

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Klinikum Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinbeck

**μ 1-Opioid Rezeptor vermittelte Effekte von Beta-Endorphin
auf die endotheliale und monozytäre
Endothelin-1 und Stickstoffmonoxid Freisetzung**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stefan Barth
aus Hermannstadt

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. Steinbeck

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Bernhard Przybilla
Priv. Doz. Dr. med. Robert Blum

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. U. Wilbert-Lampen

Dekan: Prof. Dr. med. Dr.h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 2009

Meinen Eltern gewidmet

Verwendete Abkürzungen

ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AT-II	Angiotensin-II
ATP	Adenosintriphosphat
Beta-End	Beta-Endorphin
cDNA	komplementärer DNA Strang
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
DAF-2DA	Diaminofluoreszin Diacetat
DMSO	Dimethylschwefeloxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ET-1	Endothelin-1
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HMEC-1	humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie der Haut
HUVEC	humane Endothelzellen von Bauchnabelvenen
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IL	Interleukin
LDL	Low Density Lipoprotein
L-NAME	Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester
LPS	Lipopolysaccharid
MAT	mentaler arithmetischer Test
MCDB	Medium zur Kultivierung von HMEC Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PBMC	mononukleären Zellen
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
THP-1	menschliche akute Leukämie Monozyten Zelllinie
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha
VCAM-1	Gefäßadhäsionsmolekül-1
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Pathomechanismen der Atherosklerose	1
1.2. Stress als Risikofaktor der Atherosklerose	4
1.2.1. Definition von Stress.....	4
1.2.2. Die Stressantwort	4
1.2.3. Stress-induzierte Vasokonstriktion	5
1.2.4. Stress als Auslöser akuter kardialer Ereignisse	5
1.3. Wichtige Zelltypen der Atherosklerose	6
1.3.1. Endothelzellen	6
1.3.2. Die humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie HMEC-1.....	7
1.3.3. Glatte Muskelzellen	8
1.3.4. Monozyten	8
1.3.5. Thrombozyten.....	9
1.4. In der vorliegenden Arbeit analysierte Mediatoren der Vasomotion	9
1.4.1. Stickstoffmonoxid (NO)	9
1.4.2. Endothelin-1 (ET-1)	10
1.5. In der vorliegenden Arbeit analysierte Stresshormone	11
1.5.1. Beta-Endorphin.....	11
1.5.2. Corticotropin-releasing-Hormon (CRH)	12
2. Zielsetzung	14
3. Material und Methoden	15
3.1. Reagenzien	15
3.2. PCR	15
3.3. KIT's.....	16
3.4. Materialien.....	16
3.5. Zellkultur HMEC-1	18
3.5.1. MCDB Zellmedium für HMEC-1 Zellen.....	18
3.5.2. Kultivierung der HMEC-1 Zellen.....	18
3.5.3. Stimulation der HMEC-1 mit Beta-End für NO und ET-1 Messung.....	19
3.5.4. ET-1 Bestimmung nach Stimulation der HMEC mit Beta-End	20
3.5.5. NO Bestimmung nach Stimulation der HMEC-1 mit Beta-End	20
3.6. Nachweis von Beta-End-Rezeptoren auf HMEC-1-Zellen.....	20

3.6.1.	RNA-Gewinnung	20
3.6.2.	DNase-Verdau	21
3.6.3.	RNA-Testgel	22
3.6.4.	Herstellung der cDNA	22
3.6.5.	PCR-Analyse	22
3.7.	Humane primäre Monozyten	23
3.7.1.	Gewinnung der Monozyten	23
3.7.2.	Durchflusszytometrische Analyse der gewonnenen Monozyten	24
3.7.3.	Stimulation der Monozyten mit Beta-End für NO und ET-1 Messung	25
3.7.4.	Stimulation der Monozyten mit CRH für Beta-Endorphin Messung	25
3.7.5.	Extraktion von Beta-End aus Zellkulturmedium	26
3.7.6.	Beta-End Bestimmung nach Stimulation der Monozyten mit CRH	26
4.	Ergebnisse	27
4.1.	Nachweis der μ 1-Rezeptoren auf HMEC-1-Zellen	27
4.2.	Beta-End-induzierte Stimulation der endothelialen ET-1 Freisetzung	28
4.3.	Beta-End-induzierte Stimulation der endothelialen NO Freisetzung	29
4.4.	Nachweis der μ 1-Rezeptoren auf primäre Monozyten	30
4.5.	Beta-End-induzierte Stimulation der monozytären ET-1 Freisetzung	31
4.6.	Beta-End-induzierte Stimulation der monozytären NO Freisetzung	32
4.7.	CRH-induzierte Stimulation der monozytären Beta-End Freisetzung	33
5.	Diskussion	34
6.	Zusammenfassung	37
7.	Literaturverzeichnis	38
8.	Abbildungsverzeichnis	49
9.	Danksagung	50
10.	Lebenslauf	51

1. Einleitung

Die koronare Herzerkrankung, der Apoplex, die periphere arterielle Verschlusskrankheit oder Gefäßaneurysmen sind nur einige der zahlreichen klinischen Manifestationen der Atherosklerose. 43,7% der Toten 2006 in Deutschland starben an Erkrankungen des Herzkreislaufsystems, wobei bei 17,5% aller Toten eine ischämische Herzerkrankung und bei 3,5% ein Schlaganfall ursächlich war (Statistisches Bundesamt, Fachserie 12 Reihe 4. 2007).

Das von Ross formulierte „Response to injury-Modell“ als Pathogenesemechanismus der Atherogenese ist intensiv erforscht und etabliert. Wichtige zu Grunde liegende Pathomechanismen sind die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Rauchen oder Diabetes mellitus, die alle ihren Niederschlag in einem Therapiekonzept gefunden haben (Ross 1999).

Daneben gibt es Hinweise, dass chronischer psychosozialer Stress ebenfalls die Genese der Atherosklerose fördert. Ob Stress synergistisch zu den klassischen Risikofaktoren oder als selbstständiger Faktor die Erkrankung induziert, ist ebenso wenig hinreichend geklärt wie mögliche Pathomechanismen einer Stress-induzierten Endotheldysfunktion als Vorläufer der Atherosklerose.

Es stellt sich die Frage über welche Mechanismen das ZNS, als zentrales Steuerungsorgan belastender psychosozialer Ereignisse wie Stress, an der Entwicklung und Progression der Atherosklerose beteiligt ist.

Hinweise auf Interaktionen von zentralnervösen Prozessen und der Atherogenese beschrieb erstmals Gutstein (Gutstein et al. 1990). Er konnte in einem Tierversuch zeigen, dass es durch chronische elektrische Stimulation des Hypothalamus zu Vasospasmen und Endothelschäden (bis zur Denudierung des Endothels), sowie zu einer Proliferation von glatten Muskelzellen und der Intima kam. Eine stringente pathophysiologische Erklärung für die beobachteten Phänomene konnte Gutstein allerdings nicht geben.

1.1. Pathomechanismen der Atherosklerose

Wie bereits zitiert, nimmt das von Ross postulierte „Response to injury-Modell“ eine zentrale Rolle im Verständnis der Atherosklerose ein. Als Initialphase gilt hierbei die Akkumulation von Lipiden und Lipoproteinen zunächst am Endothel und im Folgenden in der Intima, gefolgt von Anlagerung, Migration und Akkumulation von Monozyten und T-Lymphozyten im subendothelialen Raum, vermittelt durch die

Expression von Adhäsionsmolekülen an der Endothelzell- und Leukozytenoberfläche.

In Anwesenheit von oxidiertem LDL erfolgt die Aktivierung und Umwandlung der Monozyten zu Makrophagen, die durch Aufnahme von Lipoproteinen über den Scavenger-Rezeptor zu Schaumzellen werden, und mit wachsender Zahl das morphologische Bild der „fatty streak“ ergeben (Ross 1999).

Durch eine parallele Ausschüttung von vasoaktiven Substanzen, hydrolytischen Enzymen, Chemokinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Libby, Ross 1996; Raines et al. 1996) aus Endothelzellen, Monozyten, T-Lymphozyten (Giachelli et al. 1998) oder Thrombozyten (Kirkpatrick 1992) werden Proliferation und Migration glatter Muskelzellen (Glagov et al. 1987), eine weitere Akkumulation von Monozyten, Lymphozyten und Lipiden, sowie gerinnungsaktive Eigenschaften vermittelt. Die resultierende Größenzunahme der Läsion führt über eine fibröse Plaquebildung zur weiteren Lumeneinengung, bis zum klinischen Bild des Myokardinfarktes (Ross 1999).

Jüngere Studien im Bereich der vaskulären Biologie haben gezeigt, dass neben den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren die Inflammation als weiterer zentraler Mechanismus der Atherosklerose betrachtet werden muss. (Libby 2003). So ist heute bekannt, dass unter der fibrösen Plaque ein „stiller“ inflammatorischer Prozess vorliegt, der bei Vorliegen bestimmter Triggerfaktoren ausbrechen kann. Vor allem die Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen aus eingeschlossenen Makrophagen destabilisiert die schützende Plaqueoberfläche, und erhöht dadurch die Gefahr für Plaqueruptur (Libby 2003). Die Plaqueinstabilität oder Ruptur wird vor allem durch Katecholamine, Vasokonstriktion, oder durch Thrombozytenaktivierung verursacht, bedingt unter anderem durch eine lokale Endotheldysfunktion (Noll, Lüscher 1998).

Die Erosion, bzw. Ruptur der fibrösen Plaque bietet weiteren Makrophagen und Immunzellen eine Eintrittsmöglichkeit. Durch weitere Aktivierung (Fuster 1994; Lee, Libby 1997) kommt es zur Ausschüttung von Proteinasen, Kollagenasen und Elastasen, die die Plaqueinstabilität sowie die Immunsystemaktivierung potenzieren (Galis 1995). Ebenfalls möglich sind Blutungen, sowohl aus plaqueeigenen Gefäßen als auch luminal, assoziiert mit einer Aktivierung der Gerinnung und resultierender Thrombusbildung mit Gefäßokklusion.

Endotheldysfunktion und Inflammation sind demnach verantwortlich für die Entstehung der Atherosklerose, und sie sind zugleich auch Mediatoren und Promotor von akuten Ereignissen (Fichtlscherer, Zeiher 1999).

Bildliche Darstellung der Atherogenese

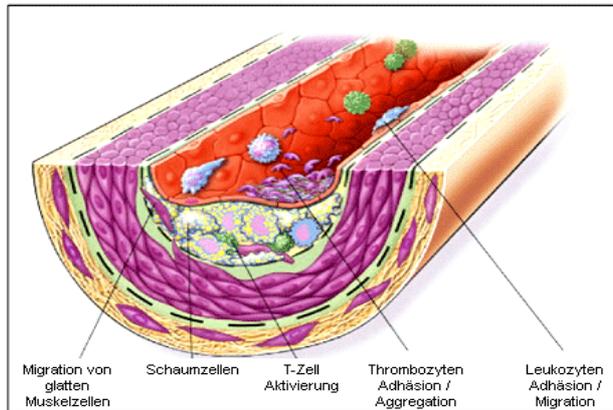


Abbildung 1: Fatty Streak Formationen, modifiziert nach Ross. (Ross 1999)

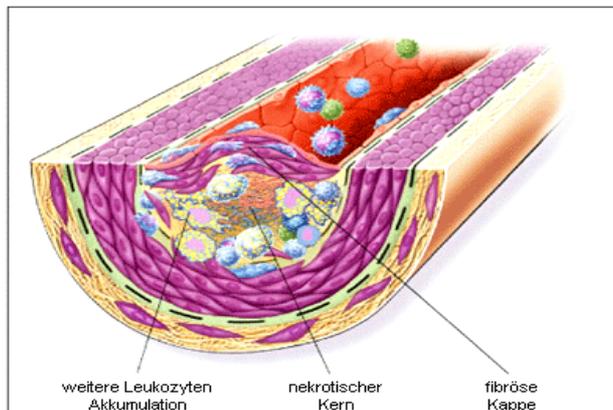


Abbildung 2: Fortgeschrittene Atherosklerose mit nekrotischem Kern und fibröse Plaques. Zunehmende Lumeneinengung, modifiziert nach Ross. (Ross 1999)

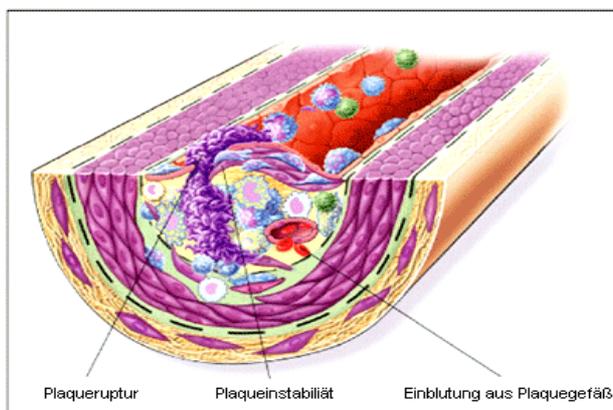


Abbildung 3: Plaquestabilität mit Ruptur, modifiziert nach Ross. (Ross 1999)

1.2. Stress als Risikofaktor der Atherosklerose

1.2.1. Definition von Stress

Das Leben wird durch ein komplexes, dynamisches Gleichgewicht charakterisiert, das ständigen Herausforderungen durch intrinsischen oder extrinsischen, realen oder nicht realen, negativen Kräfte, den sogenannten Stressoren ausgesetzt wird. Stress ist hierbei definiert als ein Zustand der Bedrohung. Die Reaktion auf Stress beinhaltet die Aktivierung von komplexen physiologischen Vorgängen zentraler und peripherer Systemen mit dem Ziel den Organismus in Abwehrzustand gegenüber den Stressoren zu versetzen, um ihm die Flucht in eine günstigere Umgebung und dadurch sein Überleben zu ermöglichen. Inadäquate und/oder über einen verlängerten Zeitraum ausfallende Antworten auf eine Stresseinwirkung können zu negativen Konsequenzen für Metabolismus, Herzkreislauf, endokrines System, Wachstum, Vermehrung, Immunsystem oder Verhalten führen (Habib et al. 2001; Chrousos, Gold 1992).

