

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

**CRH-R1/2 vermittelte Effekte von
Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) auf
die Monozytenfunktion und
Monozyten-Endothel-Interaktion**

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

vorgelegt von

Florian Straube

aus Bielefeld

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. Steinbeck

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. F. Beuschlein
Priv. Doz. Dr. med. M. Dellian

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

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhard

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2007

„Heiterkeit entlastet das Herz“

Hippokrates von Kos, 460 – 377 v. Chr.

„Dubium sapientiae initium. - Zweifel ist der Weisheit Anfang.“

René Descartes, 1596 – 1650 n. Chr.

„Der Beweis ist der einzige Weg, um anderen Wahrheiten begreiflich zu machen, welche sie unmittelbar nicht einsehen können.“

Arthur Schopenhauer, 1788 – 1860 n. Chr.

Verwendete Abkürzungen:

BCECF-AM	Bis-Carboxyethyl-Carboxyfluoreszein-Acetoxymethylester
BSA	Bovines Serum Albumin
BSS	balancierte Salzlösung
Calcein-AM	Calcein-Aminomethylfluoreszein
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementärer DNA Strang
CFDA	Carboxyfluoreszeindiacetat
CFSE	Carboxyfluoreszeindiacetat - Succiminidylester
CMFDA	Chloromethylfluoreszeindiacetat
Cr	Chrom
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CRH-BP	CRH-bindendes Protein
CRH-R1/2	Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor 1 bzw. 2
Cy3	Indocarbocyanin, Fluorochrom
DAPI	Diamidinophenylindol, Fluorochrom
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
fMLP	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
gp	Glykoprotein
HBSS	Hanks' balancierte Salzlösung

HMEC-1	Humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie 1
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmoleküle 1
Ig	Immunglobulin
LAL	Limulus Amöbozyten Lysat
LBP	LPS-bindendes-Protein
LC-NE	Locus-Coeruleus-Norepinephrin
LDL	low density lipoprotein
LFA-1	Lymphocyte function associated antigen-1
Lkn-1	Leukotactin-1
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	monoklonaler Antikörper
MAC-1	Monozyten-Differenzierungs-Antigen, CD11b/CD18
MCP-1	Monozyten Chemoattractant Protein 1
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
PBG	PBS-BSA-Gelatine-Lösung
PBMC	periphere mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PECAM	Plättchen-Endothel Zelladhäsionsmolekül
PMA	Phorbolmyristataacetat, Phorbolester
RFU	relative Fluoreszenzeinheit
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
Taq	Thermus aquatius

TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
THP-1	promonozytäre Zelllinie
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Ucn	Urocortin
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
VLA-4	very late antigen-4
VSMC	vaskuläre glatte Muskelzellen
vWF	von Willebrand Faktor

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Pathogenese der Atherosklerose	11
1.2	Die Bedeutung der Adhäsionsmoleküle für die Monozyten-Endothel-Interaktion	14
1.3	Mentaler Stress als kardiovaskulärer Risikofaktor	17
1.4	Chronische Hyperaktivität der HPA-Achse	19
1.5	CRH-Rezeptoren	19
1.6	Peripheres CRH	20
1.7	Periphere Effekte von CRH auf Endothel und Monozyt	21
2	Fragestellung und Zielsetzung	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Materialien	23
3.1.1	Geräte und Software	23
3.1.2	Verbrauchsmaterial	23
3.1.3	Reagentien	26
3.2	Experimentell untersuchte Zellen	28
3.2.1	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1)	28
3.2.2	Humane monozytäre Zelllinie (THP-1)	28
3.2.3	Humane periphere Monozyten	29
3.3	Experimentell untersuchte Peptide und Stimulantien	29
3.3.1	Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH)	29
3.3.2	Lipopolysaccharid (LPS)	31

3.4	Methoden	32
3.4.1	Zellkulturen	32
3.4.1.1	Zellkultur HMEC-1	32
3.4.1.2	Zellkultur THP-1	33
3.4.2	Gewinnung primärer Monozyten	33
3.4.2.1	Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	33
3.4.2.2	Monozytenisolation mit MACS durch Negativselektion	34
3.4.2.3	Durchflusszytometrische Analyse der gewonnenen Zellen (CD 14+)	34
3.4.3	CRH-Rezeptornachweis auf THP-1 Zellen	35
3.4.3.1	RT-PCR zum CRF-R1/2 Nachweis	35
3.4.3.2	Immunfluoreszenztechnik zum CRH-Rezeptornachweis	38
3.4.4	Intrazelluläre Fluoreszenzfärbung der Monozyten	40
3.4.5	Fluoreszenzmikroskopische Adhäsionsbestimmung	40
3.4.6	Fluoreszenzphotometrische Adhäsionsbestimmung	42
3.4.6.1	Fluorometrische Adhäsionsbestimmung von THP-1 an isoliert stimulierten HMEC-1	42
3.4.6.2	Fluorometrische Adhäsionsbestimmung von THP-1 an HMEC-1 bei Ko-Stimulation beider Zelltypen	45
3.4.7	Quantitative MAC-1/CD11b Bestimmung auf primären humanen Monozyten	46
3.4.8	Durchflusszytometrie von ICAM-1/CD54 und VCAM-1/CD106 an HMEC-1	47
3.4.9	Qualitätskontrollen	47
3.4.9.1	Mykoplasmandetektion auf RT-PCR Basis	47
3.4.9.2	Endotoxinnachweis	48
3.4.9.3	Proteinbestimmung	48
4	Ergebnisse	48

4.1	Zellkultur: Qualitätskontrollen	48
4.2	CRH-Rezeptor-Nachweis mittels RT-PCR auf THP-1 Zellen	49
4.3	CRH-Rezeptor-Nachweis mittels Immunfluoreszenz auf THP-1 Zellen	51
4.4	Entwicklung einer fluoreszenzphotometrischen Methode zur Adhäsionsbestimmung	53
4.4.1	Fluoreszenzmikroskopische Adhäsionsbestimmung von THP-1 Zellen an mit LPS stimulierten HMEC-1	54
4.4.2	Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen für eine fluoreszenzphotometrische Adhäsionsbestimmung	56
4.4.3	Vergleich der Methoden am Beispiel LPS-stimulierter HMEC-1 und THP-1 Zellen	57
4.4.4	Intra- und Interassay Kontrollen der fluorometrischen und mikroskopischen Adhäsionsmeßmethode	59
4.5	Adhäsion von THP-1 an CRH-stimulierten HMEC-1	60
4.6	Adhäsion von THP-1 an HMEC-1 nach Ko-Stimulation beider Zelltypen mit CRH	61
4.6.1	Statistische Auswertung der Daten	63
4.7	CRH-induzierte Mobilisierung von MAC-1/CD 11b auf primären Monozyten	64
4.8	Einfluss von CRH auf die endotheliale Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1/CD54 und VCAM-1/CD106	65
5	Diskussion	66
5.1	Methodendiskussion	66
5.1.1	Diskussion der Zellkulturversuche	66
5.1.2	Diskussion der entwickelten Methode zur Adhäsionsbestimmung	67
5.1.2.1	Geschichte der bisherigen etablierten Adhäsionsverfahren	67
5.1.2.2	Etablierung eines eigenen Verfahrens zur Adhäsionsbestimmung	67

5.1.3	Diskussion der verwendeten Methoden zum CRH-Rezeptornachweis	70
5.1.3.1	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	70
5.1.3.2	CRH-Rezeptornachweis auf Proteinebene	71
5.1.4	Diskussion der verwendeten Methoden zur Adhäsionsmoleküldetektion	73
5.1.4.1	Das monozytäre Adhäsionsmolekül MAC-1	73
5.1.4.2	Die endothelialen Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1	75
5.1.4.3	Die verwendeten CRH-Konzentrationen	76
5.2	Diskussion der Ergebnisse hinsichtlich der Fragestellung	76
5.2.1	Werden auf der monozytären Zelllinie THP-1 CRH Rezeptoren exprimiert?	76
5.2.2	Kann CRH die Adhäsion von Monozyten am Endothel beeinflussen und, wenn ja, welche Mediatoren sind dabei beteiligt?	77
6	Zusammenfassung	78
7	Literaturverzeichnis	80
8	Legenden	93
8.1	Abbildungsverzeichnis	93
8.2	Tabellenverzeichnis	94
9	Danksagungen	95
10	Lebenslauf	97

1 Einleitung

Für die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus sowie familiäre Disposition sind die zu Grunde liegenden Pathomechanismen für die Genese der Atherosklerose hinlänglich bekannt.

Im Gegensatz hierzu ist chronischer mentaler Stress als weiterer Risikofaktor für die Entstehung und Progression der Arteriosklerose nicht ausreichend erforscht. Epidemiologische Studien zeigen eine hohe Assoziation von psychosozialen Stress und der Entwicklung der Atherosklerose, ein plausibler Pathomechanismus ist bisher nicht bekannt. Es stellt sich die Frage, ob Stress nur als Verstärker für die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wirkt oder ob er ein eigenständiger Risikofaktor ist, der alleine schon zu einer endothelialen Dysfunktion mit Induktion einer Arteriosklerose führen kann.

Es ist hinreichend bekannt, dass chronischer mentaler Stress zu einer Hyperaktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Adrenalen-Achse mit konsekutiv erhöhten CRH-Plasma- und CRH-Liquorspiegeln führt. Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, den direkten Einfluss des chronischen Stresshormons CRH auf die Monozyten-Endothel-Interaktion zu untersuchen um somit die molekularbiologische Bedeutung von CRH auf die Stress-induzierte endotheliale Dysfunktion beurteilen zu können.

1.1 Pathogenese der Atherosklerose

Atherosklerose ist die Ursache vieler klinischer Manifestationen wie koronare Herzkrankheit, Apoplex und periphere arterielle Verschlusskrankheit. In der Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes Deutschlands aus dem Jahr

2005 sind 44,2 % (367.361) aller Todesfälle auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen zurückzuführen, 17,9% (148.641) der Todesursachen 2005 ist die ischämische Herzerkrankung und alleine 8% (36.283) sind akute Myokardinfarkte. Alle Tumorerkrankungen zusammen kamen auf einen prozentualen Anteil der Todesursachen von 25,5% (112.066) und stehen somit deutlich hinter den kardiologischen Todesursachen. Das unterstreicht die besondere Bedeutung der Atherosklerose und sollte uns darin bestärken, die Pathogenese, therapeutische Ansätze sowie die Prävention zu erforschen.

Die Pathoanatomie unterscheidet drei histologische Stadien der Atherosklerose. Zu Beginn kommt es zunächst zu einer Reduktion der Dehnbarkeit der Arterie mit Zunahme der Intimadicke und Proliferation der glatten Muskulatur sowie der extrazellulären Matrix (Davies et al., 1988). Zudem akkumulieren intra- und extrazellulär Lipide, was zum morphologischen Bild der „Fatty Streaks“ führt. In diesen Fatty Streaks finden sich neben Lipiden auch T-Lymphozyten und Makrophagen mit Bildung von zytoplasmatischen Einschlusskörperchen, die kalzifizieren können. Lipidbeladene glatte Muskelzellen, extrazelluläres Lipid und Bindegewebsvermehrung führen zum histologischen Bild des fibrösen Plaques. Im fortgeschrittenen Stadium kommt es zur Nekrose und Revaskularisierung von luminal und medial, sodass eine eigene Mikrozirkulation über vasa vasorum von der Adventitia über die Media in den intimalen Plaque entsteht. Kompensatorisch kann zunächst die Arterie lokal dilatieren, im Verlauf kommt es aber zum obstruktiven Remodeling bis hin zum Gefäßverschluss (Schoenhagen et al., 2001)

Molekularbiologisch ist das „Response-to-Injury-Modell“ von Russel Ross zu nennen (Ross R., 1993). Unterschiedliche Faktoren führen hiernach zu einer endothelialen

Dysfunktion: Die Produktion von autokrinen und parakrine Faktoren wie NO, Prostaglandinen, Endothelin-1, Angiotensin II, Tissue Faktor und Zytokinen ist gestört. Konsekutiv kommt es zu einer Imbalance von Vasodilatation und Vasokonstriktion sowie Antikoagulation und Thromboseneigung. Zudem wird durch überschießende Produktion von proinflammatorischen Mediatoren ein inflammatorischer Prozess induziert, der initial mit einer Akkumulation von oxidiertem LDL in der Intima beginnt (Ross, 1999; Faxon et al., 2004). Im Folgenden kommt es zur Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen, darunter P- und E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1, welche zirkulierende Leukozyten und Monozyten anlocken und an die Endotheloberfläche binden. Die Transmigration in die Arterienwand wird durch Chemoattractants wie MCP-1 und Lkn-1 vermittelt (Yu R. et al., 2004).

Die akkumulierten Makrophagen und T-Zellen setzen proteolytischen Enzyme, Wachstumsfaktoren und Cytokine (IL-1, -3, -8, -18, TNF- α) frei mit nachfolgender Induktion eines inflammatorischen Prozesses, der schließlich zur Plaqueruptur und Thrombose führt (Moreno et al., 1998). Daneben sind auch Matrixmetalloproteasen beteiligt, die zur Auflösung der bindegewebigen Kappe über der Läsion führen können, und so die Ruptur begünstigen (Galis et al., 2002).

