanderte und charakterisiert war durch verminderte Löslichkeit und deshalb eher die gewebegebundene Form des CRP repräsentierte. Der Dissoziationsprozess ist von einem Verlust des Überwiegens der β -Faltblatt-Sekundär-Struktur und einem relativen Anwachsen der α -Helix begleitet und einer Expression von Kontaktbindungsstellen zwischen den Untereinheiten, besonders solchen Bindungsstellen, die als vorherrschende Epitope nur auf mCRP exprimiert werden. mCRP ist in verschiedenen Geweben im ganzen Körper detektiert worden. Die Abb. 18 veranschaulicht das Modell eines monomeren CRP-Moleküls.

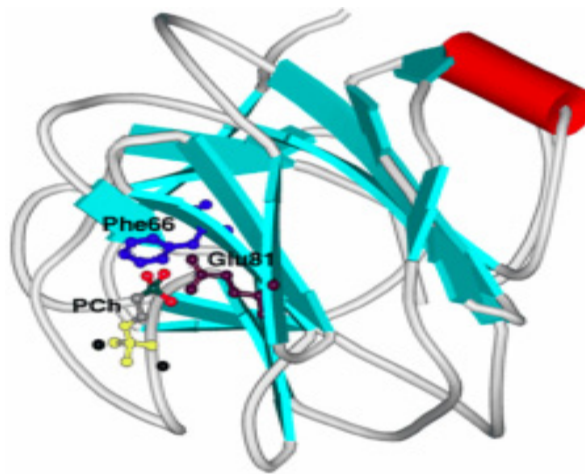


Abb. 18: Bindungsmodell eines monomeren CRP-Moleküls mit einem Phosphorylcholin-Rest (PCh). In der Abbildung sind außerdem die beiden Aminosäuren Phe66 und Glu81, die für die spezifische Bindung essentiell notwendig sind sowie die komplexierten Ca^{2+} -Ionen (schwarze Punkte) dargestellt (Abb. zit. aus Volanakis 2001).

2.4.4.2 Liganden und Rezeptoren des monomeren CRP

Bis heute sind die Rezeptoren des mCRP nicht vollständig charakterisiert worden. Bei humanen Neutrophilen bindet mCRP an Fc γ -RIII (CD16). Jedoch führt eine funktionale Blockade von CD16 zu einer partiellen Inhibition der mCRP-Suppression der Neutrophilen-Apoptose (Khreiss et al., 2002), mildert jedoch nur leicht die mCRP-induzierte Endothelzell-Aktivierung ab und inhibiert teilweise die Monocyten-Adhäsion. Diese Resultate legen die Existenz von zusätzlichen und möglicherweise bedeutenderen Rezeptoren nahe. In einer kürzlichen Studie sind Lipid Rafts (Cholesterinreiche Mikrodomänen in Zellmembranen) identifiziert worden als vorrangige Membranmikrodomänen für die mCRP-Verankerung. Lipid Rafts sind spezialisierte Membranmikrodomänen, die allgegenwärtig in der Plasmamembran von Säugetieren gefunden werden. Sie sind reich an Cholesterol und Sphingolipiden, die kritische Rollen bei zellulärem Signalweg spielen. (Simons, Toomre 2000). Diese Funde sind konsis-

tent mit den biophysikalischen Eigenschaften des mCRPs und schließen ein hohes Maß an hydrophober Oberflächen-Exposition und prominenter α -helikaler Konformation ein, die den Charakteristika von Membranproteinen ähnelt. Die Bindung von mCRP hängt von Cholesterolgehalt ab und wird synergistisch vermittelt durch die mutmaßliche Cholesterolbindungs-Konsensus-Sequenz des CRP (aa35-47) und das C-terminale Octapeptid (aa199-206). Umgekehrt hebt die Unterbrechung der Lipid Rafts entweder mit Methyl- β -Cyclodextrin oder Nystatin mCRP-induzierte Reaktionen auf, welche Zytokin-Freisetzung (Monocyte Chemotactic Protein-1, IL-8), die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies und die Heraufregulierung der Adhäsionsmolekül-Expression umfassen.

2.4.4.3 Die Herkunft des monomeren CRP

Gegenwärtig sind als Ressource des mCRPs in vivo zwei unterschiedliche Mechanismen vorgeschlagen worden.

Lokale Expression: Zahlreiche Studien haben CRP-mRNA in extrahepatischen Zellen wie glatten Muskelzellen von sowohl normalen als auch arteriellen Plaque-Geweben und menschlichem Fettgewebe identifiziert. Ob die synthetisierten Untereinheiten in lösliche, zyklische Pentamere prozessiert werden oder ob es exprimiert wird als die mCRP-Isoform, ist noch unklar. In der Tat legen jüngste Funde nahe, dass CRP-mRNA in U937-Makrophagen eher in die mCRP-Isoform als die pCRP-Isoform prozessiert wird (Ciubotaru et al., 2005).

Lokale Dissoziation: In einer mit ^{125}I markierten pCRP/mCRP-Injektionsstudie an Mäusen wurde auf die komplette lokale Umwandlung von pCRP zu mCRP geschlossen (Motie et al., 1998).

Als Hauptunterschied zu pCRP kann mCRP nicht im peripheren Kreislauf detektiert werden (Eisenhardt et al. unpublizierte Daten), was weiter den Gedanken von einer lokalisierten Dissoziation/Expression des Proteins unterstützt (Eisenhardt et al. 2009).

2.4.4.4 Monomeres CRP und Komplement

pCRP ist bekannt als Aktivator des klassischen Komplement-Signalwegs. Jedoch darüber, wie mCRP Komplement aktiviert, ist wenig bekannt. Kürzlich konnte nur gezeigt werden, dass mCRP das Potential hat, mit Komplement zu interagieren, indem es an C1q anbindet. Faszinierenderweise kann mCRP die Komplement-Aktivierung auf 2 Signalwegen regulieren,

je nachdem, ob es in der Flüssigkeitsphase oder gebunden an Oberflächen vorkommt. Ligandenfreies mCRP kann die Bindung von C1q mit anderen Komplement-Aktivatoren herstellen und so die inhibitorische Aktivität des Komplements aufweisen. Im Gegensatz dazu kann mCRP, wenn es immobilisiert oder gebunden an oxidiertes oder enzymatisch modifiziertes Low-Density-Lipoprotein (LDL) ist, den klassischen Komplement-Signalweg aktivieren via Bindung an C1q, was zum Umsatz von C3 führt, wobei die destruktivere Terminalsequenz durch Rekrutierung des Faktors H weiträumig umgangen wird. In Übereinstimmung mit diesen Funden kann mCRP die Komplementaktivierung in einer effektiveren und flexibleren Art und Weise als pCRP regulieren (Eisenhardt et al. 2009).

2.4.4.5 Immunohistochemische Detektion des mCRP

Kürzlich wurde in atherosklerotischen Läsionen die Akkumulation von mCRP, eher als pCRP, beobachtet. Darüber hinaus korrelierte die mCRP-Markierung mit Gebieten, die für Makrophagen und Thrombozyten markierten, was eine Interaktion mit diesen Zellen nahelegt. Wie schon oben erwähnt, gibt es wachsende Evidenz, dass der Ablagerung von mCRP in Entzündungsarealen ein lokalisierter Dissoziationsmechanismus des zirkulierenden pCRP vorausgeht und mCRP könnte, aber nicht pCRP, zur Atherogenese durch Hervorbringung der Schaumzellentwicklung beitragen. Somit gibt es wachsende Evidenz, dass der Ablagerung von mCRP in Entzündungsarealen ein lokalisierter Dissoziationsmechanismus des zirkulierenden pCRP vorausgeht (Eisenhardt et al. 2009).

3 Material und Methoden

3.1 Puffer und Lösungen

PBS-Lösung: KCl 0,2 g/l KH₂PO₄ 0,2 g/l NaCl 8,0 g/l Na₂HPO₄ 1,15 g/l pH 7,4 und steril filtern 10 x TBS: 24,2 g Tris 88,0 g NaCl pH 7.6 1 x TBST : 1 x TBS 0,1 % Tween 20 pH 7,6 1 x TBSTM: 1 x TBST + 6% Magermilchpulver Lysispuffer: 5 mM Tris 0,2 mM PMSF 0,5 mg/L Leupeptin 5 mM Dithiothreitol pH 7,6 Standardproteinlösung: 20 mg BSA 20 ml dH₂O Trenngel-Puffer: (4x, 500 ml, pH 8,8) 90,82 g Tris 2,0 g SDS SDS-PAA-Laufpuffer (1x) 25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS	Sammelgel-Puffer: (10x, 500 ml, pH 6,8) 15,14 g Tris 1,0 g SDS 10 x Laufpuffer (ohne SDS): 30,3 g Tris 144 g Glycin ad 1L H₂O 1 x Transferpuffer: 1 x Laufpuffer mit 20% Methanol (giftig!) Bradford-Reagenz: Coomassie Blue G 250 10% (V/V) Phosphorsäure 5% (V/V) Ethanol 96% RLT⁺-Puffer: 350 µl RLT-Puffer 3,5 µl β-Mecaptoethanol OD-Meßpuffer 100 µl 1 mmol EDTA 500 µl 10 mmol Tris/HCL pH 7.5 ad 50 ml nucleasefreies Wasser (Merck) Proben-Puffer: 50 mM Tris 2% (w/v) SDS 10% (w/v) Glycerin 0,005% Bromphenolblau Tankpuffer (10x, pH 8,6) 15,15 g Tris 72 g Glycin 5 g SDS 500 ml Aqua bidest.
--	--

3.2 Methoden

Um dieser Frage „Welche Rolle spielt das CRP - d. h. das kommerziell erhältliche CRP mit dem Konservierungsstoff Natriumazid ($\text{CRP}^{+/+}$) und das gereinigte ohne diesen ($\text{CRP}^{-/-}$) - bei der Regulation der B_2 -Rezeptor-Expression und der Entstehung von Angioödem?“ nachzugehen, wurde in dieser Arbeit die Bradykinin- B_2 -Rezeptor-Expression auf isolierten und kultivierten Endothelzellen der humanen Nabelschnur und auf Aortenendothelzellen des Schweins nach Zugabe von $\text{CRP}^{+/+}$ oder $\text{CRP}^{-/-}$ mittels Western Blot untersucht. Zur qualitativen Analyse der Western Blot-Daten wurde eine RT-PCR durchgeführt. Abschließend wurden die RT-PCR-Daten mittels einer Real-time quantitative PCR auch quantitativ ausgewertet. Abb. 19 (1, 2, 3, 4) zeigt schematisch die Vorgehensweise bzw. das Versuchsprogramm zur Klärung der CRP-Rolle bei der Entstehung des Angioödems.

Tierische Zellen (Schweinendothelzellen)

↓
ohne $\text{CRP}^{+/+}$
mit $\text{CRP}^{+/+}$
Expressionsgrad = $f(t)$

Menschliche Zellen (Nabelschnurendothelzellen)

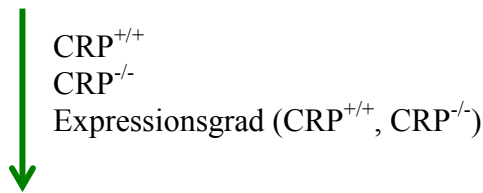
↓
ohne $\text{CRP}^{+/+}$
mit $\text{CRP}^{+/+}$
Expressionsgrad = $f(t)$

Tumorzellen als Positivkontrolle (Plattenepithelkarzinom)

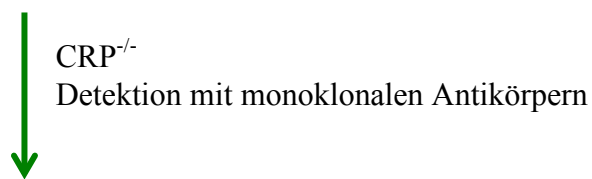
1. Zur Ermittlung der optimalen Zeit für die $\text{CRP}^{+/+}$ -vermittelte Induktion der B_2 -Rezeptor-Expression wurden Schweine- und Nabelschnurendothelzellen mit vorher festgelegter CRP-Konzentration für eine unterschiedliche Zeitdauer inkubiert. Zur Kontrolle dienten Zellen der gleichen Zellkultur ohne Zugabe von $\text{CRP}^{+/+}$. Als Positivkontrolle dienten Zellen des Plattenepithelkarzinoms, die stets B_2 -Bradykininrezeptoren exprimieren.

↓
Zeitauswahl $t_{\text{opt.}}$
Expressionsgrad = $f_{t_{\text{opt.}}}(\text{c}_{\text{CRP}^{+/+}})$

2. Zur Ermittlung der optimalen $\text{CRP}^{+/+}$ -Konzentration für die $\text{CRP}^{+/+}$ -vermittelte Induktion der B_2 -Rezeptor-Expression wurden Schweine- und Nabelschnurendothelzellen mit der optimalen Zeit bei unterschiedlichen CRP-Konzentrationen inkubiert. Zur Kontrolle dienten Zellen der gleichen Zellkultur ohne Zugabe von $\text{CRP}^{+/+}$. Als Positivkontrolle dienen Zellen des Plattenepithelkarzinoms, die stets B_2 -Bradykininrezeptoren exprimieren.



3. Untersuchung des Einflusses von Natriumazid auf die B₂-Rezeptor-Expression bei den Endothelzellen des Schweins. Das in 1. und 2. beschriebenes Vorgehen wurde an Schweinendothelzellen mit gereinigtem (natriumazidfreiem) CRP^{-/-} durchgeführt. Anschließend wurden die Daten miteinander verglichen.



4. Untersuchung eines alternativen Antikörpers zur Verbesserung der Bandendetektion

CRP^{+/+}: CRP konserviert mit 0,05% NaN₃
 CRP^{-/-}: gereinigtes CRP ohne NaN₃
 t_{opt}: optimale Zeit
 CCRP^{+/+}: Konzentration von CRP^{+/+}

Abb. 19: Schematische Vorgehensweise zur Klärung der CRP-Rolle bei der Entstehung des Angioödems.

3.2.1 Zellkulturarbeiten

Zelllinien

Zur Prüfung der Fragestellung wurden drei etablierte Zelllinien als Untersuchungs-medium ausgewählt:

1. Humane Plattenepithelkarzinom-Zellen (DU-SCC 2)
2. Humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)
3. Porcine Aortenendothelzellen (PAEC)

1. Humane Plattenepithelkarzinom-Zellen (DU-SCC 2) wurden freundlicherweise von Frau Dr. Balz aus dem Hals-Nasen-Ohren-Labor der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf zur Verfügung gestellt.
2. Die humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) wurden aus Nabelschnurvenen isoliert. Das Gewebe wurde von der Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Die Nabelschnurentnahme und Nutzung zur wissenschaftlichen Zwecken wurden durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität genehmigt.
3. Die porcinen Aortenendothelzellen wurden aus Schweineaorten isoliert. Die Schweineaorten wurden frisch aus regionalen Schlachthöfen (Duisburg und Krefeld) bezogen.

Zellkulturmedien

Die Zelllinie des humanen Plattenepithelkarzinoms (DU-SCC 2) wurde in MEM-Medium kultiviert. Das Medium wurde mit 2 mM L-Glutamin, 100 U/ ml Penicillin G, 100 µg/ ml Streptomycin, 0,85% Amphotericin B und 10 % fetalem Kälberserum (fetal calf serum = FCS) supplementiert.

Die Schweineaortenendothelzellen (porcine aortal endothelial cells = PAEC) sowie die humanen Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cells = HUVEC) wurden unter sterilen Bedingungen in einem Nährmedium kultiviert.

Folgende Substanzen enthielt das Nährmedium:

0.05 µg/ ml Amphotericin B

50 µg/ ml Gentamicin

1.0 ng/ ml hbFGF (human basic Fibroblast Growth Factor)

0.1 ng/ ml hEGF (human Epidermal Growth Factor)

1% ECGS/ H-2 (Endothelial Cell Growth Supplement / Heparin, 2 ml)

2% fetales Kalbserum (fetal calf serum = FCS)

Es wurde jeweils 500 ml Nährmedium angesetzt, welches bei 4°C gelagert und innerhalb von 10 Tagen aufgebraucht wurde.

Als Kontrollmedium wurde serumfreies Endothelzellbasalmedium mit 0.05 µg/ml Amphotericin B und 50 µg/ml Gentamicin verwendet. Es wurde jeweils 500 ml Kontrollmedium angesetzt, bei 4° C gelagert und innerhalb von 2 Wochen aufgebraucht.

Die Medien sowie deren zu supplementierende Bestandteile wurden von folgenden Firmen bezogen:

MEM	Gibco, Karlsruhe
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe
Penicillin G	Gibco, Karlsruhe
Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Endothelial Cell Basal Medium	PromoCell, Heidelberg
SupplementPack / Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell, Heidelberg
(FCS-10, ECGS/H-2, hEGF-0.05, hbFGF-0.5, Gentamicin-25, Ampho B-0.025)	

3.2.1.1 Zellkultur des humanen Plattenepithelkarzinoms (DU-SCC 2)

Kultivierung und Passagieren

Bei der Plattenepithelkarzinom-Zelllinie DU-SCC 2 handelte es sich um eine adhärent wachsende Zelllinie. Die Zellen wurden in sterilen Petrischalen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) mit einer Fläche von 60 cm² kultiviert und einmal wöchentlich passagiert. Dazu wurden die Zellen mit 1,5 ml Dispersionslösung von der Platte gelöst. Dieser Vorgang dauerte fünf Minuten in einem Inkubator (Heraeus, Hanau) bei 37°C. Nach Ablösen der Zellen von der Platte wurden diese in ein 50 ml Falcongefäß (Becton Dickinson, Heidelberg) überführt und bei 800 rpm (Minifuge, Heraeus, Hanau) für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet entweder zur Proteinextraktion in 200 µl Lysispuffer resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt oder in 6 ml Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) aufgenommen und in Petrischalen mit einer Fläche von 60 cm² eingesetzt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C, 95%iger Luftfeuchtigkeit bei 5% CO₂ kultiviert.

3.2.1.2 Zellkultur aus humanem Nabelschnurendothel (HUVEC)

Die Präparation der kultivierten Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer Zellbank (Gelaire Laminar Air Flow BSB6, Australien).

Aus den Venen humaner Nabelschnüre wurden Endothelzellen isoliert. Die Nabelschnüre, die zur Zellisolierung eingesetzt wurden, waren maximal 24 Stunden alt und wiesen keine mechanischen Schädigungen auf. Sie wurden bis zu ihrer Verwendung in sterilem Puffer bei 4°C gelagert.

Die potentiell geschädigten Nabelschnurenden wurden um ca. einen Zentimeter gekürzt, Kanülen wurden in die Nabelschnurvenen eingeführt, Blutreste und -gerinnsel wurden mit ca. 50 ml PBS-Puffer durchgespült.

Nach Verschluss der unteren Öffnung mit einer Rochesterklemme wurde eine ausreichende Menge Dispase-Lösung, abhängig von der Größe der Nabelschnur, in die Vene hineingespritzt, bevor die Kanüle mit einem Stöpsel verschlossen wurde. Anschließend wurde sie in einen CO₂-freien Inkubator bei 37°C gelegt.

Nach 60-minütiger Inkubationszeit ließen wir die Dispase-Zellsuspension in ein 50 ml Falcongefäß laufen, spülten mit 10 ml Nährmedium mit Kälberserum nach und zentrifugierten für 5 min bei 800 rpm und Raumtemperatur. Im weiteren Schritt wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 20 ml Nährmedium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) mit einer Fläche von 175 cm² ausgesät.

3.2.1.3 Zellkultur aus Schweineaortenendothel (PAEC)

Die Schweineaorten wurden unmittelbar nach dem Schlachten der Tiere im Schlachthof entnommen und in sterilem Puffer bis zur Bearbeitung aufbewahrt. Die weitere Verarbeitung erfolgte innerhalb von 4 Stunden.

Ab hier wurden alle Arbeitsschritte bei uns ausschließlich mit sterilen Materialien und unter einer Sterilbank mit laminarem Luftzug durchgeführt.

Fett- und Bindegewebsanteile der Aorten-Gefäßwand wurden herauspräpariert. Danach wurde die Schweineaorta auf ca. 9 cm Länge halbiert und zur Spülung in einem 500 ml PBS-haltigen Sammelgefäß bis zur Weiterbearbeitung aufbewahrt. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Aorta in Längsrichtung an der Linie der austretenden Interkostalgefäße aufgeschnitten, bevor sich ein mehrmaliges Spülen mit PBS anschloss. Zur weiteren Isolierung der Endothelzellen

wurde das Präparat zwischen der Eisenplatte und dem Metallrahmen unter leichtem Zug eingespannt, wobei die Endothelseite nach oben zeigte (Abb. 20).

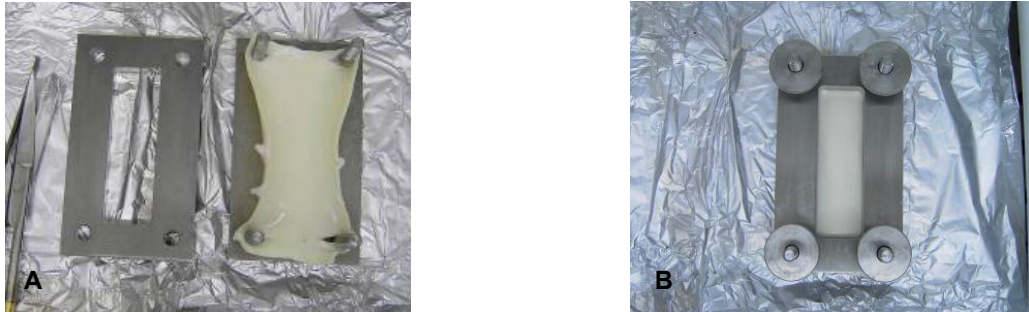


Abb. 20 A, B: Dargestellt ist die Verarbeitung der Aorta. Nach Aufschrauben der Metallplatte wurde eine ca. 9 cm lange Aorta an den vier Mutterschrauben eingespannt, bevor der Metallrahmen aufgesetzt und eingeschraubt wurde.

Anschließend wurden 5 ml Dispaselösung in die 2 x 7 cm große Aussparung gegeben. Die so fixierte Aorta wurde für 60 Minuten in einen kohlendioxidfreien Inkubator bei 37°C gelegt. Die enzymatisch dissoziierten Endothelzellen wurden mit Hilfe einer 10 ml Pipette durch mehrmaliges Pipettieren - ohne die Wand zu berühren - von der Gefäßwand gelöst. Die gewonnene Zellsuspension wurde in ein steriles 50 ml Falcongefäß überführt und anschließend für 5 min bei 8000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation erfolgte das Absaugen des Überstandes und Resuspension des Zellpellets mit 20 ml Nährmedium. Die Zellsuspension wurde schließlich in einer Zellkulturflasche mit der Fläche von 175 cm² ausgesät.

Kultivierung und Passagieren

Alle Zellen wurden in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37 °C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach der Adhäsion der Endothelzellen erfolgte das Waschen der Zellkultur nach 24 Stunden zum Entfernen von nicht anhaftenden Zellen (z.B. Erythrozyten, Zelltrümmern) sowie Bindegewebsresten. Hierbei wurde der Überstand verworfen und die Kultur dreimal mit 10 ml PBS-Puffer gespült und anschließend wieder mit 20 ml Nährmedium inkubiert. Im Weiteren wurde die Zellkultur alle drei Tage mit frischem Nährmedium versorgt. Bis zum konfluenten Wachstum der Zellen vergingen 6-7 Tage. Bei konfluenten Zellplatten wurde das Nährmedium von den Endothelzellen abgesaugt und anschließend die Zellen mit 10 ml steriler PBS-Lösung gewaschen. Zur Lösung der Zellen wurden 5 ml EDTA/

Trypsin-Lösung auf die Zellen hinzugegeben. Anschließend wurde die Kultur in kohlendioxidfreiem Inkubator für max. 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Ablösen der Zellen von der Platte wurden diese mit 10 ml steriler PBS-Lösung durch dreimaliges Auf- und Absaugen in ein 50 ml Falcongefäß überführt und für 5 min bei 800 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach erfolgte das Absaugen des Überstandes und die Resuspension des Zellpellets mit 6 ml Nährmedium. Die Zellsuspension wurde auf mit 2%iger Gelatine beschichteten Zellkulturschalen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) mit einer Fläche von 60 cm² ausgesät und in einem Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Im Weiteren wurde die Zellkultur alle drei Tage mit frischem Medium versorgt und ihre Konfluenz unter einem Lichtmikroskop (Olympus IX 50, Japan) überprüft.

Alle verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37°C erwärmt und gehalten.