1.2.2. Die Stressantwort

Die zentralen Komponenten des Stresssystems sind die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) sowie das autonome Nervensystem, wobei zahlreiche Interaktionen auf unterschiedlichsten Ebenen zwischen den beteiligten Systemen beschrieben sind (Habib et al. 2001; Chrousos 2002).

Das Stresssystem erhält und bewertet eine Vielzahl von kognitiven, emotionalen, neurosensorischen und peripheren somatischen Signalen. Die Aktivierung bewirkt zahlreiche physiologische und verhaltensbedingte Veränderungen: erhöhte Wachsamkeit und Vigilanz, Euphorie, reduziertes Schmerzempfinden, Zunahme von Blutdruck, Herz- und Atemfrequenz, maximale Durchblutung von Gehirn und Muskeln, Lipolyse und Glukoneogenese, Hemmung von Wachstum, Fortpflanzung, Darmmotilität sowie Appetit. Die Bronchien sind zwecks besserer Oxygenierung dilatiert, die Kontraktilität des Myokards ist erhöht (Chrousos, Gold 1992).

Während einer Stresseinwirkung werden gleichzeitig auch hemmende Mechanismen aktiviert, die eine inadäquate oder zu lang andauernde Stressantwort mit negativem Effekt auf die Homöostase verhindern sollen (Chrousos 2002). Bei chronischer Aktivierung der Stressantwort aufgrund der Persistenz von Stressoren mit signifikantem Serumanstieg von Kortisol, Adrenalin und Noradrenalin (Pike et al. 1997), überwiegen die negativen Effekte, die zu einer Vielzahl von pathologischen

Veränderungen führen können. Diese reichen von Depression, Malnutrition, Verhaltensstörungen, metabolisches Syndrom, Hypothyreose, Cushing-Syndrom, Nebenniereninsuffizienz, erhöhter Blutviskosität mit Gefahr der Thrombenbildung, erhöhte Thrombozytenfunktion, Stimulation der Immunantwort bis hin zum Myokardinfarkt (Kop 2003; Rozanski et al. 1999).

1.2.3. Stress-induzierte Vasokonstriktion

Die Beobachtung einer signifikanten Vasokonstriktion der Koronararterien unter mentaler Stresseinwirkung bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung lässt auf endothelabhängige Mechanismen schließen (Yeung et al. 1991; Dakak et al. 1995). Auch gesunde Probanden erfahren im Rahmen einer kurzfristigen mentalen Stressinduktion eine verlängerte Endotheldysfunktion mit Aktivierung von Endothelin-A Rezeptoren (Ghiadoni et al. 2000), Effekte, die durch Verabreichung eines Endothelin Rezeptor-Antagonisten vollständig aufgehoben werden konnten (Spieker et al. 2002). Im Rahmen eines mentalen arithmetischen Test (MAT), einer etablierten Methode zur Untersuchung einer möglichen Stress-assoziierten Beeinflussbarkeit des kardio-vaskulären Systems (Fontana et al. 1997; Specchia 1991), konnte eine signifikante Steigerung der ET-1 Plasmakonzentration gemessen werden (Fontana et al. 2005). Erhöhte ET-Spiegel wurden auch im Rahmen einer ausgeprägten Lärm-Exposition, verwendet als experimenteller Stressor, für die Induktion einer Myokardischämie dokumentiert (Castellani et al. 1999).

1.2.4. Stress als Auslöser akuter kardialer Ereignisse

Die Bedeutung von psychosozialen Faktoren wie Depression, Angst, soziale Isolation, geringer sozialer Status, chronischer Stress in Beruf oder Familie, Ärger, oder Feindseligkeit als Triggermechanismen der Atherosklerose, unabhängig von den klassischen Risikofaktoren, konnte durch viele tierexperimentelle, epidemiologische und klinische Studien belegt werden (Rugulies 2002; Rosengren et al. 2004).

Die Gruppe um Wilbert-Lampen und Mitarbeitern konnte kürzlich berichten, dass es unter Einfluss von Stress, ausgelöst durch ein bedeutendes Fußballspiel der deutschen Nationalmannschaft während der WM 2006, zu einem signifikanten Anstieg von Myokardinfarkten und plötzlichem Herztod kam (Wilbert-Lampen, Leistner et al. 2008).

Tragische Ereignisse wie der Tod des Ehepartners, Scheidung oder Verlust der Arbeitsstelle gehen einer Vielzahl von akuten Myokardinfarkten voraus (Rahe et al. 1974; Kaprio et al. 1987). 1994, während eines Erdbebens in Los Angeles, kam es zu einem signifikanten Anstieg der plötzlichen Herztoten auf dem Boden einer vorbestehenden koronaren Herzerkrankung im Vergleich zu einer korrespondierenden Vergleichsgruppe (Leor 1996). Ähnliche Beobachtungen wurden im Rahmen von Luftangriffen auf israelische Städte im Golfkrieg 1991 gemacht (Meisel et al. 1991). Karasek und Kollegen dokumentierten eine vierfache Erhöhung des Risikos für kardiovaskulär bedingten Tod bei Probanden, die in ihrer Arbeitswelt hohen Anforderungen, assoziiert mit geringer Entscheidungsbefugnis ausgesetzt waren (Karasek et al. 1981).

Psychosozialer Stress fördert Atherosklerose einerseits direkt durch Sympathikus- und HPA-Achsen Aktivierung, andererseits fördert Stress eine negative Lebensführung, die eine Zunahme der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren beinhaltet, wie z.B. das Rauchen oder cholesterinreiche Ernährung. Zudem erschwert Stress eine gezielte Veränderung der gesundheitsschädlichen Lebensgewohnheiten (Rozanski et al. 1999). So konnten Rutledge und Kollegen nachweisen, dass Faktoren wie chronischer Ärger oder Depression mit Dyslipidämie, erhöhtem Bodymaßindex oder vermehrtem Rauchen korrelieren (Rutledge et al. 2001).

Frühere Tierexperimente mit Affenpopulationen zeigten, dass ein regelmäßiger Austausch der Mitglieder innerhalb der Gruppe mit daraus resultierenden Kämpfen um die Rangordnung, zu einem signifikanten Anstieg der Atherosklerose der Koronargefäße führte (Kaplan et al. 1982). Keine Unterschiede gab es hinsichtlich Serumlipide, Blutzucker, Blutdruck oder körperlicher Aktivität. Nachfolgende Studien belegten eine deutlich reduzierte Atherosklerosebildung bei Affen in instabilen Verhältnissen, die einen Beta-Blocker erhielten. Die Autoren verwiesen dabei auf einen direkten Zusammenhang zwischen der proatherogene Wirkung von Stress und einer Sympathikusaktivierung (Kaplan et al. 1987).

1.3. Wichtige Zelltypen der Atherosklerose

1.3.1. Endothelzellen

Das vaskuläre Endothel ist ein einschichtiges Plattenepithel und bildet die Innenauskleidung sämtlicher Gefäße. Es ist ein dynamisches Organ mit Schlüsselposition in der Steuerung von kontraktile, sekretorische, mitogene,

hämostasiologischen und immunologischen Funktionen (Fichtlscherer et al. 1999). Durch Ausschüttung von Vasodilatoren (Stickstoffmonoxid und Prostacyclin) oder Vasokonstriktoren (Thromboxan A₂, Endothelin, freie Radikale, Angiotensin II) übernimmt das Endothel eine zentrale Rolle in der Regulation des Gefäßtonus. Desweiteren ist es Produktionsort von Adhäsionsmolekülen, Wachstumsfaktoren, gerinnungsaktiven Faktoren, Endzündungsmediatoren und Chemokinen (Vane 1990). Unter physiologischen Verhältnissen liegt ein Gleichgewicht von pro- und antiatherosklerotischen Eigenschaften vor; unter pathophysiologischen Umständen kommt es hingegen zu einer Imbalance der Endothelfunktion mit verringerter Ausschüttung von NO, bzw. beschleunigter Inaktivierung durch freie Radikale oder oxidiertes LDL (Epstein et al. 2000), bei gleichzeitig gesteigerter Endothelin-1 Synthese (Lerman et al. 1995), resultierend in einer Dysbalance von Vasodilatation und Vasokonstriktion, mit Überwiegen der Vasokonstriktion. Daneben werden durch Endothelzellen vermehrt proinflammatorische Zytokine gebildet, die die NO-Synthase Expression, verantwortlich für die NO-Bildung inhibiert, was zu einer weiteren Reduktion der NO Verfügbarkeit führt (Seidel et al. 2006).

Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Monozyten sind maßgeblich an Adhäsion und Migration der Blutzellen in die Gefäßwand beteiligt (Rainger, Nash 2001). Nach deren Aktivierung durch Zytokine, insbesondere TNF- α , exprimieren die Endothelzellen Adhäsionsmoleküle, wie E- und P-Selectine oder VCAM-1 (Dunon et al. 1996). Rainger und Nash konnten zudem nachweisen, dass die Leukozyten-, Neutrophilen- und Monozytenadhäsion an Endothelzellen, die Expression von E-Selectin und VCAM-1, sowie das Ansprechen der Endothelzellen auf proinflammatorische Zytokinen in Co-Kulturen von Endothelzellen und glatten Muskelzellen im Vergleich zu Endothelzellen in Monokulturen signifikant erhöht sind (Rainger, Nash 2001).

1.3.2. Die humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie HMEC-1

Ein Großteil der Erkenntnisse über Morphologie und Funktion des Endothels konnten im Rahmen von in vitro-Untersuchungen mit primären Endothelzellen gewonnen werden. Die Lebensdauer dieser Zellen ist jedoch eingeschränkt. Früher konnten aufgrund von Proliferationsstop und Zelluntergang lediglich bis zu zehn Passagen erreicht werden (Jaffe et al. 1973). Je nach Herkunft der untersuchten Endothelzellen ergeben sich zudem unterschiedlichste Eigenschaften der Zellen, die oft nicht miteinander vergleichbar sind (Watson et al. 1995). Aus diesem Grund wurden standardisierte Untersuchungsbedingungen gefordert, die auch eine

Reproduzierbarkeit von Ergebnissen ermöglichen. Dieses führte zur Entwicklung von Zelllinien mit langer Lebensdauer, stabilen Eigenschaften, Morphologie und Genexpression (Bouis et al. 2001).

Ades und Kollegen etablierten die in dieser Dissertation eingesetzten HMEC-1 Zellen. Sie stammen vom Endothel von Hautkapillaren und verfügen über die morphologischen, phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von menschlichen mikrovaskulären Endothelzellen. HMEC-1 sind in der Lage LDL aufzunehmen, Bindungen mit Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten einzugehen (Ades et al. 1992), sowie Adhäsionsmoleküle, Antigene und Gerinnungsfaktoren zu exprimieren (Xu et al. 1994). Die Zellen wachsen als konfluenter Monolayer und zeigen auch nach zahlreichen Passagen stets stabile Eigenschaften (Bouis et al. 2001).

1.3.3. Glatte Muskelzellen

Glatte Muskelzellen sind begrenzt auf die Media, erfüllen strukturelle Aufgaben und sind maßgeblich am Erhalt des Gefäßtonus beteiligt.

Bereits im frühen Stadium der Atherosklerose kommt es zu einer Änderung des Phänotyps mit Verlust der kontraktilen Eigenschaften und Zunahme von Vermehrung und Migration. Durch Einwanderung in die Intima kommt es zu einer Intimahyperplasie und Bildung von Bindegewebe; daneben setzen glatte Muskelzellen eine Vielzahl proinflammatorischer Substanzen (Rainger, Nash 2001), wie potente chemotaktische Faktoren für Leukozyten/Monozyten (Wang JM et al. 1991), oder Endothelin-1 (Hahn et al. 1990) frei. Zudem induzieren sie die Expression von Monozytenadhäsionsmolekülen auf Endothelzellen (Dunon et al. 1996) und können, die Adhäsion von Leukozyten außerordentlich potenzieren (Rainger, Nash 2001).

1.3.4. Monozyten

Monozyten sind maßgeblich an allen Stadien der Atherosklerose beteiligt. Sie werden nach Umwandlung in Makrophagen zur Aufnahme von Lipoproteinen befähigt, können Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, hydrolytische Enzyme, Sauerstoffradikale oder Metalloproteinasen freisetzen (Browatzki et al. 2005). Aktivierte Monozyten nehmen auch Einfluss auf Thrombozyten-Endothel und Thrombozyten-Monozyten Wechselwirkungen. Ihre prothrombogene Aktivität resultiert auch aus der Fähigkeit, die endotheliale Bildung von

Gewebsthromboplastin und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 zu stimulieren (Krikpatrick 1992). Durch Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren wie Zytokine, Interferone, oder TNF- α können Monozyten zudem die Inflammation stimulieren (Hansson 1989; Ross 1999).

Monozyten spielen auch im Rahmen von akuten vaskulären Ereignissen eine wichtige Rolle. Untersuchungen von Atheroskleroseplaques während eines akuten Koronarsyndroms zeigten eine hohe Anzahl aktivierter Makrophagen. Diese bewirken durch Freisetzung von Proteinase einen Verdau der Kollagen- und Elastinbestandteile der fibrösen Kappe (Gallis et al. 1995). Zusätzlich zur Plaquestabilisierung können aktivierte Makrophagen durch Ausschüttung von Gewebefaktoren die Gerinnungskaskade initiieren (Mackman 1996).

1.3.5. Thrombozyten

Thrombozyten haften an funktionsbeeinträchtigtem Endothel, an exponierten Kollagenfasern oder an Makrophagen. Nach ihrer Aktivierung tragen sie durch Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen und Makrophagen bei (Bombeli, Schwartz, Harlan 1998). Ebenfalls freigesetzte Arachidonsäure kann entweder zu Prostaglandine, insbesondere Thromboxan A₂, einem potenten Vasokonstriktor und Plättchenaktivator, oder zu proinflammatorischen Leukotriene transferiert werden. Aktivierte Thrombozyten akkumulieren an der Gefäßwand und können, insbesondere vermittelt über den Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptor, zu einer Thrombusbildung mit resultierender Gefäßokklusion führen (Badimon et al. 1997). Durch Ausschüttung von ADP, ATP oder Serotonin können Thrombozyten jedoch auch die NO Freisetzung aus Endothelzellen bewirken und somit gegenregulatorische, vasoprotektive Mechanismen induzieren (Cohen et al. 1983).