Response-to-Injury Hypothese der Atherosklerose

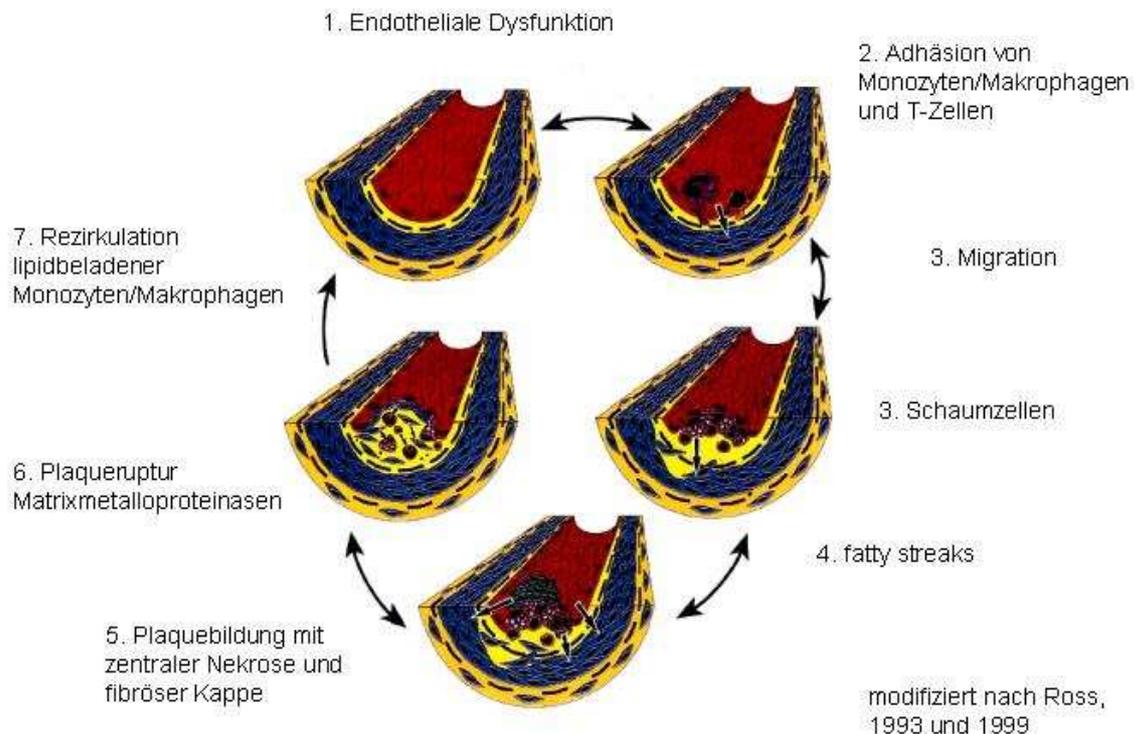


Abb. 1: Response-to-Injury-Hypothese

1.2 Die Bedeutung der Adhäsionsmoleküle für die Monozyten-Endothel-Interaktion

Im Rahmen der Progression der Atherosklerose kommt es zu einer Vielzahl von Zellinteraktionen zwischen Leukozyten-Leukozyten, Leukozyten-„glatte Muskelzellen“, Leukozyten-„extrazelluläre Matrix“, Leukozyten-Endothel sowie Monozyten-Endothel. Die Mediatoren, die diese Interaktionen vermitteln, sind die sogenannten Adhäsionsmoleküle die sich in drei Gruppen gliedern: Selektine, Integrine und die Immunglobuline (Springer TA, 1990, 1994):

Die Gruppe der Selektine bestehen aus einem Kalzium-bindendem Lektin, gefolgt von einer EGF-ähnlichen-Domäne, einer Transmembrandomäne sowie einem kurzen zytoplasmatischen Teil. Selektine vermitteln den ersten Kontakt zwischen Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen (McEver et al., 1995)

E-Selektin wird nach Aktivierung von Endothelzellen synthetisiert während P-Selektin vor allem von Thrombozyten, in geringerem Maße auch von Endothelzellen, gebildet wird, L-Selektin hingegen wird überwiegend von Leukozyten exprimiert (Price et al., 1999).

Integrine sind heterodimere Moleküle, die aus nicht-kovalent gebundenen α - und β -Untereinheiten bestehen. Sie binden an verschiedene Strukturproteine wie Laminin, Collagen, Vitronektin und Fibronektin und werden anhand der β -Untereinheit in Subklassen unterteilt.: Zur β 1-Familie gehört das VLA-4 (α 1 β 1), das neben Fibronektin auch VCAM-1 als Adhäsionsmoleküle der Immunglobulinklasse bindet.

LFA-1 (α L β 2, CD11a/CD18), MAC-1 (α M β 2, CD11b/CD18) und p150/95 (α X β 2, CD11c/CD18) sind Mitglieder der β 2-Familie, die sich nur auf der Leukozyten- und Monozytenoberfläche befinden, alle die β 2-Untereinheit CD18 enthalten und an Adhäsionsmoleküle der Immunglobulinklasse binden. LFA-1 wird konstitutiv von Lymphozyten exprimiert und ist für die Bindung von Lymphozyten an Endothelzellen und Antigen-präsentierende-Zellen von Bedeutung. MAC-1, das ICAM-1, -2, -3, C3b und Fibrinogen bindet, wird von Neutrophilen und Monozyten gebildet, das in Speichervesikel vorliegt und nach Aktivierung an die Oberfläche freigesetzt wird (Miller et al., 1987). Als Komplementrezeptor vermittelt es vor allem Phagozytose von Mikroorganismen.

Die β 3-Familie der Integrine umfasst Zytoadhäsine wie das Thrombozytenglykoprotein gpIIb/IIIa oder den Vitronektin-Rezeptor, sie vermitteln unter anderem die Thrombozytenaggregation.

Adhäsionsmoleküle der Immunglobulinklasse bestehen aus einer 90 bis 100 Aminosäuren langen Sequenz und sind vornehmlich endotheliale Liganden für Integrine der Leukozyten und Thrombozyten, sie können sowohl konstitutiv als auch nach Stimulation auf deren Oberfläche exprimiert werden. Die drei wichtigsten Vertreter sind VCAM-1, ICAM-1 und PECAM.

Während VCAM-1 und ICAM-1 beide Integrin binden, ist PECAM sein eigener Ligand und stellt somit eine homotype Assoziation dar.

ICAM-1 ist auf dem Endothel zu jeder Zeit schwach exprimiert, nach Stimulation mit IL-1, TNF- α oder Endotoxin kommt es zur vermehrten Synthese mit einem Maximum nach 24 Stunden wie in in-vitro Untersuchungen zeigen konnten. Auch VCAM-1 wird durch oben genannte Stimulantien gebildet, auf der „ruhenden“ Endothelzelle ist es hingegen nicht nachweisbar. Die Bedeutung von VCAM-1 in der frühen Atherogenese ist durch Experimente mit Knock-Out-Mäusen belegt, ICAM-1 scheint hingegen in der späteren Phase der Atherogenese eine Rolle zu spielen (Cybulsky et al., 2001).

Wie bereits oben erwähnt ist die Hauptfunktion der Adhäsionsmoleküle die Rekrutierung von Leukozyten (also Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten) aus dem Gefäßsystem mit anschließender Einwanderung in die Gefäßwand. Der Prozeß erfolgt in vier Schritten: Einfangen, Rollen, Adhäsion und Transmigration. (Konstantopoulos et al., 1996). Das Einfangen und Rollen wird vor allem durch Selektine vermittelt, wogegen Integrine und die Immunglobulin-Familie für die Adhäsion und Transmigration verantwortlich sind (Price et al., 1999). Die Adhäsionsmoleküle werden dabei durch zahlreiche Mediatoren reguliert. Zu nennen sind vor allem Chemokine und Zytokine, die bei inflammatorischen Prozessen

vermehrt freigesetzt werden (Imhof et al., 2004). Rezeptortyp und Rezeptorzahl können auf der Zelloberfläche durch Neusynthese, Sekretion aus intrazellulären Speichern, Internalisierung oder durch proteolytische Prozesse moduliert werden. Durch allosterische Konformationsänderungen kommt es zu veränderter Affinität vom Ligand zum Rezeptor.

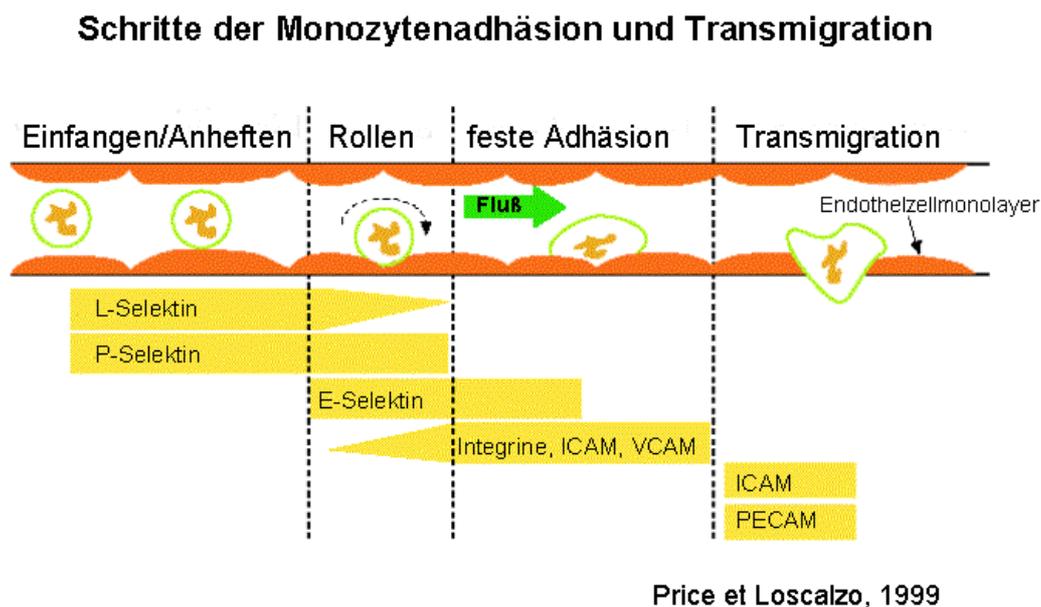


Abb. 2: Schritte der Adhäsion und Transmigration

1.3 Mentaler Stress als kardiovaskulärer Risikofaktor

Mehrfach wurde nach Naturkatastrophen und Kriegen über eine erhöhte Inzidenz für kardiovaskuläre Ereignisse wie Myokardinfarkt berichtet (Meisel et al, 1991). Der Stellenwert von akutem oder chronischem Stress bei der Entstehung und Entwicklung einer zu Grunde liegenden Atherosklerose wird aber häufig unterschätzt. Viele epidemiologische Studien haben schon in der Vergangenheit eine Bedeutung von psychischen Einflüssen auf die Entstehung und Progression einer

Atherosklerose beschrieben (Haynes et al., 1980; Rosenman et al., 1976), die zu Grunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen sind nicht geklärt (Stewart et al., 2003).

In den letzten Jahren sind viele prospektive Kohortenstudien und Fall-Kontroll-Studien publiziert worden, die die ätiologische Bedeutung des psychosozialen Stresses untersuchten, klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren wurden dabei statistisch kontrolliert. Die Mehrheit der Studien kommt zu dem Ergebnis, dass psychosozialer Stress ein eigenständiger kardiovaskulärer Risikofaktor ist und in der Bedeutung dem der Hypercholesterinämie gleichkommt. (Marmot, 1997; Kivimäki, 2002; Todaro, 2003; Wasserheil-Smoller, 2004; Möller J, 2005; Rosengren, 2004; Yusuf, 2004). Einige wenige Studien widerlegen diese Aussage (O'Malley et al., 2000; Cervilla et al., 2004). In Übersichtsarbeiten wird zudem der ätiologische Einfluss und die prognostische Bedeutung psychischer Faktoren mit Hilfe von Metaanalysen bestehender Studienergebnisse bestätigt (Hemingway, 1999; Kuper, 2002; Regulies, 2002; Wulsin, 2003).

Neben epidemiologischen Hinweisen ist interessant, dass sowohl in-vitro-Studien als auch in-vivo-Untersuchungen mit Tieren und Humanexperimente (Lespérance, Frasure-Smith et al., 2004; Rajagopalan et al., 2001) zeigen konnten, dass es unter mentaler Stresseinwirkung zur Inflammation (Kielcolt-Glaser, 2003; Panagiotakos, 2004; Miller, 2002), erhöhter Koagubilität (Steptoe, 2003; von Känel, 2001) sowie Endotheldysfunktion (Hemingway, 2003; Mangiafico, 2002; Ghiadoni, 2000) kommt. Beispielhaft sei hier eine Stress-induzierte Zunahme atheromatöser Plaquebildung im Affenmodell genannt (Kaplan et al., 1983). Desweiteren konnte bei Probanden mit depressiven Symptomen eine erhöhte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine aus Monozyten dokumentiert werden (Suarez et al., 2003).

1.4 Chronische Hyperaktivität der HPA-Achse

Veränderungen der HPA-Achse finden sich in nahezu allen psychiatrischen Erkrankungen, assoziiert mit einer permanenten Aktivierung der HPA-Achse und konsekutiv erhöhten CRH Liquor- und Plasmakonzentrationen. Hier sind insbesondere die Major Depression, Angststörungen, das posttraumatische Disstress Syndrom, Essstörungen und die Dysthymie zu nennen (Claes, 2004). Da das Stresshormon CRH der wichtigste Vertreter der HPA-Achse ist, muß seiner Wirkung eine besondere Aufmerksamkeit zukommen. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass eine CRH-Rezeptor-Blockade bei Rhesus Affen zu einer verminderten Stressantwort führte (Habib et al., 2000). In der Behandlung der Major Depression sind bisher schon in klinisch kontrollierten Studien oral applizierbare CRH-Rezeptor-Antagonisten verfügbar, die zu einer signifikanten Reduktion der klinischen Symptomatik führen können (Zobel et al., 2000; Kehne et al., 2002).

In wie weit die klinische Anwendung von CRH-Rezeptor-Antagonisten Auswirkungen auf die Atherosklerose hat, ist bisher ungeklärt.

1.5 CRH-Rezeptoren

Es gibt zwei CRH-Rezeptortypen, CRH-R1 und CRH-R2, sie sind zu 70% homolog zueinander. Beide haben sieben Transmembrandomänen und sind positiv mit der Adenylatcyclase verbunden. CRH-R1 kommt in nur einer Isoform vor (CRH-R1 α) während CRH-R2 drei funktionelle Varianten aufzeigt: CRH-R2 α , -R2 β und -R2 γ . Sie unterscheiden sich an ihrem N-terminalen Ende, bedingt durch alternatives Splicing. CRH-R1 wird vornehmlich im zentralen Nervensystem exprimiert (portales

Gefäßnetz der Hypophyse, Cerebellum, Amygdala, Hippocampus, Stammhirn) während CRH-R2 auch in der Peripherie nachweisbar ist (Herzvorhöfe und –kammern, am Myo- und Epicard und an den myokardialen Arteriolen (Kimura et al., 2002), am Skelettmuskel (Kishimoto et al., 1995), an Arteriolen in Lunge und Intestinaltrakt. So konnte beispielhaft an CRH-R2-Knock-Out Mäusen die Relevanz des Rezeptors in der Regulation des kardiovaskulären Systems aufgezeigt werden (Coste et al., 2000, 2002).

1.6 Peripheres CRH

Corticotropin-Releasing-Hormon-Konzentrationen im peripheren Plasma sind geringer als die Konzentrationen im hypothalamisch-hypophysären Portalvenenplasma, wobei in der Literatur unterschiedliche Normbereiche für CRH angegeben werden, sie variieren von CRH 10^{-11} bis 10^{-6} M (Ruckert et al., 1990; Stephanou et al., 1990, Ellis et al., 1988). Die große Variationsbreite kommt dabei durch unterschiedliche Messmethoden zu Stande, als Konsequenz hieraus gibt es keinen etablierten Normwert. Die größte Menge des CRH liegt gebunden an CRH-BP vor (Behan et al., 1989). Die Plasmahalbwertszeit von ungebundenem CRH beträgt beim Menschen nur vier Minuten (Schurmeyer et al., 1984). CRH wird neben dem ZNS auch von einer Vielzahl von peripheren Organen und Geweben produziert. Dazu gehören Milz, Thymus, inflammatorischen Zellen (Baker et al., 2003) und periphere Nervenendigungen. CRH moduliert die Sekretion von Zytokinen sowie die Proliferation und Degranulation von Lymphozyten und Makrophagen (Baigent et al., 2001), außerdem ist eine über periphere CRH-Rezeptoren vermittelte kardiovaskuläre Bedeutung bekannt (Parkes et al., 2001).