Die in destilliertem Wasser gelösten Substanzen wurden nach Einstellung des pH-Wertes 7,4 auf 5 Liter aufgefüllt und anschließend durch einen Celluloseacetatfilter (Porengröße 0,22 µm) steril filtriert. Die sterile PBS-Lösung wurde bis zu ihrem Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

Nabelschnur- und Schweineaortenpuffer:

PBS-Puffer	500 ml
0,9% NaCl	100 ml
Benzylpenicillin	5 Mio. I.E.

Dem sterilen PBS-Puffer wurde das Breitband-Antibiotikum Benzylpenicillin hinzugegeben, um das Wachstum von Bakterien zu verhindern.

Dispase-Lösung:

Dispase Typ II wurde mit einer Endkonzentration von 2,7 g/L in sterilem PBS-Puffer gelöst und anschließend durch einen Celluloseacetatfilter (Porengröße 0,22 µm) steril filtriert. Bis zum Gebrauch wurde die Dispase-Lösung bei 4°C aufbewahrt.

Trypsin/ EDTA-Lösung:

Die Trypsin/ EDTA-Lösung in 10-facher Konzentration wurde von PAA Laboratories GmbH in Österreich bezogen. Nach der Verdünnung mit sterilem PBS-Puffer wurde die einfache Konzentration erreicht und dann in einem 50 ml Falcongefäß bei -20°C aufbewahrt.

Gelatinelösung (2%-ig):

2 g Gelatine (Merk, Darmstadt) wurden mit 90 ml destilliertem Wasser aufgefüllt und anschließend autoklaviert. Bis zum Gebrauch wurde die Gelatinelösung bei 4°C aufbewahrt.

3.2.2 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration diene als Methode der Aufkonzentrierung sowie der Aufreinigung von Proben. Das Prinzip beruht darauf, dass Stoffe mit kleinem Molekulargewicht (z.B. Natriumazid) während der Zentrifugation membrangängig sind und in den Auffangzylinder gelangen, wogegen Stoffe mit großem Molekulargewicht (z.B. C-reaktives Protein) an der Membran hängen bleiben und durch die Abnahme des Volumens im Probenreservoir aufkonzentrieren. Dabei ist zu beachten, dass das Volumen des Retentates nach jeder Zentrifugation etwa 1/5 des Anfangsvolumens beträgt, um ein Durchzentrifugieren der nicht membrangängigen Moleküle zu verhindern.

Isolierung der CRP-Lösung vom eingesetzten Natriumazid

Zur Aufreinigung der CRP-Lösung (Calbiochem, EMD Biosciences, Merck, Darmstadt), die 0,05%iges Natriumazid als Konservierungsmittel enthielt, diene ein Centricon-Röhrchen des Typs YM-30 (Millipore, Bedford, USA) mit einer Ausschlussgrenze von 30.000 Dalton. Das hierbei verwendete native CRP von Calbiochem ist ein Pentamer mit einem Gesamtmolekulargewicht von 115 kDa, dass jedoch in Monomere und Dimere zerfällt, Natriumazid (NaN_3) dagegen hat ein Molekulargewicht von 65 g/mol.

Es wurde zunächst 1 ml PBS-Puffer in das Probenreservoir gefüllt und anschließend für 15 Minuten mit 3000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dieser Vorgang diene zur Befeuchtung der Membran. Nach dem Verwerfen des Durchlaufes wurde 2 ml CRP-Lösung in das Probenreservoir gegeben und für 25 Minuten bei 3000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Filtrat wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bis zum Gebrauch in einem Eppendorfstand aufbewahrt (→ Filtrat A₁). Im weiteren Schritt wurde das Probenreservoir mit sterilem PBS auf 2 ml gefüllt und für 25 Minuten bei 3000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Schließlich wurde das Filtrat in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bis zum Gebrauch in einem Eppendorfstand aufbewahrt (→ Filtrat A₂). Es folgten zwei weitere Durchgänge, wie in den oberen Schritten beschrieben, bis das Retentat vollständig frei von Natriumazid war. Am Ende des vierten Durchganges wurde der Auffangszylinder gut mit destilliertem Wasser ausgewaschen und mit 1 ml PBS-Puffer aufge-

füllt. Das Centricon-Röhrchen wurde so umgedreht, dass der Auffangszylinder über dem Probenreservoir auflag und anschließend für 15 Minuten bei 3000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Hierbei sollte der PBS-Puffer das restliche C-reaktive Protein, das an der Membran hängen geblieben war, ausspülen. Abschließend wurde das CRP-Retentat und die Reagenzien des Filtrates auf ihre Reinheit mit Hilfe eines Photometers überprüft.

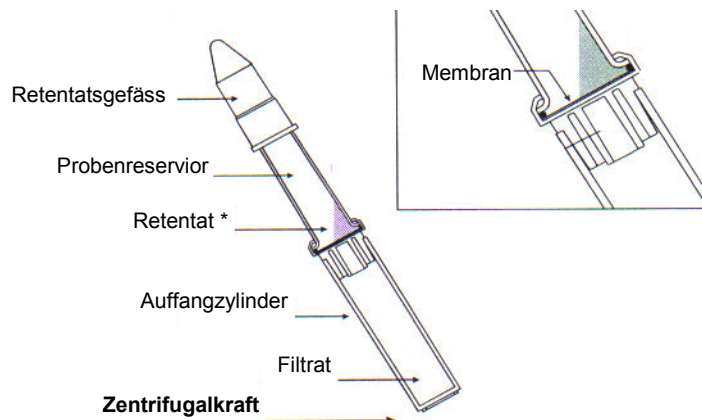


Abb. 21: Dargestellt ist ein Centricon-Röhrchen des Typs YM-30. * Aufkonzentrierung der Probe

3.2.3 Reinheitsprüfung des CRP-Retentats

Die Reinheitsprüfung des CRP-Retentats wurde durch Absorptionsmessung bei 190 bis 500 nm mit dem Photometer (Beckmann, DU 530 Lifescience UV/VIS Spectrometer) durchgeführt.

Reinheitsprüfung des CRP-Retentats mittels Photometer

Bevor die Reinheitsprüfung des CRP-Retentats mittels eines Photometers durchgeführt wurde, war mit 4 weiteren Proben gearbeitet worden, die sich durch ihre Zusammensetzung der gelösten Stoffe unterschieden. Anhand dieser Proben und ihrer Absorptionsspektren sollten Rückschlüsse auf die Reinheit des CRP-Retentats gezogen werden.

Die Proben hatten folgende Endkonzentration:

Proben	Zusammensetzung der gelösten Stoffe
Puffer ohne 0,05% NaN ₃	20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , pH 7,5

Puffer + 0,05% NaN ₃	20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 0.05% NaN ₃ , pH 7.5
CRP (Calbiochem)	20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 0.05% NaN ₃ , 1 mg CRP/ml, pH 7.5
PBS-Puffer	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 8.3 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4

Tab. 3: Bestimmung der Reinheit des CRP-Retentats mittels 4 bekannter Proben.

Hierbei wurden alle - einschließlich der durch Ultrafiltration gewonnenen - Proben mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt. Danach wurden 500 µl der verdünnten Proben in eine UV-Küvette überführt und bei einer Wellenlänge zwischen 190 und 500 nm photometrisch bestimmt. Dabei diente der Puffer ohne 0,05 %iges NaN₃ als Baseline für folgende Lösungen: Puffer mit 0,05% NaN₃, CRP (Calbiochem), PBS-Puffer und Filtrate.

Für die Bestimmung des Absorptionsspektrums des CRP-Retentats diente der PBS-Puffer als Baseline und für das CRP (Calbiochem) der Puffer mit 0,05%igem NaN₃.

Wirkungsprüfung des gereinigten CRP-Retentats auf isolierte Gefäße im Organbad

Das Abgangsgefäß der rechten Koronararterie wurde mit 8 µM PGF_{2α} bis zum Erreichen des Plateaus der Kurve vorkontrahiert. Dies Plateau wurde bei etwa 70 % der maximalen Kontraktion erreicht. Anschließend wurde 10 – 50 µl CRP^{-/-} ins Organbad gegeben. Anschließend folgte als Vergleich die Wirkungsprüfung des CRP von Calbiochem (CRP^{+/+}).

Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurden 5 µl des gewonnenen CRP-Retentats entnommen, in eine 96-Wellplatte überführt und mit 200 µl Bradford-Reagenz gemischt. Nach kurzer Inkubation wurde die Extinktion der Probe bei 595 nm im Photometer (Bio Rad, München) bestimmt. Als Standard diente CRP (Calbiochem) in den Konzentrationen 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2, 3.6, 4.0 µg/ µl.

3.2.4 Inkubation des Zellkulturen mit CRP

Nach der Konfluenz der Zellen wurde das Nährmedium von den Zellen abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und für weitere 24 Stunden in Kontrollmedium kultiviert. Anschließend wurden die zu untersuchenden Faktoren in dieses Medium hineinpipettiert und die RNA sowie die Proteinextrakte zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 3, 6, 12 und 24 Stunden) isoliert. Die Negativkontrolle war stets das unkonditionierte Medium (siehe Tabelle 3).

Die verwendeten Faktoren ließen sich in zwei Gruppen unterteilen:

1. CRP von Calbiochem mit 0,05 % igem NaN_3 ($\text{CRP}^{+/+}$)
2. Gereinigtes CRP ohne 0,05 % iges NaN_3 ($\text{CRP}^{-/-}$)

Im Folgenden werden die Gruppen nur noch mit den in den Klammern angegebenen Abkürzungen verwendet.

Nach Erreichen der gewählten Inkubationszeit wurde das Medium von den Zellen verworfen, diese mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend 1,5 ml Trypsin/ EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben, bevor diese für 5 Minuten bei 37° C im kohlendioxidfreien Brutschrank inkubiert wurden. Um die Zellvereinzelung zusätzlich zu verbessern, wurde die Zellsuspension mehrfach mit einer sterilen Pipette auf- und abpipettiert. Zur Erleichterung dieses Vorganges wurde 10 ml PBS-Puffer in die Schale gegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Falcongefäß überführt und für 5 Minuten bei 5000 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das gewonnene Zellpellet zur sofortigen Weiterverarbeitung auf Eis gestellt.

3.2.5 Molekularbiologische Methoden

3.2.5.1 Nukleinsäure-Analytik

RNA-Extraktion

Zur Isolierung des RNA-Gesamtgehaltes der Zellen wurde ein kommerzieller Kit (RNeasy® Mini Kit, QIAGEN, Hilden) verwendet. Das aus 3.2.4 gewonnene Zellpellet wurde in 350 µl RLT^+ -Puffer resuspendiert und bis zur vollständigen Auflösung der Zellen mit einer Eppendorfpipette auf- und abpipettiert. Der Guanidin-Isothiocyanat enthaltende Puffer sicherte die gesamte Ausbeute von intakter RNA durch Inaktivierung der RNase bei der Denaturierung der Proteine. Im nächsten Schritt wurde das Zelllysate auf die QIAshredder™ Säule ge-

geben, bevor es für zwei Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Die Zentrifugation trennte die gesamte RNA von DNA und Proteinen. Nach dem Verwerfen der QIAshredder™ Säule wurde das homogenisierte Lysat mit 350 µl einer 70%igen Ethanollösung versetzt und in eine neue, sterile RNeasy® Säule gegeben. Nach einminütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm und Raumtemperatur war die gesamte RNA an der Silicium-Gel-Membran gebunden. Der Durchlauf wurde verworfen und in die RNeasy® Säule wurde 350 µl RW1-Puffer gegeben, bevor diese für 1 Minute bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Nach dem Verwerfen des Durchlaufes wurde 80 µl DNase Mix zur Verdauung der übrig gebliebenen DNA in die RNeasy® Säule gegeben und anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach diesen 15 Minuten wurde der Ansatz, wie im oberen Schritt beschrieben, mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen, bevor er für eine Minute bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Nach dem Verwerfen des Durchlaufes wurde die RNeasy® Säule auf ein frisches, steriles Auffanggefäß gegeben, mit 500 µl RPE-Puffer versetzt, zunächst für eine Minute und anschließend für zwei Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der zuletzt genannte Schritt diente zu Entfernung des restlichen Ethanol, welches sonst bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit dem Primer reagieren könnte. Abschließend wurde die RNeasy® Säule auf ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt und 50 µl RNase-freies Wasser (Merk®, Darmstadt) zum Ablösen der RNA von der Membran in die Säule gegeben und für eine Minute bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Eluat wurde erneut in die Säule gegeben und anschließend, wie im vorherigen Schritt beschrieben, zentrifugiert.

Bestimmung des RNA-Gesamtgehaltes

Zur quantitativen photometrischen RNA-Konzentrationsbestimmung (Spectrometer DU 530, Beckmann) wurden 5 µl des Eluates entnommen, in 45 µl OD-Meßpuffer aufgenommen, in eine Küvette überführt und anschließend bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt. Die restliche Lösung konnte zur Synthese der cDNA durch die Reverse Transkription entweder sofort verwendet oder bis dahin bei -80 °C gelagert werden. Um die Effizienz der Proteintrennung zu überprüfen, wurden zusätzlich die Extrakte bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Das Verhältnis der Extinktion bei 260 und 280 nm sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen, um eine möglichst reine RNA-Suspension vorliegen zu haben. Da die benötigte

Menge an RNA für die Reverse Transkription 2 µg ist, wurde anschließend das Volumen ausgerechnet, in dem diese Menge RNA gelöst ist (1 OD entspricht 25 µg RNA/ml).

Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wurden je 2 µg RNA plus 2 µl Hexanukleotide (100 pg/µl, Sigma, Deisenhofen) pro Ansatz zur cDNA-Synthese eingesetzt, wobei diese Menge mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 24 µl aufgefüllt wurde. Diese 24 µl wurden anschließend für fünf Minuten bei 65°C im Thermocycler (Biometra, Göttingen) denaturiert, bevor sie für weitere fünf Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt wurden. Während dieser Zeit konnte der Premix hergestellt werden.

Der Premix für einen Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

8 µl 5xRT-Puffer (Sigma[®], Deisenhofen)

4 µl DTT (100 mM, Sigma[®], Deisenhofen)

2 µl dNTP-Mix (10 mM, Sigma[®], Deisenhofen)

1 µl SUPERase In (20 U/µl, Ambion, Wiesbaden)

1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl, Sigma[®], Deisenhofen)

Im Anschluss daran wurden 16 µl des Premix je Probe hinzugefügt. Die Reverse Transkription lief für eine Stunde bei 37°C im Thermocycler weiter, bevor die gebildete cDNA für fünf Minuten bei 95°C denaturierte. Die gewonnene cDNA-Lösung konnte zur Vervielfältigung der cDNA durch PCR entweder sofort verwendet oder bis dahin bei 4°C gelagert werden.

3.2.5.2 PCR-Reaktionen zur Amplifikation von cDNA

Um zu überprüfen, ob das Gen für den B₂-Rezeptor in mRNA transkribiert wurde, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction) durchgeführt. Hierzu wurden 5 µl cDNA und 20 µl des hergestellten PCR-Ansatzes in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt, gut gevortext und bei einer für den Primer spezifischen Zyklenanzahl und Temperatur im Cycler bearbeitet. Für den mRNA-Nachweis des B₂-Rezeptors wurden folgende Primer-Sequenzen des Schweins und der humanen Nabelschnur verwendet:

Brad-B₂-Rez-f (PAEC): 5'-GCC-TCT-TTT-CCG-CTT-TCT-TT-3'

Brad-B₂-Rez-r (PAEC): 5'-GTG-TCC-AGG-AAG-GTG-CTG-AT-3'

Brad-B₂-Rez-f (HUVEC): 5'-CAC-ATC-CCA-CTC-TGA-GTC-CA-3'

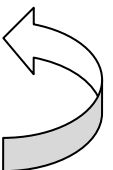
Brad-B₂-Rez-r (HUVEC): 5'-CAG-CAC-AAC-CAG-GAC-TAG-CA-3'

Der PCR-Premix für einen Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

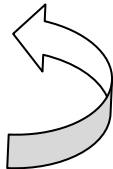
15,86 µl	dH ₂ O (Merk [®] , Darmstadt)
2,5 µl	10 x Puffer (QIAGEN, Hilden)
0,5 µl	dNTP (10 mM, QIAGEN, Hilden)
0,5 µl	Primer 1 (20 µM)
0,5 µl	Primer 2 (20 µM)
0,13 µl	Taq-Polymerase (QIAGEN, Hilden)

Im Thermocycler liefen 2 Programme durch. In dem 1. Programm wurden die cDNA des Schweins vervielfältigt und in dem 2. Programm die cDNA der Nabelschnur:

Programm 1

Denaturierung	3 min 94°C		40 Cyclen
	30 sec 94°C		
Annealing	30 sec 63°C		
Elongation	45 sec 72°C		
	5 min 72°C		

Programm 2

Denaturierung	3 min 94°C		40 Cyclen
	20 sec 94°C		
Annealing	30 sec 64°C		
Elongation	45 sec 72°C		
	5 min 72°C		

3.2.5.3 DNA-Gelelektrophorese

Zur Trennung der PCR-Amplifikate wurden die Proben in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer auf ein natives 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen.

TBE-Puffer (10x)

890 mM	Tris	(Roth)
890 mM	Borsäure	(Merck)
20 mM	EDTA	(Sigma)

Agarose-Gel-Lösung

0,525 g	Agarose
75 ml	TBE-Puffer (1x)
0,75 µl	Ethidiumbromid

Um das Gel zu verflüssigen, wurden 75 ml TBE-Puffer zusammen mit 0,525 g Agarose in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht, so dass eine homogene Lösung entstand. Anschließend wurden 0,75 µl Ethidiumbromid hinzugegeben, gut vermischt und in eine Gelkammer gegossen. Nach ca. 30 minütiger Erkaltungsphase konnte der Profilformer gezogen und das Gel mit den Proben beladen werden. Zu 5 µl Probe wurde zuvor 5 µl 2 x DNA-Probenpuffer hinzupipettiert. Zur Bestimmung der Fragmentgröße der zu untersuchenden cDNA-Proben wurde 2 µl eines DNA-Längenmarkers (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus, # SM 0321, Fermentas) ebenfalls auf das Gel aufgetragen.

DNA-Auftragspuffer (10x)

50 %	Glycin	
50 mM	EDTA	
0,1 %	Bromphenolblau	(Sigma)
0,1 %	Xylencycanol	(Fluka)

in 10x TBE

Die Gelelektrophorese fand mit 1 x TBE als Laufpuffer unter einer konstanten Spannung von 119 Volt bei einer Laufzeit von ca. 20 min statt. Um die Ergebnisse zu visualisieren, erfolgte im Anschluss die Betrachtung unter UV-Beleuchtung (UV-Platte, Biometra®, Göttingen). Die Gele wurden abfotografiert (Polaroid, Fotodyne®). Der in die doppelsträngige DNA interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid fluoreszierte violett.

3.2.5.4 Real-time (RT) quantitative PCR zur Amplifikation von cDNA

Die Real-time quantitative PCR ist eine moderne Methode, die erlaubt, mit Hilfe der fluorochrommarkierten Sonde und der Detektion des von ihr emittierten Fluoreszenzsignals die DNS-Amplifikation während der PCR zu verfolgen.

Grundprinzip der QuantiProbe

Für die Real-time quantitative PCR wurde der QuantiTectTM Custom Assay (QIAGEN, Hilden) benutzt, der eine fluoreszenzmarkierte Sonde enthält. Das Prinzip dieser Sonde basiert auf dem Zusammenspiel von Fluorophor (am 3'-Ende der Sonde), einem nicht fluoreszierenden Quencher (am 5'-Ende) und dem dazwischen liegenden Minor Groove Binder (MGB). Bei dem MGB handelt es sich um ein Oligonukleotid, das zu der Template-DNA homolog ist und den Abbau der Sonde durch Taq-DNS-Polymerase während der Extensionsphase verhindert. In der Lösung liegt die Sonde in zufällig gefalteter Form vor. Wird die intakte Sonde mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, so wird die Fluoreszenz des Fluorophors aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher unterdrückt. Bindet die Sonde während des Annealings jedoch an das Template, trennen sich Fluorophor und Quencher voneinander und ein Fluoreszenzsignal wird detektiert. Danach trennt sich die Sonde von der Template-DNS und kehrt zu ihrer ursprünglich gefalteten Form zurück (Abb. 22).

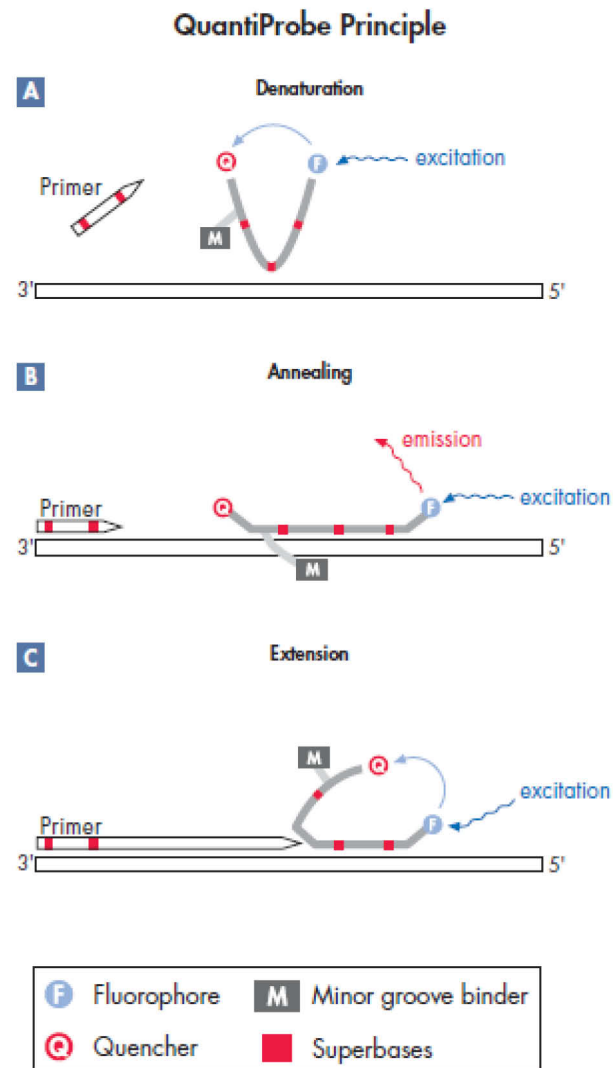


Abb. 22: Darstellung des Grundprinzips von QuantiProbe™. **A.** Wenn sie nicht an ihre Zielsequenz gebunden ist, bildet die QuantiProbe eine zufällige Struktur in der Lösung. Die Nähe des fluoreszierenden Reporters zu dem Quencher hindert den Reporter am Fluoreszieren. **B.** Durch den PCR-Annealing-Schritt hybridisiert die QuantiProbe mit ihrer Zielsequenz. Dies trennt den fluoreszierenden Farbstoff und dem Quencher voneinander und resultiert in einem Fluoreszenzsignal. Die Stärke des Signals ist proportional der Menge der Zielsequenz und wird in Realzeit gemessen und erlaubt die Quantifizierung der Menge der Zielsequenz. **C.** Während des Extensionsschritts der PCR wird die Probe von ihrer Zielsequenz verdrängt, wodurch Fluorophor und Quencher in größere Nähe zueinander gebracht werden, was zu einer Abnahme der Fluoreszenz ohne Hydrolyse der QuantiProbe führt. Dies bedeutet, dass die Konzentration der QuantiProbe konstant bleibt während der PCR, was eine reliable Quantifikation ermöglicht.

Amplifikation von cDNS-Fragmenten

Die Amplifikation der B₂-Rezeptor cDNS des Schweins wurde am Applied Biosystems 7900 HT durchgeführt. Es wurde ein 177 bp großes Fragment amplifiziert. Primer (sense 5'-GCA TCC GTA GTT TCT CCT T- 3', antisense 3' -TGG ATG GTG TTG AGC CAG TT- 5'), Sonden (5' -Fluorophor-CTT TCT TTC AGC GTC G-Quencher-3') sowie PCR-Mastermix wurden von QIAGEN in Hilden bezogen. Als externer Standard wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH), die in Zellen in konstanten Konzentrationen exprimiert wird, verwendet. Die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-spezifischen Primerpaare (Primer 1: 5'-GCA TCC GTA GTT TCT CCT T-3', Primer 2: 5'-TGG ATG GTG TTG AGC CAG TT-3') amplifizieren ein 108 bp großes Fragment. Es wurde die zugehörige Sonde (5' -Fluorophor-CTT CTT GTA CCA CCA ACT-Quencher-3) benutzt.

Der PCR-Mastermix enthält eine HotStart-Taq-Polymerase, welche erst durch 15 minütige Inkubation bei 95 °C aktiviert wird. Dadurch beginnt die Reaktion erst mit dem Start der PCR.