1.4. In der vorliegenden Arbeit analysierte Mediatoren der Vasomotion

1.4.1. Stickstoffmonoxid (NO)

NO ist an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen innerhalb des Kardiovaskulären-, Nerven-, und Immunsystem beteiligt. Es wird aus L-Arginin durch die Stickstoffmonoxid -Synthase (NOS) gebildet. Von Bedeutung sind zwei Isoformen der NOS: die endotheliale (konstitutive) und die induzierbare Form der NOS (Nakatsubo et al. 1998). Die induzierbare NOS wird von

Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Makrophagen sowie Thrombozyten gebildet. Die Freisetzung kann durch Endotoxine oder proinflammatorische Zytokine, unterschiedlichste Hormone, Neurotransmitter, Thrombin oder Scherkräfte am Endothel induziert werden (Wright et al. 1992).

Am intakten Endothel vermittelt NO über cGMP als Second-Messenger eine Vasodilatation, und wirkt hierbei als direkter Gegenspieler der Vasokonstriktoren Endothelin-1, Thromboxan und Serotonin (Drexler et al. 1992). Weitere wichtige protektive Funktionen sind die potente Inhibition der Proliferation glatter Muskelzellen (Garg, Hassid 1989) und der Adhäsion von Monozyten am Endothel (Bath et al. 1991), sowie die Inaktivierung von Hydroxidradikalen (Rubanyi, Vanhoutte 1986). Durch Hemmung der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten am Endothel verfügt NO zudem über antithrombotische Eigenschaften (Steuernagel, Schmitz 1995).

Zahlreiche Studien konnten belegen, dass die Endotheldysfunktion mit einer reduzierten NO-Bioverfügbarkeit assoziiert ist (Flavahan 1992). Somit muss der reduzierten NO Bildung eine bedeutende Rolle in der Entstehung und Progression der Atherosklerose postuliert werden.

Drexler und Kollegen beobachteten eine verminderte Fähigkeit der endothelvermittelten Vasodilatation bei Patienten mit einer fortgeschrittenen KHK unter körperlicher Belastung oder mentalem Stress, resultierend in einer verstärkten Vasokonstriktion im Vergleich zu einem gesunden Endothel (Drexler et al. 1989). Auch Lerman und Kollegen dokumentierten gleichzeitig erhöhte Endothelin-Spiegel und reduziertes NO im Blut von Patienten mit KHK (Lerman et al. 1991) und Wieczorek und Mitarbeiter bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom (Wieczorek et al. 1994).

1.4.2. Endothelin-1 (ET-1)

Endothelin-1 nimmt sowohl in der Atheroskleroseentstehung als auch innerhalb akuter vaskulärer Ereignisse eine Schlüsselrolle ein.

Es wird mittels Proteolyse aus einer aus 39 Aminosäuren bestehenden Vorstufe insbesondere in Endothelzellen, Makrophagen, oder glatte Muskelzellen gebildet (Arendt et al. 1993); die ET-1 Wirkung wird vornehmlich über Bindung an den Endothelin-A Rezeptor vermittelt (Miller et al. 1989; Lerman et al. 1990).

Zu den Faktoren, die die Endothelinexpression fördern, sind Thrombin, Wachstumsfaktoren, IL-1, Adrenalin, Angiotensin II, Vasopressin und Calcium zu nennen (Yanagisawa et al. 1988). Unter physiologischen Bedingungen werden nur

geringe Menge Endothelin-1 gebildet (Lüscher et al. 1992). Mit steigendem Alter nimmt die Endothelin-1 Produktion zu (Miyachi et al. 1989).

In hoher Konzentration bewirkt ET-1 die stärkste endogene Vasokonstriktion, es steigert zudem die Empfindlichkeit der Gefäßmuskulatur gegenüber weiteren Vasokonstriktoren, wie Katecholamine, AT-II oder Serotonin (Yang et al. 1990; Merkel et al. 1992). Desweiteren vermittelt ET-1 mitosefördernde Eigenschaften an glatte Muskelzellen und Endothelzellen (Hirata et al. 1989).

Eine pathophysiologische Bedeutung wird dem ET-1 im Rahmen von Herzinsuffizienz, KHK und Myokardinfarkt zugeschrieben, so gehen alle Krankheitsbilder mit erhöhtem Plasmaspiegel einher (Steward et al. 1992; Lerman et al. 1992; Wieczorek et al. 1994; Lam et al. 1991). Auch entzündete Atheroskleroseplaques weisen vermehrt ET-1 auf (Zeiger et al. 1995). Gefäße von Patienten mit Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus scheinen zudem empfindlicher auf Endothelin zu reagieren (Ihling 1998).

ET-1 vermindert nachweislich die cGMP-Bildung in vitro und reduziert damit die NO-vermittelte Vasodilatation (Vigne et al. 1993), und stimuliert die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , Interferonen oder Interleukin (Finsnes et al. 2001; Browatzki et al. 2000). Desweiteren moduliert ET-1 die Leukozytenadhäsion an Endothelzellen (Helset et al. 1994), induziert die Bildung von Oberflächenproteinen für Zell-Zell Kontakte auf Monozyten (Browatzki et al. 2005) und stimuliert die Kollagensynthese in Fibroblasten (Rizvi et al. 1996). Zudem ist ET-1 ein potenter Aktivator der Angiogenese (Grant et al. 2003). In Tierversuchen mit Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit einem Endothelin-Rezeptor-Antagonisten zu einer signifikant geringeren Entwicklung von Atherosklerose führen kann (Barton et al. 1998).

1.5. In der vorliegenden Arbeit analysierte Stresshormone

1.5.1. Beta-Endorphin

Beta-Endorphin ist ein endogenes Opioid und wird aus der Vorstufe Proopiomelanocortin gebildet. Bildungsorte sind Hypothalamus, Hypophyse, Endothelzellen, sowie Zellen des Immunsystems (Battistella et al. 1996). Die Beta-Endorphin Effekte werden vor allem über μ -Opioid Rezeptoren (Wang X et al. 2006) vermittelt. Das Hormon besitzt darüberhinaus eine Affinität zu δ und κ Rezeptoren. Die Beta-Endorphin-Ausschüttung unterliegt der Kontrolle zahlreicher Neurotransmitter; so wird z.B. eine Stimulation durch das serotonerge System und

eine Hemmung durch das dopaminerge System oder über GABA-Rezeptoren induziert (Sacerdote et al. 1987). Erhöhte Werte im peripheren Blut werden auch im Rahmen von psychosozialen Stress gemessen (Dantzer et al. 1989), wohingegen erniedrigte Plasmaspiegel bei Patienten mit Kopfschmerzen, Migräne und Rheuma nachweisbar sind (Battistella et al. 1996).

Das Hormon ist ein bedeutender Regulator innerhalb des Nerven-, Endokrinen-, Kardiovaskulären-, und Schmerzsystems, und übt auch modulatorische Effekte innerhalb von Inflamationsprozessen aus (Wiedermann et al. 1992). So stimuliert es Leukozyten zur Produktion und Ausschüttung von Sauerstoffradikalen (Sharp et al. 1987), wirkt chemotaktisch auf Leukozyten und fördert signifikant deren transendotheliale Migration (Wiedermann et al. 1994). Es induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen und Rezeptoren für Komplementfaktoren auf der Oberfläche von Granulozyten und ist beteiligt an deren Migration, Aggregation, Adhäsion, sowie an der Aktivierung der Phagozytose (Menzebach et al. 2003). Faletti und Kollegen gelang der Nachweis, dass Beta-End, vermittelt über μ -Rezeptoren, die NO Ausschüttung im Hypothalamus über eine Hemmung der NO-Synthase Aktivität reduzieren kann, Effekte, die unter der Gabe des μ -Rezeptor-Blockers Naloxon aufgehoben wurden (Faletti et al. 1999).

1.5.2. Corticotropin-releasing-Hormon (CRH)

CRH ist das wichtigste Stresshormon der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) mit erhöhten Plasma- und Liquorspiegel bei Stressinduktion (Claes 2004). Es ist verantwortlich für die Koordination der neuroendokrinen und autonomen Reaktionen im Rahmen einer Stresseinwirkung auf den Organismus (Vale et al. 1981). Die CRH Bildung erfolgt sowohl innerhalb des zentralen Nervensystems, als auch in der Peripherie, z.B. in Endothelien, Myokard, entzündetem Gewebe, oder Immunzellen (Harbuz, et al. 1992; Cantarella et al. 2001; Baker et al. 2003).

Über ACTH bewirkt CRH die Bildung von Kortisol in der Nebenniere. Daneben verstärkt das Stresshormon inflammatorische Prozesse, einerseits durch Mobilisation und Aktivierung von Endzündungszellen (Hansson et al. 2005), andererseits durch Induktion der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen aus Immunzellen (Agelaki et al. 2002). Aus Tierversuchen ist bekannt, dass Ratten mit lokaler Inflammation hohe CRH-Werte am Endzündungsort aufwiesen, während systemisch Normwerte festgestellt wurden. Die lokale Applikation von CRH-

Antiserum führte zu einer signifikanten Besserung der Endzündung (Karalis et al. 1991).

Einen Zusammenhang zwischen CRH und Endothelin zeigten in-vitro Untersuchungen mit humanen Endothelzellen, die nach Stimulation mit CRH im Vergleich zu den Kontrollzellen, signifikant höhere Mengen Endothelin synthetisierten. Die Effekte konnten durch den CRH-Rezeptor Antagonisten Astressin antagonisiert werden. Bestätigt wurden die Ergebnisse durch den Nachweis des CRH-Rezeptor Subtyps R2 (Wilbert-Lampen, Trapp et al. 2006). Umgekehrt konnte eine signifikante Zunahme der CRH-Ausschüttung unter systemisch appliziertem Endothelin festgestellt werden (Malendowicz et al. 1998).

CRH übt zudem einen Einfluss auf Monozyten durch Steigerung ihrer Aktivität und Mobilität (Genedani et al. 1992), sowie auf deren Zytokinenproduktion (Angioni et al. 1993). Die Zugabe von CRH in Zellkulturen steigerte signifikant die Adhäsion von humanen Monozyten an Endothelzellen, am ehesten vermittelt durch eine CRH-induzierte Stimulation der monozytären MAC-1 Expression (Wilbert-Lampen, Straube et al. 2006). Eine Steigerung der MAC-1 Expression, gekoppelt mit vermehrter Chemotaxis von Monozyten in Zusammenhang mit psychischem Stress, konnte auch innerhalb von klinischen Studien bestätigt werden (Mills et al. 1996; Redwine et al. 2003).

Die Stimulation von Monozyten mit CRH führte auch zu einem signifikanten Anstieg der Endothelin-Synthese, während die NO-Ausschüttung reduziert wurde. Beide Effekte waren durch den CRH-Rezeptor-Antagonisten Astressin antagonisierbar. Der Nachweis der monozytären CRH-Rezeptoren R1 und R2 komplettierte die Versuche (Wilbert-Lampen, Straube et al. 2006).

2. Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, mögliche direkte Effekte des Stresshormons Beta-Endorphin auf die Endothel- und Monozytenfunktion zu untersuchen, wobei beispielhaft die Vasomotion mit den wichtigen Vertretern Endothelin-1 als Vasokonstriktor und Stickstoffmonoxid als Vasodilatator gewählt wurde. Zudem sollte geklärt werden, ob CRH die periphere monozytäre Beta-Endorphin-Bildung beeinflussen kann, als Hinweis einer möglichen Interaktion beider Stresshormonsysteme.

3. Material und Methoden

3.1. Reagenzien

Bachem, Weil am Rhein, Deutschland: Beta-Endorphin

Biozym, über Biotrend Chemicals, Köln: humanes CRH

Sigma-Aldrich, Deutschland: BSA, Chloroform, DMSO, Ethanol, PBS,
Gentamycin, Epidermal Growth Factor,
Hydrocortison, Isopropanol, LPS,
Glutamin, Methanol, Trypsin, Penicillin,
Nalaxonhydrochlorid, Streptomycin

Biochrom Seromed, Berlin: Tryptanblau

CCpro, Deutschland: MCDB 131 mit/ohne Phenolrot, FCS

Biochrom, Deutschland: RPMI 1640-Medium

Axxora GmbH: CD-14 Antikörper, CD-14-PE, Isotypkontrolle,
L-NAME

Beckman Coulter, Deutschland: DAF-2 DA

3.2. PCR

Agarose: Cambrex Bio Science, Rockland, USA

Beta-End Primer Forward und Reward: Thermohybrid, Ulm, Deutschland

DNA Free: Ambion Europe, England

DNA-Taq Polymerase: Fermentas, Deutschland

dNTP, DTT, Random Primer, RNase out Recombinant Ribonuclease Inhibitor Mix:
Invitrogen, Merelbeke, Belgien

Elektrophoreseauftragspuffer (6x Loading Dye Solution): Fermentas, Deutschland

Ethidiumbromid: Merck, Darmstadt, Deutschland

Formadinauftragspuffer: Fermentas, Deutschland

Primer 1 CRFR 2 Forward, Primer 2 CRFR 2 Reward: Thermohybrid, Ulm, Deutschland

Reverse Transkriptase: Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

SDS Wasser: Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Sequenzanalyse bei Firma Medigenomix GmbH, Martinsried, Deutschland

TBE Puffer: Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

TRIzol-reagenz: Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

3.3. KIT's

DNase Kit: Ambion, Frankfurt, Deutschland

Endothelin ELISA: Assay Design über Biotrend Chemicals, Köln, Deutschland

Humanes Beta-Endorphin ELISA: Bachem, Weil am Rhein, Deutschland

Monozytenisolation Kit: Dynal Biotech GmbH, über Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

RT Kit: Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

Superscript TM II Kit: Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

3.4. Materialien

1 ml Kryotubes: TPP, Trasadingen, Schweiz

15 ml, 50 ml Röhren: Falcon; Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

C 18/200 mg Extraktion-Säulen: Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

Mikrotiter 96 Well flat bottom: Corning Costar, Schiphol-Rijk, Holland

Pipettenspitzen: Gilson, Middleton, USA

Zellkulturflaschen: Nalge Nunc Int., Roskilde, Dänemark Geräte

Autoklav: Autoklav Typ 26, Firma Melag, Berlin, Deutschland

Backautomat: Memmert, Schwabach, Deutschland

Elektrophorese: Sub-Cell GT: Bio-Rad, München, Deutschland

Geldokumentationsystem: Bio-Rad Gel Doc 2000

Analysis-Software: Quantity One 4.1.1, München, Deutschland

Lichtmikroskop: Axiovert 25, Firma Zeiss, Jena, Deutschland

Multiplate-Reader: GENios, XFlour4-Software: TECAN, Crailsheim, Deutschland

PCR Cycler: DNA Engine Dyad Cycler: BioRad, USA

Photometer: Bio-Photometer: Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Sicherheitswerkband Klasse 2: Sterilgard III, Advance: The Baker Company, Sanford, Kanada

3.5. Zellkultur HMEC-1

3.5.1. MCDB Zellmedium für HMEC-1 Zellen

Das HMEC-1 Zellmedium enthielt folgende Zielkonzentrationen, aufgelöst in MCDB 131 Nährmedium: 10% FCS (fetales Kälbermedium), 2 mM L-Glutamin, 10 ng/ml humanes Epidermal Growth Factor, 1 µg/ml Hydrocortison, sowie 2 mg/ml Gentamycin.