1.7 Periphere Effekte von CRH auf Endothel und Monozyt

CRH vermag die zelluläre Zytokinproduktion zu modulieren. So wurde beispielhaft in der Zellkultur (PBMC) ein stimulatorischer Effekt auf die Produktion von Interleukin-6 gesehen (Leu et al., 1992, Agelaki et al., 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen einer Koronarangioplastie - ein Stress-auslösendes Ereignis - wie auch bei intravenöse Gabe von CRH (in der Dosierung 1 µg/kg Körpergewicht) zu einer signifikanten Interleukin-1 und 2 Sekretion kam (Schulte et al., 1994). Eine Zunahme der zellvermittelten Lyse durch natürliche Killerzellen konnte durch CRH induziert werden, möglicherweise IL-1 vermittelt (Leu et Singh, 1991).

An isolierten humanen PBMC wurde durch CRH eine verminderte Antikörperproduktion hervorgerufen (Leu et Singh, 1993). Intrazellulär wies man zudem eine Immunreaktivität für CRH bei T- und B-Zellen wie auch bei Makrophagen nach (Baker et al., 2003). In-vitro-Migrationsstudien zeigten ein stimuliertes Migrationsverhalten von Monozyten (Genedani et al., 1992), während eine CRH-Wirkung auf das Endothel über die Beeinflussung der endothelialen NO-Synthase demonstriert werden konnte (Cantarella et al., 2001).

Zusammenfassend zeigt sich aus den oben aufgeführten Daten, dass die Bedeutung von CRH als parakrines und autokrines Hormon weit über eine nur als zentralnervös wirkende Substanz verstanden werden muß.

2 Fragestellung und Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, eine mögliche Regulation des Stresshormons CRH auf die Monozyten-Endothel-Interaktion zu untersuchen.

Es wurden konkret folgende Fragestellungen experimentell untersucht:

- *Werden auf der monozytäre Zelllinie THP-1 CRH Rezeptoren exprimiert?*
- *Kann CRH die Adhäsion von Monozyten am Endothel beeinflussen und, wenn ja, welche Mediatoren sind dabei beteiligt?*

Methodisch war die Entwicklung und Validierung und Anwendung folgender Verfahren erforderlich:

- *Identifizierung der CRH-Rezeptoren auf der Zelloberfläche mittels PCR-Analyse und Immunfluoreszenz-Technik*
- *Etablierung einer fluorometrischen Adhäsionsmessung*
- *Quantifizierung der endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 unter Einfluß von CRH*
- *Quantifizierung des monozytären Adhäsionsmoleküls MAC-1 unter Einfluß von CRH*

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte und Software

BioPhotometer: Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

DNA Engine Dyad Cyclor: Fa. BioRad, USA

Epics XL Flow Cytometry: Fa. Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200, Kamera, Software AxioVision: Fa. Zeiss, Deutschland

GENios Multiplate-Reader, XFlour4-Software: Fa. TECAN, Deutschland

Primer3-Software (Rozen et Skaletsky, 2000)

Microsoft Excel 2000, Word 2000: Fa. Microsoft Corp., USA

SPSS für Windows, Version 11.5.1, 2000

Chromas Version 1.45, 1996

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Humanes CRH: Fa. Biozym, Deutschland

LPS E. coli O126 und fMLP, L-Glutamin, Trypsin, VEGF, EGF, Hydrocortison, PBS, Gentamycin, Penicillin Streptomycin, Methanol, Ethanol, Glycerin, Glycin, BSA: Fa. Sigma-Aldrich, Deutschland

Chloroform: Fa. Merck, Deutschland

Antikörper für die Durchflusszytometrie

Fa. Beckman Coulter, Deutschland

- mAb CD 14 – FITC - IgG2a

- mAb CD 11b – PE - IgG1

- Isotypkontrolle PE - IgG1
- Isotypkontrolle FITC - IgG2a

Fa. Becton-Dickinson, Deutschland

- mAb CD54 – PE – IgG1

Fa. R&D Systems, Deutschland

- mAb CD106 – FITC – IgG2a,

Antikörper für die Immunfluoreszenzcytochemie:

Fa. SantaCruz, USA

- CRF-RI-IgG affinity-purified goat polyclonal antibody (C-20)
- Blockierungspeptid für CRF-RI-IgG, Santa Cruz, USA

Fa. Sigma-Aldrich, Deutschland

- Cy3-conjugated affinity-purified mouse anti-goat IgG (H+L),

RPMI 1640-Medium Modified: Fa. ATCC, USA

MCDB 131 mit/ohne Phenolrot: Fa. CCpro, Deutschland

Fetales Kälberserum, FCS clone low Endotoxin tested: Fa. Ccpro, Deutschland

Zellkulturflaschen: Fa. Nalge Nunc Int., USA

TRizol-Reagenz: Fa. Gibco-Invitrogen, Deutschland

Superscript TM II Kit: Fa. Invitrogen, Deutschland

Taq Polymerase: Fa. Promega Corp., USA

DNase Kit: Fa. Ambion, USA

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

GeneRuler, 50bp-Ladder, Fa. Fermentas, Deutschland

Nucleo Spin Extract^R Kit: Fa. Machery-Nagel, Deutschland

Primersynthese – Fa. Thermohybaid, Deutschland

Sequenzierung – Fa. Eurofins Medigenomix, Deutschland

Vacutainer CPT: Fa. Becton-Dickinson, Deutschland

Ficoll-Paque-Plus: Fa. Amersham Biosciences, United Kingdom

MACS Monozytenisolation Kit II: Fa. Miltenyi Biotech, Deutschland

Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger: Fa. Menzel, Deutschland

Mikrotiter 96 Well flat bottom white und transparente Platten, Fa. Corning Costar,
USA

8er und 4er Chamberslides mit Glasobjektträgern, Fa. BD Falcon, USA

VECTASHIELD-DAPI, Fa. Vector Laboratories, UK

CMFDA Celltracker C-7025: Fa. Invitrogen Molecular Probes, Deutschland

LIMUSATE LAL-Test: Fa. Kappes Laborservice, Deutschland

VenorGeM RT-PCR-Mykoplasmentest-Kit: Fa. Minerva Biolabs, Deutschland

Quantitativer Proteinassay: Fa. PIERCE Biotechnology Corp., USA

Zellkulturzubehör, diverse Laborartikel, Chemikalien und Verbrauchsmaterial wurde von namhaften Herstellern bezogen.

3.1.3 Reagentien

PBS-Glycin

1,87 g Glycin, das ein Molekulargewicht von 75 g/mol besitzt, wurde in 500 ml PBS gelöst und mit 1 ml einer 10% Natriumazidlösung versetzt, so dass die Lösung 0,02% Natriumazid enthalten hat. So entstand eine 0,05 M Glycinlösung mit 0,02% Natriumazid. Anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert.

PBS-BSA-Gelatine-Reagenz

2 g Gelatine wurde unter Rühren bei 42°C in 700 ml PBS gelöst, anschließend wurden 5 g BSA langsam unter Rühren innerhalb von einer Stunde bei 38°C zugefügt und mit 1,4 ml einer 10% Natriumazidlösung versetzt, so dass die Lösung zu 0,02% Natriumazid enthalten hat.

PBS-1%BSA-0,01%Natriumazid

1 g BSA wurde auf 100 ml mit PBS aufgegossen und unter ständigem Rühren bei ca. 35°C gelöst. Anschließend wurden 100 µl einer 10 % Natriumazidlösung zugegeben und dann sterilfiltriert.

0,4 % Formaldehydreagenz

1,08 ml einer 37 % Formaldehydlösung wurde auf 100 ml mit PBS aufgegossen und anschließend sterilfiltriert.

Erythrozyten-Lyse-Puffer

Wie von Hamblin et al. 1992 beschrieben, wurden 4,15 g Ammoniumchlorid mit 0,605 g Tris auf 500 ml mit destilliertem Wasser aufgegossen und ein pH von 7,4 eingestellt.

BSS-Puffer

Balanced Salt Solution Mix wurde nach Herstellerangaben des Ficoll aus Stock A und Stock B im Verhältnis 1:10 hergestellt.

Stock A wurde angesetzt mit 0,1% D-Glucose, 5×10^{-5} M $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, $9,8 \times 10^{-4}$ M $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, $5,4 \times 10^{-3}$ M KCl und 0,145 M TRIS in Aqua dest. und einem pH-Wert von 7,6. Stock B war eine Natriumchloridlösung mit 0,14 M NaCl.

MACS-Puffer

0,5 % BSA und 2 mM EDTA wurden in PBS ohne Calcium und Magnesium gelöst und mit einem pH von 7,2 eingestellt, sterilfiltriert und im Ultraschallbad entgast.

TBE-Puffer

TBE-Puffer wurde als Stock in zehnfacher Konzentration angesetzt, pH-Wert 8,35 . Es wurden 54 g (0,89 M) Tris, 27,5 g (0,89 M) Borat und 3,7 g (2 mM) EDTA mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt und für den Gebrauch entsprechend verdünnt.

Mastermix für die PCR

Herstellung von 50 μl Mastermix:

10xPCR-Puffer	5 μl
MgCl_2 25 mM	3 μl
DNTP 10 mM	5 μl
Forward Primer 20 μM	1 μl
Reward Primer 20 μM	1 μl
Taq Polymerase 5 U/ μl	0,25 μl

cDNA bzw. für Kontrolle Aqua dest. je 1 µl
Aqua BiDest. auf 50 µl

3.2 Experimentell untersuchte Zellen

3.2.1 Humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1)

HMEC-1 wurden über das Center of Disease Control and Prevention/National Center for Infectious Disease, Atlanta, Georgia, USA bezogen. Es handelt sich um eine immortalisierte Zelllinie, die 1992 etabliert wurde und seither zu den am besten charakterisierten Endothelzelllinien für in-vitro Untersuchungen gehört (Ades et al., 1992). Sie weist einen diploiden Chromosomensatz auf, wächst zu einem typischen pflastersteinartigen Monolayer und ist kontaktinhibiert. Auch in Medium mit reduziertem Serumanteil bleiben die Eigenschaften der Zelle erhalten.

Nachgewiesen wurde zum Beispiel die Aufnahme von azetyliertem LDL sowie die Zelladhäsion von peripheren Blutzellen auf dieser Zelllinie. Zudem sind die Zellen in der Lage, den von Willebrand Faktor, die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin, den Tissue Faktor, Thrombomodulin, Tissue Plasminogen Aktivator und Plasminogen Aktivator Inhibitor zu synthetisieren. (Bouis et al., 2001; Unger et al., 2002).

3.2.2 Humane monozytäre Zelllinie (THP-1)

THP-1 Zelllinie wurde über ATCC, Rockwell, USA erworben. Die humane promonozytäre Zelllinie THP-1 wurde 1978 in Japan von einem einjährigen Jungen, erkrankt an einer akuten monozytären Leukämie, gewonnen (Tschuchiya et al., 1980).

Die in Suspension wachsenden Zellen sind 12-14 µm im Durchmesser, rund bis polygonal, weisen einen gefalteten Zellkern mit einem gut abgrenzbaren Nukleolus auf. Sie sind zur Phagozytose fähig und besitzen auf ihrer Oberfläche die für Monozyten typischen Fc-Rezeptoren, CD14 Rezeptoren sind induzierbar. Auch nach 8 Monaten in Kultur kann ein diploider Chromosomensatz (46, XY) nachgewiesen werden. Die Monozytenlinie ist etabliert und wird in zahlreichen in-vitro Studien verwendet (darunter auch in Adhäsionsstudien).

3.2.3 Humane periphere Monozyten

Human Monozyten wurden von freiwilligen gesunden Probanden aus dem peripher venösem Blut gewonnen. Es wurde darauf geachtet, dass zum Zeitpunkt der Blutabnahme keine medikamentöse Therapie erfolgte. Die gewonnenen Zellen wurden sofort weiterverarbeitet, so dass eine primäre Zellkultur der Monozyten nicht notwendig war.

3.3 Experimentell untersuchte Peptide und Stimulantien

3.3.1 Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH)

CRH ist ein aus 41 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, das aus einem Prä-Pro-Hormon durch proteolytisches Prozessing entsteht. Es wird in den parvozellulären Neuronen des Nucleus paraventricularis im Hypothalamus gebildet und befindet sich auch im limbischen System und in Hirnarealen, die die Verbindung mit dem sympathischen System herstellen. Es ist ein regulatorisches Peptid der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse und ein wichtiger Bestandteil der Stressantwort.

Die intrazelluläre Signalkaskade, die CRH über seine Rezeptoren auslöst, läuft hauptsächlich über G-Proteine, die über Adenylatcyclase zur cAMP-Erhöhung und dann zur Aktivierung der Phosphokinase A führt. Diese kann über Phosphorylierung von Proteinen die Transkription von Genen beeinflussen. Außerdem ist eine G-Protein-vermittelte Aktivierung eines Phospholipase-C-Wegs bekannt, der wiederum durch Aktivierung der Phosphokinase C die Transkription steuert.

Die Ausschüttung erfolgt durch mindestens zwei Stimuli, wobei der eine stressinduziert und der andere biologischen Rhythmen folgt (Löffler et Petrides, 2000). Intrazerebroventrikuläre Wirkungen von CRH gleichen denen des sympathischen Nervensystems. Steigerung der Herzfrequenz, des Blutdrucks und der Auswurffraktion des Herzens konnten im Tierexperiment gezeigt werden.

Wie oben bereits erwähnt, wird CRH und seine Rezeptoren CRH-R1 und (vor allem) -R2 nicht nur im zentralen Nervensystem sondern auch in der Peripherie gefunden, z.B. in allen vier Herzkammern sowie in der Aorta. Die peripheren Effekte von CRH sind dabei kontrovers. So wurden etwa auf kardiovaskulärer Ebene zum einen eine Vasodilatation mit Reflextachykardie (Lenz et al., 1985) gesehen, zum anderen eine Blutflusssteigerung mit positiv inotropem Effekt (Grunt et al., 1992, 1993) . In vitro bewirkt CRH eine erhöhte endotheliale Sekretion von Endothelin-1, dem stärksten endogenen Vasokonstriktor sowie eine verminderte Freisetzung von endotheliale NO. (Wilbert-Lampen et al., 2006)

Man geht heute davon aus, dass es ein lokales CRH-Rezeptor-Liganden-System im peripheren Gewebe gibt, das in autokriner und parakriner Weise die kardiovaskuläre Stressantwort moduliert.

Darüber hinaus ist CRH ein wichtiger Mediator für die Auslösung einer Akut-Phase-Reaktion und somit ein Bindeglied zwischen Stress und inflammatorischer Antwort (Black, 2002)

3.3.2 Lipopolysaccharid (LPS)

Lipopolysaccharid ist ein Endotoxin, das aus der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien wie *Escherichia coli* gewonnen wird. Es gehört zu der Gruppe der Pyrogene, Stoffe, die schon in geringsten Mengen und innerhalb einer begrenzten Einwirkzeit beim Menschen und bestimmten Versuchstieren eine inflammatorische Reaktion hervorruft und dosisabhängig einen Temperaturanstieg bewirkt (Osborne et al., 1964, Bishop, 2005).