Der Reaktionsansatz für eine Probe setzte sich wie folgt zusammen:

QuantiTect™ Probe PCR Master Mix (2x)	10 µl
Primer Mix, 20x	1 µl
Quanti Probe, 20x (FAM)	1 µl
dH ₂ O	6 µl
Proben cDNA (50 ng)	2 µl

Der Reaktionsansatz für Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) entsprach dem des B₂-Rezeptor-Ansatzes. Es kamen hier die entsprechenden Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Primerpaare zum Einsatz. Für jede Probe wurde eine Zweifachbestimmung (B₂-Rezeptor, cDNS) bzw. Dreifachbestimmung (GAPDH, cDNS) durchgeführt. Hierfür wurden je 20 µl des PCR-Ansatzes in eine 96-Well-Reaktionsplatte (Ambion, Wiesbaden) hineinpipettiert, kurz zentrifugiert, diese mit Folien verschlossen und auf Eis gelegt, bis die Platte in das Applied Biosystems 7900 HT gestellt wurde. Anschließend wurde die DNA in folgendem Programm amplifiziert:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
Vordenaturierung	1	95	15 min
Denaturierung	45	94°C	15 sec
Annealing	45	56°C	30 sec
Elongation	45	76°C	30 sec

In dem Applied Biosystems 7900 HT wurden parallel zum Probenmaterial 4 bekannte Ausgangskonzentrationen des jeweilig zu amplifizierenden DNS-Fragmentes (B₂-Rezeptor, mRNS) zur Erstellung einer internen Standardkurve mitgeführt. Bei diesem als Standard definiertem Ausgangsmaterial handelte sich um Plasmid-DNS mit integriertem B₂-Rezeptor-Fragment. Dieser Standard wurde auf folgende Konzentrationen eingestellt: 0.5, 3.0, 50, 500 pg. Als Baseline diente ein Reaktionsansatz, welcher kein Template enthielt. Das Template wurde durch 2 µl dH₂O ersetzt. Zusätzlich, um die Kontamination mit ubiquitärer RNS zu überprüfen, wurde ein weiterer Reaktionsansatz unter gleichen Bedingungen hergestellt, der statt der Template-DNS die Template-RNS (Monolinie 42) umfasste. Abschließend wurden die mRNS-Konzentrationen nach Beenden der PCR anhand der internen Standardkonzentrationen bestimmt und die gewonnenen Amplifikate im 1,5% Agarose-Gel überprüft.

Auswertung von Echtzeit-Fluoreszenzdaten

Die Kinetik der PCR-Reaktion am Applied Biosystems 7900 HT ermöglicht, die Nukleinsäuren zu quantifizieren: In den frühen PCR-Zyklen findet eine weitgehend exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente statt. Mit zunehmender Akkumulation des Produkts verlangsamt sich die Reaktion zu einem linearen Wachstum und erreicht schließlich ein Plateau. Die Quantifizierung ist daher nur in der exponentiellen Phase möglich, weil dort keine störenden Einflüsse zu befürchten sind.

Hierbei bestimmt man die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal besonders deutlich vom Hintergrund abhebt. Zu diesem Zeitpunkt verläuft die Amplifikation noch exponentiell. Sie wird auch als sog. Schwellenzyklus C_T (cycle threshold value) bezeichnet. Um die unbekannten Proben zu quantifizieren, amplifiziert man parallel mehrere bekannte Templatemenen und vergleicht, welchen C_T-Wert man für welche Templatemenge erhält. Daraus kann man eine Standardkurve erstellen, aus der sich dann umgekehrt aus einem C_T-Wert auf die Templatemenge schließen lässt.

3.2.5.5 Absolute Quantifizierung

Die absolute Quantifizierung unbekannter Proben erfolgt dabei mit Hilfe von Verdünnungsreihen externer Standards bekannter Templatemenen. Diese werden parallel zum Probenmaterial amplifiziert und lassen sich zur Erstellung von Standardkurven heranziehen. Die Auftragung des Logarithmus der initialen Standard-Kopienzahl gegen den jeweiligen Schwellenzyklus C_T liefert dabei über den quantifizierbaren Bereich eine lineare Funktion. Aus dem C_T -Wert der Probe lässt sich umgekehrt auf die ursprüngliche Template-Menge schließen. Dabei handelte es sich um von uns selbsterstellte, in vitro transkribierte RNA-Standards.

$\Delta\Delta C_T$ - Methode der relativen Quantifizierung

Die relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_T$ - Methode ermöglicht einen direkten Vergleich zweier C_T -Werte aus unterschiedlichen Proben. Die Erstellung einer Standardkurve ist hierbei nicht erforderlich.

Zu Beginn berechnet man für jede Probe den ΔC_T -Wert, indem man die Differenz des C_T -Werts der Zielgene und der Referenzgene bildet. Diesen Wert bestimmt man sowohl für jede unbekannte Probe als auch für die zu kalibrierende Probe:

$$\Delta C_T (\text{Probe}) = C_{T\text{-Zielgene}} (B_2R) - C_{T\text{-Referenzgene}} (\text{GAPDH})$$

$$\Delta C_T (\text{Calibrator}) = C_{T\text{-Zielgene}} (B_2R) - C_{T\text{-Referenzgene}} (\text{GAPDH})$$

Anschließend rechnet man für jede Probe den $\Delta\Delta C_T$ aus, in dem man die Differenz der ΔC_T der Probe und des Calibrators bildet:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Probe}) - \Delta C_T (\text{Calibrator})$$

Ist die PCR-Effektivität der Probe und des Calibrators vergleichbar, so lässt sich die relative Expression der Probe mit Hilfe folgender Formel bestimmen:

$$\text{Relative Expression (Probe)} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

3.2.6 Biochemische Methoden

3.2.6.1 Proteinextraktion

Das gewonnene Zellpellet (3.2.4) wurde in 200 µl Lyse-Puffer (Tris 5 mM, PMSF 0,2 mM, Leupeptin 0,5 mg/L, Dithiothreitol 5 mM, pH 7,6) aufgenommen, gut durchpipettiert und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Dann erfolgte zur vollständigen Zerstörung intakter Zellen eine Behandlung mit Ultraschall (50 Watt, 3x5 s, 4°C). Das Zellhomogenat wurde anschließend bei 100 g für 10 min unter 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, in ein 2,0 ml Eppendorfgefäß überführt und bei -80 °C aufbewahrt. Die Proben wurden wie folgt beschriftet: Datum, Nummer, Art des Gewebes (z.B. PAEC), Passage und Konzentration des CRP, sowie Inkubationszeit.

3.2.6.2 Proteinbestimmung (Bio-Rad-Assay)

Die Proteinbestimmungen erfolgten nach der Methode von Bradford. Vor jeder Messung wurde eine Eichung mit BSA vorgenommen. Die Proteinkonzentration wurde mittels einer Eichgerade berechnet.

Zur Proteinbestimmung wurden eine 96 Well Platte, Bradfordreagenz (1x), eine 10-er und eine 200-er Eppendorfpipette sowie Standardproteinlösung BSA gebraucht. 20 ml einer Konzentration mit 1 mg/ml BSA (bovines Serumalbumin) wurde hergestellt. Anschließend wurde diese 1:5 verdünnt mit der Endkonzentration 0,2 µg/µl. Danach wurde in eine 96 Wellplatte wie folgt pipettiert:

µg	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0	2,4	2,8	3,2	3,6	4,0
µl	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20

Das BIO-RAD Farbreagenz wurde 1:5 verdünnt und jeweils 200 µl/ Well zu der Standardreihe zugegeben. Als Blank diente 5 mM Tris-Lösung. Es war zu beachten, dass die Regression nicht unter 0.99 liegt. Die photometrische Bestimmung erfolgte am ELISA-Reader bei 595 nm.

3.2.6.3 Western Blot

Die Analyse der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot. Das Prinzip des Western Blots beruht darauf, dass Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran transferiert (geblottet) und dort durch Antikörperbindung und anschließende Detektion nachgewiesen werden.

Auftrennung der Proteine:

Die Auftrennung der Proteine aus dem Proteinhomogenat erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen, denaturierenden Gelelektrophorese (Laemmli, 1970; Neville, 1971). Dazu wurde ein Trenngel (10% Acrylamid in 375 mM Tris/ 0,4% SDS) und darauf ein Sammelgel (4,5% Acrylamid 25 mM Tris/ 0,2% SDS) gegossen. Zur Untersuchung der Proteine wurden verschiedene Mengen an Gesamtprotein eingesetzt. Die Proben wurden vor dem Beladen auf das Gel mit 2 x Probenpuffer im Verhältnis 1:1, oder mit mindestens 30% Probenpuffer versetzt, gemischt und fünf Minuten lang bei 95°C denaturiert. Der Gellauf erfolgte bei 150 V in einer BioRad Elektrophoresekammer (BioRad, München) mit 1x Tankpuffer für etwa 90 min. Als Molekulargewichtsmarker diente ein Kaleidoskopmarker (BioRad, München).

Proteintransfer:

Die aufgetrennten Proteine wurden in einer Blotting Apparatur (BioRad, München) vom Gel auf eine PVDF-Membran (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Bioscience) transferiert. Der Transfer erfolgte bei 90 Volt für eineinhalb Stunden im Western Blot-Puffer.

Absättigung unspezifischer Bindungen:

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran mindestens 12 Stunden über Nacht bei 4°C in 6% Blocking-Milch (6% Milchpulver in TBST) auf einer Wippe inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und die Membran anschließend einmal mit 30 ml TBST-Puffer gewaschen.

Antikörperinkubation:

Folgende Primärantikörper wurden in den angebenen Verdünnungen verwendet:

Anti-B2R PAb, Alexis Biochemicals; 1:1000 in 3% Milch (=TBSTM)

Anti-B2R M Ab, BD Transduction Laboratories; 1:500 in 3% Milch (=TBSTM)

Die Inkubation erfolgte für 3 Stunden bei Raumtemperatur. Nach 5 x 5 Minuten Waschen in 30 ml TBST-Puffer erfolgte die Inkubation mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern für 60 Minuten bei Raumtemperatur:

Anti-Rabbit IgG, Callbiochem; 1:5000 in 3% Blocking Milch (=TBSTM)

Anti- Mouse IgG, Sigma; 1:5000 in 3% Blocking Milch (=TBSTM)

Detektion:

Nach einer Waschphase von 5 x 5 Minuten wurden die Membranen zur Detektion der Proteine für fünf Minuten mit Lumi-Light Western Blotting Substrat (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach Angaben des Herstellers inkubiert. Bei dieser Detektionsmethode findet durch die an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase die Oxidation von Luminol statt. Es entsteht ein chemilumineszentes Signal, welches nach Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm TM ECL TM, Amersham Pharmacia Bioscience, Freiburg) sichtbar gemacht wurde.

Ponceaufärbung:

Anschließend wurde die Membran mit 25 ml Ponceaulösung bedeckt und für 5 min bei Raumtemperatur auf der Wippe inkubiert. Danach wurde sie mit destilliertem Wasser für 5 min gewaschen und abschließend getrocknet.

3.2.7 Berechnung und Statistik

Die Ergebnisse aller Messungen sind als arithmetischer Mittelwert ($\pm$ SEM, Standardfehler des Mittelwertes) angegeben, wobei n die Anzahl der den Mittelwerten zugrunde liegenden Versuche bezeichnet. Die Messdaten wurden computergestützt mit dem Statistikprogramm Graph Pad Prism 4.0 ausgewertet. Bei Vergleichen zwischen drei und mehr Werten wurden die Daten durch eine Varianzanalyse (einseitige ANOVA) mit nachfolgendem Student-Newman-Keuls-Test auf signifikante Unterschiede getestet. Dabei wurde für einen statistisch abgesicherten Unterschied ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Zellkulturen

Um die Rolle des C-reaktiven Proteins (CRP) bei der Regulation der B₂-Rezeptor-Expression und der Entstehung von Angioödemem untersuchen zu können, wurden Zellen des humanen Plattenepithelkarzinoms (DU-SCC 2), humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) sowie porcine Aortenendothelzellen (PAEC) verwendet. Für die Überprüfung des Einflusses von CRP auf die Zellen und ihre mRNA-Expression der B₂-Rezeptoren wurden lediglich die beiden Endothellinien herangezogen. Die Zelllinie des Plattenepithelkarzinoms (DU-SCC 2) diente in diesem Experiment als Positiv-Kontrolle, da diese Zellen vermehrt B₂-Rezeptoren exprimieren.

4.1.1 Kultur des humanen Plattenepithelkarzinoms (DU-SCC 2)

Es wurden Zellen des humanen Plattenepithelkarzinoms (DU-SCC 2) aus Passage 59 verwendet. Sie wurden wie unter 3.2.1.3 beschrieben isoliert und in MEM-Nährmedium kultiviert. Die Zellen zeigen eine sehr hohe Wachstumsrate. Die Zellen einer Petrischale von 60 cm² waren nach 3-4 Tagen konfluent. Nach 1-2 Subkulturen wurden die Zellen isoliert und für die Experimente eingesetzt.

4.1.2 Kultur der humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)

Die humanen Nabelschnurendothelzellen, die sich leicht aus der Nabelschnur isolieren lassen, wurden wie unter 3.2.1.2 beschrieben in einem Nährmedium kultiviert. Die primären Zellen der 2. Passage und 3. Passage wurden in den Experimenten eingesetzt. Nach etwa 6-7 Tagen zeigen die Zellen (HUVEC) in konfluenter Kultur das für Endothelzellen typische Pflasterstein-Muster bei einer insgesamt einheitlichen Zellmorphologie (Abb. 23).

4.1.3 Kultur der porcinen Aortenendothelzellen (PAEC)

Die porcinen Aortenendothelzellen wurden frisch aus den Schweineaorten isoliert und kultiviert. Zellen der 2. und 3. Passage wurden in den Experimenten eingesetzt. Die Zellen erreichten ihren konfluenten Zustand nach etwa 6-7 Tagen Inkubation (Abb. 24).

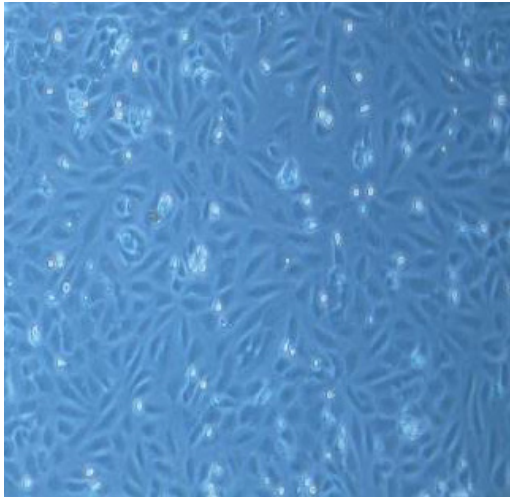


Abb. 23: Isolierte primäre Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) nach 6 Tagen Inkubation. Aufsicht mit 10-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop (Olympus).

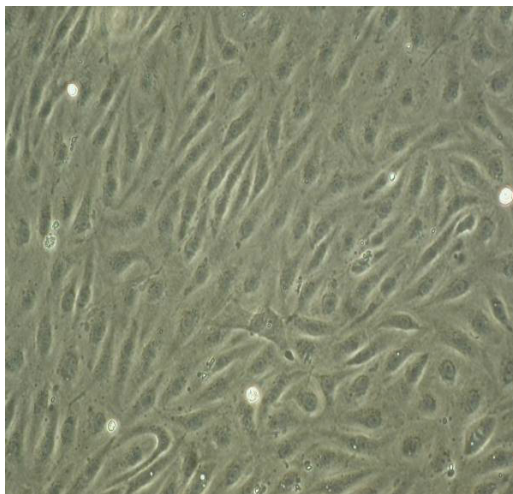


Abb. 24: Primäre Aortenendothelzellen (PAEC) in konfluenter Kultur nach 7 Tagen Inkubation. Aufsicht mit 10-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop (Olympus).

4.2 Reinheitsprüfung des CRP-Retentats

Für die Aufreinigung der CRP-Lösung vom zugesetzten Konservierungsstoff Natriumazid (NaN_3) wurde die Methode der Ultrafiltration (3.2.2) angewandt. Anschließend wurde die CRP-Reinheit durch die Absorptionsmessung von 190 nm bis 500 nm mit dem Photometer überprüft.

4.2.1 Überprüfung der CRP-Reinheit mittels eines Photometers

Es wurden zunächst 4 bekannte Proben, sowie das $\text{CRP}^{-/-}$ und das zugehörige Filtrat, wie in 3.2.3 beschrieben, photometrisch bestimmt. Um etwas über die Reinheit des $\text{CRP}^{-/-}$ aussagen zu können, wurden anschließend die Absorptionsspektren miteinander verglichen.

Abbildung 25 zeigt die maximale Absorption von Natriumazid bei etwa 200 nm Wellenlänge.

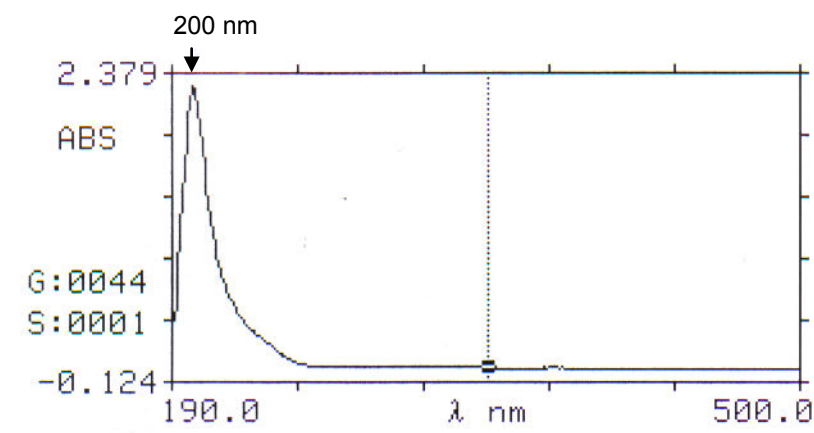


Abb. 25: NaN_3 -Absorptionsspektrum. Probe: Puffer mit 0,05% NaN_3 ; Baseline: Puffer ohne 0,05% NaN_3

Dagegen liegt das Maximum der Kurve des $\text{CRP}^{+/+}$ mit einer abgerundeten Spitze bei etwa 211 nm Wellenlänge. Die abgerundete Spitze kommt dadurch zustande, da sie sich aus zwei Maxima zusammensetzt, und zwar der Spitze des Natriumazids und der Spitze des C-reaktiven Proteins (siehe unten). Einen weiteren Gipfel, der für das CRP spezifisch ist, findet man bei 278 nm Wellenlänge (Abb. 26).

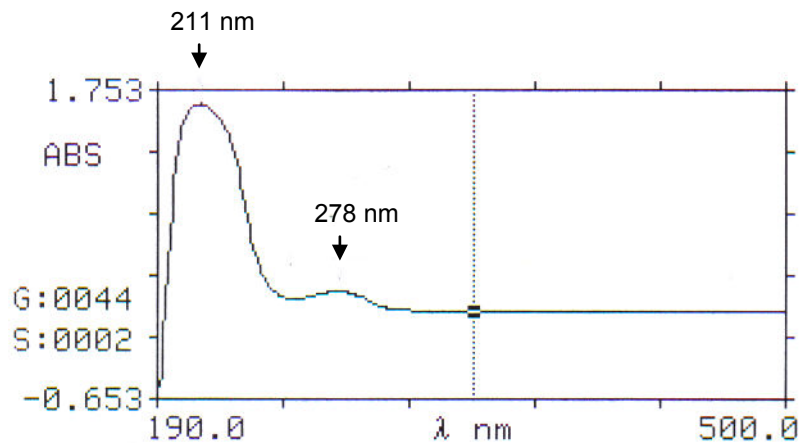


Abb. 26: CRP⁺⁺-Absorptionsspektrum. Probe: CRP von Calbiochem; Baseline: Puffer mit 0,05% NaN₃

Zieht man nun den Anteil des Natriumazids ab, so erhält man schließlich das reine CRP-Absorptionsspektrum, welches durch ein spitz zulaufendes Maximum bei 212 nm Wellenlänge und einen weiteren Hochpunkt bei 280 nm Wellenlänge gekennzeichnet ist (Abb. 27).

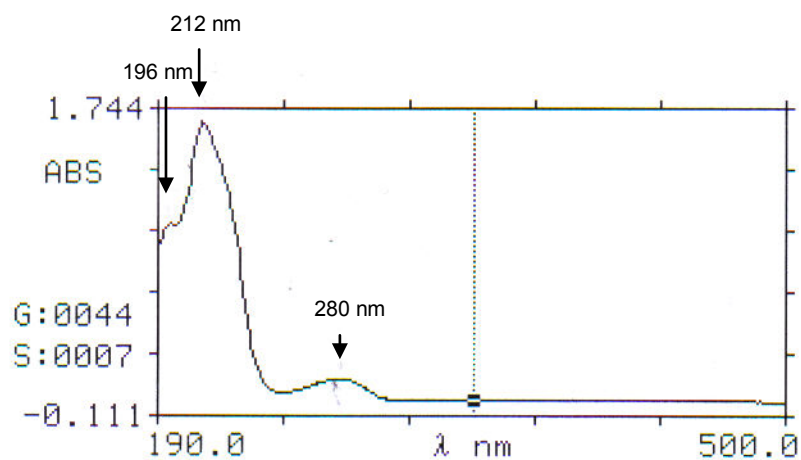


Abb. 27: reines CRP-Absorptionsspektrum. Probe: CRP von Calbiochem; Baseline: Puffer ohne 0,05% NaN₃

Als Kontrolle der CRP-Reinheit diente das PBS-Absorptionsspektrum (Abb. 28).

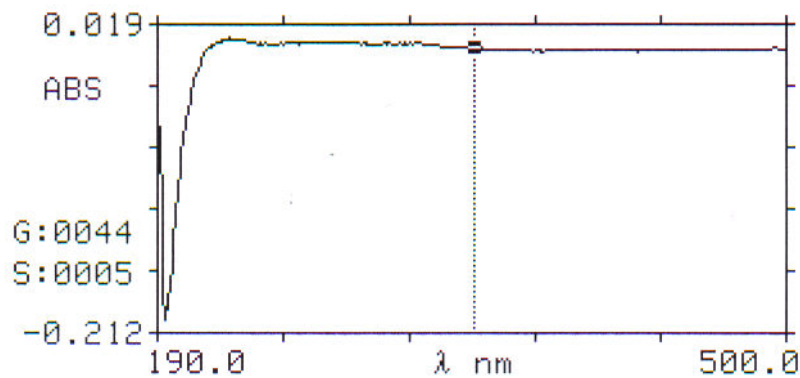


Abb. 28: PBS-Absorptionsspektrum. Probe: PBS-Lösung; Baseline: Puffer ohne 0,05% NaN_3

Abbildung 29 stellt das Absorptionsspektrum des Filtrats nach dem ersten Durchgang der Ultrafiltration dar. Dieses stimmt mit dem reinen NaN_3 -Absorptionsspektrum in etwa überein.

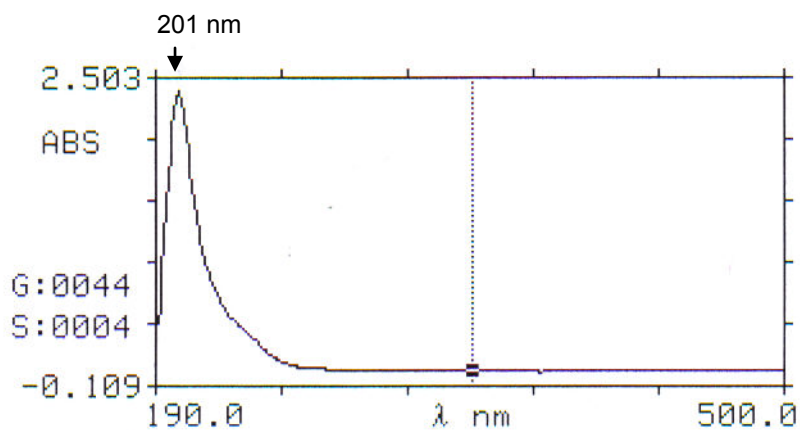


Abb. 29: Filtrat A₁-Absorptionsspektrum. Probe: Filtrat A₁; Baseline: Puffer ohne 0,05% NaN_3

Nach dem 4. Durchgang der Ultrafiltration wurde das Filtrat (A₄) gesammelt und photometrisch bestimmt. Die gewonnenen Daten nähern sich dem PBS-Absorptionsspektrum weitgehend an (Abb. 30). Daraus lässt sich schließen, dass das zugehörige CRP^{-/-} frei von Natriumazid ist.