3.5.2. Kultivierung der HMEC-1 Zellen

Die Zellen wurden in 1ml Kryotubes zu je 1 Million Zellen pro Milliliter in 10% DMSO bei -180°C tiefgefroren und aufbewahrt.

Zur Kultivierung wurden 10 ml der im Wasserbad aufgetauten Zellen entnommen, in 75 ml-Zellkulturflaschen überführt und in den Brutschrank gestellt. Nach 24 h erfolgte der erste Mediumwechsel, die weiteren je nach Zelldichte, nach etwa 48 bis 72 h.

Das Splitten der Zellen erfolgte in Abhängigkeit der vorliegenden Zelldichte. Sind die ausgesäten Zellen soweit proliferiert, dass sie die Bodenfläche nahezu vollständig einnehmen, wird der Zellrasen als konfluent bezeichnet. In diesem Stadium wurden die Zellen abgelöst und in eine neue Zellkulturflasche für weitere Passagen überführt, bzw. in den gewünschten Versuchsansätzen eingesetzt. Frisch aufgetaute Zellen wurden in drei bis vier Passagen kultiviert, bevor sie Verwendung in den Versuchsansätzen fanden.

Zunächst erfolgte das Absaugen des MCDB-Mediums, einschließlich Schwebstoffe, oder avitale Zellen. Durch anschließendes Spülen mit 10 ml PBS wurden Reste des serumhaltigen Mediums eliminiert, um die Funktion des im nachfolgenden Schritt verwendeten Enzyms Trypsin zu gewährleisten. Es folgte die Gabe von 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung. Während einer 2 bis 3- minütigen Inkubation im Brutschrank lösten sich die adhärenen Zellen ab. Die definitive Einwirkzeit wurde unter lichtmikroskopischer Kontrolle des Ablösevorgangs festgelegt. Zum Stoppen des Ablösevorgangs wurde MCDB-Medium auf die gesamte Zellsuspension gegeben, diese wurde anschließend in einem 50 ml-Röhrchen überführt und bei 1200 - 1400 U/min 10 min zentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes blieb das aus HMEC-1 bestehende Pellet übrig, das im Anschluss im MCDB-Medium resuspendiert wurde. 15 µl der Zellsuspension wurden mit 15 µl Trypanblau verdünnt, und eine Zellzahlbestimmung in einer Neubauer Zählkammer vorgenommen.

Unbenötigte Zellen wurden in 10 % DMSO bei -180°C tiefgefroren. Dazu wurden die Zellen in 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) in Kryotubes aliquotiert, mit einer Gesamtzahl von 1 Million Zellen pro Milliliter. Die Zellen wurden zunächst über Nacht bei -80°C in einem mit Alkohol gefühlten Freezing Container gelagert, anschließend in flüssigen Stickstoff bei -180°C überführt.

3.5.3. Stimulation der HMEC-1 mit Beta-End für NO und ET-1 Messung

Je 15.000 Zellen wurden pro Well in 100 µl MCDB-1 Medium in schwarzen 96er Well Platten und jeweils im Doppel in transparenten 96er Well Platten zur Sichtkontrolle überführt. Die weitere Behandlung der HMEC-1 richtete sich ausgehend von der Beurteilung der Zellen in den transparenten Platten. Aufgrund der identischen Behandlung beider Platten ist davon auszugehen, dass sich die Zellen in den schwarzen Platten konform den Zellen in den transparenten Platten verhalten. Nach 72 bis 96 h Inkubation im Brutschrank waren die Zellen ausreichend dicht gewachsen, und somit bereit für die Stimulation.

Die Simulation der HMEC-1-Zellen erfolgte in 1% MCDB Medium (FCS Anteil: 1%), um eine weitere Vermehrung während der Stimulation zu verhindern.

Eine Stunde vor dem Versuchsansatz erfolgte ein Mediumwechsel, sowohl in den schwarzen, als auch in den transparenten 96 Well Platten. Das 10%-ige MCDB Medium wurde vorsichtig mit der Eppendorf Pipette entfernt, ein einmaliges Waschen der Wells mit je 100 µl 1%-igem MCDB Medium ermöglichte das Entfernen von avitalen und dadurch nicht mehr adhären Zellen. Nach anschließender Gabe von 100 µl des 1%-igen MCDB Mediums pro Well wurden die Platten für eine Stunde in den Brutschrank gestellt.

Das 1%-Medium wurde anschließend entfernt, und je 100 µl pro Well der vorbereiteten Versuchskonzentrationen von Beta-Endorphin, ebenfalls in 1% MCDB aufgelöst, der unstimulierten Kontrolllösung, und der Negativ- und Positiv-Kontrolle hinzugegeben.

Als Positiv-Kontrolle für die NO Messung wurde LPS in einer Konzentration von 1µg/ml in 1% MCDB Medium verwendet.

Als Negativ-Kontrolle für die Endothelin-Bestimmung wurde der µ1-Rezeptor-Antagonist Nalaxon eingesetzt.

Sämtliche Reagenzien wurden, sowohl in den 96er Well Platte als auch jeweils im Doppel in der transparenteren 96er Well Platte, als Sichtkontrolle eingesetzt.

Nach Ablauf der gewünschten Inkubation wurden in zwei unabhängigen Schritten einerseits NO, andererseits Endothelin bestimmt.

3.5.4. ET-1 Bestimmung nach Stimulation der HMEC mit Beta-End

Die Endothelinbestimmung mittels ELISA erfolgte aus dem Zellkulturüberstand der HMEC-1-Zellen. Der Überstand der einzelnen Wells wurde in je ein Eppendorf-Gefäß übertragen, bei 1200 - 1400 U/min, 5 min zentrifugiert und der hierbei entstandene Überstand bei -80°C bis zur Messung konserviert.

Die Proben wurden mit einer Verdünnung von 1:4 in den Endothelin-1 ELISA eingesetzt.

Das Ansetzen der Proben und der Standardkurve, sowie die anschließende Auswertung im Multiplate-Reader mit einem Filter der Wellenlänge von 450 nm mit Korrektur gegen 570 und 590 nm erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

3.5.5. NO Bestimmung nach Stimulation der HMEC-1 mit Beta-End

Die Bestimmung von Stickstoffmonoxid erfolgte mittels der DAF-2-DA Methode, entsprechend der von Kojima 1998 veröffentlichten Vorschrift (Kojima et al. 1998). Die Konzentration des gebildeten NO konnte im Multiplate-Reader gemessen werden.

3.6. Nachweis von Beta-End-Rezeptoren auf HMEC-1-Zellen

Der Nachweis von Beta-Endorphin-Rezeptoren auf den HMEC 1-Zellen wurde mittels PCR-Analyse erbracht. Als Positiv-Kontrolle wurde menschliches Hirngewebe eingesetzt.

3.6.1. RNA-Gewinnung

Der erste Arbeitsschritt bestand darin, Arbeitsplatten, Pipetten und alle eingesetzten Gebrauchsmaterialien mit verdünnten SDS Wasser vorsichtig zu reinigen. SDS Wasser wurde in autoklavierten Spritzflaschen aus Natriumdodecylsulfat (SDS Pulver) und zweifach destilliertem Wasser hergestellt. Das RNA Wasser bestand aus zweifach destilliertem Wasser, welches in vorab bei 220 - 240 °C gebacken Glasgefäßen autoklaviert wurde.

Eingesetzte Eppendorf-Röhrchen und Pipetten wurden jeweils aus frischen, ungeöffneten Packungen in vorher gebackene Glasgefäße übertragen und autoklaviert. Chloroform, Isopropanol und Ethanol stammten aus Behältnissen, die nur für RNA-Gewinnung benutzt wurden. Das Arbeiten mit Trizol erfolgte unter dem

Abzug. Während sämtlicher Arbeitsschritte der RNA-Gewinnung wurden spezielle Schutzhandschuhe getragen.

Nach Entfernen des MCDB-Mediums wurden 2,5 ml Trizol in den 25 cm²-Flaschen gegeben, anschließend 1,25 ml Trizol/Zell-Suspension in je ein RNA Eppendorf-Gefäß überführt, und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 0,250 ml Chloroform wurde zum Ansatz pipettiert und nach 2 min Inkubation bei Raumtemperatur, 15 min bei 4° C mit 15.500 U zentrifugiert. Die wässrige P hase (beinhaltet die RNA) wurde in neues Gefäß überführt, 0,625 ml Isopropanol hinzugegeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, und für 10 min bei 4°C mit 10.500 U zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen; zum Pellet wurden 1,25 ml 75% Ethanol pipettiert und 5 min bei 4°C mit 8400 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für die Dauer von 10 bis 15 min auf ein Löschpapier zum Trocknen gelegt (hierfür wurde das Gefäß auf den Kopf gestellt). Das Auflösen des Pellets erfolgte nach Zugabe von 20 µl autoklaviertem RNA-Wasser und 10-minütiger Inkubation bei 60°C.

3.6.2. DNase-Verdau

Aus der gewonnenen RNA wurden in diesem Schritt unter Befolgung der Anleitung des eingesetzten Kits mögliche Verunreinigungen mit DNA entfernt. Vorab erfolgte eine 15-minütige UV-Licht Bestrahlung sämtlicher eingesetzten Arbeitsmittel.

Das RNA/DNA-Gemisch wurde mit den mitgelieferten 10 x DNase-Puffer in 0,1 Volumenanteile des Endvolumens, sowie mit 1 µl DNase zusammengeführt. Üblicherweise wurden je 20 µl RNA/DNA-Gemisch mit 2,3 µl 10 x DNase-Puffer und 1 µl DNase zu einem Endvolumen von 23,6 µl eingesetzt. Nach vorsichtigem Mischen erfolgte eine 20 bis 30-minütige Inkubation im Heizblock bei 37°C, im Anschluss die Gabe von 0,1 Volumenanteilen des Endvolumens des DNase-Inaktivierungsreagenz. Wiederum nach vorsichtigem Mischen und einer 2-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte die Zentrifugation der Probe bei 10.000 G für die Dauer von 2 min. Der die RNA enthaltende Überstand wurde abgenommen, und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis aufbewahrt.

Die Kontrolle der Reinheit des Gemisches und die Berechnung des RNA-Gehaltes erfolgten mittels Bestimmung der optischen Dichte im Photometer nach vorangegangener Kalibrierung des Photometers mit RNA-freiem Wasser. Hierzu wurde eine Lösung, bestehend aus 2% gewonnenes RNA-Gemisch in RNA-freiem Wasser eingesetzt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel: Optische

Dichte bei 260 nm x 40 x Verdünnungsfaktor = Gesamtmenge in µg/ml. Weiterhin wurden die optischen Dichten bei 230 und 280 mitbestimmt, sowie der Quotient: OD 260 / OD 280.

3.6.3. RNA-Testgel

Die Kontrolle der gewonnenen RNA erfolgte mittels Elektrophorese.

Das Kontrollgel bestand aus 0,4 g Agarose und 40 ml TBE Puffer. Nach Aufkochen beider Substanzen wurden 0,3 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gel gegossen. Während der Abkühlung des Gels konnten die Proben vorbereitet werden. Je Probe wurden 500 ng RNA, 4 µl RNA Wasser und 4 µl Formadinauftragspuffer hinzugefügt. Nach Auftragen der Proben auf das Gel konnte die Elektrophorese bei 90 V gestartet werden. Die dabei entstandenen Banden wurden unter UV-Licht fotografiert.

3.6.4. Herstellung der cDNA

Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem Superscript™ II. Sämtliche Arbeitsschritte fanden unter der Flow statt, die eingesetzten Substanzen waren auf Eis gekühlt, eingesetzt wurden ausschließlich PCR geeignete Materialien.

Beginnend mit der Zusammengabe von 1 µl Random Primer (200 ng/µl), 2 µg RNA und 0,5 µl dNTP Mix (20 mM), wurde auf ein Gesamtvolumen von 12 µl mit Wasser ad injectabile aufgefüllt. Während der anschließenden Überführung des Gemisches im PCR Cycler für die Dauer von 5 min bei 65°C fand die Bindung des Primers an die RNA statt. Anschließend wurde das Gemisch auf Eis gestellt und folgende Reagenzien dazugegeben: 4 µl First Strand Buffer, 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNase out Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl) und 1 µl Super Script (200 units). In der anschließenden Inkubation im PCR Cycler für 10 min bei 25°C, gefolgt von 50 min bei 42 °C und von 15 min bei 70°C, konnte die gewünschte cDNA synthetisiert werden. Im Anschluss folgte die Amplifikation.