Als LPS-vermittelte Effekte am Monozyten sind zu nennen: Stimulation der Interleukinproduktion (IL-1, IL-6, TNF- α) sowie der Expression der Adhäsionsmoleküle LFA-1, MAC-1, VLA-1 und ICAM-1 (Heinzelmann et al., 2000). Analog dazu findet man am Endothel die Expressionszunahme von Adhäsionsfaktoren wie ICAM-1 und VCAM-1.

LPS führt nicht nur zu einer Induktion der Adhäsionsmolekülexpression im Sinne einer gesteigerten Proteinbiosynthese sondern trägt auch zur schnellen Entleerung von intrazellulären Speichern von Oberflächenmolekülen bei, was beispielhaft an Monozyten und polymorphnukleären Leukozyten an MAC-1 (CD11b/CD18) gezeigt werden konnte. Schon nach wenigen Minuten Stimulationszeit lässt sich ein Zwei- bis Vierfaches an Oberflächenrezeptoren durchflusszytometrisch nachweisen (Heinzelmann et al., 2000).

Wegen des ubiquitären Vorkommens von gram-negativen Bakterien und somit auch von LPS ist eine Testung auf Verunreinigung durch LPS bei allen biologisch-wissenschaftlichen Experimenten von äußerster Wichtigkeit. Hierfür kann man sich eine Eigenschaft von LPS auf *Limulus polyphemus*, dem Pfeilschwanzkrebs zu

Nutze machen, bei dem Endotoxin durch Reaktion mit Amöbozyten eine Gerinnungskaskade auslöst.

3.4 Methoden

3.4.1 Zellkulturen

Die für die Versuche verwendeten Zellkulturen wurden in einem Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂/Luft und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zur Überprüfung der Viabilität der Zellkulturen wurde die Trypanblaufärbung durchgeführt, die anschließende Zellzählung erfolgte in einer Neubauer Zählkammer. Der Anteil der lebenden Zellen wurde zur Gesamtzahl in Relation gesetzt und betrug immer > 90 %.

3.4.1.1 Zellkultur HMEC-1

Die Humane-Mikrovaskuläre-Endothelzelllinie-1 wurde in Anlehnung an Ades et. al. (1992) und Xu et al. (1994) im Nährmedium MCDB 131, ergänzt durch 10% fetales Kälberserum, 10 ng/ml humanes EGF, 1 µg/ml Hydrocortison, 2 mM L-Glutamin, und 2 mg/ml Gentamycin, kultiviert.

Die Zelldichte bei Aussaat betrug je nach verwendeter Zellkulturflasche 5000 bis 10000 Zellen pro Quadratzentimeter Fläche. Für Mikrotiterplatten und Kammer-Objektträger musste zuvor die optimale Zelldichte in Vorversuchen bestimmt werden. Erster Wechsel des Zellkulturmediums wurde nach 24 Std. durchgeführt, Konfluenz erreichte die Kultur am dritten Tag. Zum Splitten der Zellen im Verhältnis 1:5 bzw. 1:10 wurde das Medium abgesaugt und mit Trypsin/EDTA einmal kurz gespült und anschließend mit Trypsin/EDTA für ca. 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Leichtes Klopfen an die Zellkulturflasche beschleunigte den Ablösevorgang. Nach Zugabe von Zellkulturmedium und Zentrifugation für 10 Minuten bei 150 g wurde der

Überstand dekantiert und das Pellet mit Medium resuspendiert. Nach Zellzählung mit Trypanblau-Viabilitätsfärbung wurde ein Teil der Zellen erneut ausgesät, der Rest bei -170°C mit 10 % DMSO tiefgefroren.

Es wurde darauf geachtet, dass nur junge Zellpassagen ab Lieferung für die Versuche benutzt wurden.

3.4.1.2 Zellkultur THP-1

Die promonozytäre Zelllinie THP-1 wurde in RPMI-1640 mit 10 % FCS, 0,05 mM Mercaptoethanol und Penicillin/Streptomycin (100 IE/100 IE pro Milliliter Medium) kultiviert.

Die Zelldichte bei Aussaat in der 75 ccm Zellkulturflasche betrug 500.000 Zellen pro Milliliter Suspension. Am dritten Tag hatte sich die Zellzahl verdoppelt. Nährmedium wurde im Verhältnis 1 : 1 zugegeben. Einmal in der Woche erfolgte eine Zentrifugation (150g, 10 Minuten), der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Nach Zellzählung erfolgte die Aussaat mit optimaler Zelldichte.

3.4.2 Gewinnung primärer Monozyten

3.4.2.1 Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Vollblut wurde von gesunden Spendern mit handelsüblichen EDTA-Röhrchen abgenommen und mit einem gleichen Volumen BSS-Puffer versetzt (Verdünnung 1:1). Im 50 ml Röhrchen wurden vorsichtig 3 Teile verdünntes Blut auf 4 Teile Ficoll-Paque-Plus pipettiert. Nach Zentrifugation für 30 Minuten (Schwingzentrifuge, 18°C, 400 g) wurde die weiße PBMC-Schicht mit einer 5 ml Pipette entnommen und in

einem neuen 50 ml Röhrchen dreimal mit BSS-Puffer gewaschen, um Ficoll-Rückstände zu entfernen. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in MACS-Puffer resuspendiert und mit Trypanblaufärbung in der Neubauerzählkammer die PBMC-Zellzahl bestimmt.

3.4.2.2 Monozytenisolation mit MACS durch Negativselektion

Zur Monozytenisolation aus der mit Ficoll-Paque-Plus gewonnenen PBMC-Fraktion wurde der Monozyten-Isolationskit II, der auf Negativselektion mittels Mikrobeads basiert, nach Herstellerangaben benutzt. Das in MACS-Puffer resuspendierte PBMC-Pellet wurde dabei mit FcR-Blockingreagenz und Biotin-Antikörper-Cocktail für 10 Minuten im Kühlschrank bei 6°C inkubiert, anschließend MACS-Puffer und Anti-Biotin-Mikrobeads zugegeben und weitere 10 Min. im Kühlschrank inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit MACS-Puffer wurde die Zellsuspension über eine Säule gegeben, die an einem Magneten befestigt war. Die an Mikrobeads gekoppelten Zellen haben in der Säule gebunden, sodass allein die CD14 positiven Zellen (entsprechen den Monozyten) eluiert wurden.

3.4.2.3 Durchflusszytometrische Analyse der gewonnenen Zellen (CD 14+)

Zur Überprüfung der Reinheit der Monozytenisolation mittels Mikrobeads wird ein Teil der Zellsuspension mit Anti-CD14-mAb (FITC) gefärbt und mittels FACS-Analyse die Anzahl der CD14-positiven Zellen zur Gesamtzellzahl bestimmt. Isotypkontrollen zu den Antikörpern wurden bei jedem Ansatz angefertigt, zur Viabilitätskontrolle wurde in Vorversuchen eine 7-AAD-Färbung mitgeführt. Nach Durchführung der MACS-

Monozyten-Isolation lagen mehr als 80% CD14 positive Zellen vor, die umgehend der RNA-Gewinnung zugeführt wurden.

3.4.3 CRH-Rezeptornachweis auf THP-1 Zellen

3.4.3.1 RT-PCR zum CRF-R1/2 Nachweis

3.4.3.1.1 Primerdesign (CRF-R1/2)

Es wurden zwei verschiedene Primerpaare verwendet, um die cDNA der CRH-Rezeptoren zu bilden. Für CRH-R1 wurde sense 5' – GGC AGC TAG TGG TTC GGC C – 3' und antisense 5' – TCG CAG GCA CCG GAT GCT C – 3' verwendet. Die Primer für CRH-R2 sind sense 5' – GCT GCT CTT GGA CGG CTG GG – 3' und antisense 5' – CCA GGG CTG CCA CAG ATA CGC – 3'. Entworfen wurden diese Primer mit Hilfe der beim National Center for Biotechnology Information (NCBI) hinterlegten DNA-Sequenzen. Die Genbank Accession Nummern sind NM_004382 und NM_001883.2. Die Primerpaare wurden mit Hilfe des Programms Primer3 anhand der Sequenzen entworfen (Rozen et Skaletzki, 2000). Für jedes Primerpaar wurden optimale Annealingtemperatur, Zykluszahl, Magnesiumkonzentration und Taq-Polymerase-Menge in Vorversuchen ermittelt. Als etablierte Positivkontrollen wurde für CRH-R1 cDNA aus Cerebellum, für CRH-R2 cDNA aus Myokard benutzt.

3.4.3.1.2 RNA Gewinnung mit TRIzol-Reagenz

Ein Zellpellet mit 5 bis 10×10^6 Zellen wird mit 1 ml TRIzol-Reagenz vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform 100% und Vortexen folgen weitere 2 bis 3 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur. Bei 4°C und 14800 g wird der Ansatz 15 Minuten zentrifugiert, die wässrige RNA-haltige

Schicht mit einer Pipette in ein neues Eppendorfgefäß überführt und dann mit 0,5 ml Isopropanol versetzt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine erneute Zentrifugation (10 Min., 4°C, 14800 g), der Überstand wurde dekantiert und mit 1 ml 75% Ethanol durch Schütteln vermischt. Nach Zentrifugation (5 Min., 9000 g, 4°C) wurde der Überstand dekantiert und das Pellet im umgedrehten Eppendorf-Gefäß für 10-15 Min. getrocknet, in 20 µl zweifachdestilliertem und autoklaviertem Wasser gelöst und bei –80°C aufbewahrt.

3.4.3.1.3 Denaturierung der genomischen DNA

Nach der RNA-Isolierung erfolgte eine Entfernung von genomischer DNA aus dem RNA-Gemisch, die nach Herstellerangaben des DNase Kits durchgeführt wurde. Nach Auftauen der RNA auf Eis wurde die optische Dichte bei 260 nm im Photometer bestimmt und damit die Gesamtmenge an Nukleinsäuren (DNA und RNA) mit der Formel $OD_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Gesamtmenge } (\mu\text{g/ml})$ berechnet. Die OD_{280} wurde ebenfalls errechnet und der Quotient OD_{260}/OD_{280} ermittelt. Nach Herstellerangaben wurde das RNA-Gemisch mit DNase 1 Puffer und DNase versetzt, für 30 Minuten bei 37 °C im Heizblock inkubiert, mit der DNase-Inaktivierungs-Reagenz versetzt und das Gemisch für 2 Minuten ruhen gelassen. Nach Zentrifugation wurde im Überstand die reine RNA gewonnen. Zur Kontrolle der DNA-Denaturierung und zur Berechnung des RNA-Gehalts erfolgte eine erneute Bestimmung der optischen Dichte.

3.4.3.1.4 RNA-Kontroll-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der gewonnenen RNA wurde ein Kontrollgel in 1% Agarosegel angefertigt (0,4 g Agarose wurde mit 40 ml TBE-Puffer aufgekocht, mit 0,3 µl Ethidiumbromid 1% versetzt und in eine Gelkammer gegossen). 500 ng RNA wurde mit Bromphenolaufragspuffer und Aqua bidest. versetzt (Endvolumen 10 µl) und mit einem Ladder als Fragmentlängenmarkierung sowie einer Negativkontrolle auf das erkaltete Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte im elektrischen Feld (bei 90 V).

3.4.3.1.5 cDNA Synthese und Polymerasekettenreaktion

Die cDNA Synthese wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase Superscript TM II nach Herstellerangaben durchgeführt. 200 ng Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer wurde dabei mit 4 µg RNA und 1 µl dNTP-Gemisch aller vier Basen (10 mM) versetzt und für 5 Minuten bei 65 °C im PCR-Cycler erhitzt, so dass die Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer an die RNA binden konnten. Anschließend wurden 4 µl First Strand Buffer (5fach), 2 µl DTT (0,1M), 40 U RNase Out Recombinant Ribonuclease Inhibitor und 200 U Superskript hinzugegeben und im PCR-Cycler für 10 Min. bei 25 °C, gefolgt von 60 Min. bei 42 °C cDNA synthetisiert. Die Reaktion wurde bei 70 °C beendet.

Zur Amplifikation wurde die Taq Polymerase verwendet. Nach Herstellung des Mastermixes wurden je 45 µl Mastermix mit 5 µl cDNA oder 5 µl Aqua bidest. als Kontrolle versetzt und im PCR-Cycler nach folgendem Programm amplifiziert:

CRH-R1-Primern: Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten und für 30 Sekunden, Annealing bei 58°C für 30 Sekunden und Polymerisation bei 72°C für 35 Zyklen für je 30 Sekunden. CRH-R2: Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten und für 30 Sekunden, Annealing bei 57°C für 30 Sekunden und Polymerisation bei 72°C für 35 Zyklen für je 30 Sekunden. Die Proben wurden danach bei -20°C tiefgefroren.

3.4.3.1.6 Gelelektrophorese des PCR Produkts

Zur Darstellung des PCR-Produkts erfolgte eine Elektrophorese in einem 1,5% Agarosegel. Das PCR-Produkt wurde mit Elektrophoreseauftragspuffer versetzt (Endvolumen 10 µl) und neben einem Marker zur DNA-Fragmentlängenbestimmung für 50 Basenpaare, einer Negativkontrolle sowie einer Positivkontrolle auf das erkaltete Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte im elektrischen Feld (bei 90 V).

3.4.3.1.7 Sequenzierung des PCR Produkts

Die zu sequenzierende Bande wurde aus dem Gel mit einem sterilen Einmalskalpell ausgeschnitten und die DNA vom Agarosegel mittels Nucleo Spin Extract^R Kit nach Herstellerangaben gereinigt. Die gewonnene DNA wurde anschließend sequenziert, mittels Chromas 1.45 Software als Textdatei exportiert und mit Hilfe des BLAST-Programms des NCBI mit der bekannten Gensequenzen verglichen.

3.4.3.2 Immunfluoreszenztechnik zum CRH-Rezeptornachweis

Als Primärantikörper wurde ein aus Ziege gewonnener anti-humaner CRH-R1-IgG affinitätsgereinigter polyklonaler Antikörper verwendet, wobei der Antikörper an beide CRH-Rezeptortypen (CRH-R1 und R2) bindet. Die optimale Verdünnung des Antikörpers von 1:50 wurde in Vorversuchen ermittelt.

Als Sekundärantikörper wurde ein Maus anti-Ziege Cy3-konjugierter affinitätsgereinigter IgG Antikörper eingesetzt, die optimale Verdünnung von 1:200 wurde ebenfalls in Vorversuchen bestimmt.

Die Zellsuspension wurde zunächst mit PBS Dulbecco gewaschen und anschließend resuspendiert in PBS Dulbecco auf 3,5 Mio. Zellen/ml. Die Immunfluoreszenz-Histologie der Suspensionszellen erfolgte auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern. Jeweils 20 µl der Suspension wurden mit der Pipette auf die Objektträgermitte pipettiert (standardisiertes Quadrat) und durch kreisende Bewegungen verteilt. Nach 10 Minuten waren die Slides unter dem Abzug getrocknet, sodass die Fixierung mit 100% Methanol für 10 Minuten bei -20°C im Tiefkühlschrank durchgeführt werden konnte.