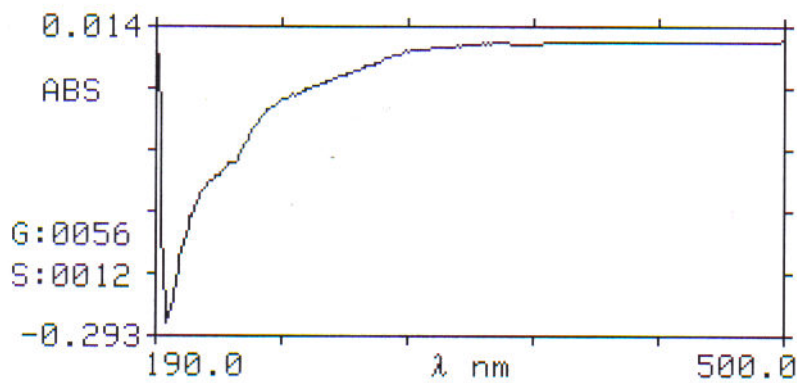


Abb. 30: Filtrat A₄-Absorptionsspektrum. Probe: Filtrat A₄; Baseline: Puffer ohne 0,05% NaN₃

Zum Schluss wurde das CRP^{-/-} photometrisch bestimmt. Das Absorptionsspektrum hatte einen spitz zulaufenden Höhepunkt bei 207 nm Wellenlänge und ein flaches Maximum bei 277 nm Wellenlänge. Es ist mit dem reinen CRP-Absorptionsspektrum vergleichbar (Abb. 31). Die Ausbeute an gereinigtem CRP^{-/-} über die Methode der Ultrafiltration lag bei etwa 35%.

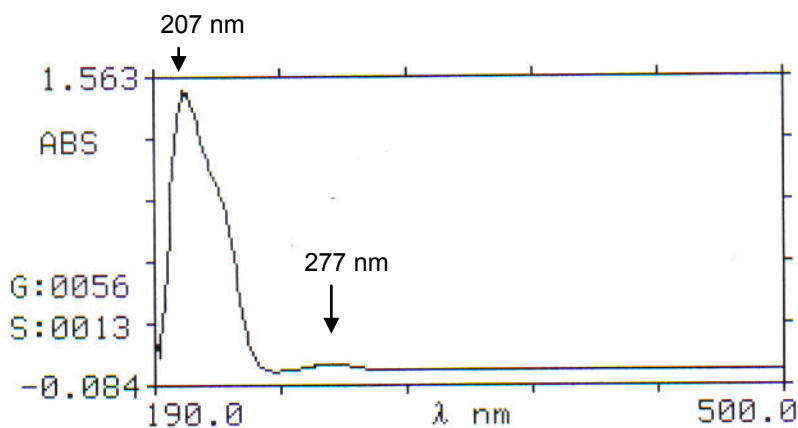


Abb. 31: CRP^{-/-}-Absorptionsspektrum. Probe: CRP^{-/-}; Baseline: PBS-Puffer

4.2.2 Überprüfung der vasorelaxierenden Wirkung des ungereinigten CRP

Das Abgangsgefäß der rechten Koronararterie des Schweins wurde mit 8 μ M PGF_{2 α} bis zum Erreichen des Plateaus der Kurve vokontrahiert. Dann wurde CRP^{-/-} (10 μ l) ins Organbad zugegeben. Dabei konnte keine oder nur eine sehr geringe Vasodilatation beobachtet werden, die auch durch Artefakte bedingt sein könnte. Der zweite Versuch wurde mit fünffach erhöhter Konzentration von CRP^{-/-} (50 μ l) wiederholt. Auch bei dieser Konzentration konnte kaum eine zusätzliche Gefäßentspannung beobachtet werden. Als nächstes wurde das kommerziell erhältliche CRP^{+/+} mit einer Konzentration von 10 μ l zugegeben. Dieses führte am Gefäß zu

einer starken Gefäßerweiterung, die also im Wesentlichen durch Natriumazid erklärbar ist (Abb. 32).

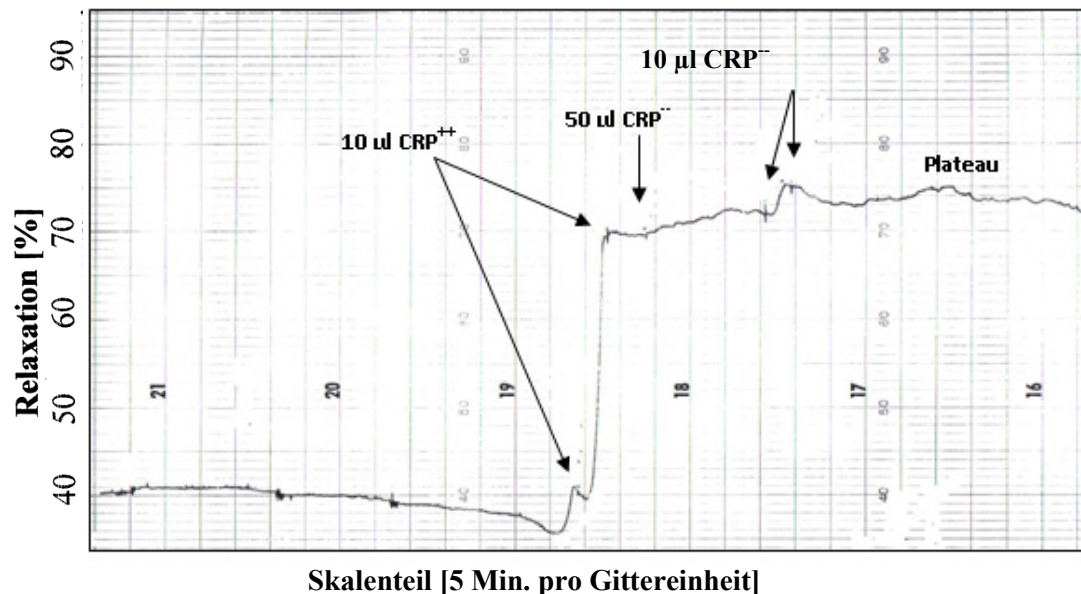


Abb. 32: Effekt der gereinigten CRP-Lösung ($\text{CRP}^{-/-}$) und des CRP von Calbiochem ($\text{CRP}^{+/+}$) auf isolierte Gefäße. Relaxion [%]; Einheiten sind auf dem Blatt abzulesen: Plateau bewegt sich knapp über 70 [%], fällt dann bis unter 40 [%]

4.3 Einfluss von $\text{CRP}^{+/+}$ auf die B_2 -Rezeptor-mRNA-Expression via RT-PCR

Zunächst wurde gereinigtes CRP ($\text{CRP}^{-/-}$) zugegeben, was einen geringfügigen, jedoch nicht signifikanten Relaxationseffekt auslöste. Dann wurde mit dem CRP von Calbiochem gearbeitet, dass 0,05%iges Natriumazid (NaN_3) als Konservierungsmittel enthält. Im Organbad (siehe oben) wurde unter $\text{CRP}^{+/+}$ ein erheblicher Abfall des Vorkontraktionszustandes von über 70% des Maximums auf etwa 40% festgestellt, worauf auf das Natriumazid als Ursache derselben geschlossen werden konnte.

Die nachfolgenden Ergebnisse zeigen die mRNA-Expression der B_2 -Rezeptoren an den Nabelschnurendothelzellen unter dem Einfluss von $\text{CRP}^{+/+}$. Die Zellen (Proben Nr. 140, 141 und 142) wurden für 24 Stunden mit 4.0 mg/dl $\text{CRP}^{+/+}$ inkubiert. Zur Kontrolle dienten Zellen (Proben Nr. 34, 150 und 155) ohne Zugabe von $\text{CRP}^{+/+}$, die nach 24 Stunden unter gleichen Bedingungen geerntet wurden. Hierbei wurde eine eindeutige $\text{CRP}^{+/+}$ -vermittelte Induktion der B_2 -Rezeptor-mRNA-Expression gefunden (Abb. 33).

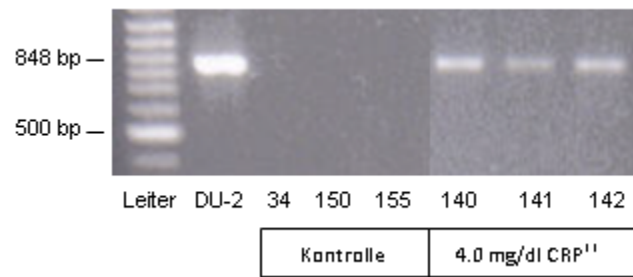


Abb. 33: Dargestellt ist die CRP^{+/+}-vermittelte Induktion der B₂-Rezeptor-mRNA-Expression an den Nabelschnurendothelzellen durch RT-PCR. Die Zellen (Proben Nr. 140, 141 und 142) wurden für 24 Stunden mit 4.0 mg/dl CRP^{+/+} inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen (Proben Nr. 34, 150 und 155) ohne Zugabe von CRP^{+/+} und als Positivkontrolle dienten Zellen des Plattenepithelkarzinoms DU-SCC 2. Die Fragmentgröße des PCR-Produktes des B₂-Rezeptors liegt bei 848 Basenpaaren (bp).

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration für die CRP^{+/+}-vermittelte Induktion der endothelialen B₂-Rezeptor-Expression wurde CRP^{+/+} in steigenden Konzentrationen eingesetzt und die Inkubation nach 24 Stunden beendet. CRP^{+/+} wurde in Konzentrationen 0.5, 1.0, 2.0 und 4.0 mg/dl verwendet. Eine deutliche CRP^{+/+}-vermittelte Induktion der mRNA-Expression konnte für 0.5 und 4.0 mg/dl CRP^{+/+} nachgewiesen werden (Abb. 34).

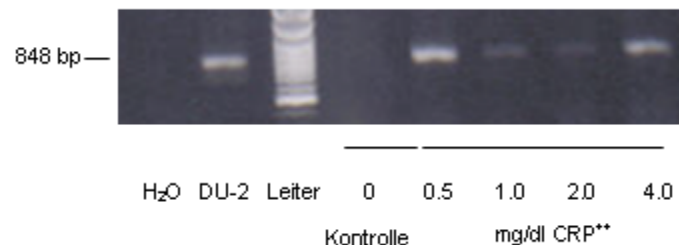


Abb. 34: Dargestellt ist die Konzentrationskinetik der endothelialen B₂-Rezeptor-Expression mittels RT-PCR. Die Nabelschnurendothelzellen wurden 24 Stunden mit CRP^{+/+} in steigenden Konzentrationen (0.5, 1.0, 2.0 und 4.0 mg/dl) inkubiert. Zur Kontrolle (K) dienten Zellen der gleichen Zellkultur ohne Zugabe von CRP^{+/+}, die nach 24 Stunden unter gleichen Bedingungen geerntet wurden. Als Positivkontrolle dienten Zellen des Plattenepithelkarzinoms (DU-SCC 2) und als Negativkontrolle diente nukleasefreies Wasser (H₂O). Gut zu sehen ist die CRP^{+/+}-vermittelte Induktion der mRNA-Expression für 0.5 und 4.0 mg/dl CRP^{+/+}, wogegen für 1.0 und 2.0 mg/dl ein schwaches Signal zu erkennen ist.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das CRP^{+/+} (also das CRP und 0.05% NaN₃!) die mRNA-Expression der B₂-Rezeptoren an den Nabelschnurendothelzellen hochreguliert,

wogegen bei den unkonditionierten Zellen keine mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte.

4.4 Einfluss von CRP^{-/-} auf die B₂-Rezeptor-mRNA-Expression via RT-PCR

Das soeben beschriebene experimentelle Vorgehen wurde noch einmal an porcinen vaskulären Endothelzellen mit gereinigtem (natriumazidfreiem) CRP^{-/-} durchgeführt, da bekannt war, dass die Lösung aus CRP und 0,05 %igem Natriumazid auf isolierte Gefäße des Schweins vasodilatierend wirkt. Dabei wurde aus den Schweineaorten-endothelzellen isolierte Gesamt-RNA eingesetzt. Dazu wurden zunächst Zellen ohne Zugabe von CRP^{-/-} (Kontrolle), sowie dann Zellen mit Zugabe von CRP^{-/-} untersucht.

Die folgende Abbildung 35 zeigt das Ergebnis der Untersuchung. Aus diesem ist zu entnehmen, dass sowohl Zellen ohne Zugabe von CRP^{-/-} als auch Zellen mit Zugabe von CRP^{-/-} B₂-Rezeptor-mRNA exprimieren. Gleichzeitig konnte aber nicht gezeigt werden, dass die konditionierten Zellen erhöhte B₂-Rezeptor-mRNA exprimieren.

Genauere Auskunft in dieser Frage sollte die nächste Untersuchung mittels Real-time quantitative PCR geben, weil die Real-time quantitative PCR feinere Unterschiede als die RT-PCR zu detektieren vermag und weil sie wirklich quantitativ ist!

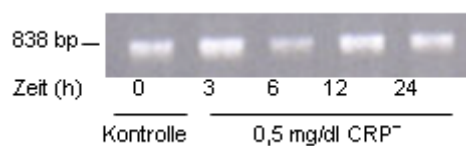


Abb. 35: Repräsentatives Agarose-Gel nach Amplifikation der cDNA mit Oligonukleotiden für B₂-Rezeptor-mRNA an Schweineaortenendothelzellen. Die cDNA wurde aus der mRNA von isolierten Schweineaortenendothelzellen gewonnen, die unter Kontrollbedingungen (K) kultiviert und anschließend mit konstantem CRP^{-/-} (0,5 mg/dl) für 3, 6, 12 und 24 Stunden inkubiert wurden.

Im Unterschied zu den Nabelschnurendothelzellen konnte nachgewiesen werden, dass auch die unkonditionierten Endothelzellen der Schweinaorta die B₂-Rezeptor-mRNA exprimierten.

4.5 Quantifizierung der B₂-Rezeptor-mRNA-Expression via RT quantitative PCR

4.5.1 Absolute Quantifizierung

Es wurde zunächst eine Standardkurve zur Quantifizierung der B₂-Rezeptor-mRNA mit Hilfe von 4 bekannten Ausgangskonzentrationen des jeweils zu amplifizierenden DNS-Fragmentes erstellt. Die Auftragung des Logarithmus der initialen Standard-Kopienzahl gegen den jeweiligen Schwellenzyklus C_T liefert dabei über den quantifizierbaren Bereich eine lineare Funktion (Abb. 36). Aus dem C_T -Wert der Probe lässt sich umgekehrt auf die ursprüngliche Template-Menge schließen.

Die folgende Abbildung 37 zeigt das Ergebnis der absoluten Quantifizierung der B₂-Rezeptor-mRNA der Schweineaortenendothelzellen. Zu erkennen ist die Abnahme der mRNA-Expression (Proben Nr. 42, 49 und 46) nach 3 bis 6 Stunden Inkubation, bevor diese nach 24 Stunden zunimmt. Die Probe 46 erreicht ihre maximale mRNA-Expression nach 12 Stunden und nimmt anschließend ab. Im Vergleich dazu findet man eine stetige Zunahme der mRNA-Expression der Probe 51.

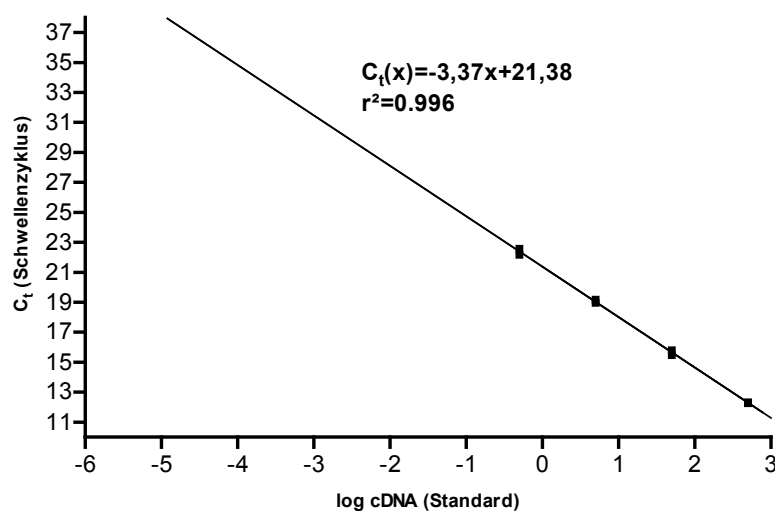


Abb. 36: Standardkurve zur Quantifizierung der B₂-Rezeptor-mRNA des Schweins mittels Real-time quantitative PCR. Lineare Auftragung von C_T (cycle threshold value) gegen den Logarithmus der anfangs eingesetzten DNA-Menge. Abkürzung: r, Korrelationskoeffizient.

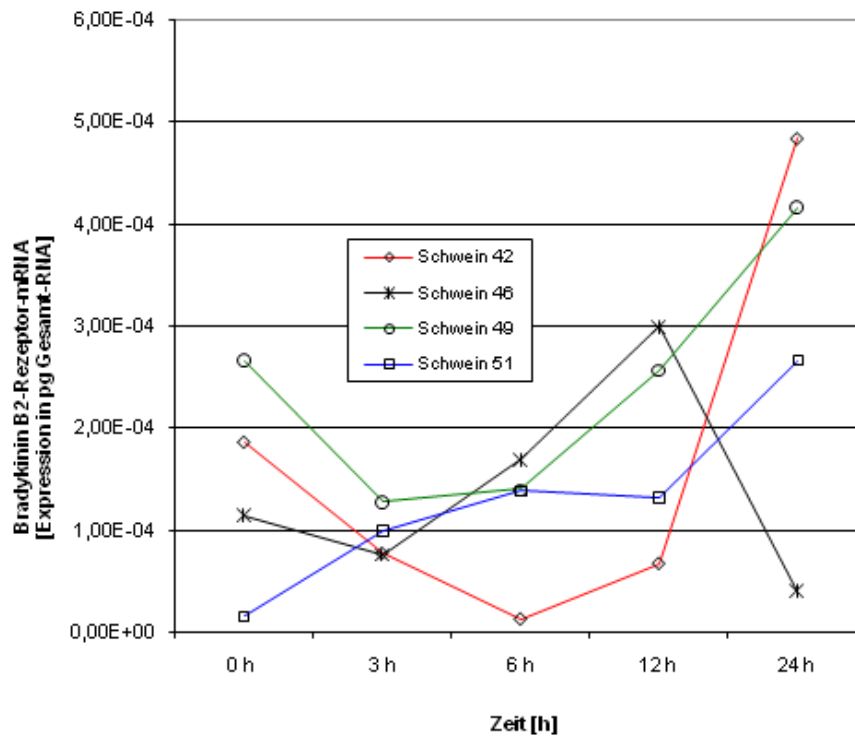


Abb. 37: Absolute Quantifizierung der B₂-Rezeptor-mRNA-Expression der Schweineaortenendothel-zellen mittels Real-time quantitative PCR. Die Zellen wurden wie unter Kontrollbedingungen (K=0 h) kultiviert, anschließend für 3, 6, 12 und 24 Stunden mit 0,5 mg/dl CRP^{-/-} inkubiert und unter gleichen Bedingungen geerntet. Die Gesamt-B₂-R-mRNA wurde über RT-PCR auf cDNA-Ebene umgeschrieben und amplifiziert. Die Abbildung 38 fasst die Versuchsergebnisse in einem Säulendiagramm zusammen.

Sie zeigt die stetige Zunahme der mRNA-Expression der endothelialen B₂-Rezeptoren in Abhängigkeit von der Zeit. Zu keinem Zeitpunkt (3, 6, 12 oder 24 Stunden) konnte ein signifikanter Unterschied zur Expression unbehandelter Kontrollzellen gefunden werden.

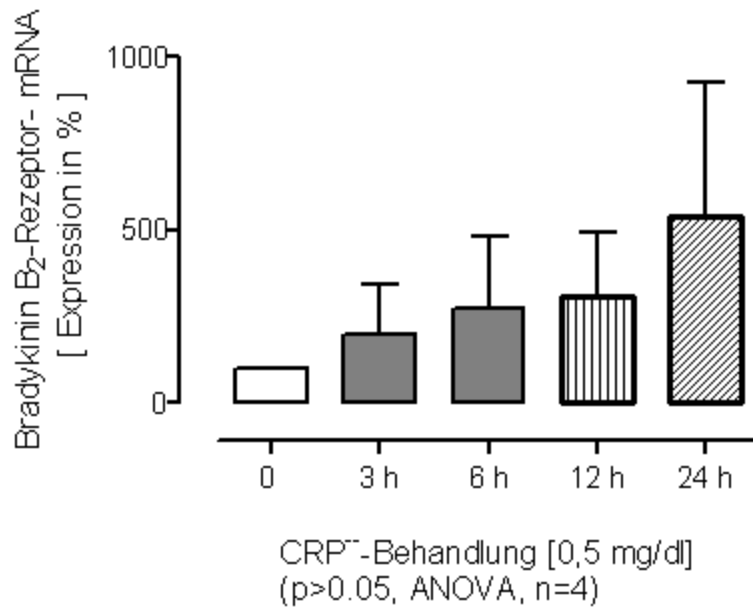


Abb. 38: Zusammenfassung der Ergebnisse der absoluten Quantifizierung in einem Säulendiagramm. Die Abbildung zeigt die stetige Zunahme der B₂-Rezeptor-mRNA-Expression nach 3, 6, 12 und 24 stündiger Inkubation mit 0,5 mg/dl CRP^{-/-}. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen der gleichen Präparation, deren B₂-Rezeptor-mRNA-Expression 100 % entspricht. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM aus n = 4 Versuchen. $p > 0.05$, einseitige ANOVA und Newman-Keuls's multipler Vergleichstest.

4.5.2 Relative Quantifizierung

Die relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ermöglicht einen direkten Vergleich zweier C_T -Werte aus unterschiedlichen Proben. Hierbei wurde ein konstitutiv exprimiertes Haushaltsgen, GAPDH, als externer Standard verwendet. Die Auswertung dieser Versuche ist aus der Tabelle 4 (s. Seite 103) zu entnehmen. Trägt man nun die gewonnenen Werte der relativen Expression gegen die inkubierte Zeit (0, 3, 6, 12 und 24 Stunden) auf, so erhält man die in Abbildung 39 dargestellten Kurven. Deutlich zu erkennen ist die starke Abweichung der Probe Nr. 51 im Vergleich zu den anderen drei Proben (Nr. 42, 46 und 49). Bei dieser findet man eine deutlich höhere zeitabhängige Zunahme der relativen Expression. Sie erreicht nach 24 Stunden Inkubation etwa das 11-fache der Kontrolle. Im Gegensatz dazu zeigen die Proben Nr. 42, 46 und 49 eine Abnahme der relativen Expression nach 3 Stunden Inkubation, bevor sie anschließend zunimmt. Probe Nr. 46 dagegen erreicht ihr Maximum bereits nach 6 Stunden Inkubation und nimmt anschließend ab.

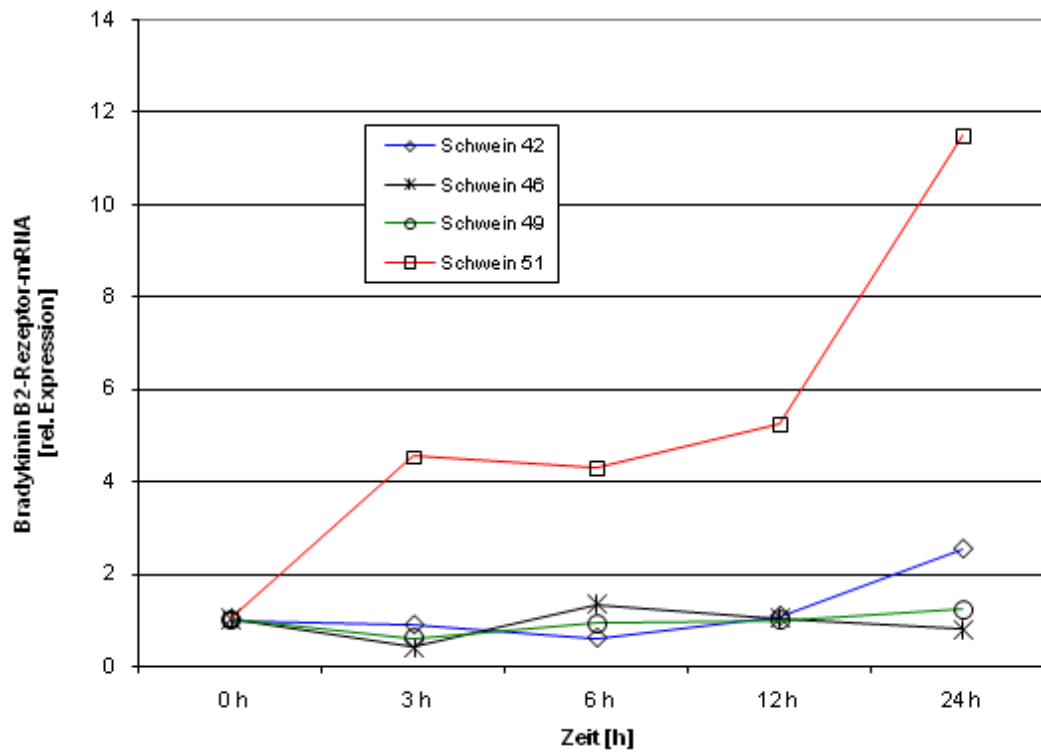


Abb. 39: Ergebnis der relativen Quantifizierung der B₂-Rezeptor-mRNA-Expression der Schweineaortenendothelzellen mittels Real-time quantitative PCR.