3.6.5. PCR-Analyse

Auch hier erfolgten ebenfalls sämtliche Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen unter der Flow. Eingesetzte Materialien wie Pipettenspitzen, Pipetten, etc. wurden davor mindestens 15 min unter UV-Licht bestrahlt. Verwendet wurde das Kit Tag Fermentas with (NH₄)₂SO₄, die Beta-End Primer Fn und Rn mit ca. 850 Basenpaaren, sowie destilliertes Wasser.

Der Mastermix enthielt je Probe 17,6 µl Wasser ad injectabile, 3 µl 10x-PCR-Puffer, 2,4 µl MgCl₂ 2mM, 1,2 µl dNTP 400µM, 0,3 µl Primer 1 CRFR 2 Forward 200 nM, 0,3 µl Primer 2 CRFR 2 Reward 200 nM, 0,2 µl Taq Polymerase 1 U/µl, sowie 5 µl Template. Je 25 µl Mastermix wurden mit 5 µl cDNA, bzw. mit 5 µl Aqua zweifach destilliert als Kontrolle versetzt, und in den Cyclor gegeben. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Schema: Erhitzen auf 95°C für 3 min, anschließend 40 Sekunden bei 94°C. Dieser Schritt führte zur Denaturierung. Die Primeranlagerung erfolgte in insgesamt 25 Zyklen bei 64°C von je 60 Sekunden Dauer, die Elongation bei 72°C nach 90 Sekunden. Beendet wurde das Programm mit 2 min bei 72°C. Je nach weiterem Vorgehen wurden die Proben entweder bei -20°C konserviert, oder im Falle der Weiterbearbeitung, bis zur Gel-Fertigstellung auf Eis gelagert.

Die PCR-Proben wurden in einem 1,7% Agarose-Gel eingesetzt, bestehend aus 0,68 g Agarose und 40 ml 1 x TBE-Puffer. Nach Aufkochen und Abkühlen folgte die Zugabe von 0,5 µl Ethidiumbromid, anschließend konnte das Gel in die Gelkammer gegossen werden, und 30 min abkühlen. Es folgte das Auftragen des PCR-Produktes, bestehend aus je 10 µl Probe und 10 µl Formamidaufragspuffer, neben 1 µl Marker für eine DNA-Länge von 100 Basenpaaren, versetzt mit 4 µl Wasser und 5 µl Formamidaufragspuffer, sowie einer Positiv- und einer Negativ-Kontrolle. Die Auftrennung erfolgte bei 90 V für die Dauer von ca. 40 min. Anschließend wurden die Banden unter UV Licht fotografiert.

3.7. Humane primäre Monozyten

3.7.1. Gewinnung der Monozyten

Menschliche primäre Monozyten wurden durch negative Isolierung aus mononukleären Zellen (PBMC) aus peripher venösem Blut von gesunden Probanden mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Hierzu wurde das Blut nach Abnahme in mit Heparin besetzten Gefäßen mit gleichen Teilen einer vorgefertigten Lösung („Lymphoprep“) versetzt und bei 840 G für die Dauer von 40 min zentrifugiert.

Die weiße PBMC Schicht wurde im Anschluss mit einer Pipette abgezogen, in ein frisches 50 ml-Röhrchen übertragen, mit RPMI-Medium aufgefüllt und für 10 min bei 600 G zentrifugiert. Das Pellet wurde im weiteren Verlauf insgesamt dreimal mit RPMI gewaschen, und nach der letzten Zentrifugation in PBS-Puffer resuspendiert. Mittels Trypanblau-Färbung konnte die Zellzahl der gewonnenen PBMC Fraktion bestimmt werden.

Zur Monozytenisolation aus den gewonnenen PBMC wurde ein Kit der Firma Dynal Biotech GmbH eingesetzt, die einzelnen Arbeitsschritte entsprachen hierbei den Herstellerangaben.

Nach Waschen der Zellen mit dem Puffer I (PBS ohne Calcium und Magnesium, mit 0,1% BSA und 2 mM EDTA) und anschließender Zentrifugation, wurde das Pellet mit gleichen Teilen einer Blocking-Reagenz und eines Antikörper-Mix gegen sämtliche Zellen der Suspension, außer den Monozyten, versehen, und für die Dauer von 15 min bei 4°C inkubiert. Nach weiterer Gabe von 1 ml Puffer I wurden die Zellen 8 min mit 500 G bei 4°C zentrifugiert.

Auf dem verbliebenem Pellet wurden 0,9 ml Puffer I und 100 µl Dynabeads gegeben und für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach weiterer Gabe von 1 ml Puffer I und vorsichtiger Resuspension wurde die Zellsuspension in einem Röhrchen auf einen Magnetständer übertragen und für 2 min dem Magnetfeld ausgesetzt.

Die Dynabeads gingen hierbei eine Bindung mit Antikörper ein, und hafteten, vom Magneten angezogen, am Röhrchen, so dass der Überstand die freien, ungebundenen Monozyten enthielt, während die restlichen Zellen der Suspension aufgrund ihrer Bindung mit den Antikörpern, ebenfalls am Röhrchen haften blieben.

Der Überstand wurde in neues Eppendorf-Gefäß übertagen und 5 min mit 350 G bei 4°C zentrifugiert, das Pellet mit den gewonnenen Monozyten anschließend in RPMI-Medium mit 10% FCS und 2mM L-Glutamin resuspendiert.

3.7.2. Durchflusszytometrische Analyse der gewonnenen Monozyten

Da primäre Monozyten CD14 Antigene exprimieren, konnte die Reinheit der isolierten Zellen durch den Nachweis der CD14 Expression mittels Durchflusszytometrie überprüft werden.

Hierzu wurden die Zellen in PBS mit Calcium, Magnesium und 1% BSA zweimal gewaschen, im Anschluss 5 min mit 300 G bei 4°C zentrifugiert, und wiederum in PBS mit Calcium, Magnesium und 1% BSA resuspendiert. Je 100.000 Zellen wurden mit 15 µl CD-14 Antikörper versetzt und für die Dauer von 35 min auf Eis inkubiert.

Im Anschluss erfolgte nach weiterer Gabe von 1 ml eiskaltem PBS mit Calcium, Magnesium und 1% BSA eine 7-minütige Zentrifugation mit 300 G bei 4°C. Nach zweimaligem Waschen der gewonnenen Pellets mit PBS mit Calcium, Magnesium und 1% BSA, wurden die Zellsuspension sowie die Isotypenkontrollen der durchflusszytometrischen Untersuchung zugeführt.

Im Folgenden wurden nur Zellpopulationen eingesetzt, die einen Anteil von mehr als 75% CD14-positiven Zellen aufwiesen.

Da die primären Monozyten im Anschluss an deren Isolierung umgehend weiterverarbeitet wurden, war eine Zellkultur für diese nicht erforderlich.

3.7.3. Stimulation der Monozyten mit Beta-End für NO und ET-1 Messung

Primäre Monozyten wurden analog zu den HMEC-1-Zellen mit Beta-Endorphin stimuliert, um die Effekte des Stresshormons auf die monozytäre NO und Endothelin-1 Freisetzung zu untersuchen.

Hierzu wurden die Zellen in 96 Well Platten überführt, die Zellzahl pro Well betrug 50.000. Beta-Endorphin, gelöst in 100 µl 1% RPMI-Medium mit einer Konzentration von 10^{-7} und 10^{-9} mol/l, wurde zu den Zellen hinzugegeben, und für 2, 4 und 24 h inkubiert.

Als Negativkontrolle für die Endothelin-1 Messung diente der selektive μ -1 Rezeptor Antagonist Naloxon, als Negativkontrolle der NO-Messung L-NAME 10^{-3} M, das die NO-Bildung in den Monozyten hemmt (Kojima, et al. 1998). Die Kontrollzellen wurden lediglich mit reinem 1% RPMI Medium versetzt.

Nach Ende der Inkubation wurden die Zellsuspensionen bei 4°C für die Dauer von 8 min mit 500 G zentrifugiert, im Überstand erfolgte die Endothelin-1 Bestimmung mittels ELISA nach Vorschrift des Herstellers. Das Pellet wurde in einem DAF-2-DA/KRP- Gemisch, mit einer DAF-2-DA Konzentration von 10 µM resuspendiert, und der NO Messung mittels Immunfluoreszenz, entsprechend der von Kojima 1998 veröffentlichten Vorschrift (Kojima et al. 1998) zugeführt.

Der Nachweis des μ -1 Opioid-Rezeptors auf den primären Monozyten erfolgte analog zum Nachweis auf HMEC-1 Zellen.

3.7.4. Stimulation der Monozyten mit CRH für Beta-Endorphin Messung

Unmittelbar nach der Monozyten-Isolation mittels Dichtegradientenzentrifugation und anschließender durchflusszytometrischer Analyse mit erfolgtem Nachweis eines 75%-igen Anteils von CD14-positiven Zellen, wurden diese mit CRH, aufgelöst im RPMI Medium mit 1% FCS, 2 mM L-Glutamin, ohne Phenol Rot inkubiert, und im Anschluss der Beta-Endorphin Messung zugeführt.

Eingesetzt wurden 1.000.000 Zellen/ml, die Stimulation erfolgte je nach Versuchsanordnung mit CRH 10^{-7} , 10^{-8} und 10^{-9} M, für die Dauer von 4 oder 24 Stunden. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation bei Raumtemperatur für die Dauer

von 10 min bei 600 G. Der abgenommene Überstand wurde entweder sofort weiterbearbeitet, alternativ bei -80 °C konserviert.

3.7.5. Extraktion von Beta-End aus Zellkulturmedium

Die Beta-Endorphin Messung erfolgte aus einem Zellkulturüberstand. Der Empfehlung des ELISA Kits entsprechend, wurde vor der Messung ein Extraktionsverfahren zur Bindung des Proteins aus dem Zellkulturüberstand angewandt. Die Durchführung entsprach der Empfehlung des ELISA Kits der Firma Peninsula Laboratories. Eingesetzt wurden C 18/200 mg-Säulen der Firma Macherey-Nagel. In einer speziellen Einrichtung war die Bildung eines Vakuums möglich, mit dessen Hilfe einzelne Schritte des Extraktionsverfahrens unterstützt werden konnten.

3.7.6. Beta-End Bestimmung nach Stimulation der Monozyten mit CRH

Das zu bestimmende Peptid (Standardkurve oder Probe) und Beta-Endorphin-Antikörper wurden gemeinsam in den Wells verteilt. Die Antikörper gingen einerseits mit vorbestimmten Stellen am Wellboden eine Bindung ein, andererseits entstand eine feste Bindung des Peptids an die fixierten Antikörper. Es folgte die Zugabe eines weiteren Peptids (Biotinyliertes Peptid), das sich an die noch freien fixierten Antikörper bindet, die im vorhergegangenen Schritt kein Komplex mit dem zu bestimmenden Peptid gebildet haben. Biotinylierte Peptide, die keine Bindung mit einem fixierten Antikörper eingegangen sind, wurden nach einer kurzen Inkubation ausgewaschen. Die Gabe einer Peroxidase, die lediglich an Antikörper-biotinyliertes-Peptid-Komplexe bindet, ermöglichte den Farbumschlag eines im nächsten Schritt hinzukommenden Substrates. Ausgehend von der Intensität des Farbumschlages konnte eine quantitative Bestimmung der vorhandenen Peptidmenge erfolgen.

Sämtliche Arbeitsschritte des ELISA erfolgten nach Anleitung des Herstellers. Sie wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, und die Proben wurden in eine 1:3 Verdünnung eingesetzt.

4. Ergebnisse

4.1. Nachweis der μ 1-Rezeptoren auf HMEC-1-Zellen

Mittels PCR-Analyse ist es gelungen, μ 1 Rezeptor RNA auf HMEC-1 Zellen nachzuweisen. Als Positivkontrolle wurde humanes Hirngewebe eingesetzt. Die anschließende Sequenzanalyse bestätigte die Ergebnisse mit einer Genauigkeit von 98%.

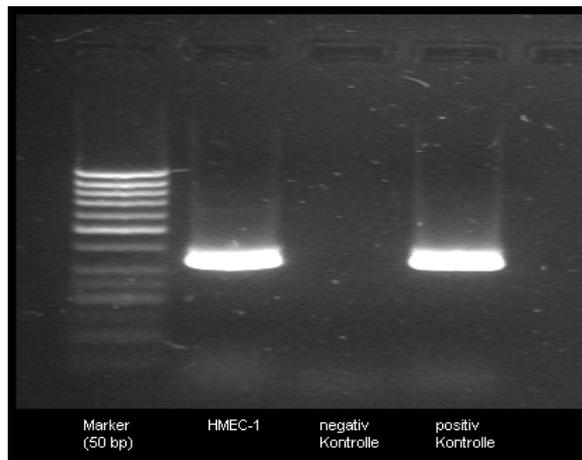


Abbildung 4: Nachweis von μ 1 Rezeptoren auf HMEC-1 Zellen

4.2. Beta-End-induzierte Stimulation der endothelialen ET-1 Freisetzung

Die endotheliale Endothelin-1 Konzentration wurde nach Stimulation der HMEC-1 mit Beta-Endorphin (10^{-7} und 10^{-9} M) Inkubationszeit 2, 4 und 24 h bestimmt und mit nicht stimulierten Zellen verglichen.

Im Vergleich zur Kontrolle führte Beta-Endorphin zu einer signifikant erhöhten zeit- und konzentrationsabhängigen Endothelinausschüttung.

Die Zugabe des potenten μ 1-Opioid Rezeptor-Antagonisten Naloxon (10^{-7} M) hob sämtliche stimulierende Effekte des Beta-Endorphins auf, wobei die Substanz keine eigene intrinsische Aktivität auf die Endothelin-1 Freisetzung ausübte.