Nach Wässerung der Objektträger erfolgte abwechselnd das Auftragen einer PBS-Glycin und PBS-BSA-Gelatine-Lösung zur Blockade unspezifischer Bindungen für jeweils 20 Minuten. Zur Testung der Antikörperspezifität wurde in einigen Ansätzen das antikörperspezifische Blockierungspeptid zugegeben.

Es wurden jeweils 80 µl der Antikörperverdünnung auf die Slides aufgetragen, die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in einer dunklen feuchten Kammer. Am darauffolgenden Tag wurden die Objektträger dekantiert und zur Entfernung des primären Antikörpers viermal PBS-BSA-Gelatine-Lösung aufgetragen, für 0, 5, 10 und nochmals 10 Minuten inkubiert und im Anschluss mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde in einer dunklen feuchten Kammer inkubiert. Nach 2-maligem Waschen mit Aqua bidest wurde der Objektträger mit Vectashield-DAPI und einem Deckglas eingedeckelt und versiegelt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop innerhalb von 3 Tagen. Dabei wurde zunächst die optimale Belichtungszeit bestimmt und anschließend von allen Ansätzen Bilder mit der gleichen Einstellung angefertigt und digital gespeichert.

3.4.4 Intrazelluläre Fluoreszenzfärbung der Monozyten

Der Zelltracker CMFDA kann die Zellmembran durchdringen und wird als Farbstoff für die intrazelluläre Fluoreszenzfärbung von lebenden Zellen verwendet, wobei die Funktionsfähigkeit der Zellen erhalten bleibt. Eine Fixierung der Zellen unter Erhalt der Fluoreszenzaktivität ist ebenfalls möglich.

Der als Lyophilisat vorliegende Zelltracker wurde von -20°C auf Raumtemperatur erwärmt, mit DMSO gelöst (Endkonzentration 10 mM), aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für die Herstellung der Gebrauchsverdünnung wurden 5 μl der 10 mM Lösung in 1 ml 37°C warmes serumfreies Medium pipetiert, Gebrauchskonzentration 5 μM . Die zu färbenden Monozyten wurden bei 150 g für 10 Minuten zentrifugiert, einmal mit serumfreiem Medium gewaschen, erneut zentrifugiert, mit 1 ml der Zelltrackergebrauchsverdünnung resuspendiert und im Brutschrank 30 Minuten inkubiert bei 37°C , 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchtigkeit.

Nach dem Färbeschritt und Waschen mit serumfreiem Medium und mit PBS wurden die Zellen für weitere 30 Minuten im Brutschrank inkubiert um zu gewährleisten, dass CMFDA intrazellulär sicher an Thiolgruppen binden kann.

3.4.5 Fluoreszenzmikroskopische Adhäsionsbestimmung

Die fluoreszenzmikroskopische Adhäsionsbestimmung erfolgte auf Objektträgern mit einem Plastikaufbau für acht Kammern. Diese ließen sich sowohl am Mikroskop als auch im Fluoreszenzreader auswerten.

HMEC-1 Zellen wurden auf dem Kammerobjektträger mit einer Dichte von 80.000 Zellen pro Well ausgesät, am dritten Tag zeigten die Zellen im Phasenkontrastmikroskop ein konfluentes Monolayer.

Die Stimmulationsversuche mit CRH wurden in Endothelzellmedium mit reduziertem FCS (1%) durchgeföhrt. Eine Umstellung auf das reduzierte Endothelzellmedium geschah eine Stunde vor dem Experiment. Das reduzierte Medium wurde anschließend vorsichtig vom Rand abgesaugt und durch das auf 37°C gebrachte, Stimulanz enthaltende Medium, ersetzt. Das Volumen betrug immer 500 µl pro Well bei Verwendung der Kammerobjektträger.

Monozyten wurden mit CMFDA kurz vor dem Versuch standardisiert gefärbt und in HBSS resuspendiert. Eine Zellzahlbestimmung der Monozytensuspension erfolgt durch achtmaliges Zählen in der Neubauerzählkammer mit Trypanblauvitalitätsfärbung. Nach Ablauf der Stimmulationszeit wurde die Stimmulationslösung abgesaugt, dreimal gewaschen, die Monozytensuspension hinzupipettiert und auf einem Horizontalschüttler bei 50 Umdrehungen pro Minute für 60 Minuten lichtgeschützt bei 37°C inkubiert.

Nach dreimaliger Waschung wurden die Zellen mit 100% Methanol für 10 Minuten bei -20°C fixiert, die aufgesetzte Plastikammer abgelöst und der Objektträger mit Vectashield (DAPI) und Rillenfüller eingedeckelt. Die Objektträger wurden lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt und innerhalb einer Woche am Zeiss Fluoreszenzmikroskop Axiovert mit Hilfe der Axiovision Software ausgewertet.

Dazu wurden unter Phasenkontrast bei 100facher Vergrößerung in jedem Well zufällig fünf Blickfelder des Monolayers digital fotografiert und anschließend im Fluoreszenzlicht die grün leuchtenden Monozyten markiert, gezählt und von jedem Blickfeld eine Phasenkontrastaufnahme und je eine Aufnahme mit Filtern für grün (Monozyten) und blau (Endothelzellkerne) über die eingebaute Digitalkamera gespeichert. Durch eine Dreifachprojektion der Bilder übereinander war es möglich zu unterscheiden, ob ein Monozyt am Endothel gebunden war oder nur auf dem Objektträger haftete.

Die ermittelten Daten wurden über die Ereignisfunktion in Microsoft Excel exportiert und die absolute Zahl der gebundenen Monozyten für jedes Well bestimmt. So war es möglich, mit CRH und LPS stimulierte Ansätze mit der nicht stimulierten Kontrolle in Beziehung zu setzen.

Die Kompatibilität der Kammerobjektträger mit dem Fluoreszenzreader ermöglichte es, einen direkten Vergleich der Ergebnisse beider Methoden anhand eines Versuchsansatzes vorzunehmen.

3.4.6 Fluoreszenzphotometrische Adhäsionsbestimmung

3.4.6.1 Fluorometrische Adhäsionsbestimmung von THP-1 an isoliert stimulierten HMEC-1

3.4.6.1.1 Beschreibung der Methode

In Anlehnung an Mertens et al. (1993) und Saarinen et al. (2000) wurde eine neue, modifizierte fluoreszenzphotometrische Methode zur Bestimmung der Zunahme der Adhäsion von Monozyten am Endothel etabliert.

Die Adhäsionszunahme wurde zunächst an stimulierten Endothelzellen bestimmt, die Monozyten blieben unstimuliert.

Am Tag 1 wurden in einer weißen 96-Well-Mikrotiterplatte HMEC-1 Zellen mit einer Zelldichte von 16.000 pro Well in 100 µl Wachstumsmedium ausgesät und im Brutschrank inkubiert bei 37°C, 5 % CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit. Als Kontrolle wurden zudem mehrere Ansätze auf einer transparenten 96-Well-Mikrotiterplatte mitgeführt um die Konfluenz und Intaktheit des Monolayers nach jedem Arbeitsschritt am Phasenkontrastmikroskop kontrollieren zu können.

Am Tag 2 erfolgte ein Mediumwechsel, wobei das Medium mit einer Pasteurpipette (bei leichter Kippung der Platte) vorsichtig am Rand abgesaugt wurde um das Endothel nicht zu berühren.

Am Tag 4 zeigte sich eine vollständige Konfluenz der Endothelzellen, sodass am selben Tag der Adhäsionsversuch stattfinden konnte. Hierbei wurden die Endothelzellen vor Versuchsbeginn zweimal mit dem Versuchsmedium (MCDB mit 1% FCS) gewaschen und 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurde 100 µl eines mit Stimulantien versetzten Mediums auf die Endothelzellen gegeben und für die beobachteten Zeitintervalle inkubiert.

Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Endothelzellen gewaschen mit 1% FCS und HBSS. Pro Well wurde anschließend 100 µl HBSS pipettiert und eine Leerwertmessung im Fluoreszenzreader (Wellenlängen für Exzitation von 485 nm und Emmision von 535 nm) vorgenommen. Bei jeder Messung wurden 4 leere Wells und 4 Wells mit 2 nM Fluoreszein-HBSS als Bezugsgrößen mitgeführt, um eine Messung mit optimalem Verstärkungsfaktor zu ermöglichen.

Nach der Leerwertmessung wurden 100 µl der Monozytensuspension, entsprechend 10^4 Zellen/Well zu den Endothelzellen pipettiert und bei 37°C für eine Stunde im Horizontalschüttler (Frequenz 50/Min.) bewegt, um eine gleichmäßige Verteilung der Monozyten zu gewährleisten.

Nach Ablauf der Kontaktzeit erfolgt die zweite Messung im Fluoreszenzreader. Die ermittelten relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) entsprachen der totalen Fluoreszenz der adhärennten und nichtadhärennten Monozyten.

Die nichtadhärennten Monozyten wurden vorsichtig mit einer Pasteurpipette bei leichter Kippung über den Rand abgesaugt, gewaschen, mit 100 µl HBSS versetzt und erneut im Fluoreszenzreader gemessen (Exzitation 485 nm, Emmision 535 nm).

Die so ermittelte Fluoreszenz korrelierte mit der am Endothel haftenden Monozytenanzahl.

Die Daten werden über das Computerprogramm XFluor4 ausgegeben und mit dem Microsoft Excel Computerprogramm ausgewertet.

3.4.6.1.2 Darstellung der Messergebnisse

Die Adhäsionszunahme wird quantifiziert durch Ermittlung der prozentualen Relation der Fluoreszenzintensitäten der adhärennten Zellen im Vergleich zu der Gesamtzahl der Monozyten.

$$\frac{\frac{\text{RFU (X)}}{\text{RFU (F}_X\text{)}}}{\frac{\text{RFU (T)}}{\text{RFU (F}_T\text{)}}} \cdot \frac{\text{RFU (L)}}{\text{RFU (F}_L\text{)}} \times 100 \quad \left[\begin{array}{c} \text{ } \\ \% \\ \text{ } \end{array} \right]$$

L : Fluoreszenz des Leerwertes (vor Monozytenzugabe)

T : totale Fluoreszenz nach Zugabe aller Monozyten

X : Fluoreszenz der adhärennten Monozyten

F : Fluoreszeinbezug in der jeweiliger Messung

RFU : relative Fluoreszenzeinheit

Abb. 3: Berechnung der prozentualen monozytären Adhäsion am Endothel

3.4.6.2 Fluorometrische Adhäsionsbestimmung von THP-1 an HMEC-1 bei Ko-Stimulation beider Zelltypen

3.4.6.2.1 Beschreibung der Methode

Die oben beschriebene fluoreszenzphotometrische Methode zur Adhäsionsbestimmung wurde für die Ko-Stimulation modifiziert.

Die Vorbereitung der Endothelzellen bis zum Tag 4 wurde analog der oben aufgeführten Methode durchgeführt.

Die Monozyten wurden mit den Stimulantien versetzt und auf die nicht-stimulierten Endothelzellen pipettiert. Während der Stimulationszeit waren die Zellkulturplatten vor Licht geschützt im Brutschrank und auf einem kleinen Kippschüttler, Neigungswinkel 7°, Frequenz 25 pro Minute bewegt, um eine gleichmäßige Verteilung der Monozyten zu gewährleisten.

Nach Ablauf der Stimulationszeit erfolgt die Messung im Fluoreszenzreader (Exzitation 485 nm, Emmision 535 nm). Die ermittelten relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) entsprachen der totalen Fluoreszenz der adhärenen und nichtadhärenen Monozyten. Anschließend wurden die nichtadhärenen Monozyten vorsichtig mit einer Pasteurpipette bei leichter Kippung über den Rand abgesaugt, gewaschen und der Ansatz erneut im Fluoreszenzreader gemessen (Exzitation 485 nm, Emmision 535 nm), die so ermittelte Fluoreszenz korrelierte mit der am Endothel haftenden Monozytenanzahl.

Die Daten wurden, wie oben bereits beschrieben, computertechnisch ausgewertet.

Um eine eventuelle Ablösung des Monolayers zu erfassen wurde zusätzlich zur mikroskopischen Kontrolle der mitgeführten transparenten Platte ein Proteinassay durchgeführt. Wells in denen die Gesamtproteinmenge signifikant vom Mittelwert abwichen, wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen.

3.4.6.2.2 Darstellung der Messergebnisse

Die Adhäsionszunahme der Monozyten am Endothel erfolgte analog der oben beschriebenen Methode.

3.4.7 Quantitative MAC-1/CD11b Bestimmung auf primären humanen Monozyten

Heparinisiertes Vollblut (900 µl pro Ansatz) von freiwilligen, gesunden Spendern wurde in einer 12-Well-Platte für maximal 15 Minuten mit einer Stimulanz (CRH, LPS) oder PBS-Puffer (100 µl) im Brutschrank inkubiert. Nach einer Methode von Hamblin et al. (1992) wurden anschließend die Erythrozyten lysiert. Die gewonnene PBMC-Fraktion wurde mittels FACS-Analyse nach Herstellerangaben für 20 Minuten mit Anti-CD14-mAb (FITC) und anti-CD11b-mAb (PE) bei Dunkelheit inkubiert. Isotypkontrollen zu den Antikörpern wurden bei jedem Ansatz mitgeführt.

Es wurde die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) des PE Kanals in Bezug zur nicht stimulierten Kontrolle gemessen, die Zellsuspension gated und von den so erfassten Monozyten 10.000 Ereignisse pro Ansatz gezählt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität im zweiten Fluoreszenzkanal (PE für CD11b) von allen Monozyten, die doppelt positiv für CD14 und CD11b waren. Eine Negativkontrolle (gleiches Volumen an PBS anstatt der Stimulantien) wurde in jedem Ansatz mitgeführt und als Bezugswert verwendet. Als etablierte Positivkontrolle diente eine mit fMLP (in einer Konzentration von 10^{-9} M) stimulierte Probe (Miller et al., 1987).