Schwein	C _T B ₂ R Mittelwert	C _T GAPDH Mittelwert	$\Delta C_T = C_T \text{ B}_2\text{R} - C_T \text{ GAPDH}$	$\Delta\Delta C_T$ = $\Delta C_T \text{ B}_2\text{R} - \Delta C_T \text{ Calibrator}$	rel. B ₂ R-Expression = $2^{-\Delta\Delta C_T}$
42.1 50 ng	32,16	26,83	5,34	0	1
42.2 50 ng	32,84	27,32	5,52	0,18	0,88
42.3 50 ng	35,54	29,46	6,08	0,74	0,60
42.4 50 ng	33,56	28,32	5,23	-0,11	1,08
42.5 50 ng	31,05	27,06	3,99	-1,34	2,53
44.1 50 ng	32,90	28,18	4,72	0	1
44.2 50 ng	33,63	27,56	6,07	1,31	0,39
44.3 50 ng	32,33	28,00	4,33	-0,39	1,31
44.4 50 ng	32,03	27,34	4,69	-0,03	1,02
44.5 50 ng	34,32	29,22	5,10	0,38	0,77
49.1 50 ng	31,34	26,30	5,05	0	1
49.2 50 ng	33,16	27,38	5,78	0,74	0,60
49.3 50 ng	32,74	27,56	5,18	0,13	0,91
49.4 50 ng	31,93	26,86	5,07	0,03	0,98
49.5 50 ng	31,93	27,16	4,77	-0,28	1,21
51.1 50 ng	35,64	28,08	7,56	0	1
51.2 50 ng	33,21	27,83	5,38	-2,18	4,52
51.3 50 ng	32,77	27,31	5,46	-2,09	4,27
51.4 50 ng	32,35	27,18	5,18	-2,39	5,24
51.5 50 ng	31,51	27,47	4,04	-3,52	11,48

Tab. 4: In der Tabelle aufgeführt sind die relative B₂-Rezeptor-mRNA-Expression nach Inkubation der Schweineaortenendothelzellen (Proben Nr. 42, 46, 49 und 51) mit CRP^{-/-} (0,5 mg/dl) und als Kontrolle diente das Referenzgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase).

4.6 Einfluss von CRP^{+/+} auf die endotheliale B₂-Rezeptor Expression via Western Blot

Wie im Abschnitt 3.2 wurde auch hier am Anfang der Experimente mit dem CRP^{+/+} gearbeitet. Die Zellen (PAEC) wurden zeit- und konzentrationsabhängig mit CRP^{+/+} stimuliert. Die Zeitkinetik der B₂-Rezeptor-Expression zeigte einen signifikanten Anstieg der BK-B₂R-mRNA-Proteinmenge nach 6 Stunden, die nach 12 Stunden abnahm (Abb. 40 und 41).

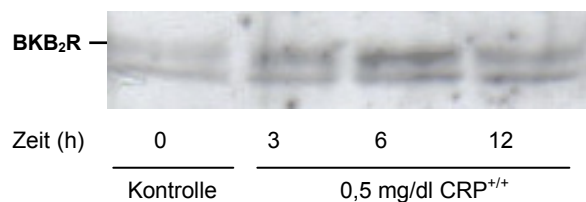


Abb. 40: Ausschnitt aus einem repräsentativen Western-Blot. Zur Ermittlung der optimalen Zeit für die CRP^{+/+}-vermittelte Induktion der B₂-Rezeptor-Expression an Schweineaortenendothelzellen wurden die Zellen mit 0,5 mg/dl CRP^{+/+} für 3, 6 und 12 Stunden inkubiert. Als Kontrolle (K) dienten Zellen der gleichen Zellkultur ohne Zugabe von CRP^{+/+}, die zum Zeitpunkt null unter gleichen Bedingungen geerntet wurden. Die Proteinextrakte der Zellen wurden in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und anschließend mit einem polyklonalen B₂-Rezeptor-Antikörper und einem unspezifischen Anti-rabbit-IgG-Antikörper behandelt. Das zu erwartende Molekulargewicht für das Bradykinin- B₂-Rezeptor Protein liegt bei etwa 70 kDa.

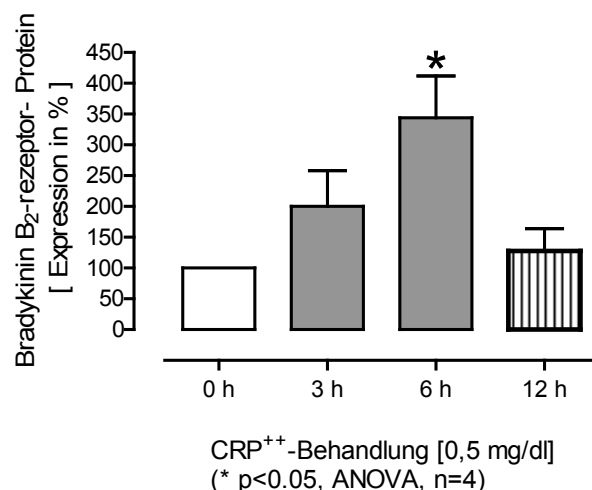


Abb. 41: Dargestellt ist die maximale Zunahme der B₂-Rezeptor-Expression nach 6 stündiger Inkubation mit 0,5 mg/dl CRP^{+/+}. Die Daten zeigen Mittelwerte ± SEM aus n = 4 Versuchen. * = p < 0.05 versus Kontrolle, berechnet durch einseitige ANOVA und Newman-Keuls's Multiple Range Test. Als Kontrolle dienten die ermittelten Werte bei null Stunden. Diese Werte entsprechen 100%.

Nachdem die maximale B₂-Rezeptor-Expression nach 6 Stunden Inkubation gefunden wurde, wurden die Zellen zur Ermittlung der optimalen Konzentration CRP^{+/+} in steigenden Konzentrationen ausgesetzt und die Inkubation nach 6 Stunden beendet. Hierbei konnte bei 1.0 mg/dl CRP^{+/+} eine Zunahme der BK-B₂R-Proteinmenge gefunden werden, die sich aber in wiederholten Versuchen nicht konsistent nachweisen liess (Abb. 42 und 43).

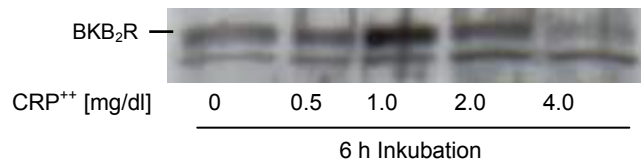


Abb. 42: Repräsentativer Western-Blot der endothelialen B₂-Rezeptor-Expression. Zu erkennen ist die erhöhte B₂-Rezeptor-Expression (etwa 70 kDa) bei 1.0 mg/dl CRP^{+/+}-Inkubation nach 6 Stunden, die sich aber in wiederholten Versuchen nicht immer nachweisen ließ. Schweineaortenendothelzellen wurden 6 Stunden mit 0.5, 1.0, 2.0 und 4.0 mg/dl CRP^{+/+} inkubiert. Als Kontrolle (K) dienten Zellen der gleichen Zellkultur ohne Zugabe von CRP^{+/+}, die unter gleichen Bedingungen geerntet wurden. Die Proteinextrakte der Zellen wurden in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und anschließend mit einem polyklonalen B₂-Rezeptor-Antikörper und einem unspezifischen Anti-rabbit-IgG-Antikörper behandelt.

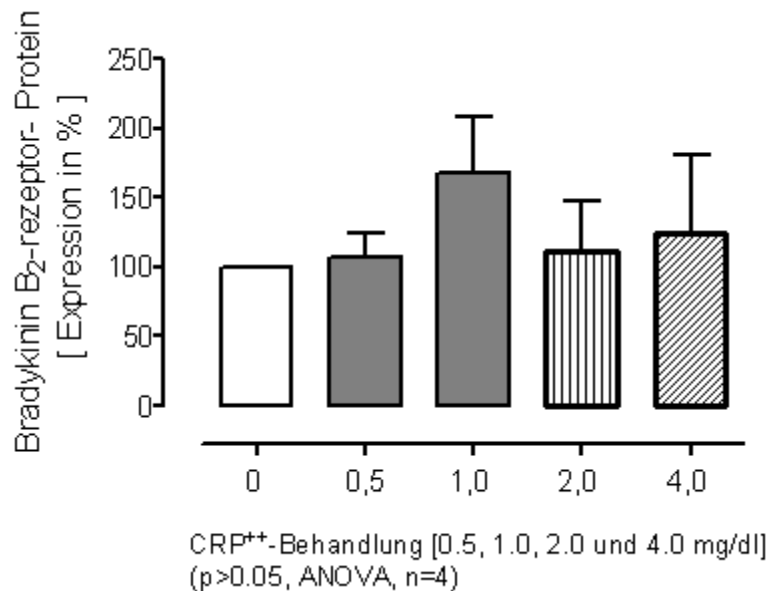


Abb. 43: Dargestellt ist die Konzentrationskinetik der endothelialen B₂-Rezeptor-Expression unter CRP^{+/+}. Bei 1.0 mg/dl CRP^{+/+}-Inkubation fand eine erhöhte B₂-Rezeptor-Expression nach 6 Stunden statt, die aber nach 4 Versuchen nicht signifikant war. Dargestellt sind Mittelwerte aus n = 4 Versuchen, berechnet durch einseitige ANOVA und Newman-Keuls's Multiple Range Test. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Zugabe von CRP^{+/+}. Diese Werte entsprechen 100%.

4.7 Einfluss von CRP^{-/-} auf die endotheliale B₂-Rezeptor-Expression via Western Blot

Da bekannt ist, dass 0,05 % iges Natriumazid auf isolierte Gefäße vasodilatierend wirkt, wurde der obige Versuch nun mit gereinigtem (natriumazidfreiem) CRP^{-/-} an den Aorten-Endothelzellen des Schweins durchgeführt. Weiterhin wurde in diesem Versuch ein monoklonaler Antikörper verwendet, um die gesuchte Bande besser detektieren zu können als bei den polyklonalen Antikörpern. Hierbei konnte von uns ein Molekulargewicht der B₂-Rezeptoren von 37 kDa bestimmt werden, obwohl laut Hersteller ein Wert von 42 kDa erwartet wird. Demgegenüber liegt bei den polyklonalen das zu erwartende Protein bei etwa 70 kDa. Deutlich zu erkennen ist der graduelle Anstieg der B₂-Rezeptor-Expression während 24 Stunden Inkubation mit 0,5 mg/dl CRP^{-/-}.

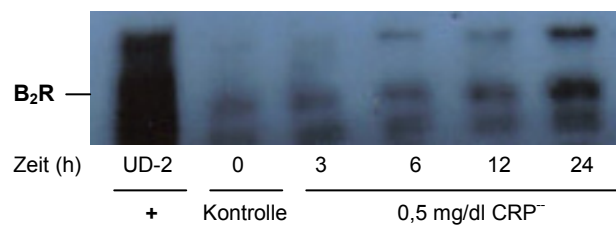


Abb. 44: Ausschnitt aus einem repräsentativen Western-Blot. Um eine CRP-vermittelte Steigerung der B₂-Rezeptor-Expression zu untersuchen, wurden Schweineaortenendothelzellen mit 0,5 mg/dl CRP^{-/-} inkubiert und nach 3, 6, 12 und 24 Stunden geerntet. Zur Kontrolle (K) dienten wiederum Zellen der gleichen Zellkultur ohne Zugabe von CRP zum Zeitpunkt null, die unter gleichen Bedingungen geerntet wurden. Als Positivkontrolle dienten Plattenepithelkarzinomzellen (DU-SCC 2), die vermehrt B₂-Rezeptoren exprimieren. Die Proteinextrakte der Zellen wurde in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und anschließend mit einem B₂-Rezeptor-spezifischen monoklonalen B₂-Rezeptor-Antikörper und einem unspezifischen Anti-Mouse-IgG Antikörper behandelt. Hierbei konnten die B₂-Rezeptoren (B₂R) mit einem Molekulargewicht von etwa 37 kDa bestimmt werden.

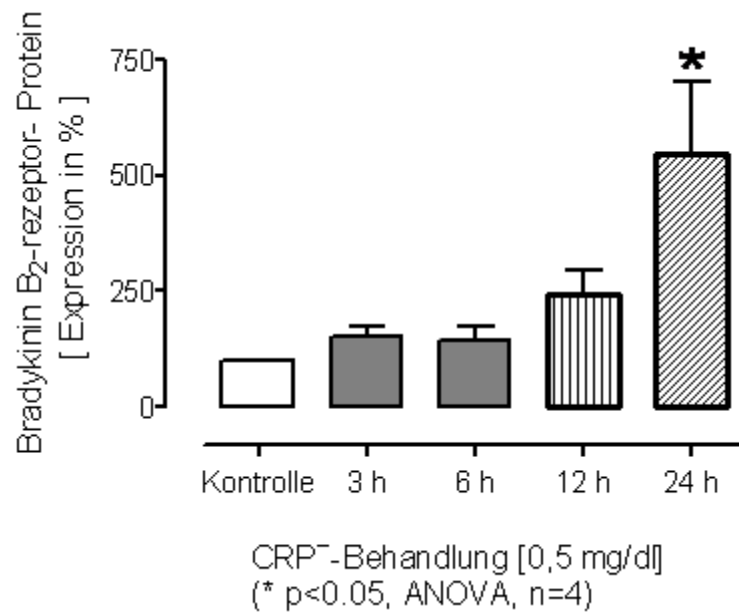


Abb. 45: Dargestellt ist die Zunahme der B₂-Rezeptor-Expression nach CRP⁻-Induktion (0,5 mg/dl) für 3, 6, 12 und 24 Stunden. Die Daten zeigen Mittelwerte ± SEM aus n = 4 Versuchen. * = p < 0.05 versus Kontrolle. Als Kontrolle dienten die ermittelten Werte bei null Stunden. Diese Werte entsprechen 100%.

5 Diskussion

5.1 Einleitung in die Diskussion

Um einen Überblick über den von mir verwendeten Endothelzellenvorrat verschiedener Herkunft zu vermitteln, werden die vaskulären Endothelzellen in ihrer Gesamtheit zunächst in der nun folgenden Argumentation als „das vaskuläre Endothel“ interpretiert. Seit langem ist es bekannt, dass das Endothel nicht nur als Leitsystem für das Blut im Körper dient, sondern dass es vielmehr metabolisch aktiv ist und als Hauptakteur bei zahlreichen Regulierungsprozessen tätig ist. Eine seiner wichtigsten grundlegenden physiologischen Rollen ist es, durch seine antithrombotische luminaire Oberfläche, welche die Adhäsion und Koagulation der Blutplättchen verhindert, den Blutfluss zu ermöglichen. Die wichtigsten Moleküle für die Blutgerinnung, wie z.B. Prostacyclin (PGI_2), Thrombomodulin, Plasminogen, von Willebrand Faktor (vWF) und Fibrinogen werden von den vaskulären Endothelzellen synthetisiert und freigesetzt. Die Endothelzellen beeinflussen die Zusammensetzung der Basalmembran, vermitteln immunologische Prozesse (Cotran, 1987) und verfügen über einen kontraktilen Apparat (Curry, 1992). Weiter sind sie an der Regulierung des Vasotonus (Pohl, Kaas 1994) sowie an der Angiogenese beteiligt (Jaffe, 1985). Die Regulation des Tonus der Blutgefäße erfolgt durch Synthese vasoaktiver Substanzen wie NO, Endothelin-1 (ET-1) und Prostacyclin. Ihre endothelialen Zell-Zell-Kontakte bestimmen dabei die Permeabilität der Blutgefäßwand.

Die Wirkung des C-reaktiven Proteins auf die Endothelzellen wurde von Pasceri et al. im Jahr 2000 zum ersten Mal beschrieben. Das rekombinant gewonnene CRP (rCRP) induzierte die Expression des intrazellulären Adhäsionsproteins ICAM-1 und des vaskulären Zell-Adhäsionsproteins VCAM-1 und E-Selektin in HUVEC dosisabhängig (Pasceri et al., 2000). Anschließend berichtete sein Arbeitskreis ein Jahr später, dass die Sekretion des Chemokins Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in HUVECs durch CRP stimuliert wurde (Pasceri et al., 2001). Die beiden Arbeitskreise von Venugopal und Verma veröffentlichten unabhängig voneinander ihre Arbeiten im Jahr 2002, in denen das CRP die endotheliale NO-Synthase (eNOS) sowohl bezüglich ihrer Expression als auch ihrer Aktivität inhibierte. Die eNOS-vermittelten Prozesse wie Gefäßneubildung wurden dadurch ebenfalls inhibiert und bei Endothelzellen trat vermehrt Apoptose ein (Venugopal et al., 2002; Verma et al., 2002). In einer ähnlichen Studie wurde von Blaschke et al. beobachtet, dass das kommerziell erhältliche CRP die Apoptose der Zellen glatter Muskeln fördert (Blaschke et al., 2004) und die eNOS-

Aktivität in menschlichen endothelialen Gefäßzellen hemmt. Ebenso veröffentlichten Wang et al. in ihrer Arbeit, dass auch die glatten Gefäßmuskelzellen als Angriffspunkte für das CRP dienen können. Normalerweise erfolgt die Bindung durch geschädigte Zellen, in diesem Fall wurde das CRP über Fc-Rezeptoren gebunden. Die *in vitro* und *in vivo* Experimente an Ratten zeigten, dass CRP die Expression des Angiotensin-Typ-1 Rezeptors (AT-1) induziert, die Angiotensin II-vermittelten Effekte verstärkt und Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen hervorruft (Wang et al., 2003).

Um die Rolle des C-reaktiven Proteins (CRP) bei der Regulation der B₂-Rezeptor-Expression zu untersuchen, wurden als Zelllinien von mir humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC), porcine Aortenendothelzellen (PAEC) sowie humane Plattenepithelkarzinomzellen (DU-SCC 2) mit Blick auf die Lokalisation des B₂-Rezeptors eingesetzt. Zur Untersuchung des Einflusses von CRP auf die mRNA-Expression der B₂-Rezeptoren wurden die beiden Endothelzelllinien HUVEC und PAEC verwendet. Die Zelllinie des Plattenepithelkarzinoms (DU-SCC 2) diente in diesem Experiment als Positivkontrolle, da diese Zelllinie B₂-Rezeptoren vermehrt exprimieren kann.

5.2 Evaluation der Resultate der CRP^{+/+}/CRP^{-/-}-Wirkungen auf die Gefäße im Organbad

Aufgrund der möglichen Wirkungen der von NaN₃ verursachten Verunreinigungen mußte das eingesetzte CRP für die nächste Untersuchung auf die isolierten Gefäße natriumazidfrei sein. Die Untersuchung des Einflusses des CRP plus NaN₃ sowie des gereinigten CRP (CRP^{-/-}) auf die Vasodilatation wurde am Organbadexperiment mit Hilfe der Abgangsgefäße der rechten Koronararterie des Schweins durchgeführt.

Das Abgangsgefäß der rechten Koronararterie des Schweins wurde zuerst mit 8 µM PGF_{2α} bis zum Erreichen des Plateaus der Kurve vorkontrahiert. Dann wurde CRP^{-/-} (10µl) ins Organbad zugegeben. Dabei konnte keine oder nur eine sehr geringe Vasodilatation beobachtet werden, die auch durch Artefakte bedingt sein könnte. Der zweite Versuch wurde mit fünffach erhöhter Konzentration von CRP^{-/-} (50µl) wiederholt. Auch bei dieser Konzentration konnte kaum eine zusätzliche Gefäßentspannung beobachtet werden.

Als nächstes wurde das kommerziell erhältliche CRP^{+/+} mit einer Konzentration von 10µl zugegeben. Dieses führte am Gefäß zu einer starken Gefäßerweiterung, die also im Wesentlichen durch Natriumazid erklärbar ist.

Dieses Ergebnis bestätigt ähnliche Daten aus der Literatur (siehe Abb. 46). Die linke Abbildung 46 (A) stellt die in Rahmen der Dissertation ermittelten Ergebnisse von mir mit Schweineaortenendothelzellen dar. Die rechte Abbildung 46 (B) als Vergleich die Graphik der Kurve von Van den Berg et al. 2004, durchgeführt mit Kaninchenaortenendothelzellen.

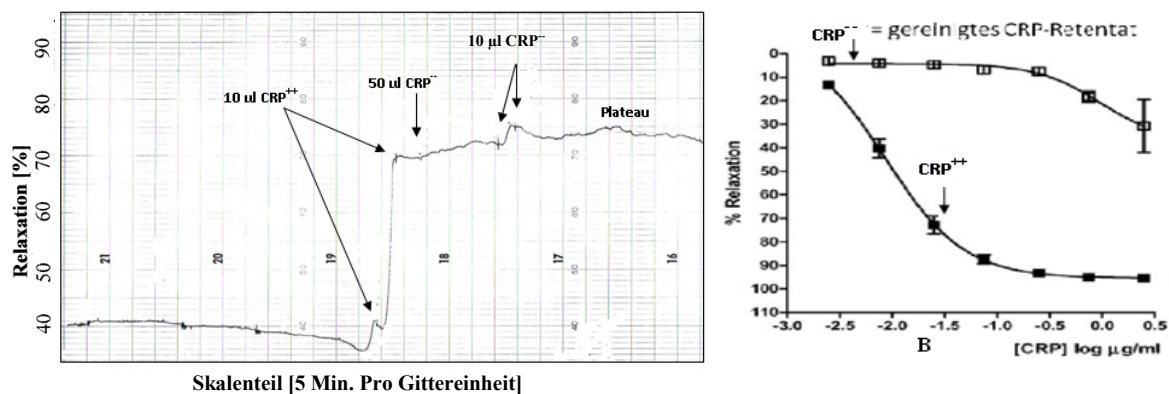


Abb. 46: Effekt des gereinigten CRP und des CRP plus Natriumazid auf isolierte Gefäße. CRP^{-/-} = gereinigtes CRP-Retentat; CRP⁺⁺ = CRP von Calbiochem (A) CRP-Kurvengraphik aus Van den Berg, 2004 (B).

5.3 Aktueller Stand der Forschung zum Thema: Wirkungen des Konservierungsstoffs Natriumazid oder des CRP?

Einige Publikationen beschreiben, dass das Natriumazid auf isolierte Gefäße vasodilatierend wirkt und dass das kommerziell erhältliche CRP nach der NaN₃-Entfernung keine Wirkung auf den Gefäßtonus zeigt. Die erste Studie zur CRP-induzierten Vasorelaxation wurde 2002 veröffentlicht (Sternik et al., 2002). In dieser Studie wurde festgestellt, dass CRP eine Gefäßentspannung durch die K⁺-Kanäle der glatten Muskulatur verursachte, wohingegen im folgenden Jahr 2003 die Autoren ihre Vermutung nahelegten, dass vielleicht die Konservierungsmittel die Vasorelaxation hervorrufen könnten (Triggle et al., 2003). Ein Jahr später berichteten van den Berg u. a. 2004, dass die CRP-induzierte Vasorelaxation durch die Anwesenheit von NaN₃ in kommerziell erhältlichen CRP-Präparaten verursacht wurde. Die Rolle des NaN₃ bei der Gefäßentspannung wird hauptsächlich durch das glattmuskuläre Enzym Katalase sowie die cGMP-abhängige Nachrichtenübermittlung gesteuert. Diese Theorie, dass das NaN₃ Hypotension verursacht, fand weitere Unterstützung (Kaplita et al, 1984 und Trout et al., 1996) wie auch diejenige, dass Nitro-Verbindungen Blutgefäße erweitern (Abrams 1985). Im

Jahr 2004 haben Van den Berg und ihre Mitarbeiter den Einfluss von drei verschiedenen CRP-Präparaten auf die Zell-Relaxation vaskulärer glatter Muskeln untersucht. Folgende CRP-Präparate wurden eingesetzt: eigenes rekombinantes CRP, aus Aszites gewonnenes CRP und azidhaltiges kommerzielles CRP. Sie fanden heraus, dass nur das kommerzielle CRP in der Lage war, die Gefäßentspannung zu induzieren. Deswegen bestätigen die Autoren die anderen Untersuchungen, dass die Gefäßentspannung durch Natriumazid verursacht wurde (van den Berg et al., 2004). Swafford und seine Mitarbeiter konnten im Jahr 2005 zeigen, dass NaN_3 durch die Bildung von Stickoxid Vasodilatation induzieren kann. Dabei wurde vermutet, dass die Gefäßentspannung durch die cGMP-abhängige Aktivierung der glattmuskulären K^+ -Kanäle vermittelt wird (Swafford et al., 2005). Diese Wirkmechanismen von NaN_3 auf den Tonus der glatten Muskeln der Arterien wurden von Swafford et al. 2006 schematisch veranschaulicht, wie in der Abbildung 47 dargestellt.