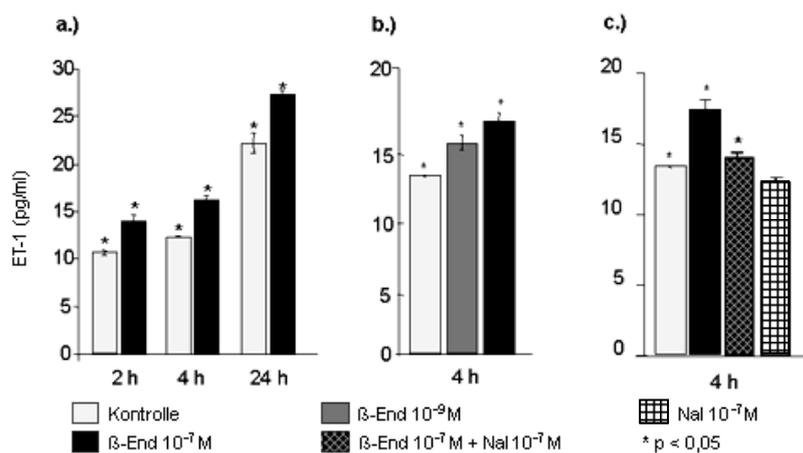


Abbildung 5: endotheliale Beta-Endorphin induzierte Endothelin-1 Freisetzung.

a) Zeitabhängig: 2, 4, 24 h

b) Konzentrationsabhängig: β -End 10^{-7} ; 10^{-9} M

c) Antagonisierung der ET-1 Freisetzung mit Naloxon (Nal 10^{-7})

Angegeben als Standardabweichung in pg/ml

n=6. * signifikant zur Kontrolle, p < 0,05

4.3. Beta-End-induzierte Stimulation der endothelialen NO Freisetzung

Die endotheliale NO-Konzentration wurde nach Stimulation der HMEC-1 mit Beta-Endorphin (10^{-7} M), Inkubationszeit 4 h, bestimmt und mit unstimulierten Zellen verglichen. LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) diente als Positivkontrolle.

Beta-Endorphin führte zu einer signifikanten Abnahme der NO-Ausschüttung, wohingegen die Zugabe von LPS eine signifikante Zunahme bewirkte.

Die Ergebnisse stellen prozentuale Unterschiede zu den nicht stimulierten Zellen dar.

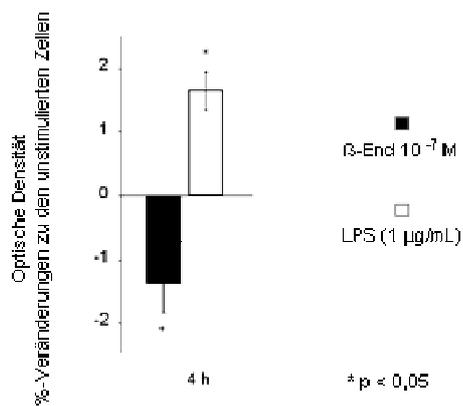


Abbildung 6: endotheliale β -Endorphin-induzierte NO-Freisetzung
LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) als Positivkontrolle
Angegeben in % zur Kontrolle
n=6. * signifikant zur Kontrolle, $p < 0,05$

4.4. Nachweis der μ 1-Rezeptoren auf primäre Monozyten

Mittels PCR-Analyse ist es gelungen, μ 1 Rezeptor RNA auf primäre Monozyten nachzuweisen. Als Positivkontrolle wurde humanes Hirngewebe eingesetzt, die Negativkontrolle wurde nur mit Phosphatpuffer statt Zellen angesetzt. Die anschließende Sequenzanalyse bestätigte die Ergebnisse mit einer Genauigkeit von 99%.

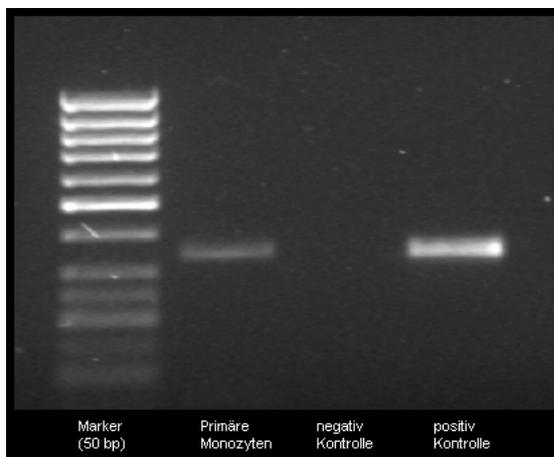


Abbildung 7: Nachweis von μ 1 Rezeptoren auf primären Monozyten

4.5. Beta-End-induzierte Stimulation der monozytären ET-1 Freisetzung

Die monozytäre Endothelin-1 Konzentration wurde nach Stimulation der primären Monozyten mit Beta-Endorphin (10^{-7} und 10^{-9} M), Inkubationszeit 2, 4 und 24 h bestimmt und mit nicht stimulierten Zellen verglichen. Im Vergleich zur Kontrolle führte Beta-Endorphin zu einer signifikant erhöhten zeit- und konzentrationsabhängigen Endothelinausschüttung. Die Zugabe des potenten μ 1-Opioid Rezeptor-Antagonisten Naloxon (10^{-7} M) hob sämtliche stimulierende Effekte des Beta-Endorphins auf, wobei die Substanz keine eigene intrinsische Aktivität auf die ET-1 Freisetzung ausübte.

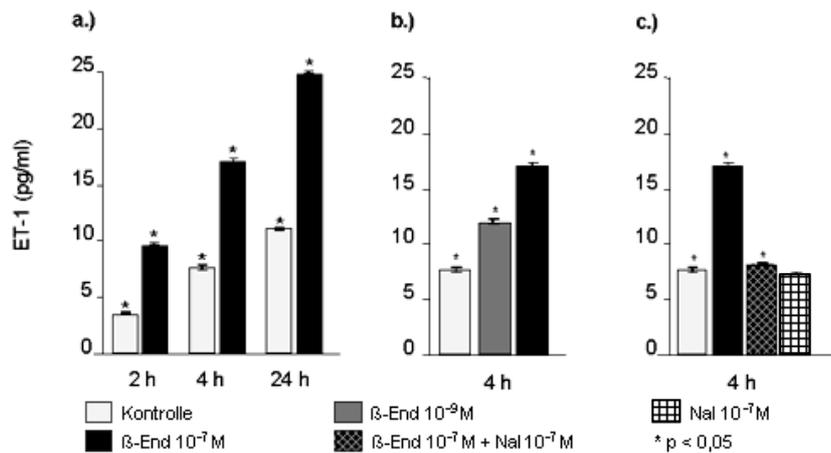


Abbildung 8: monozytäre Beta-Endorphin-induzierte Endothelin-1 Freisetzung
a) Abhängig von der Inkubationszeit mit Beta-Endorphin (β -End 10^{-7} M): 2, 4, 24 h
b) Abhängig von der Beta-End Konzentration (β -End 10^{-7} ; 10^{-9} M)
c) Antagonisierungsversuch der Endothelin 1 Freisetzung mit Naloxon (Nal 10^{-7} mol/L)
Angegeben als Standardabweichung in pg/ml
n=6. * signifikant zur Kontrolle, $p < 0,05$ (T Test)

4.6. Beta-End-induzierte Stimulation der monozytären NO Freisetzung

Die monozytäre NO-Konzentration wurde nach Stimulation der primären Monozyten mit Beta-Endorphin (10^{-7} und 10^{-9} M), Inkubationszeit 2 und 4 h bestimmt und mit unstimulierten Zellen verglichen. L-NAME (10^{-3} M) diente als Negativkontrolle.

Beta-Endorphin und L-NAME führten beide zu einer signifikanten zeit- und konzentrationsabhängigen Abnahme der NO-Ausschüttung.

Die Ergebnisse stellen prozentuale Unterschiede zu den nicht stimulierten Zellen dar.

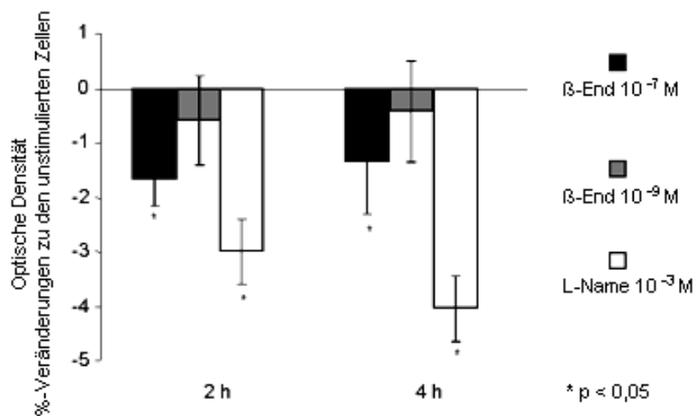


Abbildung 9: monozytäre Beta-Endorphin-induzierte NO-Freisetzung

L-Name (10^{-3} M) diente als Negativkontrolle.

Die Ergebnisse geben die prozentuale Standardabweichung im Vergleich zu unstimulierten Zellen wieder

n=6. * signifikant zur Kontrolle, $p < 0,05$ (T Test)

4.7. CRH-induzierte Stimulation der monozytären Beta-End Freisetzung

Die monozytäre Beta-Endorphin Konzentration wurde nach Stimulation der primären Monozyten mit CRH (10^{-7} M), Inkubationszeit 4 und 24 h bestimmt und mit unstimulierten Zellen verglichen.

CRH führte zur einer signifikanten Zunahme der monozytären Endorphinfreisetzung.

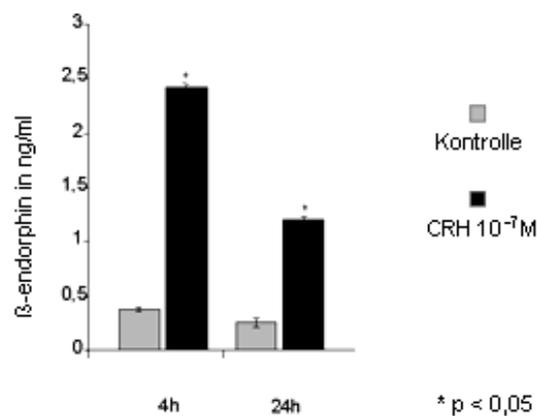


Abbildung 10: monozytäre CRH-induzierte Beta-Endorphin Freisetzung
Die Ergebnisse sind Mengenangaben in pg/ml
n=6. * signifikant zur Kontrolle, p < 0,05 (T Test)

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Stresshormon Beta-Endorphin die endotheliale und monozytäre Endothelin-1 Freisetzung signifikant stimulieren kann. Die Effekte wurden durch den Opioid-Rezeptor-Antagonisten Naloxon nahezu komplett aufgehoben. Im Gegensatz dazu führte Beta-Endorphin zu einer Inhibierung der monozytären NO-Freisetzung.

Bestätigt wurden die Ergebnisse durch den Nachweis der signalübermittelnden μ 1-Opioidrezeptoren auf der Endothelzelle und dem Monozyten. Daneben ist es gelungen, eine CRH-induzierte Stimulation der monozytären Beta-Endorphin-Synthese nachzuweisen.

Die hier vorgestellten stimulatorischen Effekte von Beta-Endorphin auf die endotheliale ET-1 Freisetzung konnten auch in einer Arbeit von Wang und Kollegen nachgewiesen werden (Wang X et al. 2006). Im Gegensatz hierzu beobachtete die Arbeitsgruppe von Lam eine Reduktion der endothelialen Endothelin-1 Freisetzung unter Einfluss eines lokal verabreichten Proopiomelanocortinderivaten, während keine Auswirkungen auf die Transkription von Endothelin-1 mRNA gesehen wurde. Die Autoren vermuteten eine Beeinflussung des Endothelin-converting-Enzyms als mögliche Erklärung der Ergebnisse (Lam et al. 2006). Zudem ist anzumerken, dass die Gruppe um Lam humane endotheliale EA.hy926-Zellen, einer Hybridzelllinie aus HUVEC Zellen und humanen Lungencarcinom Zellen (Bouis et al. 2001) verwendeten, während in der vorliegenden Arbeit HMEC-1 Zellen untersucht wurden. Wie oben bereits ausgeführt, können die verschiedenen Zelllinien beträchtliche Unterschiede in Funktion und Eigenschaften aufweisen (Ruoslahti and Rajotte 2000). Somit könnten alleine die ursprungsbedingten unterschiedlichen Eigenschaften der Zellen zu abweichenden Ergebnissen führen, was einen direkten Vergleich der Ergebnisse erschwert.

Fontana und Kollegen veröffentlichten eine klinische Studie, in der Patienten mit vorbekannter dilatativer Kardiomyopathie einem mentalen Stresstest unterzogen und im Anschluss die Beta-Endorphin- und ET-1 Konzentrationen gemessen wurden. Sie fanden erhöhte Beta-Endorphin Spiegel, während die ET-1 Werte niedriger lagen als vor dem Test (Fontana et al. 1998). Zur Diskrepanz hinsichtlich der reduzierten Endothelinausschüttung muss angemerkt werden, dass in der vorliegenden Arbeit humane primäre Monozyten von gesunden Probanden untersucht haben, während Fontana kardial erkrankte Patienten analysierte, die

eine mögliche inhomogene Verteilung der μ 1-Rezeptoren aufweisen, was einen Einfluss auf eine Stress-induzierte ET-1 Freisetzung haben könnte.

Die hier dargestellten Ergebnisse hinsichtlich der Reduktion der NO Freisetzung unter Einfluss von Beta-Endorphin entsprechen den Untersuchungen von Faletti und Kollegen, die eine Abnahme der NO-Synthase-Aktivität unter Beta-Endorphin Einwirkung mit konsekutiver Inhibition der NO Bildung beobachtet haben (Faletti et al. 1999). Seidel und Kollegen konnten in Zellkulturexperimenten mit Endothelzellen von humanen Koronararterien (HCAEC) keinen Einfluss die endotheliale NO-Synthase nach Beta-Endorphin-Stimulation sehen, ohne dabei die tatsächliche NO-Ausschüttung bestimmt zu haben (Seidel et al. 2006). Ein direkter Vergleich der Studien erscheint auch hier schwierig, da verschiedene endotheliale Zellkulturen (HCAEC und HMEC-1) mit unterschiedlichem Ursprung und unterschiedlichen Eigenschaften eingesetzt wurden.