3.4.8 Durchflusszytometrie von ICAM-1/CD54 und VCAM-1/CD106 an HMEC-1

HMEC-1 wurden in einer Dichte von 100.000 Zellen pro Milliliter in sechs Zellkulturschalen angesetzt und bis zur Konfluenz des Monolayers in 10% FCS enthaltenem MCDB-Zellkulturmedium gezüchtet. Zur Stimulation der Zellen wurde CRH in Konzentrationen von 10^{-5} M und 10^{-6} M oder LPS (1 µg/ml) in 1% FCS enthaltendem reduzierten MCDB-Zellkulturmedium gegeben und die Zellen für 6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Endothelzellmonolayer vorsichtig mit einem dafür vorgesehenen Zellschaber abgelöst, in PBS resuspendiert und mit 3,7% Formaldehyd in PBS für 30 Minuten auf Eis fixiert. Nach 2-maligem Waschen mit 1% BSA enthaltendem PBS wurden je 100.000 Zellen mit 5 µl IgG1 anti-CD54-PE-mAb und 7,5 µl IgG2a anti-CD106-FITC-mAb oder den entsprechenden Isotypkontrollen, IgG1-PE und IgG2a-FITC, für 45 Minuten versetzt und im Anschluß mittels Durchflusszytometrie die homogene Zellpopulation in Forward- und Sidewardscatter gemessen. Es wurden jeweils 10.000 Zellen mittels Zweifarbentechnik nach Kompensation der Fluorochromsignale zueinander analysiert. Bestimmt wurde die Anzahl von positiven Zellen für ICAM-1/CD54 im Fluoreszenzkanal für PE und für VCAM-1/CD106 im Kanal für FITC im Verhältnis zur Gesamtzahl analysierter Zellen pro Ansatz.

3.4.9 Qualitätskontrollen

3.4.9.1 Mykoplasmandetektion auf RT-PCR Basis

Ein Screening von Zellkulturen ist eine unabdingbare Qualitätskontrolle bei der Arbeit mit Zelllinien (Uphoff et Drexler, 2005). Die hier verwendeten Zellkulturen wurden daher regelmäßig auf Kontamination mit Mykoplasmen überprüft. Diese intrazellulären Erreger, die lichtmikroskopisch nicht erkennbar sind, sind in der Lage,

Veränderungen von Stoffwechselprozessen innerhalb eines biologischen Systems herbei zu führen, die zu artifiziellen Veränderungen der beschriebenen Untersuchungen führen können.

Der verwendete Mykoplasmandetektionskit beruht auf der RT-PCR und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.4.9.2 Endotoxinnachweis

Der etablierte LAL-Test (Scheer et al., 1984) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt um die hier verwendeten Zellkulturnährmedien in regelmäßigen Abständen auf Endotoxin zu testen.

3.4.9.3 Proteinbestimmung

Nach fluorometrischer Bestimmung der Adhäsion wurde im Anschluss die Gesamtproteinmenge pro Well mittels PIERCE-BCA-Protein-Assay bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

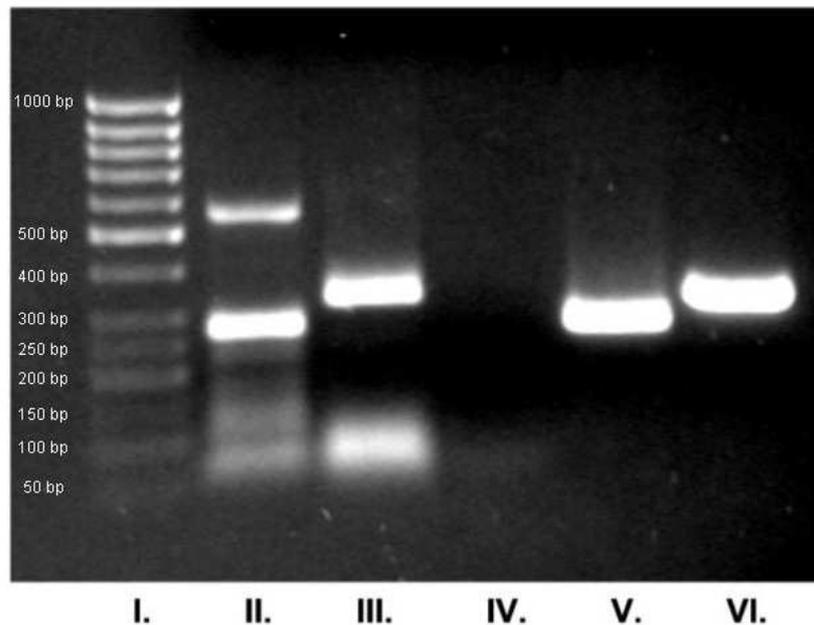
4 Ergebnisse

4.1 Zellkultur: Qualitätskontrollen

Zellkulturbedingungen wurden standardmäßig überwacht mittels Phasenkontrastmikroskopie, Trypanblau-Viabilitätsprüfung sowie Zellzählungen. Daneben wurden regelmäßig Mykoplasmen- und Endotoxintests durchgeführt. Alle durchgeführten Untersuchungen waren stets negativ.

4.2 CRH-Rezeptor-Nachweis mittels RT-PCR auf THP-1 Zellen

Der Nachweis beider CRH-Rezeptorsubtypen R1- und R2 konnte mittels PCR-Analyse erbracht werden. Als Positivkontrolle für den Subtyp R1 wurde Cerebellum, für den Subtyp R2 humanes Myokard verwendet.



- I. 50-Basenpaar-Längenmarkierung
- II. Positivkontrolle CRH-R1(humanes Cerebellum)
- III. Positivkontrolle CRH-R2 (humanes Myokard)
- IV. Negativkontrolle
- V. Nachweis von CRH-R1 auf THP-1 Zellen
- VI. Nachweis von CRH-R2 auf THP-1 Zellen

Abb. 4: PCR-Elektrophorese für CRH-R1/2 auf THP-1 Zellen

Legt man die jeweilige Positivkontrolle zu Grunde ist erkennbar, dass sowohl das Primerpaar für CRH-R1 als auch das Primerpaar für CRH-R2 das erwartete PCR-Produkt mit den Größen um 270 Basenpaare für CRH-R1 und 310 Basenpaare für CRH-R2 aus THP-1 gebunden hat. Die Negativkontrolle war negativ.

Mit Bande V. und VI. wird hier erstmals auf RNA-Ebene der Nachweis der CRH-Rezeptoren, Subtyp R1 und R2, auf THP-1 Zellen geführt. Nach Sequenzierung aller

hier gezeigten Banden konnten auch in der Wiederholung des Versuchs die gesuchten Sequenzen für CRH-R1 und CRH-R2 im Vergleich mit den von uns zu Grunde gelegten Referenzsequenzen (NM_004382 und NM_001883.2) wiedergefunden werden.

Obere Zeile: Referenzsequenz NM_004382, Primer:grün
Mittlere Zeile: Sequenzierung für CRHR1 Forwardprimer
Untere Zeile: Sequenzierung für CRHR1 Rewardprimer

```

361 cgcacccgtg gacctcattg gcacctgctg gccccgcagc cctgcggggc agctagtggg
                                1_ TGGCAGCTAGTGGTTTGGCAGC 23_AGTGGT

421 tcggccctgc cctgcctttt tctatgggtg ccgctacaat accacaaaca atggctaccg
    1_ GC CCTGCCTTTT TCTATGGTGT CCGCTACAAT ACCACAAACA ATGGCTACCG
    TCGGCCCTGC CCTGCCTTTT TCTATGGTGT CCGCTACAAT ACCACAAACA ATGGCTACCG

481 ggagtgccctg gccaatggca gctgggcccgc ccgctggaat tactccgagt gccaggagat
    GGAGTGCCTG GCCAATGGCA GCTGGGCCGC CCGCTGAAT TACTCCGAGT GCCAGGAGAT
    GGAGTGCCTG GCCAATGGCA GCTGGGCCGC CCGCTGAAT TACTCCGAGT GCCAGGAGAT

541 cctcaatgag gagaaaaaaaa gcaaggtgca ctaccatgtc gcagtcatca tcaactacct
    CCTCAATGAG GAGAAAAAAAA GCAAGGTGCA CTACCATGTC GCAGTCATCA TCAACTACCT
    CCTCAATGAG GAGAAAAAAAA GCAAGGTGCA CTACCATGTC GCAGTCATCA TCAACTACCT

601 gggccactgt atctccctgg tggccctcct ggtggccttt gtcctctttc tgccgctcag
    GGGCCACTGT ATCTCCCTGG TGGCCCTCCT GGTGGCCTTT GTCCTCTTTC TGCCGCTCAG
    GGGCCACTGT ATCTCCCTGG TGGCCCTCCT GGTGGCCTTT GTCCTCTTTC TGCCGCT_265

661 gagcatccgg tgctgcgaa acatcatcca ctggaacctc atctccgct tcacccctgcg
    GAGCATCCGG TGCCTGCgA tCCGGTGCCTGCGA _ 265

```

Abb. 5: CRH-R1 Referenzsequenz NM_004382 versus Produktsequenz aus THP

Obere Zeile: Referenzsequenz NM_001883.2, Primer: orange
 Mittlere Zeile: Sequenzierung für CRHR2 Forwardprimer
 Untere Zeile: Sequenzierung für CRHR2 Rewardprimer

```

61 gagctgctct tggacggctg ggggccaccc ctggaccccg agggtcccta ctcctactgc
    1_ CCCCgga - GGTCCCTA CTCCTACTGC
1_T-GCTGCTCT TGGACGGCTG GGGGCCACCC CTGGACCCCG AGGGTCCCTA CTCCTACTGC

121 aacacgacct tggaccagat cggaacgtgc tggccccgca gcgctgccgg agccctcgtg
    AACACGACCT TGGACCAGAT CGGAACGTGC TGGCCCCGCA GCGCTGCCGG AGCCCTCGTG
    AACACGACCT TGGACCAGAT CGGAACGTGC TGGCCCCGCA GCGCTGCCGG AGCCCTCGTG

181 gagaggccgt gccccgagta cttcaacggc gtcaagtaca acacgaccgg gaatgcctat
    GAGAGGCCGT GCCCCGAGTA CTTCAACGGC GTCAAGTACA ACACGACCCG GAATGCCTAT
    GAGAGGCCGT GCCCCGAGTA CTTCAACGGC GTCAAGTACA ACACGACCCG GAATGCCTAT

241 cgagaatgct tggagaatgg gacgtgggcc tcaaagatca actactcaca gtgtgagccc
    CGAGAATGCT TGGAGAATGG GACGTGGGCC TCAAAGATCA ACTACTCACA GTGTGAGCCC
    CGAGAATGCT TGGAGAATGG GACGTGGGCC TCAAAGATCA ACTACTCACA GTGTGAGCCC

301 attttggatg acaagcagag gaagtatgac ctgcactacc gcatcgccct tgtcgtcaac
    ATTTTGGATG ACAAGCAGAG GAAGTATGAC CTGCCTACC GCATCGCCCT TGTCGTCAAC
    ATTTTGGATG ACAAGCAGAG GAAGTATGAC CTGCCTACC GCATCGCCCT TGTCGTCAAC

361 tacctgggcc actgcgatc tgtggcagcc ctgg | tggccg ccttcctgct tttcctggcc
    TACCTGGGCC ACTGCGTATC TGTGGCAGCC CTGG _299
    TACCTGGGCC AC _311
  
```

Abb. 6: CRH-R2 Referenzsequenz NM_001883.2 versus Produktsequenz aus THP

4.3 CRH-Rezeptor-Nachweis mittels Immunfluoreszenz auf THP-1 Zellen

Mittels indirekter Immunfluoreszenz-Histologie gelang auch der fluoreszenz-mikroskopische Nachweis der CRH-Rezeptoren auf der Oberfläche der THP-1 Zellen. Mit Hilfe von Konzentrationsreihen des primären und sekundären Antikörpers wurden die optimalen Verdünnungen ermittelt. Das beste Ergebnis zeigte sich bei der Verdünnung 1:50 für den primären und 1:200 für den sekundären Antikörper.

Die Spezifität des primären Antikörpers wurde überprüft durch Zugabe von Blockierungspeptid des Primärantikörpers im Verhältnis 1:10, welches eine deutlich verminderte Bindung an den THP-1 Zellen induzierte. Bei jedem Versuch wurde eine

Probe ohne Primärantikörper mitgeführt um unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers auszuschließen. Eine Autofluoreszenz der Zellen, wie sie zum Beispiel bei Fixierung mit Glutaraldehyd 4% auftrat, nicht jedoch bei Fixierung mit Methanol, wurde durch das Mitführen einer Probe ohne Antikörperzusatz kontrolliert. Außerdem wurde eine Probe ohne Sekundärantikörper angefertigt, die ebenfalls kein Fluoreszenzmuster bewirkte.

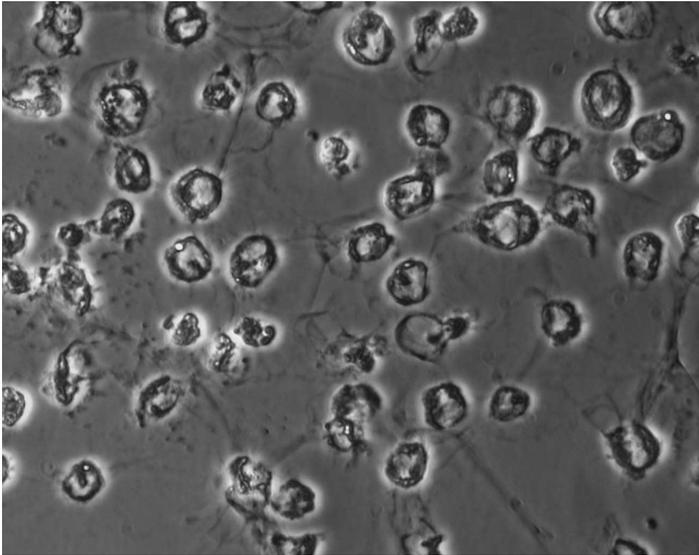


Abb. 7 a:
Primäre Monozyten,
Phasenkontrastbild
(200fach)

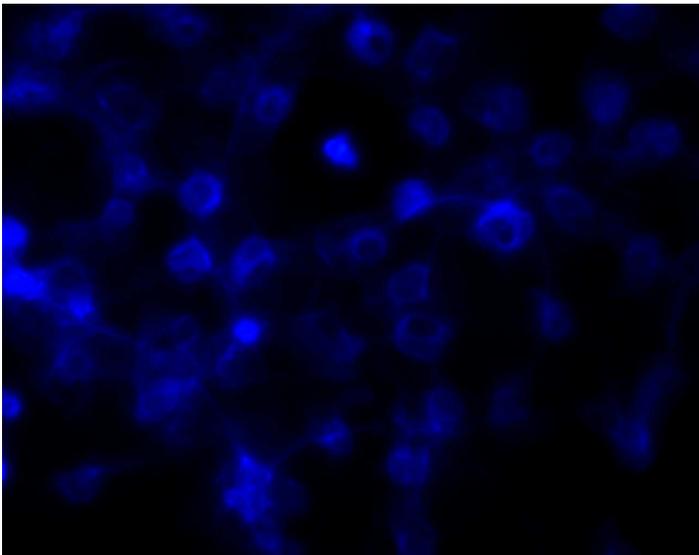


Abb. 7 b:
Primäre Monozyten,
Immunfluoreszenz,
Darstellung Zellkern-DNA
(DAPI, blau, 200fach)

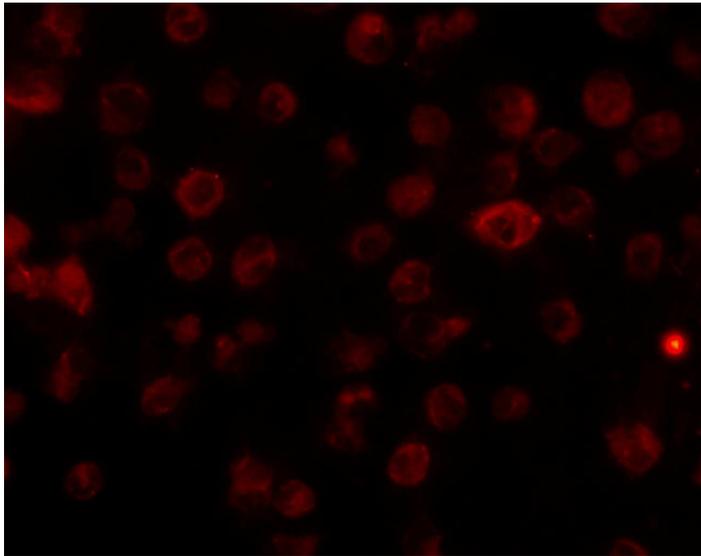


Abb. 7 c:
Primäre Monozyten,
Immunfluoreszenz,
Darstellung der CRH-
Rezeptorsubtypen R1 / R2
(Cy3, rot)

Abb. 7 a-c: Immunfluoreszenz-Nachweis von CRH-R1/2 auf primären Monozyten

4.4 Entwicklung einer fluoreszenzphotometrischen Methode zur Adhäsionsbestimmung

Mit dem Ziel, eine leicht durchführbare, genaue und untersucherunabhängige Methode zur Bestimmung des Adhäsionsverhaltens von Suspensionszellen an konfluentem Monolayer zu etablieren, wurde zunächst die Methode der mikroskopischen Auszählung etabliert. In einem in-vitro Ansatz mit THP-1 und HMEC-1 erfolgte eine Stimulation der Endothelzellen mit LPS in Kammerobjektträgern und im Folgenden die mikroskopische Auszählung in Korrelation mit der neuen fluoreszenzphotometrischen Methode gesetzt.