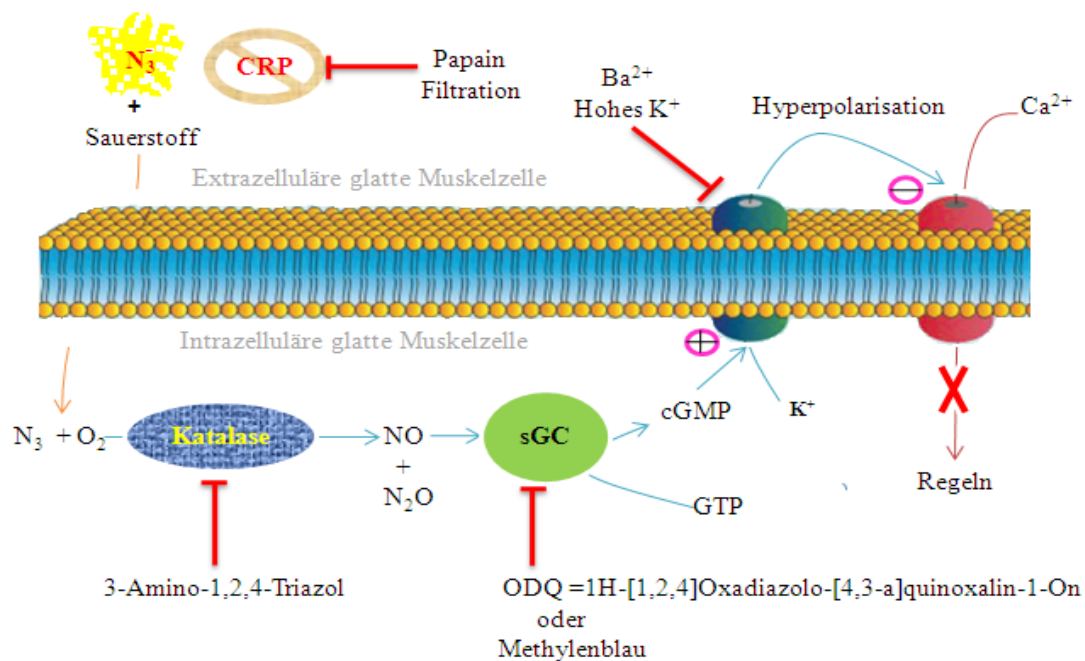


Abb. 47: Die dargestellten Wirkungsmechanismen von NaN_3 auf Gefäßzellen (Abb. modifiziert nach Nelson et al., 1990)

Das gelöste Azid (N_3^-) liegt als Anion im Extrazellulärraum glatter Muskelzellen vor und wird zuerst vom Sauerstoff (O_2) zum Azid (N_3) oxidiert, das durch die Zellmembran diffundiert. Nachdem es dann intrazellulär in den glatten Muskelzellen anzutreffen ist, wird es in Anwesenheit vom Sauerstoff durch das Enzym Katalase zum Stickstoffmonoxid (NO) umgebildet, um im Folgenden die lösliche Guanylatcyclase (sGC) zu aktivieren. sGC katalysiert die Umwandlung von GTP zu cGMP. Über die cGMP-Wirkung auf die Kalium-Kanäle in glatten Muskelzellmembranen verursacht es einen erhöhten Kaliumausstrom, wobei es zu einer Hyperpolarisation kommt. Die Wahrscheinlichkeit von offenen Ca^{2+} -Kanälen des L-Typs wird dadurch reduziert, was letztendlich zu einer Senkung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und schließlich zur Vasorelaxation führt (Keilin, Hartree 1954; Mittal et al., 1977; Theorell, Ehrenberg 1952).

Zusammengefasst führen diese Mechanismen zu einer Senkung der intrazellulären Calcium-Konzentration, so dass es zu einer Einschränkung der Aktin/Myosin-Wechselwirkung in der glatten Muskelzelle und letztlich zur Gefäßentspannung kommt.

Wird aber das Enzym Katalase von der chemischen Verbindung TRZ (3-Amino-1,2,3-Triazol) blockiert, ruft es keine Gefäßentspannungswirkung hervor, weder bei NaN_3 noch bei einer CRP-Lösung, die NaN_3 enthält, wird aber das lösliche Enzym Guanylatcatalase vom hoch selektivem ODQ (1H-[1,2,4]Oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one) oder Methylenblau inhibiert, geht die Relaxationswirkung komplett verloren. Bei Entfernung von NaN_3 aus der CRP-Lösung gibt es überhaupt keine Relaxationswirkung. Die Vasodilatation geht auch trotz der Anwesenheit von CRP, das NaN_3 enthält, verloren, wenn nichtspezifische Kanalantagonisten oder hohe extrazelluläre Konzentrationen von K^+ (100 mM) oder von Ba^{2+} (1.0 mM) zugeben werden. Wird das kommerziell erhältliche CRP-Präparat durch Erhitzen bzw. durch Degradierung mit Papain deaktiviert, wirkt es trotzdem weiterhin gefäßentspannend. Aus diesen Gründen wurde geschlussfolgert, dass diese Wirkung nicht dem kommerziell erhältlichen CRP, sondern dem verunreinigten NaN_3 zu zuschreiben ist (Chang, Lamm 2003; Verma et al., 2006).

In weiteren Untersuchungen wurden noch Zustandsänderungen der Endothelzellfunktion (z.B. Proliferation, Morphologie, Apoptose, Expression von eNOS und ICAM-I oder den Level des MCP-I, IL-8 oder des Willebrand-Faktors betreffend) in Gegenwart von verschiedenen CRP-Präparaten, LPS, oder NaN_3 (Taylor et al. 2005) untersucht. In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen (Van den Berg et al. 2004) konnte keiner der berichteten Effekte des CRPs auf Endothelzellen dem CRP zugeschrieben werden, sondern vielmehr den Kontaminanten.

Der mögliche Beitrag von anderen Nicht-CRP-Komponenten der Lösung ist, wie beim Natriumazid, mit Blick auf den Einfluss von CRP auf proinflammatorische Mechanismen analysiert worden, wie sie z.B. durch IL-1 β in kultivierten menschlichen vaskulären Zellen der glatten Muskulatur hervorgerufen werden. Auch hier schwächte Natriumazid ähnlich kommerziellem CRP und Vehikel-Medium die Induktion von iNOS und die NO-Freisetzung in diesem Zelltyp ab. Wenn Natriumazid aus der CRP-Lösung beseitigt wurde oder das Vehikelmedium durch Dialyse aufgereinigt wurde, gingen die zuvor beobachteten Effekte fast verloren, was wiederum für Natriumazid als den Hauptmediator solcher Effekte spricht (Lafuente et al. 2005). Liu et al. berichteten 2005, dass Natriumazid die oxidative Phosphorylation verhindert und das bioaktive Molekül NO unterdrückt. Zusätzlich veröffentlichten Holland et al. im Jahr 1986, dass NaN_3 die Zellaktivität beeinflusst. NaN_3 agiert wie Zyanid. Es hemmt den Endschritt in der mitochondrialen Atmungskette und verhindert die Reaktion des Sauerstoffs mit den Cytochromen a und a_3 und verursacht letztlich den Zelltod (Holland, Kozlowski 1986).

Die intravenöse Injektion von aus malignem Aszites gewonnenem CRP in Mäuse (Van den Berg et al. 2004) induzierte keine Akute-Phase-Reaktion, auch nicht bei Maus-Serum Amyloid P oder -Serum Amyloid A. Im Gegensatz dazu induzierte die Injektion von CRP aus einem kommerziellen bakteriellen rekombinanten Präparat ein dramatisches Anwachsen der zirkulierenden Konzentration von beiden dieser Proteine, vergleichbar mit der wohlbekannten höchstsensitiven murinen Akute-Phase-Reaktion auf Endotoxin (Pepys et al. 2005). Das rekombinante Material erzeugte auch den Entzündungsmarker TNF- α und Signalreaktionen bei Maus-Makrophagen in vitro, während nicht-rekombinantes CRP dies nicht tat, was wiederum nahelegte, dass ein Kontaminant des kommerziellen Präparats eine mögliche Ursache der entzündlichen Stimulation ist, eher als das CRP selbst.

Diese Ansicht wird jedoch nicht von allen Forschern geteilt. Viele Untersuchungen zeigten, dass die biologischen Effekte des CRP auf Endothel für das Protein spezifisch sind und nicht von Kontamination abhängen, weder von Endotoxin noch von Natriumazid (Verma et al. 2006; Dasu et al. 2007).

5.4. Diskussion der Resultate der Untersuchungen zu zeit- und konzentrationsabhängigen Stimulationswirkungen des CRP^{+/+}/CRP^{-/-} auf die BKR-2-Expression der Endothelzellen

Als Ergebnis eines Schritts meiner Untersuchungen kann festgehalten werden, dass sowohl gereinigtes CRP (CRP^{-/-}) wie auch die Kontrolle ohne CRP an Schweineaortenendothelzellen zu einer B₂-Rezeptor-mRNA-Expression führte. Dieser qualitative Befund ließ jedoch noch keine quantitativen Unterschiede in der Höhe der Expression der beiden RT-PCR-Banden erkennen.

Um in dieser Frage nach der Höhe der B₂-Rezeptor-mRNA-Expression Klarheit zu schaffen, wurde nun anschließend mittels quantitativer Real-time-PCR weiteruntersucht, da nur die quantitative Real-time-PCR wirklich *quantitativ* ist und feinere Unterschiede als die RT-PCR zu detektieren vermag.

Die Ergebnisse der absoluten Quantifizierung von vier Schweineaortenendothelzellproben (siehe dazu Abbildung 37) ergaben keinen eindeutigen Trend und können deshalb nicht als signifikant angesehen werden, was den zeitlichen Verlauf der Inkubation und die Höhe der B₂-Rezeptor-mRNA-Expression angeht. Die einzige Ausnahme, die stetige Zunahme bei Probe 51 im Zeitverlauf, kann den Verdacht auf ein Artefakt nicht sicher ausschließen.

Die graphische Säulendiagramm-Darstellung dieses Sachverhalts (siehe dazu Abbildung 38) zeigt zwar im zeitlichen Verlauf eine stetige Zunahme der B₂-Rezeptor-mRNA-Expression, die jedoch zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zur Expression unbehandelter Kontrollzellen aufzeigt und uns somit statistisch keinen sicheren Beleg für eine erhöhte B₂-Rezeptor-mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen liefert.

Verdeutlicht man diese Ergebnisse der vier Schweineaortenendothelzellproben im nächsten Schritt jetzt noch als Graphik, die die relative Quantifizierung der B₂-Rezeptor-mRNA-Expression (siehe dazu Abbildung 39) zeigt, so wird die Ausnahme der Probe 51 noch extremer sichtbar, jedoch insgesamt auch in dieser graphischen Darstellung das Signifikanzniveau nicht verbessert.

Ein weiterer Schritt bei unseren Untersuchungen war, mittels Western-Blot Schweineaortenendothelzellen (PAEC) mit kommerziell erhältlichem CRP, also CRP mit Konservierungsmittel Natriumazid (CRP^{+/+}), zu untersuchen, um zeit- und konzentrationsabhängige Effekte

auf die Rezeptor-Expression zu finden. Eingesetzt hierbei wurden polyklonale B₂-Rezeptor-Antikörper. Mit Blick auf die Zeitkinetik erreichte der Anstieg der BK-B₂R-mRNA-Proteinmenge sein Maximum nach sechs Stunden (siehe dazu Abb. 40 und 41). Dies entspricht, was die Degradation des Bradykinins angeht, etwa der Halbwertszeit der B₂-Rezeptoren unter verschiedenen Bedingungen (Blaukat et al. 2003, Seite H1913). Aus der Sicht der Konzentrationskinetik erreichte die Zunahme der BK-B₂R-mRNA-Proteinmenge bei 1.0 mg/dl CRP^{+/+} ihr Maximum, die sich aber in wiederholten Versuchen nicht konstant nachweisen liess (siehe Abb. 42 und 43). Diese deutlichen zeit- und konzentrationsabhängigen Effekte sind jedoch ambivalent zu bewerten, da CRP mit Konservierungsmittel NaN₃ eingesetzt wurde, bekannt als Ursache für eine Gefäßerweiterung.

Hieraus ergab sich folgerichtig der nächste Schritt, nämlich der Einsatz von gereinigtem CRP (CRP^{-/-}), um Zweifel an den Ergebnissen durch Verunreinigungsartefakte durch das Konservierungsmittel auszuschließen. Diesmal wurde allerdings aufgrund der besseren Detektionsmöglichkeit ein monoklonaler Antikörper statt der vorherigen polyklonalen Antikörper eingesetzt. Sowohl die Western-Blot-Banden als auch die folgende Graphik mit dem Balkendiagramm zeigten einen zeitabhängigen Anstieg der Bradykinin-B₂-Rezeptor-Expression beim Vergleich mit der Kontrollprobe ohne Zugabe von CRP^{-/-} (siehe dazu Abb. 44 und 45).

Meine gefundenen Ergebnisse mit einem nicht eindeutigen Trend bei der BKR-2-Expression bespreche ich nun am Beispiel der HUVEC und ihres Bindungsverhaltens an das CRP^{+/+}. Drei mögliche Gründe hierfür könnten in Frage kommen:

- 1. Hypothese: Mangelnde Bindungsfähigkeit des pCRP an diese Endothelzellen*
- 2. Hypothese: Zur Zeit meiner Versuche noch unbekannte Detektionsmöglichkeiten für eine weitere notwendige Differenzierung bei den CRP-Konformationen. Außer derjenigen zwischen CRP und NaN₃ einerseits und CRP^{-/-} andererseits muss unterschieden werden zwischen pCRP und seinem Dissoziationsprodukt mCRP.*
- 3. Hypothese: Unterschiede bei der Expression der BKR-2 sind durch die verschiedenen Herkunft (Gewebeart und Species) der Endothelzellen erklärbar.*

Erste Hypothese: Mangelnde Bindungsfähigkeit des pCRP an diese Endothelzellen

Bei der Induzierung der BKR-2-Expression durch CRP^{+/+} konnte von mir gezeigt werden, dass nur eine bestimmte Menge von CRP^{+/+} an die Nabelschnurendothelzellen bindet und die mRNA-Expression der B₂-Rezeptoren an den Nabelschnurendothelzellen deshalb begrenzt hochreguliert (Elektrophorese-Abbildung 34). Eine deutliche CRP^{+/+}-vermittelte Induktion der mRNA-Expression der B₂-Rezeptoren wurde nur bei 0.5 und 4.0 [mg/dl] beobachtet. Trotz der achtfachen Erhöhung der Konzentration an CRP^{+/+} bis auf 4.0 [mg/dl] wurde keine nennenswerte Zunahme der Induktion festgestellt.

Die ermittelten Ergebnisse zeigten keine Abhängigkeit der endothelialen B₂-Rezeptor-Expression von den unterschiedlichen CRP^{+/+}-Konzentrationen bei den kultivierten Gefäßzellen. Deshalb kann vermutet werden, dass die Bindungsfähigkeit bzw. die Affinität des CRP^{+/+} zu den Endothelzellen von HUVEC sehr schlecht oder nur begrenzt war.

Diese Vermutung kann man durch Ergebnisse von Tayler et al. bestätigt sehen. Sie sind bei Bindungsstudien an vaskulären Endothelzellen von HUVEC mit verschieden modifiziertem CRP, nämlich nativem CRP (nCRP), monomerem CRP (mCRP) und biotinyliertem CRP (bCRP), durch flusszytometrische Analyse zu einem ähnlichen Ergebnis wie ich gekommen. Bei dieser Methode wurden einzelne Zellen erfasst und gezählt. Die Detektion erfolgte durch einen Laserstrahl. Sie fanden heraus (siehe Abbildung 48), dass sowohl mCRP(b) als auch bCPR (c/d) an die Endothelzellen von HUVECs gebunden haben, jedoch nicht nCRP⁺⁺(a) (Taylor KE, van den Berg CW, 2007)

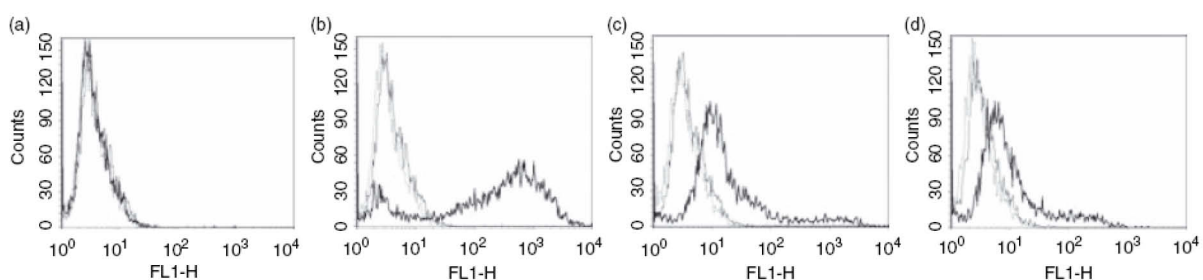


Abb. 48: Darstellung der Bindungsfähigkeit verschiedener modifizierter C-reaktive-Proteine - natives CRP^{+/+} (a), monomeres CRP (b) und biotinyliertes CRP (c) und (d) - durch das flusszytometrische Verfahren. Abbildung entnommen aus Taylor KE, van den Berg CW, 2007

Die oben genannten unklaren Ergebnisse bei den Effekten des CRP^{+/+} auf HUVECs könnten auch in diesem Falle dem CRP plus Natriumazid (NaN₃) oder einer Fülle weiterer

Kontaminanten zugeschrieben werden. Deshalb wurde von uns anschließend das CRP gereinigt zu natriumazidfreiem CRP (CRP^{-/-}) und dann Versuche mit vaskulären Schweineaortenendothelzellen unternommen.

Zweite Hypothese: Zur Zeit meiner Versuche noch unbekannte Detektionsmöglichkeiten für eine weitere notwendige Differenzierung bei den CRP-Konformationen. Außer derjenigen zwischen CRP und NaN₃ einerseits und CRP^{-/-} andererseits muss unterschieden werden zwischen pCRP und seinem Dissoziationsprodukt mCRP.

Bis vor sehr kurzer Zeit waren konformationsspezifische Anti-CRP-Antikörper nicht weitverbreitet erhältlich, so dass einige der Resultate, die mit immunohistochemischen Ansätzen gewonnen wurden, mit Vorsicht interpretiert werden müssen, da einige möglicherweise die Ablagerung oder Bildung von mCRP repräsentieren könnten. In diesem Zusammenhang muss festgestellt werden, dass einer der am häufigsten benutzten Antikörper in der CRP-Forschung (Anti-CRP clon-8) eine Kreuzreaktivität für beide Konformationen zeigt, mit einer höheren Affinität für mCRP als für pCRP (Eisenhardt SU und andere, nicht publizierte Beobachtungen). In einer aktuellen Studie wurde der monoklonale Anti-pCRP-Antikörper 8D8, der exklusiv an die pentamerische Form anbindet, eingesetzt. pCRP wurde weder in gesunden noch in kranken Gefäßen gefunden. Daraus folgt, dass zukünftige immunohistologische Studien, die gewebeassoziiertes CRP bewerten, präzise zwischen der Detektion des mCRP und des pCRP unterscheiden sollten (Eisenhardt et al., 2009).

In diesem Zusammenhang weise ich auch nochmals auf die zum Dissoziationsprozess des CRP schon gemachten Ausführungen hin (Eisenhardt et al., 2009): Außer der Überprüfung auf Kontaminationen sollte man möglicherweise die pCRP-Präparationen auf Dissoziationsprodukte analysieren. Dauerhafte Lagerungen des gereinigten CRP in Lösungen ohne Calcium werden in einer spontanen Konversion von pCRP zu mCRP enden.

Wu und andere zeigten, dass in Abwesenheit von Calcium oder in der Gegenwart von Chelatbildnern wie EDTA eine spontane Dissoziation des CRP auftreten kann (siehe oben S. 59). Nun ist EDTA bei meinen Experimenten sozusagen allgegenwärtig gewesen!

Da sich nun das Bindungsverhalten des mCRP an Endothelzellen von dem des pCRP unterscheidet, konnten bei meinen Experimenten gewebegebundene CRP-Wirkungen möglicherweise nicht ausreichend trennscharf detektiert werden.

Dritte Hypothese: Unterschiede bei der Expression der BKR-2 sind durch die verschiedene Herkunft (Gewebeart und Species) der Endothelzellen erklärbar.

Die CRP-Wirkung auf Endothelzellen ist auch vom Zelltyp abhängig: Es lohnt sich, daran zu erinnern, dass die Herkunft oder der Typ von Endothelzellen auch entscheidend für das Ergebnis einer Studie sein kann. Zum Beispiel gelang es Devaraj et al. 2004 nicht, den stimulatorischen Effekt des CRP auf die MCP-1-Freisetzung in HAECs zu beobachten, während dieser Effekt in Experimenten mit HUVEC behauptet wurde (zit. aus Boncler, Watała 2009)

Weiterhin gibt es eine Studie aus der experimentellen Pharmakologie, die darauf hinweist, dass bei der Erforschung der Bindungsprofile der BKR-2 die Bindungspuffer-Komposition berücksichtigt werden sollte und bei der Festlegung von Tiermodellen Inter-Species-Unterschiede in Betracht gezogen werden sollten (Paquet et al., 1999).

Dies könnte dazu geführt haben, dass die HUVEC und PAEC nicht das gleiche Muster bei der BKR-2-Expression gezeigt haben.

5.5 Wie sind die gefundenen unterschiedlichen Western-Blot Molekulargewichtswerte für den BKR-2 zu erklären?

Laut Blaukat et al. 2003 wurde ein Molekulargewicht des Bradykinin-Rezeptors von etwa 70 kDa bestimmt, was auf eine Glykosylierung des Rezeptors schließen lässt [70]. Dieses liegt höher als der aus der B₂-Rezeptor-Aminosäuresequenz theoretisch zu bestimmende Wert von 42 kDa. Der B₂-Rezeptor besitzt 3 Asparagin-Moleküle in seiner Peptidkette auf der extrazellulären Seite, die von Oligosacchariden gebunden werden können (siehe die Abbildung 14). Durch die Spaltung dieser Bindungen mittels der Endo- β -N-acetylglucosaminidase erhält man nach Yaqoob et al. ein primäres Rezeptor-Protein mit einem Molekulargewicht von 42 bis 44 kDa (Yaqoob et al., 1995).

Michineau et al. (2004) berichten, dass das Molekulargewicht des Rezeptors durch jede weitere Glykosylierung an den Asparagin-Molekülen jeweils um 4 kDa zunimmt. Anders als Yaqoob et al. wurde von Michineau beschrieben, dass der nicht glykosylierte B₂-Rezeptor ein Molekulargewicht von 33 kDa aufweist. Die Werte der glykosylierten Verbindungen lagen bei 37, 41 und 45 kDa. Das niedrige Gewicht des nicht glykosylierten B₂-Rezeptors von 33 kDa zu seiner theoretischen Masse von 42 kDa ist durch seinen hydrophobischen Charakter

bedingt. Michineau et al. konnten an COS-7-, HEK 293- und CHO-K1-Zellen zeigen, dass sich die B₂-Rezeptoren dieser Zellen stets in vier Banden (33, 37, 41 und 45 kDa) anordnen.

Eine weitere und die vielleicht plausibelste Erklärung dafür, dass wir beim Einsatz von polyklonalen Antikörpern (siehe Abb. 40) ein Molekulargewicht von 70 kDa fanden und beim Einsatz von monoklonalen Antikörpern (siehe Abb. 44) etwa die Hälfte davon, nämlich 37 kDa, ist in den Forschungsergebnissen von Michineau et al. 2006 zu finden: Bradykinin-B₂-Rezeptoren präsentieren sich auf Zelloberflächen als Dimere und Monomere. Die Dimere kommen zustande durch unterschiedliche Assoziation von verschiedenen glykolisierten reifen Rezeptor-Molekülen, die durch Disulfidbildung zur Stabilisation humaner B₂-Rezeptor-Dimere auf der Zelloberfläche beitragen. Die Western-Blot-Bande Michineaus für B₂-Rezeptoren ohne N-Glykolisationsstellen werden von ihm mit bis zu 36 kDa angegeben, die doppelte Molekulargröße bei ihm bei etwa 73 kDa (Dimere) (siehe S. 2702 in Michineau et. al., 2006), was beides etwa den von uns gemessenen 37 kDa und 70 kDa entspricht.