Als einer der wichtigsten Modulatoren der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse vermittelt das Stresshormon CRH, wie oben beschrieben, eine Vielzahl von Effekten in der Stressantwort. Daneben sind direkte Einflüsse auf die endotheliale und monozytäre Endothelin-Freisetzung, sowie auf die Adhäsion von Monozyten am Endothel gesehen worden, die Effekte konnten durch den selektiven CRH-Rezeptor Antagonisten Astressin nahezu komplett aufgehoben werden (Wilbert-Lampen, Trapp et al. 2006; Wilbert-Lampen, Straube et al. 2006). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass CRH sowohl zentral als auch in der Peripherie (u. a. Endothelzellen, Monozyten) synthetisiert werden kann, was auf eine autokrine / parakrine Funktion des Hormons hinweist (Harbuz et al. 1992). Zusammenfassend kann somit postuliert werden, dass sowohl Endothelzellen als auch Monozyten Syntheseort und Zielzellen für CRH sind.

Zahlreiche Publikationen belegen eine gegenseitige Beeinflussung der Stresshormone CRH und Beta-Endorphin (Charmandari, Tsigos, Chrousos 2005), was die vorliegende Arbeit, durch den Nachweis einer CRH-induzierten Stimulation der monozytären Beta-Endorphin-Synthese, ebenfalls bestätigen konnte. Die dabei eingesetzte CRH-Konzentrationen von 10^{-7} mol/l entsprechen den im Plasma gemessenen Werten, die je nach Nachweismethode zwischen 10^{-11} bis 10^{-6} mol/l variieren können (Ruckert et al. 1990).

CRH, Beta-Endorphin, und Endothelin-1 verfügen auch über eine direkte pro-inflammatorische Potenz (Agelaki et al. 2002; Browatzki et al. 2005). Die gegenseitige Beeinflussbarkeit der Hormone kann somit zu einer potenzierten Zunahme von pro-inflammatorischen Mediatoren führen, was neben der dargestellten Induktion einer Beta-Endorphin-induzierten Imbalance von Vasokonstriktion und Vasodilatation, eine weitere mögliche pathophysiologische Erklärung für die Progression der Stress-vermittelten Atherosklerose sein kann.

6. Zusammenfassung

Neben den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren sind psychosoziale Faktoren wie chronischer Stress oder Depression in der Genese der Atherosklerose von Bedeutung. Ob Stress dabei synergistisch zu den klassischen Risikofaktoren oder als selbstständiger Faktor die Erkrankung induziert, ist noch nicht hinreichend geklärt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine direkte Beeinflussbarkeit der Monozyten- und Endothelfunktion durch das Stresshormon Beta-Endorphin. Die Ergebnisse werden durch den Nachweis involvierter peripherer endothelialer und monozytärer μ 1-Rezeptoren, sowie durch die erfolgreiche Blockierung der Stresshormoneffekte durch den Rezeptor-Antagonisten Naloxon bestätigt. Der Nachweis einer CRH-induzierten Stimulation der monozytären Beta-Endorphin-Synthese belegt zudem eine gegenseitige Beeinflussung beider Stresshormone.

Somit ist es gelungen, einen pathophysiologischen Mechanismus einer Stress-induzierten Modifikation der Endothel- und Monozytenaktivität aufzuzeigen.

7. Literaturverzeichnis

- Ades EW, Candal FJ. HMEC-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol.* 1992. 99:683-90
- Agelaki S, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris AN. Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *Infect Immun* 2002;70:6068–74.
- Angioni S, Petraglia F, Gallinelli A et al. Corticotropin-releasing hormone modulates cytokines released in cultured human peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci.* 1993. 53(23):1735-42
- Arendt RM, Wilbert-Lampen U, Heucke L, et al. Increased endothelin plasma concentrations in patients with coronary artery disease or hyperlipoproteinemia without coronary events. *Res Exp Med.* 1993. 193(4):225-30
- Badimon JJ, Meyer B, Feigen LP, et al. Thrombosis triggered by severe arterial lesions is inhibited by oral administration of a glycoprotein IIb/IIIa antagonist. *Eur J Clin Invest.* 1997. 27:568-74
- Baker C, Richards LJ, Dayan M, Jessop DS. Corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in human T and B cells and macrophages: colocalization with arginine vasopressin. *J Neuroendocr.* 2003. 15:1070-4
- Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV, et al. Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci.* 1998. Nov 24;95(24):14367-72
- Bath PMW, Hassell DG, et al. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arterioscler Thromb.* 1991. 11:254-260
- Battistella PA, Bordin A, Cernetti R, et al. Beta-endorphin in plasma and monocytes in juvenile headache. *Headache* 1996 Feb. 36(2):91-4
- Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule-1, α v β 3 integrin, and GPIb. *J Exp Med* 1998.187:329-39

- Bouis D, Hospers GAP, Meijer C, et al. Endothelium in vitro: A review of human vascular endothelial cell lines for blood-vessel-related research. *Angiogenesis* 2001. 4:91-102
- Browatzki M, Schmidt J, Kübler W, Kranzhöfer R. Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol.* 2000. Apr; 95(2):98-105
- Browatzki M, Pfeiffer CA, Schmidt J, Kranzhöfer R. Endothelin-1 induces CD40 but not IL-6 in human monocytes via the proinflammatory transcription factor NF-kappaB. *Eur J Med Res.* 2005. May 20;10(5):197-201
- Cantarella G, Lempereur L, Lombardo G, et al. Divergent effects of corticotropin releasing hormone on endothelial cell nitric oxide synthase are associated with different expression of CRH type 1 and 2 receptors. *Br J Pharmacol.* 2001. 134(4):837-44
- Castellani S, Ungar A, Cantini C, et al. Impaired renal adaptation to stress in the elderly with isolated systolic hypertension. *Hypertension* 1999. Nov;34(5):1106-11
- Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol.* 2005. 67:259-84
- Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA.* 1992. 267:1244–52
- Chrousos GP. Organization and integration of the endocrine system. In *Pediatric Endocrinology 2002*, ed. M Sperling, pp. 1-14
- Claes SJ. CRH, stress, and major depression: a psychobiological interplay. *Vitam Horm.* 2004. 69:117-50
- Cohen RA, Shepherd JT, Vanhoutte PM. Inhibitory role of the endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets. *Science* 1983. Jul;221(4607):273-4
- Dakak N, Quyyumi AA, Eisenhofer G, et al. Sympathetically mediated effects of mental stress on the cardiac microcirculation of patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1995. 76:125–130
- Dantzer R, Kelley KW. Stress and immunity: an integrated view of relationships between the brain and the immune system. *Life Sci.* 1989. 44(26):1995-2008

- Drexler H, Banhardt U, Meinertz T, et al. Contrasting peripheral short-term and long-term effects of converting enzyme inhibition in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1989. Mar 79(3): 491-502
- Drexler H, Zeiher AM, Köster W, et al. Endothelial dysfunction in the coronary circulation in hypercholesterolemia: protective effect of high HDL-cholesterol. *Circulation* 1992. 86(Suppl. I): 1-117
- Dunon D, Piali L, Imhof BA. To stick or not to stick: the new leukocyte homing paradigm. *Curr Opin Cell Biol.* 1996 Oct. 8(5):714-23
- Epstein SE, Zhu J, Burnett MS, et al. Infection and atherosclerosis: potential roles of pathogen burden and molecular mimicry. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Jun;20(6):1417-20
- Faletti AG, Mastronardi CA, Lomniczi A, et al. Beta-Endorphin blocks luteinizing hormone-releasing hormone release by inhibiting the nitricoxidergic pathway controlling its release. *Proc Natl Acad Sci.* 1999. Feb 16:96(4):1722-6
- Fichtlscherer S, Zeiher AM. Endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndrome *Herz.* 1999 Nov. 24(7):534-43
- Finsnes F, Lyberg T, Christensen G, Skjøsberg OH. Effect of endothelin antagonism on the production of cytokines in eosinophilic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001. Apr;280(4):L659-65
- Flavahan NA. Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation* 1992 May. 85(5):1927-38
- Fontana F, Bernardi P, Merlo Pich E, et al. Opioid peptide modulation of circulatory and endocrine response to mental stress in humans. *Peptides* 1997. 18:169-75
- Fontana F, Bernardi P, Merlo Pich E, et al. Opioid peptides in response to mental stress in asymptomatic dilated cardiomyopathy. *Peptides* 1998;19(7):1147-53
- Fontana F, Bernardi P, Lanfranchi G, et al. Endothelin-1 response to mental stress in early ischemic lesions of the extremities due to systemic sclerosis. *Peptides* 2005. Dec;26(12):2487-90
- Fuster V. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* 1994. 90:2126-46

- Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhöfer R, et al. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci.* 1995. Jan 17;92(2):402-6
- Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989 May. 83(5):1774-7
- Genedani S, Bernardi M, Bertolini A. Neuropeptides of the stress response and monocyte motility. *Ann N Y Acad Sci.* 1992. Nov 21;663:494-6
- Ghiadoni L, Donald AE, et al. Mental Stress Induces Transient Endothelial Dysfunctions in Humans. *Circulation* 2000. 102:2473-8
- Giachelli CM, Lombardi D, et al. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol.* 1998. 152:353-8
- Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, et al. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1987. 316:1371-5
- Grant K, Loizidou M, Taylor I. Endothelin-1: a multifunctional molecule in cancer. *Br J Cancer.* 2003. Jan 27;88(2):163-6
- Gutstein WH, Wu JM. The central nervous system and atherogenesis: interrelationships. *Adv Exp Med Biol.* 1990. 273:359-80
- Habib KE, Gold PW, Chrousos GP. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2001. 30:695–728
- Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, et al. Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul.* 1990. Aug;1(9):649-59
- Hansson GK, Jonasson L, Seifert PS, Stemme S. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1989. 9:567-78
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005. Apr 21;352(16):1685-95
- Harbuz MS, Lightman SL. Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. *J Endocrinol.* 1992. Sep;134(3):327-39
- Helset E, Ytrehus K, Tveita T, et al. Endothelin-1 causes accumulation of leukocytes in the pulmonary circulation. *Circ Shock.* 1994. 44:201–209

- Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y, Marumo F. Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1989. 78:225-228
- Ihling C. Pathomorphology of coronary atherosclerosis. *Herz*. 1998 Mar;23(2):69-77
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. 1973 Nov. 52(11):2745-56
- Kaplan JR, Manuck SB, Clarkson TB, et al. Social status, environment, and atherosclerosis in cynomolgus monkeys. *Arteriosclerosis* 1982. 2:359–368
- Kaplan JR, Manuck SB, Adams MR, et al. Inhibition of coronary atherosclerosis by propranolol in behaviorally predisposed monkeys fed an atherogenic diet. *Circulation* 1987. 76: 1365–1372
- Kaprio J, Koskenvuo M, Rita H. Mortality after bereavement: a prospective study of 95,647 persons. *Am J Public Health*. 1987. 77:283–287
- Karalis K, Sano H, Redwine J, et al. Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science*. 1991. Oct 18; 254(5030):421-3
- Karasek RA, Baker D, Marxer F, et al. Job decision latitude, job demands, and cardiovascular disease: a prospective study of Swedish men. *Am J Public Health*. 1981. 71:694 –705
- Kirkpatrick CJ. Pathophysiologie und Pathogenese der Atherosklerose. *Hamburger Ärzteblatt* 46(1992): 344-351
- Kojima H, Nakatsubo N, et al. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem*. 1998 Jul 1. 70(13): 2446-53
- Kop WJ. The integration of cardiovascular behavioral medicine and psychoneuroimmunology: new developments based on converging research fields. *Brain Behav Immun*. 2003. Aug;17(4):233-7
- Lam HC, Takahashi K, Ghatei MA, et al. Immunoreactive endothelin in human plasma, urine, milk, and saliva. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1991. 17 Suppl 7:S390-3
- Lam HC, Kuo SM, Chuang MJ, et al. Blockade of endothelin-1 release contributes to the anti-angiogenic effect by pro-opiomelanocortin overexpression in endothelial cells. *Exp Biol Med*. 2006 Jun. 231(6):782-8

- Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997. 17:1859-67
- Leor J, Poole WK, Kloner RA. Sudden cardiac death triggered by an earthquake. *N Engl J Med.* 1996. Feb 15;334(7):413-9
- Lerman A, Hildebrand FL Jr, Margulies KB, et al. Endothelin: a new cardiovascular regulatory peptide. *Mayo Clin Proc.* 1990. 65:1441-1455.
- Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, et al. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med.* 1991. 325:997-1001
- Lerman A, Burnett JC Jr. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation* 1992. 86(suppl III):III-2-III-19
- Lerman A, Holmes DR Jr, Bell MR, et al. Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation* 1995. Nov 1;92(9):2426-31
- Libby P, Ross R. Cytokines and growth regulatory molecules. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease* 1996. Vol.1:585-94
- Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation* 1997. 96:4095-103
- Libby P. Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. *Am J Cardiol.* 2003 Feb. 6 91(3A):3A-6A
- Lüscher TF, Boulanger CM, Dohi Y, Yang ZH. Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 1992. Feb;19(2):117-30
- Mackman N. Regulation of tissue factor gene expression in human monocytic and endothelial cells. *Haemostasis* 1996. 26 Suppl 1:17-9
- Malendowicz LK, Belloni AS, Nussdorfer GG, et al. Arginine-vasopressin and corticotropin-releasing hormone are sequentially involved in the endothelin1-induced acute stimulation of rat pituitary-adrenocortical axis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1998. Jul;66(1-2):45-9
- Meisel SR, Kutz I, et al. Effects of Iraqi missile war on incidence of acute myocardial infarction and sudden death in Israeli civilians. *Lancet* 1991. 338:660-661