4.4.1 Fluoreszenzmikroskopische Adhäsionsbestimmung von THP-1 Zellen an mit LPS stimulierten HMEC-1

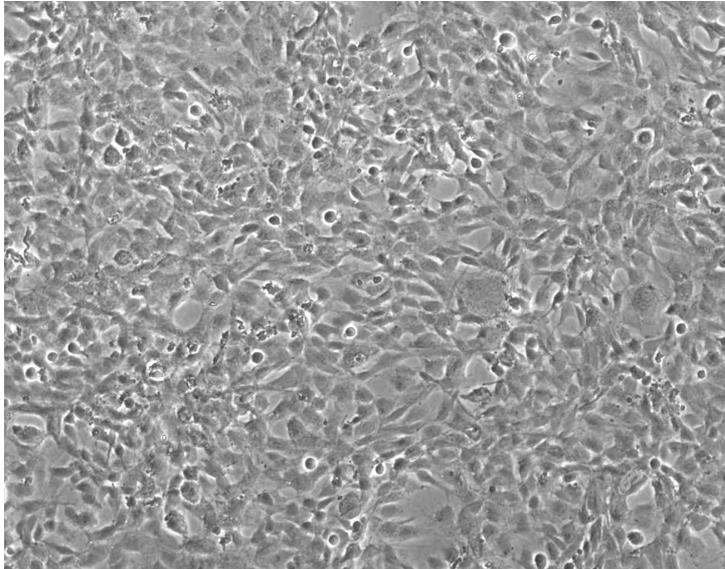


Abb. 8:
Adhärente THP-1 auf HMEC-1
Monolayer (Phasenkontrast)

HMEC-1 Monolayer (Phasenkontrast)

Es wurden von jedem Blickfeld sowohl phasenkontrast- als auch immunfluoreszenzmikroskopische Bilder angefertigt und gespeichert, die Auswertung erfolgte mittels Auszählung. Jede grünfluoreszierende Zelle (Monozyten), die auf einem intakten Monolayer (Endothelzelle) zu finden war, wurde markiert und gezählt. Die Ergebnisse wurden zur Etablierung der fluorometrischen Adhäsionsbestimmungsmethode verwendet.

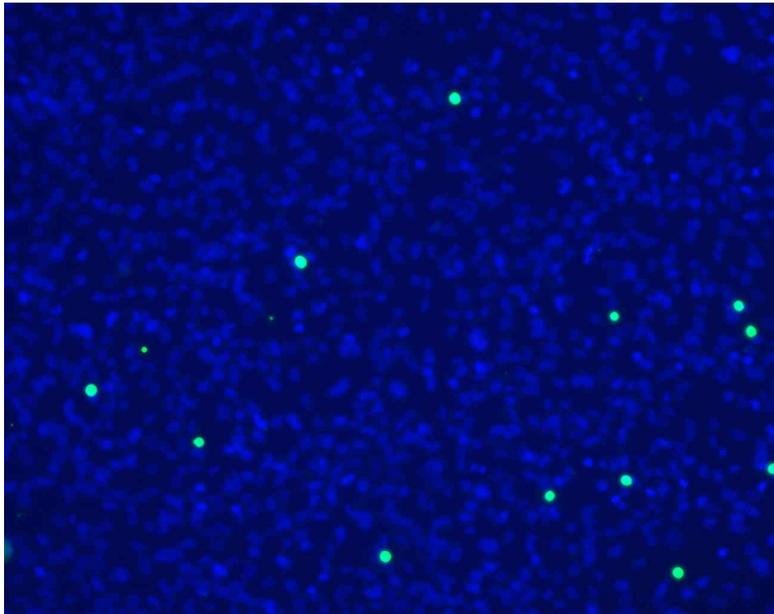


Abb. 9 a:
Unstimulierte HMEC-1

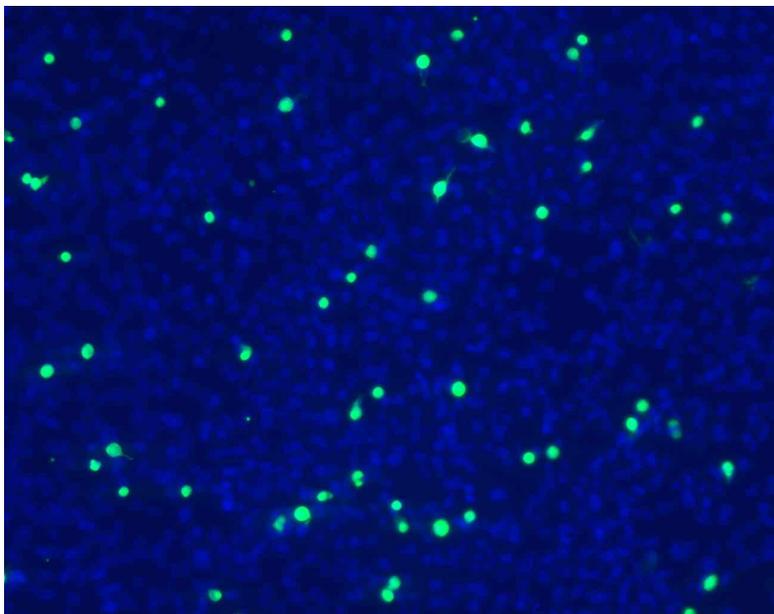


Abb. 9 b:
LPS-stimulierte HMEC-1

Abb. 9 a,b: LPS induzierte Adhäsionszunahme der THP-1 an HMEC-1.

Fluoreszenzmikroskopisches Bild (100fach) in Doublelayer-Technik (100fach).
Solitär mit DAPI (blau) gefärbte Zellkern DNA und FITC markiertes Zytoplasma
der THP-1 Zellen

4.4.2 Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen für eine fluoreszenz-photometrische Adhäsionsbestimmung

Zur Etablierung des fluorometrischen Adhäsionsassays wurden zunächst die Fluoreszenzintensität, die Zellzahl und das Volumen pro Well sowie die Autofluoreszenz der Materialien ermittelt.

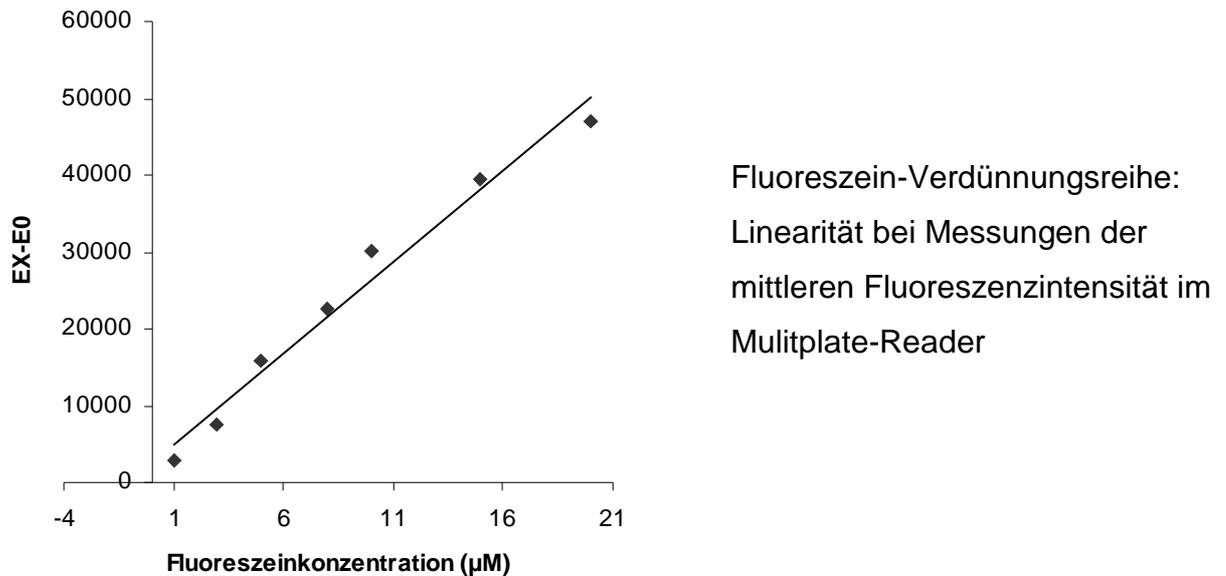


Abb. 10: Linearität der Fluoreszenz im Multiplaterader (ohne THP-1)

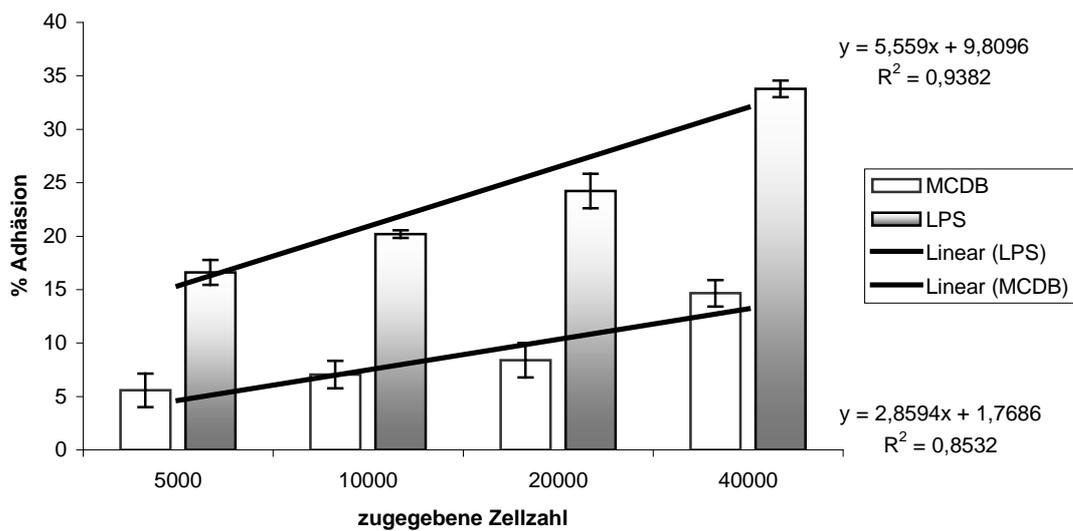


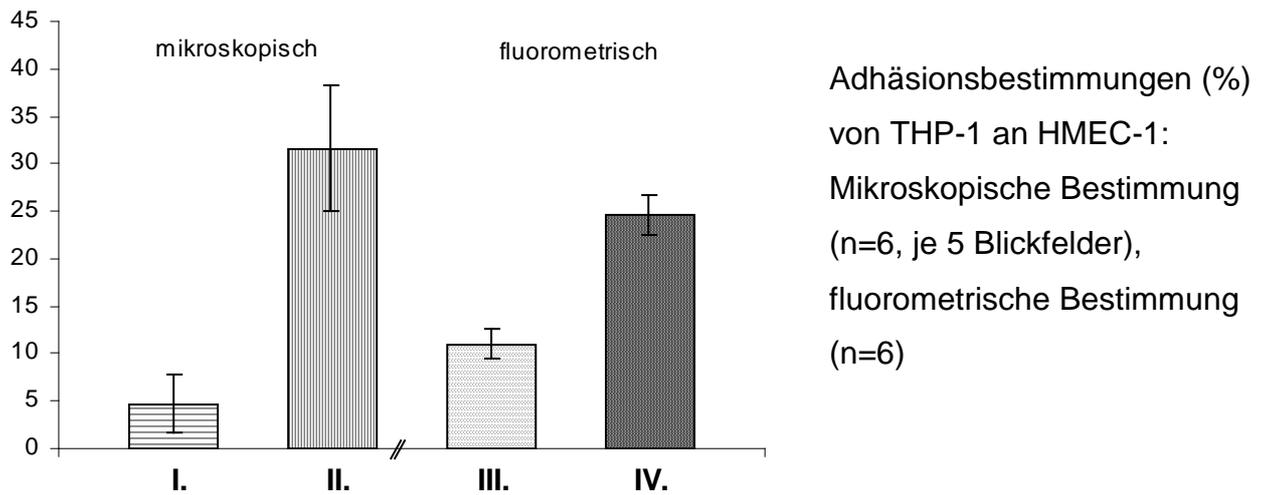
Abb. 11: Linearität der Fluoreszenz (mit THP-1 Zellen, n=5)

Das Säulendiagramm (Abb. 11) veranschaulicht die Linearität der Adhäsionsbestimmungen bei der jeweiligen THP-1 Verdünnungsstufe. Die Ergebnisse zeigen bei 10.000 Zellen / Well die geringste Standardabweichung.

4.4.3 Vergleich der Methoden am Beispiel LPS-stimulierter HMEC-1 und THP-1 Zellen

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse aus sechs unabhängigen Versuchen. Als Kontrolle diente eine unstimulierte Zelle, deren Adhäsionsverhalten mit LPS-stimulierten (1 µg/ml) Endothelzellen, verglichen wurde. Nach dem Zufallsprinzip wurden fünf Blickfelder ausgewählt, gezählt und davon der Mittelwert gebildet.