Eine Hypothese hierfür könnte lauten, dass unsere polyklonalen Antikörper möglicherweise größere Präzipitate detektiert haben, während die monoklonalen zielgenauere Antikörper für Monomere darstellen.

5.6 Vorläufige Bilanz der Forschungsmeinungen, wie CRP-Einflüsse, Bradykininwirkungen und AÖ-Entstehung zusammenhängen

An diesem Punkt der Diskussion versuche ich nun eine vorläufige Gesamtbewertung des derzeitigen Forschungsstandes zu dem Thema, welche Zusammenhänge zwischen CRP-Einflüssen, Bradykininwirkungen und AÖ-Entstehung gesehen werden und wie dieser erreichte Evidenzgrad begründet wird.

Ich lasse nun im Folgenden diejenigen, die noch offene Forschungsfragen sehen und diejenigen, die bereits von der hinreichenden Aufklärung der Sachverhalte überzeugt sind, zu Wort kommen. Zur Verdeutlichung der ersten Position, nach der es noch offene Fragen gibt, wiederhole ich hier zunächst kurz die in der Einleitung schon genannte zusammenfassende Sicht:

Klinische Beobachtungen haben enthüllt, dass nicht alle Patienten mit hohen BK-Plasma-Konzentrationen auch ein Ödem entwickeln. Nur 0.5% der ACEI-Patienten leiden an einem Angioödem. Dieser Befund zeigt deutlich, dass auch andere Faktoren bei der Entwicklung des

Angioödem eine Rolle spielen müssen.

In diesem Kontext ist es bemerkenswert, dass Patienten mit erhöhten BK-Plasma-Konzentrationen häufig Ödeme entwickeln während oder direkt nach einer Operation oder bei entzündlichen Zuständen. Als Grund hierfür können wir eine Wechselwirkung zwischen Akute-Phase-Proteinen und chronisch erhöhtem BK in Betracht ziehen. Dementsprechend muss angenommen werden, dass die Entwicklung eines AÖ ein multikausales Phänomen ist, bei dem eine Serie von Faktoren zusammenwirken muss. Eine erhöhte Plasma-BK-Konzentration allein ist nicht ausreichend, um ein AÖ auszulösen. Jedoch, wenn weitere Faktoren wie Akute-Phase-Proteine und vermutlich Zytokine anwesend sind, haben wir mehrere Bedingungen für die Entwicklung eines AÖ gleichzeitig zur Hand (Bas et al., 2009).

Zusammengenommen könnten diese Resultate hinweisen auf den Beitrag des Entzündungsprozesses zur Pathophysiologie des Angioödems. Jedoch ist es noch nicht klar, ob oder ob nicht Akute-Phase-Proteine Angioödeme wirklich auslösen (Bas et al., 2007). Vertiefen wir also an dieser Stelle diese Diskussion und vermehren das Wissen durch zusätzliche Argumente aus der Forschung:

Veränderungen der Bradykinin-Konzentration in Plasma und Urin von Patienten, die in ACEI-Behandlung sind, haben nicht eindeutig nachgewiesen werden können. Erhöhte Plasma-Konzentrationen von Bradykinin nach akuter und chronischer ACEI-Behandlung wurden, unter anderen, von Nussberger und Mitarbeitern bei normalen Probanden bestimmt (Nussberger J, Koike 2004; Gohlke 2009).

Die Diskussion um die Resultate der Bradykinin-Tiermodelle kommt zu folgenden Ergebnissen und Schlussfolgerungen (siehe dazu S. 40ff): Tiermodell für die Gefäßentspannung durch erhöhte Produktion von Kallikrein / Tiermodell für die Gefäßentspannung durch erhöhte Produktion von Bradykinin / Tiermodell C1-INH-Knockout-Tiere: ihre erhöhte vaskuläre Permeabilität ist BKR-2-abhängig/ Tiermodell B₂-R-Knockout Mäuse: Bradykinin und Hirn-ödem):

Zitat: Gemeinsam ist allen Tiermodellen, dass sie alle das Kallikrein-Kinin-System betreffen und alle zu einer erhöhten Signalweitergabe via BKR-2 durch sehr unterschiedliche Mechanismen führen. Zudem entwickelten alle Tiere kein phänotypisch sichtbares Angioödem, wie man es erwarten könnte. Deshalb muss die Frage nach dem Grund für das Nicht-Auftreten des Angioödems gestellt werden. Eine mögliche Erklärung wäre z. B., das erhöhte Bradykininaktivität bei diesen Tiermodellen notwendig, aber nicht hinreichend ist als Grund für die Entwicklung eines Angioödems. Es gibt jedoch keine aktuellen Daten, die diese

Hypothese unterstützen.

Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass alle Tiere, die bisher erzeugt wurden, eine ubiquitäre Erhöhung des Kallikrein-Kinin-Systems entwickeln. Daher ist es möglich, dass die lokale Konzentration an der Gefäßwand nicht hoch genug ist, um die Entwicklung eines Angioödems zu begünstigen. Um auf diese Frage einzugehen, müsste jemand ein transgenes Tiermodell erzeugen, bei dem Bradykinin oder auch BKR-2 unter der Kontrolle eines endothelspezifischen Promotors exprimiert würde. In diesem Falle wären wir in der Lage, zu bestätigen, dass diese Faktoren sowohl stark als auch lokal im Endothel, dem Zielorgan, überexprimiert werden. Jedoch sind solche Tiere bis jetzt nicht erhältlich.

Die Schaffung eines Tiermodells, das ein isoliertes Angioödem hervorbringt, wäre für die Forschung von größter Bedeutung, weil man dann in der Lage wäre, mit einem solchen Modell die Pathophysiologie zu demonstrieren und therapeutische Konzepte zu etablieren (Adams 2009).

Nun folgen die Argumente derjenigen, die von der hinreichenden Aufklärung der Sachverhalte betreffend Bradykinin/AÖ überzeugt sind:

Pro-Argumente für hinreichende Evidenz: C1-INH-Mangel führt zu einer Erhöhung der Faktor XII- und Kallikrein-Aktivität, die schließlich zu einer Überproduktion von Bradykinin führt. Es gibt eine hinreichende Evidenz, dass Bradykinin der Schlüsselmediator der Symptome des HAE ist (Bas et al., 2006; Nielsen, Gramstad 2006). HAE-Patienten zeigen eine zwei- bis zwölffache Zunahme der Bradykinin-Level während ihrer Anfälle. Da Bradykinin ein bedeutender Vermittler der mikrovaskulären „leakage“ ist, kann dies die Ödembildung während der HAE-Anfälle erklären (Rosenkranz et al., 2009).

Mehrfach gesicherte Evidenzen belegen, dass Bradykinin der Schlüsselmediator für die HAE-assoziierte Vasodilatation und erhöhte vaskuläre Permeabilität ist. Erhöhte vaskuläre Permeabilität nämlich, die charakteristisch ist für C1-INH-Knockout-Mäuse, kann durch Icatibant umgekehrt werden. Darüber hinaus ist Icatibant in der Lage, die Bradykinin-induzierte Vasodilatation bei Menschen zu inhibieren. Demzufolge repräsentiert die Blockierung der BKR-2 auf Endothelzellen einen logischen Ansatz bei der Behandlung des HAE. Icatibant wurde in Phase 2- und Phase 3-Studien für die Behandlung von akuten Anfällen des HAE (Typ I und Typ II) bewertet, wo es sich als sicher und effektiv erwies (Rosenkranz et al., 2009).

5.7 Welche Rolle spielt nun das C-reaktive Protein bei der Regulation der B2-Bradykininrezeptor-Expression und der Entstehung von Angioödem?

Ich fasse zunächst nochmals die wesentlichen von mir schon zitierten Ergebnisse unseres Instituts u. a. zusammen:

In Organbadexperimenten mit menschlichen und tierischen vaskulären Gewebeproben haben Bas u. a. entdeckt, dass Akute-Phase-Proteine (CRP und Fibrinogen) auf der einen Seite selbst als Mediatoren für die Entwicklung des AÖ fungieren, auf der anderen Seite die BK-Wirkung bis zum 10-fachen verstärken können.

Unsere Hauptresultate [bei der Funktionsprüfung von zwei Akute-Phase-Proteinen an porcinen Koronargefäßen und humanen Arterien (Arteria mammaria interna) und Venen (Große Vena saphena) in Organbad-Experimenten] bis jetzt sind, erstens, dass beide Akute-Phase-Proteine selbst funktionell aktiv sind und Gefäßerweiterung induzieren in einer konzentrationsabhängigen Weise.

Diese Beobachtungen lassen uns annehmen, dass Akute-Phase-Proteine an der Entwicklung des Kinin-induzierten Angioödems teilhaben und nicht nur unspezifische Marker sind (Bas et al., 2009).

Die Akute-Phase-Reaktion verursacht nicht nur den Anstieg von z.B. pCRP, Komplementfaktoren, Fibrinogen, Antiproteasen, Haptoglobin, Phospholipase A₂, sondern auch den Abfall bestimmter Plasmaproteine (z.B. Albumin, Transferrin), was letztlich auf eine Veränderung der Synthese zurückgeführt wird.

Jedoch ist es noch nicht klar, ob oder ob nicht Akute-Phase-Proteine Angioödeme wirklich auslösen.

Als wesentliche Beiträge zur Diskussion Pro und Contra CRP und Gefäßerweiterung habe ich schon zitiert:

Wie kürzlich berichtet, unterdrückte pCRP die endothelabhängige, stickoxid (NO)-vermittelte Gefäßerweiterung durch Aktivierung der p38-mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und NAD(P)H-Oxidase. (siehe S. 59)

Im Jahr 2008 berichtete Oppermann in seiner Dissertationsarbeit, dass die vasorelaxierende Wirkung von CRP in kleinelumigen Arterien endothelabhängig ist. Dieser Effekt scheint möglicherweise auf dem NO/cGMP-Signalweg zu beruhen (siehe S. 59).

Sternik et al. im Jahr 2002 und Li et al. hatten im Jahr 2004 beschrieben, dass das pCRP endothelunabhängige Gefäßentspannung vermittelt und Komplement-inhibierende Proteine in Endothelzellen heraufreguliert (siehe S. 59).

Einige Berichte legen nahe, dass einige der publizierten Effekte des CRP an Endothelzellen der Anwesenheit von Natriumazid, Lipopolysaccharid oder beiden zugerechnet werden können. Außer der Überprüfung auf Kontaminationen sollte man möglicherweise die pCRP-Präparationen auf Dissoziationsprodukte analysieren.

Einige weitere Gedanken von mir zur Diskussion der Referenzwerte:

Die Studien über pCRP-Level bei gesunden normalen britischen Kaukasiern zeigten einen Mittelwert von 0.8 mg/L (Eisenhardt et al., 2009).

In der Literatur finden wir bei der Festlegung der Referenzbereiche für das CRP eine gewisse Schwankungsbreite:

In der 261. Aufl. des Pschyrembel finden wir zwei Angaben: Im Artikel Referenzbereiche: <10 mg/L, im Artikel CRP dort: Referenzbereich bei gesunden Erwachsenen <5 mg/L Serum [7]. Zwischen diesen beiden Werten liegt die Angabe in Zeidlers Rheumatologie-Werk: Bis 7 mg/L (Zeidler 2008). Bas u. a. 2005 orientieren sich wie auch viele andere Publikationen an dem Referenzwert <5 mg/L.

In der Internet-Enzyklopädie Wikipedia finde ich:

Als normal gelten bei Erwachsenen Werte bis 10 mg/L (Milligramm pro Liter) oder 1 mg/dl (Milligramm pro Deziliter). Es gibt auch Laboratorien mit anderen Normalwerten, abhängig von der jeweiligen Analysemethode.

Werte zwischen 10 und 50 mg/l: Leichte oder lokale (örtlich begrenzte) Entzündungen.

Des Weiteren kann CRP bei Rauchern oder Ausdauersportlern leicht erhöht sein.

Werte über 50 mg/l: Schwere Entzündungen

Werte über 100 mg/l: Schwere Erkrankungen, bakterielle Infektionen (Blutvergiftung (Sepsis), bakterielle Hirnhautentzündung oder Lungenentzündung, komplizierte Bauchspeicheldrüsenerkrankung (Pankreatitis), schwere Operationen, schwere rheumatische Erkrankungen im aktiven Stadium, aktiver Morbus Crohn, manche ausgedehnte Tumoren, schwere akute Osteomyelitis (Wikipedia-Artikel CRP 20.12.09).

Was für die relative Risiko-Kategorie und die durchschnittlichen hs-CRP Level beim Screening des CRP gilt, habe ich schon zitiert: Die erhöhten pCRP-Werte sind in Verbindung mit chronischen Erkrankungen gebracht worden wie Bluthochdruck, dem metabolischen Syndrom und Typ II Diabetes bzw. dem ACEI-induzierten Angioödem (Eisenhardt et al., 2009).

CRP-Level von weniger als 1 mg/L werden als geringes Risiko betrachtet, 1 bis 3 mg/L als mittleres Risiko und > 3 mg/L werden als Hochrisiko betrachtet für die Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung (Pearson et al., 2003).

Im obengenannten Rheumatologie-Fachlehrbuch von Zeidler heißt es jedoch zum CRP: Allerdings ist die normale Schwankungsbreite so groß, sodass das CRP für die Bestimmung milder Entzündungsprozesse nicht geeignet ist und zum Monitoring chronischer Entzündungen die Messung eines weiteren, langsam reagierenden Akute-Phase-Proteins (z. B. $\alpha 1$ -Antichymotrypsin oder $\alpha 1$ -saures Glykoprotein) oder der BSG günstiger ist (Zeidler 2008, S. 46).

Folgende Tabelle zeigt einige Gründe für erhöhte oder besonders niedrige CRP-Werte:

TABLE 3. Patient Characteristics and Conditions Associated With Increased or Decreased Levels of hs-CRP

Increased Levels	Decreased Levels
Elevated blood pressure	
Elevated body mass index	Moderate alcohol consumption
Cigarette smoking	Increased activity/endurance exercise
Metabolic syndrome/diabetes mellitus	Weight loss
Low HDL/high triglycerides	Medications
Estrogen/progestogen hormone use	Statins
Chronic infections (gingivitis, bronchitis)	Fibrates
Chronic inflammation (rheumatoid arthritis)	Niacin

Tab. 5: Verschiedene Gründe für erhöhte oder besonders niedrige CRP-Werte (Abb. zit. aus Pearson et al., 2003).

In der Arbeit von Bas u. a. 2005, deren Ergebnisse auch die Ausgangsbasis für meine Experimente lieferte, werden bei den dort genannten Charakteristika der untersuchten Patienten mit einem ACEI-induziertem AÖ CRP-Werte von durchschnittlich 4,32 mg/dl, d. h. 43,2 mg/L genannt.

Es gibt jedoch auch aktuelle Studien, die so hohe Werte nicht bestätigen können: Bas u. a. 2010 fanden als Durchschnittswert einer kleinen Gruppe von 8 Patienten, die mit Icatibant

behandelt wurden, 2,11 mg/dl, d. h. 21 mg/L, bei der retrospektiven Kontrollgruppe von 47 konsekutiven Patienten der Klinik einen Wert von durchschnittlich 3,9 mg/dl, also 39 mg/L (Bas et al., 2010b).

Eine weitere aktuelle von Taki et al. Anfang des Jahres 2010 durchgeführte Studie, die 14 AÖ-Fälle ihrer Klinik retrospektiv untersuchte, fand in der der Teilgruppe der Patienten mit ACEI-induziertem AÖ bei keinem dieser Patienten erhöhte CRP-Werte (Taki et al., 2010).

Oppermann berichtet in seiner Dissertation (2009) von seinen Experimenten, bei denen er CRP in einer azidfreien Zubereitung einsetzte, um Artefakte zu vermeiden: CRP bewirkte nach Vorkontraktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ in diesen Gefäßen eine deutliche dosisabhängige Vasodilatation. Die maximale Dilatation, die mit 5 mg/dl CRP erreicht wurde, lag bei $50,1 \pm 2,5\%$. Der vasodilatative Effekt des CRP ist also vor allem bei pathologisch hohen Konzentrationen, wie sie bei den Patienten mit ACE-Hemmer-induzierten Angioödem vorkommen, am deutlichsten (Oppermann 2008).

Bei meinen Experimenten konnte nur bei CRP und Natriumazid ($\text{CRP}^{+/+}$) im Organbad ein starker vasodilatativer Effekt festgestellt werden, nicht aber bei gereinigtem CRP ($\text{CRP}^{-/-}$).

Dies ist am ehesten auf die geringere Konzentration des von mir eingesetzten $\text{CRP}^{-/-}$ zurückzuführen.

Auch die Induktion der BKR-2-Expression, die nur bei dem Einsatz von $\text{CRP}^{+/+}$ eindeutige Resultate brachte, jedoch bei den Zellkulturen mit $\text{CRP}^{-/-}$ verschiedene Interpretationen zulässt, teilweise statistisch nicht signifikant ist und weitere Kontrolluntersuchungen nötig machen würde, um eindeutige Ergebnisse daraus abzuleiten, ist möglicherweise auf die von mir verwendenden CRP-Konzentrationen zurückzuführen.

Schließlich kann man noch ein grundsätzliches Problem diskutieren, dass bei der Erforschung von AA bei ACEI-Patienten kaum aus der Welt geschafft werden kann: Wie soeben in der Tabelle 5 der Gründe für erhöhte CRP-Werte zu sehen, sind die dort genannten Krankheiten zum größten Teil bei der überwiegenden Mehrzahl der Patienten, die mit ACEI behandelt werden, anzutreffen, so dass sich hier ein nicht zu vermeidendes Überschneidungsproblem ergibt bei der Ursachenfahndung für erhöhte CRP-Werte und das AÖ. In der Studie von Bas u. a. 2005 werden beispielsweise Hypertension, Erkrankungen der Koronararterien, Diabetes, Arrhythmien und Hypercholesterolämie genannt. All diese Erkrankungen können auch ohne AÖ und ohne Einnahme von ACEI mit erhöhten CRP-Werten einhergehen.

Ein vorläufiges Resümee: Seit kurzem erreichte Gewissheit legt nahe, dass der Akute-Phase-Reaktionspartner CRP nicht nur ein Marker, sondern ein potentieller Mitwirkender bei entzündlichen Erkrankungen ist. Widersprüchliche Daten zur Charakterisierung des CRP, entweder pro- oder antiinflammatorisch zu wirken, können durch die Existenz von 2 Konformationen des Proteins erklärt werden: Das zirkulierende native pentamerische CRP (pCRP) und die monomere Isoform (mCRP), gebildet als Ergebnis eines Dissoziationsprozesses des pCRP.

In vitro zeigen beide Isoformen ein sehr verschiedenes inflammatorisches Profil. Das neue Verständnis der lokalen Dissoziation von zirkulierendem Pentamer-CRP zu dem unverwechselbar proinflammatorischen mCRP erlaubt uns einen Ausblick auf das CRP bei Entzündungsreaktionen und beleuchtet weiterhin mCRP und den Dissoziationsprozess des pCRP als potentiell therapeutisches Zielobjekt (Eisenhardt et al. 2009).

Natives oder pentameres CRP (pCRP) hat auch teil an der Wirtsverteidigung durch die Limitierung der Progression und Intensität der Entzündungseffekte, die durch die letzten Stufen der Komplement-Komponenten induziert werden .

pCRP, das frei von Kontamination mit Lipopolysaccharid, Natriumazid oder potentieller Kontamination mit Dissoziationsprodukten (mCRP) ist, scheint weniger Entzündungseffekte oder sogar antiinflammatorisches Potential zu haben .

Verschiedene Tiermodelle und namentlich ein Experiment an Menschen haben die proinflammatorischen Effekte von pCRP geprüft. Wenn kommerzielles pCRP eingesetzt wurde, konnte man nicht sagen, ob die provozierten Effekte infolge der Kontamination erfolgten oder ob die Reaktion von einer möglichen Dissoziation zu mCRP in vivo induziert wurde.

Als Hauptunterschied zu pCRP kann mCRP nicht im peripheren Kreislauf detektiert werden (Eisenhardt SU et al. unpublizierte Daten), was weiter den Gedanken von einer lokalisierten Dissoziation/ Expression des Proteins unterstützt (Eisenhardt et al., 2009).

Die Ansicht Oppermanns: Zurzeit besteht keine Einigkeit darüber, ob CRP lediglich ein Entzündungsmarker oder selbst ein proinflammatorischer Faktor und proatherogener Stimulus ist (Oppermann 2008).

Zum Schluß fasse ich den Stand der Diskussion noch einmal mit einem Zitat aus einer aktuellen Veröffentlichung von Bas u. a. zusammen: Wir berichteten über signifikant erhöhte Serumwerte von CRP und Fibrinogen bei Patienten mit ACEI-induzierten AÖ, nicht aber bei

denjenigen mit anderen AÖ unbekannter Ursache (IAE). Die Beobachtung erhöhter Akute-Phase-Proteine während des AÖ könnte jedoch ebenso ein Epiphänomen sein und wird gegenwärtig weiter erforscht (Bas et al., 2010c).

5.8 Perspektiven

Derzeit scheinen die Behandlungserfolge mit B₂-Rezeptorblockern das stärkste Argument zu liefern, dass es sich bei der Annahme von der Rolle des Bradykinins bei der Genese des AÖ nicht nur um eine gut fundierte Hypothese handelt, sondern dass damit ein entscheidender Durchbruch bei unserem Wissen über die AÖ-Entstehung erreicht wurde. Das könnte allerdings wiederum zur Folge haben, dass die zu Anfang dieser Dissertation im Einleitungsteil genannten Defizite über einen uns fehlenden Algorithmus zu Diagnose und Therapie des AÖ und über das Fehlen einer evidenzbasierten Behandlung zukünftig überarbeitet und bestenfalls korrigiert werden müssten.

6 Zusammenfassung

Welche Rolle spielt das C-reaktive Protein bei der Regulation der B₂-Bradykinin-rezeptor-Expression und der Entstehung von Angioödem?

Angioödem sind Schwellungen der Mukosa und/oder Submukosa der Haut, die die Atmung beeinträchtigen können und potentiell lebensbedrohlich sind.

Im ersten Teil meiner Dissertation liefere ich in meiner Literaturübersicht einen Überblick über den gegenwärtigen medizinischen Wissensstand zum Thema Angioödem (Formen, Epidemiologie, Lokalisationen, Symptome, Diagnostik, Differentialdiagnosen, Therapie und Marker/Trigger vor/während/nach Angioödemattacken, wobei Bradykinin und CRP als Triggerfaktoren in meiner Untersuchung natürlich Schwerpunktthemen bilden).

Bradykinin und Akute-Phase-Proteine und ihre Wirkungen auf Gefäße sind Gegenstand intensiver Forschung und somit auch Ausgangspunkt meiner Experimente gewesen. Die Motivation für die Forschungsaktivitäten an unserem Institut, die Angioödem-induzierenden biologischen Aktivitäten des Bradykinins, die Aktivierung von Entzündungskaskaden, die Verbindung zwischen Plasmamarkern für Entzündung und der Entwicklung eines Angioödems näher zu untersuchen, war der festgestellte signifikant erhöhte Plasma-Level des CRP bei unserem Patientenkollektiv unter ACEI-Behandlung. Da es sich bei der Genese des Angioödems jedoch um ein multikausales Phänomen handelt, eine erhöhte Plasma-BK-Konzentration als Angioödem-Ursache aber allein nicht ausreichend ist, können meine Untersuchungen an Endothelzellen einen weiteren Mosaikstein zu den offenen Fragen hinzufügen.

Ein Ziel des experimentellen Teils meiner Dissertation war die Klärung der Rolle des CRP mit Konservierungsstoff Natriumazid (CRP^{+/+}) und des gereinigten CRP (CRP^{-/-}) auf die Induktion der Bradykinin-B₂-Rezeptor-Expression meiner untersuchten

Gefäßendothelzellproben. Weiter wurden von mir die Gefäßrelaxationswirkungen der beiden genannten CRP-Zubereitungen im Organbad und die zeit- und konzentrationsabhängigen Stimulationswirkungen des CRP^{+/+}/CRP^{-/-} auf die Bradykinin-B₂-Rezeptor-Expression mit den notwendigen Methoden wie PCR, Western Blot usw. an Gefäßendothelzellproben verschiedener Herkunft geprüft.

Es folgt eine Diskussion meiner Ergebnisse mit Blick auf die Schwerpunkt-Themen Rolle von Verunreinigungen des kommerziell erhältlichen CRP und Möglichkeit spontaner Dissoziation des CRP vor dem Hintergrund des aktualisierten Forschungsstandes betreffend CRP, Angioödem und Bradykininwirkungen und der Einflüsse möglicher Signalkaskaden hierbei. Hierzu gehört auch die Diskussion neuer therapeutischer Ansätze und Durchbrüche bei medikamen-

tösen Optionen zur Behandlung des Angiödems.