- Menzebach A, Hirsch J, Hempelmann G, et al. Effects of endogenous and synthetic opioid peptides on neutrophil function in vitro. *Br J Anaesth.* 2003 Oct;91(4):546-50
- Merkel LA, Bilder GE. Modulation of vascular reactivity by vasoactive peptide in aortic rings from hypercholesterolemic rabbits. *Eur J Pharmacol.* 1992. 222:175-179
- Miller WL, Redfield MM, Burnett JC Jr. Integrated cardiac, renal, and endocrine actions of endothelin. *J Clin Invest.* 1989. 83:317-320
- Mills PJ, Dimsdale JE. The effects of acute psychologic stress on cellular adhesion molecules. *J Psychosom Res.* 1996. 41(1):49-53
- Miyauchi T, Yanagisawa M, Suzuki N, et al. Venous plasma concentrations of endothelin in normal and hypertensive subjects. *Circulation* 1989. 80:2280
- Nakatsubo N, Kojima H, Kikuchi K, et al. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Lett.* 1998 May 8. 427(2):263-6
- Noll G, Lüscher TF. The endothelium in acute coronary syndromes. *Eur Heart J.* 1998 Apr. 19 Suppl C:C30-8
- Pike JL, Smith TL, Hauger RL, et al. Chronic life stress alters sympathetic, neuroendocrine, and immune responsivity to an acute psychological stressor in humans. *Psychosom Med.* 1997 Jul-Aug;59(4):447-57
- Rahe RH, Romo M, Bennett L, Siltanen P. Recent life changes, myocardial infarction, and abrupt coronary death. *Arch Intern Med.* 1974. 133:221–228
- Raines EW, Rosenfeld ME, Ross R. The role of macrophages. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease* 1996. Vol.1:539-55
- Rainger GE, Nash GB. Cellular pathology of atherosclerosis: smooth muscle cells prime cocultured endothelial cells for enhanced leukocyte adhesion. *Circ Res.* 2001 Mar 30. 88(6):615-22
- Redwine L, Snow S, Mills P, et al. Acute psychological stress: effects on chemotaxis and cellular adhesion molecule expression. *Psychosom Med.* 2003. 65:598-603

- Rizvi MA, Katwa L, Spadone DP, et al. The effects of endothelin-1 on collagen type I and type III synthesis in cultured porcine coronary artery vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 1996. 28:243–252
- Rosengren A, Hawkin S, Ounpuu S, et al. Association of psychosocial risk factors with risk of acute myocardial infarction in 11,119 cases and 13,648 controls from 52 countries (INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004. 364:953– 62.
- Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 Jan 14. 340(2):115-26
- Rozanski A, Blumenthal JA, Kaplan J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation* 1999. Apr 27;99(16) 2192-217
- Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 1986 May. 250(5 Pt 2):H822-7
- Ruckert Y, Rhode W, Furkert J. Radioimmunoassay of corticotropin-releasing-hormone. *Exp Clin Endocrinol.* 1990. 96(2):129-37
- Rugulies R. Depression as a predictor for coronary heart disease. A review and meta-analysis. *Am J Prev Med.* 2002. 23:51– 61.
- Ruoslahti E, Rajotte D. An address system in the vasculature of normal tissues and tumors. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:813-27
- Rutledge T, Reis SE, Olson M, et al. Psychosocial variables are associated with atherosclerosis risk factors among women with chest pain: the WISE study. *Psychosom Med.* 2001 Mar-Apr;63(2):282-8
- Sacerdote P, Brini A, Mantegazza P, Panerai AE. A role for serotonin and beta-endorphin in the analgesia induced by some tricyclic antidepressant drugs. *Pharmacol Biochem Behav.* 1987 Jan. 26(1):153-8
- Seidel M, Billert H, et al. Regulation of eNOS expression in HCAEC cell line treated with opioids and proinflammatory cytokines. *Kardiol Pol.* 2006 Feb; 64(2): 153-8
- Sharp BM, Tsukayama DT, Gekker G, et al. Beta-endorphin stimulates human polymorphonuclear leukocyte superoxide production via a stereoselective opiate receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987 Aug. 242(2):579-82

- Specchia G, Falcone C, Traversi E, et al. Mental stress as a provocative test in patients with various clinical syndromes of coronary heart disease. *Circulation* 1991. Apr;83(4 Suppl):II108-14
- Spieker LE, Hürlimann D, Ruschitzka F, et al. Mental stress induces prolonged endothelial dysfunction via endothelin-A receptors. *Circulation*. 2002 Jun;105(24):2817-20
- Steuernagel C, Schmitz JE. Die Aktivierbarkeit des Kapillarendothels - Regulation der Perfusion, Blutgerinnung und Entzündungsantwort. *Aspekte* 1 (1995), 14-18
- Stewart DJ, Cernacek P, Costello KB, et al. Elevated endothelin-1 in heart failure and loss of normal response to postural change. *Circulation* 1992. 85:510–517
- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 1981. Sep 18;213(4514):1394-7
- Vane JR, Anggård EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*. 1990 Jul 5. 323(1):27-36
- Vigne P, Lund L, Frelin C. Cross talk among cyclic AMP, cyclic GMP, and Ca²⁺-dependent intracellular signaling mechanism in brain capillary endothelial cells. *J Neurochem*. 1993. 62:2269-2274
- Wang JM, Sica A, Peri G, et al. Expression of monocyte chemotactic protein and interleukin-8 by cytokine-activated human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*. 1991 Sep-Oct. 11(5):1166-74
- Wang X, Xu H, Rothman RB. Regulation of the rat brain endothelin system by endogenous beta-endorphin. *Peptides* 2006 Apr;27(4):769-74
- Watson CA, Camera-Benson L, Palmer-Crocker R, Pober JS. Variability among human umbilical vein endothelial cultures. *Science* 1995 Apr 21. 268(5209):447-8
- Wieczorek I, Haynes WG, Webb DJ, et al. Raised plasma endothelin in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction: relation to cardiovascular outcome. *Br Heart J*. 1994. Nov;72(5):436-41

- Wiedermann CJ, Sacerdote P, Mur E, et al. Decreased immunoreactive beta-endorphin in mononuclear leucocytes from patients with rheumatic diseases. *Clin Exp Immunol.* 1992 Feb. 87(2):178-82
- Wiedermann CJ, Schratzberger P, Kähler CM. Migration of neutrophils across endothelial monolayers is stimulated by treatment of the monolayers with beta-endorphin. *Brain Behav Immun.* 1994 Sep. 8(3):270-7
- Wilbert-Lampen U, Straube F, Trapp A, Deutschmann A, Plasse A, Steinbeck G. Effects of Corticotropin-Releasing-Hormone (CRH) on Monocyte Function, Mediated by CRH-Receptor Subtype R1 and R2: A Potential Link between Mood Disorders and Endothelial Dysfunction? *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006. 47(1):110-116
- Wilbert-Lampen U, Trapp A, Modrzik M, Fiedler B, Straube F, Plasse A. Effects off corticotropin-releasing hormone on endothelin-1 and NO release, mediated by CRH receptor subtype R2: a potential link between stress and endothelial dysfunction? *J Psychosom Res.* 2006. 61(4):453-60
- Wilbert-Lampen U, Leistner D, Greven S, et al. Cardiovascular events during World Cup soccer. *N Engl J Med.* 2008. Jan;358(5):475-83
- Wright CE, Rees DD, Moncada S. Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovasc Res.* 1992. Jan;26(1):48-5
- Xu Y, Swerlick RA, Sepp N, et al. Characterization of expression and modulation of cell adhesion molecules on an immortalized human dermal microvascular endothelial cell line (HMEC-1). *J Invest Dermatol.* 1994 Jun. 102(6):833-7
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988. 332:411–415
- Yang Z, Richard D, Von Segesser L, et al. Threshold concentrations of endothelin-1 potentiate concentrations to norepinephrine and serotonin in human arteries: a new mechanism of vasospasm? *Circulation* 1990. 82:188-195
- Yeung AC, Vekshtein VI, Krantz DS, et al. The effect of atherosclerosis on the vasomotor response of coronary arteries to mental stress. *N Engl J Med.* 1991. Nov 28; 325:1551-6
- Zeiber AM, Goebel H, Schächinger V, et al. Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque. A clue to the mechanism of

increased vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. *Circulation*
1995. 91(4):941-7

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fatty Streak Formationen	3
Abbildung 2: Fortgeschrittene Atherosklerose	3
Abbildung 3: Plaqueinstabilität mit Ruptur	3
Abbildung 4: Nachweis von $\mu 1$ Rezeptoren auf HMEC-1 Zellen	27
Abbildung 5: endotheliale Beta-Endorphin induzierte Endothelin-1 Freisetzung	28
Abbildung 6: endotheliale β -Endorphin-induzierte NO-Freisetzung	29
Abbildung 7: Nachweis von $\mu 1$ Rezeptoren auf primären Monozyten	30
Abbildung 8: monozytäre Beta-Endorphin-induzierte Endothelin-1 Freisetzung	31
Abbildung 9: monozytäre Beta-Endorphin-induzierte NO-Freisetzung	32
Abbildung 10: monozytäre CRH-induzierte Beta-Endorphin Freisetzung	33

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für meine Übernahme als Doktorand der Ersten Medizinischen Klinik, für die formelle Betreuung meiner Arbeit und für die Bereitstellung von hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten im experimentellen Forschungslabor sei Herrn Prof. Dr. med. Steinbeck gedankt.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. med. Ute Wilbert-Lampen bedanken. Als Leiterin der Arbeitsgruppe Stress bot sie mir die Möglichkeit, an einem äußerst interessanten Projekt teilnehmen zu dürfen. Sie gewährte mir stets sowohl fachliche als auch menschliche Unterstützung, ich konnte in allen Phasen der Dissertationsarbeit von ihrer langjährige Erfahrung als Wissenschaftlerin profitieren, ihre wertvollen Ratschläge waren unverzichtbar.

Zu großen Dank bin ich Frau Andrea Plasse verpflichtet. Mit viel Geduld, einer stets unerschöpflich positiven Energie und immer guter Laune führte sie mich durch die Grundzüge des experimentellen Arbeitens im Forschungslabor. Es gab kein Problem, das dank ihrer Erfahrung und ihrem Einfallsreichtum nicht gelöst werden konnte.

Vielen Dank auch an Frau Heike Kartmann, Frau Bianca Hildebrand, Frau Cornelia Grimm und Frau Ingrid Liß für das zur Verfügung stellen von technischen Hilfsmitteln und von wertvollen Ratschlägen. Die fachliche Beratung und Hilfsbereitschaft von Frau Dr. hum. biol. Katja Vogler und von Frau Dr. hum. biol. Anja Trapp waren für die Erstellung dieser Arbeit von sehr hohem Wert, ebenso die vielen Tipps und Hilfestellungen von Herrn Dr. med. Florian Straube, ebenfalls ein Doktorand der Forschungsgruppe Stress.

Insbesondere möchte ich meinen Eltern und Brüdern Danke sagen, die mich mit ihrer Liebe, ihrem Verständnis und ihrer Kraft stets unterstützt haben. Danke auch an Elke für ihre große Hilfe und vielen Dank meiner lieben Freundin Steffi, dass sie immer für mich da war.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	14. Februar 1978
Geburtsort	Hermannstadt, Rumänien
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Konfession	evangelisch

Beruflicher Werdegang

seit Juni 2006	Assistenzarzt in Weiterbildung Medizinische Klinik I Kardiologie, Angiologie, Pneumologie, Nephrologie, internistische Intensivmedizin Klinikum des Landkreises Deggendorf
----------------	--

20. April 2006	Approbation als Arzt, Regierung von Oberbayern
----------------	---

Praktisches Jahr

<i>Drittes Tertial</i> November 2005 - März 2006	Chirurgie Krankenhaus München-Harlaching Allgemein- und Viszeralchirurgie, Prof. Dr. Horn Unfallchirurgie, Prof. Dr. Hertlein
---	--

<i>Zweites Tertial</i> August - November 2005	Anästhesie Klinikum Großhadern, Klinik für Anästhesiologie Direktor Prof. Dr. Dr. h.c. Peter urologischer und orthopädischer OP, Intensivstation, Notarztdienst
--	---

Erstes Tertial

April - August 2005

Innere Medizin

Krankenhaus München-Harlaching, Zentrum für
internistische Akutmedizin und Prävention

Chefarzt kommissarisch Dr. Spuhler

Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität München

April 2006

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

März 2005

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

März 2003

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

März 2002

Ärztliche Vorprüfung

April 2000

Beginn des Studiums der Humanmedizin

Famulaturen

August 2004

Hausärztliche Innere Medizin

Praxis Dr. Certain, Konstanz

März 2004

Rekonstruktive und

korrigierende Extremitätenchirurgie

Prof. Dr. Dr. Baumgart

Chirurgische Klinik Innenstadt, München

August 2003

Innere Medizin/Kardiologie

Praxis Dr. Muscholl, München

Juli - August 2002

Innere Medizin, Klinikum Radolfzell

Chefarzt Dr. Langbein

Krankenpflegepraktikum

Februar - März 2001

Allgemeinchirurgische Station

Städtisches Klinikum, Konstanz

Wissenschaftliche Aktivitäten

August 2003 Beginn der Dissertation bei Prof. Dr. med. Steinbeck, Medizinische Klinik und Poliklinik I, LMU Großhadern in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. med. Wilbert-Lampen über die proatherogene Wirkung des Stresshormon Beta-Endorphin und die Beta-Endorphin-Freisetzung aus Monozyten unter CRH-Stimulus; als Modell für chronische Stress-Induktion

Bibliographie

Wilbert-Lampen U, Trapp A, Barth S, Plasse A, Leistner D. "Effects of beta-endorphin on endothelial/monocytic endothelin-1 and nitric oxide release mediated by mu1-opioid receptors: a potential link between stress and endothelial dysfunction?"

(Endothelium 2007 Mar-Apr;14(2):65-71)

Zivildienst

August 1998 - August 1999 Zivildienst beim DRK Konstanz, Rettungsdienst

Schulbildung

Juni 1998 Allgemeine Hochschulreife
Oktober 1992 - Juni 1998 Geschwister-Scholl-Schule, Konstanz
Oktober 1984 - Juli 1992 Grundschule/Gymnasium in Mediasch, Rum.