Als Ergebnis meiner Organbadversuche ist festzuhalten, dass die starke Gefäßerweiterung im Wesentlichen durch das Natriumazid des CRP^{+/+} erklärbar ist. Für die gefundenen Ergebnisse mit einem nicht eindeutigen Trend bei der BKR-2-Expression diskutiere ich im Ergebnisteil der Dissertation drei mögliche Gründe:

1. Mangelnde Endothelzell-Bindungsfähigkeit des pCRP
2. Seinerzeit fehlende Detektionsmöglichkeiten zur Differenzierung von CRP-Konformationen
3. Expression der BKR-2 ist von der Herkunft der Endothelzellen abhängig.

In der Literatur wird erwähnt, dass in Gegenwart von Chelatbildnern wie EDTA eine spontane Dissoziation des CRP auftreten kann. EDTA ist bei meinen Experimenten sozusagen allgegenwärtig gewesen, deshalb sind die Einflüsse solcher Dissoziationsprozesse bei meinen Ergebnissen nicht auszuschließen.

In der Ergebniserörterung folgen nun die Gründe für gefundene unterschiedliche Western-Blot Molekulargewichtswerte für den BKR-2. Eine Vermutung ist hier, dass polyklonale Antikörper möglicherweise größere Präzipitate binden, also Dimere, monoklonale Antikörper aber zielgenauere Antikörper für Monomere sind.

Nun fasse ich die vorläufige Bilanz der Forschermeinungen zusammen, wonach für die Einen erhöhte Plasma-BK-Konzentrationen allein nicht ausreichend sind, um ein Angioödem auszulösen, für die Anderen hinreichend Evidenz besteht, Bradykinin als Schlüsselmediator der Vasodilatation anzusehen.

Bei der Erörterung der Rolle des CRP gehe ich von der Position von Bas et al. aus, dass Akute-Phase-Proteine (CRP und Fibrinogen) auf der einen Seite selbst als Mediatoren für die Entwicklung des Angioödems fungieren, auf der anderen Seite die BK-Wirkung bis zum 10-fachen verstärken können, jedoch weiterhin offen ist, ob Akute-Phase-Proteine Angioödeme wirklich auslösen.

Es folgt nun, was bei der Evaluation erhöhter CRP-Werte an Argumenten im Auge zu behalten ist, ihre Schwankungsbreite und ihre Aussagekraft betreffend: Bei der Ursachenfahndung für erhöhte CRP-Werte ergeben sich Überschneidungsprobleme zu erhöhten Werten durch andere Ursachen und Krankheiten.

Gestritten wird in der neuesten Forschung, ob CRP lediglich ein Entzündungsmarker oder selbst ein proinflammatorischer Faktor und proatherogener Stimulus ist, ob die Beobachtung erhöhter Akute-Phase-Proteine während des AÖ ein eigenständiges Phänomen oder ein Epiphänomen ist.

7 Literatur

Bas M, Hoffmann TK, Kojda G (Hrsg.). Angioedema Congress Book. Georg Thieme Verlag Stuttgart (2009) im folgenden abgekürzt als ACB

Abrams J. Hemodynamic effects of nitroglycerin and long-acting nitrates. *Am Heart J* 110: 216-224. (1985)

Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Forth W. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 10. Aufl. 2009, S. 466/467

Adams V. Bradykinin and the Kallikrein-Kinin System: Kallikreins, Bradykinin and Vascular Signal Transduction. In: ACB. S. 23-27. (2009)

Alcoceba E, Gonzalez M, Gaig P, Figuerola E, Auguet T, Olona M. Edema of the Uvula: Etiology, Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 20(1): 80-83. (2010)

BART-Studie 2007: Titel dieser Studie: Blut-Konservierung mit Antifibrinolytika: Eine randomisierte Studie bei Hochrisiko-Herz-Operations-Patienten, unabhängig, multiinstitutionell, blind, randomisiert und kontrolliert.

Bas M, Hoffmann TK, Bier H, Kojda G. Increased C-reactive protein in ACE-inhibitor-induced angioedema. *Br J Clin Pharmacol* 59(2):233-8 (2005)

Bas M, Hoffmann TK, Kojda G. Evaluation and management of angioedema of the head and neck. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 14: 170-173. (2006)

Bas M, Adams V, Suvorava T, Niehues T, Hoffmann TK, Kojda G. Nonallergic angioedema: role of bradykinin. Review. *Allergy*. 62(8):842-56. (2007)

Bas M, Hoffmann TK, Kojda G (Hrsg.). Angioedema Congress Book. Georg Thieme Verlag Stuttgart (2009)

Bas M, Bier H, Oppermann M, Hoffmann TK, Kojda G. Acute Phase Proteins in Kinin Induced Angioedema. In: ACB (2009). S. 19-22.

Bas M, Greve J, Bier H, Knopf A, Stark T, Schuler P, Hoffmann TK, Kojda G. Notfallsituation akutes Angioödem. *Dtsch Med Wochenschr*; 135: 1027–1031. [Epub 2010 May 11] (2010a)

Bas M, Greve J, Stelter K, Bier H, Stark T, Hoffmann TK, Kojda G. Therapeutic Efficacy of Icatibant in Angioedema Induced by Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors: A Case Series. *Ann Emerg Med*. [Epub ahead of print May 4.]. (2010b)

Bas M, Hoffmann TK, Tiemann B, Dao VT, Bantis C, Balz V, Schultz-Coulon HJ, Stark T, Schuler P, Greve J, Ivens K, Bier H, Kojda G. Potential genetic risk factors in angiotensin-converting enzyme-inhibitor-induced angio-oedema. *Br J Clin Pharmacol*. 69:2, 179–186 (2010c).

- Black S, Kushner I, Samols D. Minireview C-reactive Protein. *J Biol Chem* 279 : 48487-48490 (2004)
- Blaschke F, Bruemmer D, Yin F, Takata Y, Wang W, Fishbein MC, Okura T, Higaki J, Graf K, Fleck E, Hsueh WA, and Law RE. C-reactive protein induces apoptosis in human coronary vascular smooth muscle cells. *Circulation* 110: 579-587. (2004)
- Blaukat A, Micke P, Kalatskaya I, Faussner A, Müller-Ester I. Regulation of Cardiovascular Signaling by Kinins and Products of Similar Converting Enzyme Systems Downregulation of Bradykinin B₂ receptor in human fibroblasts during prolonged agonist exposure. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol* 284: H1909-H1916. (2003)
- Böcker W, Denk H, Heitz PU. Pathologie. 4. Aufl. S. 1032. (2008)
- Bönner G, Chrosch R. Kinine und ACE-Hemmer. München, Arcis Verlag. S. 1-51. (1994)
- Boncler, M. and Watała, C.: Review: Regulation of cell function by isoforms of C-reactive protein: A comparative analysis. *Acta Biochimica Polonica* 56(1): 17–31 (2009)
- Bork K, Hardt J, Schicketanz KH, Ressel N. Clinical studies of sudden upper airway obstruction in patients with hereditary angioedema due to CI esterase inhibitor deficiency. *Arch Intern Med* 163: 1229-1235. (2003)
- Bork K. Current and Future Treatment Options for Hereditary Angioedema. In: ACB (2009). S. 42-45.
- Chang S and Lamm SH. Human health effects of sodium azide exposure: a literature review and analysis. *Int J Toxicol* 22: 175-186 (2003)
- Ciubotaru I, Potempa LA, Wander RC. Production of modified C-reactive protein in U937-derived macrophages. *Exp Biol Med (Maywood)* 230:762-70 (2005)
- Cotran RS. New roles for the endothelium in inflammatory and immunity. *Am J Pathol* 129: 407-413 (1987)
- CRP Molekulargewicht: Die berechnete Größe des Proteins ist 31,6 kD (Berechnung mittels online-Software auf www.sciencegateway.org). Das Molekulargewicht von monomerem CRP liegt bei 24,9 kD (siehe CRP-Protein, NP_000558, PubMed-Datenbank). (Zit. aus Oppermann 2008)
- Curry FE. Modulation of venular microvessel permeability by calcium influx into endothelial cells. *FASEB J* 6: 2456-2464. (1992)
- Dasu MR, Devaraj S, Du Clos TW, Jialal I. The biological effects of CRP are not attributable to endotoxin contamination: evidence from TLR4 knockdown human aortic endothelial cells. *J Lipid Res* 48: 509-512. (2007)
- D'Orleans-Juste P, de Nucci G, Vane JB. Kinins act on B1 and B2 receptors to release conjointly endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 96:4: 920-924. (1989)

- Du Clos TW. The interaction of C-reactive protein and serum amyloid P component with nuclear antigens. *Mol Biol Rep* 23:253-60 (1996)
- Eisenhardt SU, Thiele JR, Bannasch H, Stark GB, Peter K. C-reactive protein. How conformational changes influence inflammatory properties *Cell Cycle* 8(23):3885-92 Review (2009)
- Forth W, Henschler D, Rummel, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie. 6. Auflage. Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich. S. 316-318 (1992)
- Gainer JV, Nadeau JH, Ryder D, Brown NJ. Increased sensitivity to bradykinin among African Americans. *J Allergy Clin Immunol* 98:283–287. (1996)
- Gavras H, Gavras I. Endothelial function in cardiovascular disease: the role of bradykinin, London, Science Press Ltd. 1-57 (1996)
- Gohlke P. RAAS Blocker and Bradykinin Metabolism: The Role of Bradykinin for Clinical Efficacy. In: ACB. S. 32-37 (2009)
- Goodman L, Gilman AG. Pharmakologische Grundlagen der Arzneimitteltherapie, 9. Auflage. London, McGraw Hill. S. 609-632. (1999)
- Hartman K. Treatment of Allergic Angioedema. In: ACB S. 1-3. (2009)
- Hoffmann TK, Bier H, Kojda G, Bas M. Emergency Therapy for angioedema. In: ACB S. 4-7(2009)
- Holland MA and Kozlowski LM. Clinical features and management of cyanide poisoning. *Clin Pharm* 5: 737-741. (1986)
- Ignarro LJ, Byrns GM, Wood KS. Mechanism of endothelium-dependent vascular smooth-muscle relaxation elicited by bradykinin and VIP. *Am J Physiol* 253:H1074-H1082 (1987)
- Jaffe EA. Physiologic function of normal endothelial cells (Review). *Ann N Y Acad Sci* 454: 279-291 (1985)
- Kaplita PV, Borison HL, McCarthy LE, and Smith RP. Peripheral and central actions of sodium azide on circulatory and respiratory homeostasis in anesthetized cats. *J Pharmacol Exp Ther*; 231: 189-194. (1984)
- Kaplan AP. Mechanisms of Bradykinin Formation. In: Kaplan AP, Greaves MW (Hrsg.). Urtikaria and Angioedema. 2. Aufl. S. 80 (2009)
- Kaplan, A. P., Joseph, K.: Review: The bradykinin-forming cascade and its role in hereditary angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol* 104:193–204. (2010)
- Keilin D and Hartree EF. Reactions of methaemoglobin and catalase with peroxides and hydrogen donors. *Nature* 173: 720-723 (1954)

- Khreiss T, Jozsef L, Hossain S, Chan JS, Potempa LA, Filep JG. Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with delayed apoptosis of human neutrophils. *J Biol Chem* 277:40775-81 (2002)
- Kimura A, Kihara T, Ohkura R, Ogiwara K, and Takahashi T. Localisation of Bradykinin B2-receptor in the follicles of porcine ovary; *Bio Reprod.* 65: 1462-147 (2001).
- Kreuz W, Aygören-Pürsün E, Martinez Saguer I, Rusicke E. Hereditary Angioedema: Clinical Manifestation and Therapy. In: ACB S. 8-14. (2009).
- Lafuente N, Azcutia V, Matesanz N, Cercas E, Rodriguez-Manas L, Sanchez-Ferrer CF, Peiro C. Evidence for sodium azide as artifact mediating the modulation of inducible nitric oxide synthase by C-reactive protein. *J Cardiovasc Pharmacol* 45: 193-196. (2005)
- Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the Kinin Receptor Family: from Molecular Mechanisms to Pathophysiological Consequences. *Pharmacol Rev* 57(1):27-77. Review. (2005)
- Leuwer A., Krause J. ACE-Hemmer-induziertes Angioödem. *HNO* 46: 56-59. (1998) Mutschler E, Geisslinger G., Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M. Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie u. Toxikologie 9. Aufl. S. 747 (2008)
- Li SH, Szmitko PE, Weisel RD, Wang CH, Fedak PW, Li RK, et al. C-reactive protein upregulates complement-inhibitory factors in endothelial cells. *Circulation* 109:833-6 (2004)
- Mittal CK, Kimura H, and Murad F. Purification and properties of a protein required for sodium azide activation of guanylate cyclase. *J Biol Chem*; 252: 4384-4390. (1977)
- Liu C, Wang S, Deb A, Nath KA, Katusic ZS, McConnell JP and Noel M. Saplicce NM. Proapoptotic, Antimigratory, Antiproliferative, and Antiangiogenic Effects of Commercial C-Reactive Protein on Various Human Endothelial Cell Types In Vitro. Implications of Contaminating Presence of Sodium Azide in Commercial Preparation. *Circ Res* Published online 2005; Jun 23
- Michineau S, Muller L, Pizard A, Alhenc-Gélas F, Rajerison RM. N-linked glycosylation of the human Bradykinin B2 receptor is required for optimal cell-surface expression and coupling. *Biol Chem* 385: 49-57 (2004)
- Michineau S, Alhenc-Gelas F, Rajerison RM. Human bradykinin B₂ receptor sialylation and N-glycosylation participate with disulfide bonding in surface receptor dimerization. *Biochemistry* 45(8):2699-707 (2006)
- Motie M, Schaul KW, Potempa LA. Biodistribution and clearance of 125I-labeled C-reactive protein and 125I-labeled modified C-reactive protein in CD-1 mice. *Drug Metab Dispos* 26:977-81 (1998)
- Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, and Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *AM J Physiol Cell Physiol* 259: C3-C18 (1990)

- Nielsen EW, Gramstad S. Angioedema from angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor treated with complement 1 (C1) inhibitor concentrate. *Acta Anaesthesiol Scand* 50: 120-122 (2006)
- Nussberger J, Koike H. Antagonizing the angiotensin II subtype 1 receptor: a focus on olmesartan medoxomil. *Clin Ther* 26 (Suppl. A): A12 -A20 (2004)
- Oppermann M. Regulation der Expression und Aktivität vaskulärer Proteine durch Stickstoffmonoxid. Dissertation HHU Düsseldorf (2008)
- Osmand A P, Friedenson B, Gewurz H, Painter RH, Hofmann T, Shelton E. Characterization of C-reactive protein and the complement subcomponent C1t as homologous proteins displaying cyclic pentameric symmetry (pentraxins). *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 739-743 (1977)
- Paquet JL, Luccarini JM, Fouchet C, Defrene E, Loillier B, Robert C, Belichard P, Cremers B, Pruneau D. Pharmacological characterization of the bradykinin B2 receptor: inter-species variability and dissociation between binding and functional responses. *British Journal of Pharmacology* 126, 1083-1090 (1999)
- Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*; 102:2165-8 (2000)
- Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* 103:2531-4 (2001)
- Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC Jr, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F. Centers for Disease Control and Prevention: American Heart Association. 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(3):499-511. (2003)
- Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol*; 34:141-212(1983)
- Pepys MB, Hawkins PN, Kahan MC, Tennent GA, Gallimore JR, Graham D, Sabin CA, Zychlinsky A, de Diego J. Proinflammatory effects of bacterial recombinant human C-reactive protein are caused by contamination with bacterial products, not by C-reactive protein itself. *Circ Res* 97: e97-e103 (2005)
- Pohl U, Kaas J. Interaction of hormones with the vascular endothelium/Effects on the control of vascular tone. *Arzneimittelforschung* 44: 459-461 (1994)
- Potempa LA, Maldonado BA, Laurent P, Zemel ES, Gewurz H. Antigenic, electrophoretic and binding alterations of human C-reactive protein modified selectively in the absence of calcium. *Mol Immunol* 20:1165-75 (1983)
- Potempa LA, Siegel JN, Fiedel BA, Potempa RT, Gewurz H. Expression, detection and assay of a neoantigen (Neo-CRP) associated with a free, human C-reactive protein subunit. *Mol Immunol* 24:531-41 (1987)

Povoa P, Almeida E, Moreira P, Fernandes A, Mealha R, Aragao A, and Sabino H. C-reactive protein as indicator of sepsis. *Intensive Care Med* 24: 1052-1056. (1998)

Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch. 261. Aufl.

Qamirani E, Ren Y, Kuo L, Hein TW. C-reactive protein inhibits endothelium-dependent NO-mediated dilation in coronary arterioles by activating p38 kinase and NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:995-1001 (2005)

Ramakers J, Niehues T. Spezialaspekte der Behandlung des Hereditären Angioödems bei Kindern. In: ACB S. 15-18 (2009)

Rosenkranz B, Fan W, Zimmermann J. Drugs Affecting the Kallikrein-Kinin System In: ACB. S. 28-31. (2009)

Rosenthal, J, Koch, R. Arterielle Hypertonie 4. Aufl. 2004; S. 251

Rottem M: Successful Use of Etanercept in Acquired Angioedema in a Patient with Psoriatic Arthritis *J Rheumatol* 37:1; S. 209. (2010)

Salmon JE, Pricop L. Human receptors for immunoglobulin G: key elements in the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 44:739-50 (2001)

Saxena S, Gierl B, Eibling DE. Supraglottic Swelling May Not Correlate With Tongue Swelling in Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor-Induced Angioedema. *Laryngoscope* 120(1):62-64. (2010)

Shine B, de Beer FC, Pepys MB. Solid phase radioimmunoassay for human C-reactive protein. *Clin Chim Acta* 117:13-23. (1981)

Shrive AK, Holden D, Myles DA, Greenhough TJ. Structure solution of C-reactive proteins: molecular replacement with a twist. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 52:1049-57 (1996).

Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31-9. (2000)

Sternik L, Samee S, Schaff HV, Zehr KJ, Lerman LO, Holmes DR, et al. C-reactive protein relaxes human vessels in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1865-8. (2002)

Swafford AN Jr., Bratz IN, Knudson JD, Rogers PA, Timmerman JM, Tune JD, Dick GM. C-reactive protein does not relax vascular smooth muscle: effects mediated by sodium azide in commercially available preparations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1786-H1795. (2005)

Taki M, Watanabe H, Hasegawa T, Bamba H, Shimada T, Hisa Y. Angioedema: 6 years experience with fourteen cases. *Auris Nasus Larynx* 37(2):199-204 (2010)

Taylor KE and van den Berg CW. Structural and functional comparison of native pentameric, denatured monomeric and biotinylated C-reactive protein. *Immunology* 120 (3): 404-411. (2007)

- Theorell H and Ehrenberg A. The reaction between catalase, azides and hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* 41: 442-474. (1952)
- Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure* 7(2):169-77. (1999).
- Trabold R, Erös C, Zweckberger K, Relton J, Beck H, Nussberger J, Müller-Esterl W, Bader M, Whalley E, Plesnila N. Trabold, R. u. a.: The role of bradykinin B1 and B2 receptors for secondary brain damage after traumatic brain injury in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 30: 130–139. (2010)
- Triggle CR, Hollenberg M, Anderson TJ, Ding H, Jiang, Ceroni L, Wiehler WB, Ng Es, Ellis A, Andrews K, McGuire JJ, and Pannirselvam M. The endothelium in health and disease-a target for therapeutic intervention. *J Smooth Muscle Res*; 39: 249-267(2003)
- Trout D, Esswein EJ, Hals T, Brown K, Solomon G, and Miller M. Exposures and health effects: an evaluation of workers at a sodium azide production plant. *Am J Ind Med* 30: 343-350. (1996)
- van den Berg CW, Taylor KE, Lang D. C-Reactive Protein-Induced In Vitro Vasorelaxation Is an Artefact Caused by the Presence of Sodium Azide in Commercial Preparations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(10):e168-71 (2004)
- Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation* 106: 1439-1441. (2002)
- Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PWM, Badiwala MV, Dhillon B, Weisel RD, Li RK, Mickle DAG, Stewart DJ. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 106: 913-919. (2002)
- Verma S, Devaraj S, Jialal I. Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? C-reactive protein promotes atherothrombosis. *Circulation* 113: 2135-2150 (2006).
- Verzilli C, Shah T, Casas JP, Chapman J, Sandhu M, Debenham SL, et al. Bayesian meta-analysis of genetic association studies with different sets of markers. *Am J Hum Genet* 82:859-72. (2008)
- Volanakis JE, Kaplan MH. Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proc Soc Exp Biol Med* 136:612-4. (1971)
- Volanakis JE. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol Immunol* 38: 189-197. (2001)
- Wahbe LJ. Das Auftreten von angioneurotischen Ödemen im HNO-Bereich im Zusammenhang mit der Medikation von ACE-Hemmern. Diss. Düss. S. 27. (2005)
- Wang CH, Li SH, Weisel RD, Fedak PWM, Dumont AS, Szmitko P, Li RK, Mickle DAG, Verma S. C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation* 107: 1783-1790. (2003)

Wu Y, Wang HW, Ji SR, Sui SF. Two-dimensional crystallization of rabbit C-reactive protein monomeric subunits. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59:922-6 (2003)

Yaqoob M, Snell CR, Burgess GM. Carbohydrate Analysis of B₂ Bradykinin Receptor from Rat Uterus. *J Neurochem* 65: 1290-1296. (1995)

Zeidler H, Zacher J, Hiepe F (Hrsg.). Interdisziplinäre klinische Rheumatologie, 2. Aufl. S. 1173 (2008)

8 Curriculum vitae

Name: Huu Quang Le
Geburtsdatum: 08.01.1976
Geburtsort: Hoi An/ Quangnam / Danang / Vietnam
Staatsangehörigkeit: deutsch

1982 Flucht aus Vietnam und Einreise in die BRD

Schulbildung

1982 - 1984	Katholische Grundschule und Foerderschule, Horneburg
1984 - 1987	Erich-Kaestner-Grundschule, Ratingen
1987 - 1996	Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium, Ratingen
1996	Abitur

Studium

04.1997 - 04.2004	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHU)
04.1999	Ärztliche Vorprüfung
09.2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

04.2003 - 08.2003	Chirurgie am Kantonspital in Zug (Schweiz)
08.2003 - 11.2003	Neurologie am Marienhospital in Düsseldorf
11.2003 - 03.2004	Innere Medizin am Marienhospital in Düsseldorf

Ärztliche Tätigkeit:

07.2005 - 10.2006	Kardiologie in der Abteilung von Dr. Jacksch am St.Vincenz-Krankenhaus
10.2006 – 04.2007	Gastroenterologie in der Abteilung von PD Dr. Kath am Philippusstift-Krankenhaus
04.2007 bis dato	Gastroenterologie in der Abteilung von Prof. Dr. Rünzi am Klinikum Essen Süd

9 Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde auf Anregung und unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Georg Kojda aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Georg Kojda und Herrn Dr. Murat Bas danke ich besonders für die Überlassung des Themas, die Betreuung bei der Anfertigung der Arbeit sowie für die vielen Hinweise, Ratschläge und Ihre Geduld mit mir bei der Bearbeitung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Berndhard Homey und Herrn Prof. Dr. Hans-Wilhelm Müller, dass Sie sich als Ko-Referenten zur Verfügung gestellt haben.

Auch Herrn Prof. Dr. Thomas Hohlfeld aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie gilt mein besonderer Dank für seine ermutigenden Worte in schwierigen Situationen.

Frau Dr. rer. nat. Vera Balz aus dem Forschungslabor der HNO-Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf danke ich sehr für Ihre Einführung in das molekularbiologische Arbeiten, für Ihre hilfreiche Beratung und Unterstützung bei Problemen mit meinen Experimenten.

Frau Petra Kuger (BTA) verdanke ich die sorgfältige Revision des Methodenteils meines Manuskripts.

Gerne denke ich zurück an die freundschaftliche, inspirierende und hilfreiche Atmosphäre unter uns Doktoranden und Praktikanten, die bei unserer Arbeit im Labor für Klinische Pharmakologie herrschte.

Hans-Hermann, ich danke Dir, dass Du das Manuskript durchgelesen und korrigiert hast.

Last but not least schulde ich meiner Familie, meiner Mutter, meiner Schwester Vivian, meinem Bruder Phuoc und meiner Schwägerin My-Dung ganz besonderen Dank für Ihre Unterstützung und ihr Mitgefühl in schwierigsten Situationen, die sich bei der Anfertigung und notwendigen Überarbeitung der Dissertation einstellten.