Die erstellten Bilder wurden mittels Axiovision Software gespeichert. Die adhärenenten Monozyten wurden dann mit einem Cursor als „Ereignis“ markiert und im Folgenden in einer Tabellenkalkulationsdatei als Koordinaten und absolute Anzahl dokumentiert. Für die fluorometrische Methode bestimmten wir die Fluoreszenzintensität der Kammerobjektträger während der Versuchsdurchführung im Multiplaterreader. Dabei wurde ein Leerwert, ein Wert nach Zugabe aller fluoreszierenden THP-1 Zellen und ein Wert nach Abwaschen nicht-adhärenenten Zellen gespeichert. Die Datenausgabe erfolgte mit der Software XFluor 4.



- I. Unstimuliert - mikroskopische Adhäsionsbestimmung
- II. LPS (1 µg/ml) – mikroskopische Adhäsionsbestimmung
- III. Unstimuliert – fluorometrische Adhäsionsbestimmung
- IV. LPS (1 µg/ml) – fluorometrische Adhäsionsbestimmung

Abb. 12: Vergleich mikroskopische und fluorometrischen Adhäsionsbestimmung

Im Säulendiagramm sind die Ergebnisse der mikroskopischen Auszählung mit der Auswertung im Fluoreszenzreader gegenübergestellt. Die y-Achse gibt die Mittelwerte der Monozytenzählung pro Blickfeld bzw. die prozentuale Adhäsion der fluorometrischen Messung wieder. Die mikroskopische Auszählung wies eine größere Standardabweichung auf als die fluorometrische Methode (3,0 und 6,6 gegenüber 1,5 und 2,0). Außerdem war die Intra- und Interassay-Variabilität bei der mikroskopischen Methode wesentlich höher als im Vergleich zum fluorometrischen Ansatz. Die Quotienten der Ergebnisse aus Verum gegen Kontrolle waren bei der mikroskopischen Methode sehr viel höher (ratio to control, Mittelwerte 8,72 gegenüber 2,28).

4.4.4 Intra- und Interassay Kontrollen der fluorometrischen und mikroskopischen Adhäsionsmeßmethode

Um die statistische Zuverlässigkeit beider Methoden zu untersuchen, wurden die Variationskoeffizienten als Maß für die Streuung der Ergebnisse nach folgender Formel berechnet: Variationskoeffizient (%) = (Standardabweichung x 100) / Mittelwert.

Intraassay-Kontrolle	Mikroskopische Methode (je 5 Blickfelder gezählt)	Fluorometrische Methode (je 5 Wells gemessen)
1	8,67	2,33
2	5,05	2,00
3	4,02	2,89
Mittelwert	5,91	2,41
Standardabweichung	2,44	0,45
Variationskoeffizient	41,3	18,69

Tab. 1: Intraassay-Kontrollen der mikroskopischen und fluorometrischen Adhäsionsbestimmung

Interassay-Kontrolle	Mikroskopische Methode (je 5 Blickfelder gezählt)	Fluorometrische Methode (je 5 Wells gemessen)
1.	5,91	2,41
2.	11,53	2,15
Mittelwert	8,72	2,28
Standardabweichung	3,97	0,18
Variationskoeffizient	45,57	8,06

Tab. 2: Interassay-Kontrollen der mikroskopischen und fluorometrischen Adhäsionsbestimmung

Im Vergleich zur mikroskopischen Auszählung bot die fluorometrische Methode eine gute Präzision mit niedrigen Variationskoeffizienten. Dabei waren die Werte für Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten deutlich niedriger als bei der mikroskopischen Auszählung.

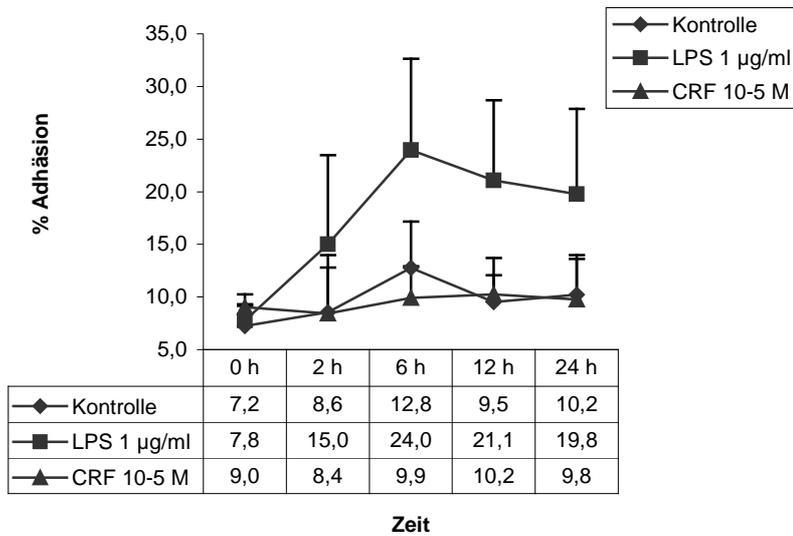
4.5 Adhäsion von THP-1 an CRH-stimulierten HMEC-1

Mittels fluorometrischer Adhäsionsbestimmung wurde der Einfluss von CRH auf HMEC-1 hinsichtlich des Adhäsionsverhaltens von THP-1 Zellen untersucht. Die HMEC-1 wurden mit CRH (10^{-5} M) bzw. LPS (1 µg/ml) stimuliert (0 bis 24 Stunden) und nach Ablauf der Stimulationszeit für eine Stunde mit CMFDA markierten, unstimulierten THP-1 Zellen inkubiert. Die Adhäsion wurde mit einer nicht-stimulierten Kontrolle verglichen.

Die mit LPS-stimulierten Zellen zeigten eine Verdreifachung der Adhäsion innerhalb der ersten 6 Stunden auf mit einem Mittelwert von 24,0 % als Maximum. Eine Verlängerung der Stimulationszeit brachte keine weitere Zunahme der Adhäsion, es zeigte sich hingegen bei 12 und 24 Stunden eine Abnahme der Adhäsion auf 21,1 und 19,8%.

Die nicht stimulierte Kontrolle wies eine unspezifische Adhäsionszunahme mit einem Maximum von 12,8 % bei 6 Stunden auf. Auch hier wurden, analog der LPS-Stimulation, in der 12. und 24. Stunde niedrigere Werte mit 9,5 und 10,2 % dokumentiert.

Unter CRH-Stimulation wurde das Maximum der Adhäsion bei 12 Stunden erreicht (10,2 %) und reduzierte sich auf 9,8 % nach 24 Stunden, beide Zunahmen waren aber nicht signifikant zur Stunde 0 (9.0%).



Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Versuchen mit 3 Ansätzen pro Zeit und Stimulanz. Mann-Whitney-U-Test

Abb. 13: Zeitkinetik der Adhäsion von THP-1 an stimulierten HMEC-1

4.6 Adhäsion von THP-1 an HMEC-1 nach Ko-Stimulation beider Zelltypen mit CRH

Mittels fluorometrischer Adhäsionsbestimmung wurde der Einfluss von CRH auf HMEC-1 und THP-1 (Ko-Stimulation) hinsichtlich des Adhäsionsverhaltens von THP-1 Zellen untersucht.

Die HMEC-1 und CMFDA markierten THP-1 wurden simultan mit CRH (10^{-5} M, 10^{-6} M) bzw. LPS (1 µg/ml) stimuliert (3, 6 und 10 Stunden), die Adhäsionsbestimmung erfolgte mit einer nicht-stimulierten Kontrolle.

Die Kontrolle sowie die mit LPS stimulierte Ko-Kultur zeigten einen ähnlichen Verlauf wie im oben beschriebenen Versuch der isolierten HMEC-1 Simulation. Das

Maximum der Kostimulation lag für LPS bei 22,0% (Zeitpunkt 6 Stunden) mit einer Standardabweichung von 2,0%, der Wert war signifikant zur unstimulierten Kontrolle. Bei 10 stündiger Stimulation zeigte sich eine signifikante Adhäsionszunahme gegenüber der Kontrolle (12,8% gegenüber 6,5%), der Maximalwert war allerdings unterschritten.

Nach 6 stündiger Ko-Stimulation mit CRH (10^{-5} M) konnte eine signifikante Zunahme der Adhäsion von THP-1 an HMEC-1 gegenüber der Kontrolle (17,8% versus 12,7%, Signifikanzniveau $p < 0,01$, Standardabweichung 3,1%) gesehen werden. Die Adhäsionszunahme nach 3 Stunden Inkubationszeit war ebenfalls signifikant (9,03 versus 5,35%, Standardabweichung 2,3%), wohingegen keine Zunahme nach 10 Stunden Inkubation gemessen werden konnte.

CRH in der Konzentration von 10^{-6} M bewirkte bei 6 Stunden eine signifikante Adhäsions-zunahme (15,2 % versus 12,7%), wogegen es bei 3 und 10 Stunden zu keiner signifikanten Zunahme kam.

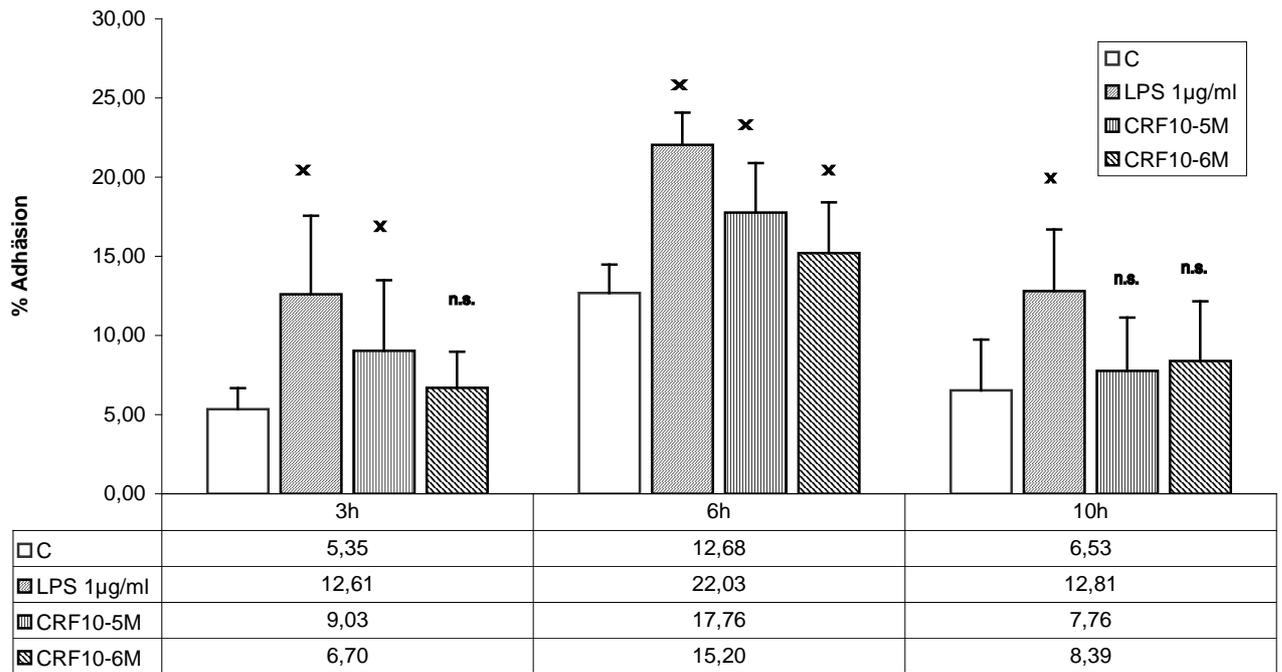


Abb. 14: Zeitkinetik der Kostimulation von THP-1 und HMEC-1. Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabh. Versuchen mit je 4 Ansätzen pro Zeit und Stimulanz. Signifikanzniveau $p < 0,01$, Mann-Whitney-U-Test.

4.6.1 Statistische Auswertung der Daten

Die Auswertung der Adhäsionsversuche wurde, nach Prüfung auf Normalverteilung, mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Testes als Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Das Signifikanzniveau p wurde mit SPSS für Windows, Version 11.5.1 berechnet (Signifikanzniveau $p < 0,01$).

4.7 CRH-induzierte Mobilisierung von MAC-1/CD 11b auf primären Monozyten

Heparinisiertes Vollblut von freiwilligen gesunden Spendern wurde mit CRH in Konzentrationen von 10^{-7} bis 10^{-5} M für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte nach einem etablierten Verfahren die Lysierung der Erythrozyten und nachfolgender Fixierung.

Als Positivkontrolle für die Mobilisierung von MAC-1 wurde fMLP (10^{-9} M) eingesetzt. Durchflusszytometrisch erfolgte die Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (PE für CD11b) von jeweils 10.000 CD14 positiven Monozyten und die Quotientenbildung mit unstimulierter Kontrolle. In 5 unabhängigen Versuchen wurden die Mittelwerte sowie die Standardabweichung berechnet.

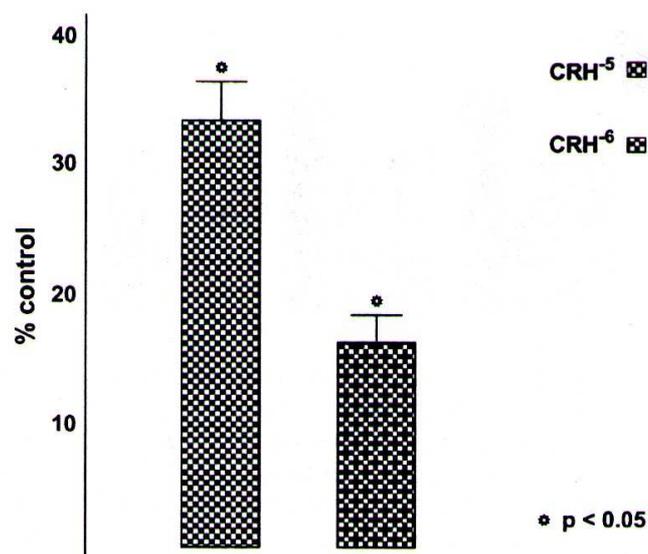


Abb. 15: MAC-1-Mobilisierung aus primären Monozyten durch CRH

Im Vergleich zur Kontrolle konnte bei 10^{-7} M keine Modifikation der MAC-1 Expression nachgewiesen werden wobei es bei einer CRH Konzentration von 10^{-6} M

zu einer signifikanten Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle kam (16,4%, Standardabweichung 2,05%, Signifikanzniveau $p < 0,05$).

CRH in der Konzentration von 10^{-5} M führte sogar zu einer noch deutlicheren Steigerung der MAC-1 Expression (33,4%, Standardabweichung von 3,1%, Signifikanzniveau $p < 0,05$). Die statistische Auswertung erfolgte mit einer ANOVA Varianzanalyse und einem t-Test .

4.8 Einfluss von CRH auf die endotheliale Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1/CD54 und VCAM-1/CD106

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden nach Stimulation der HMEC-1 mit CRH 10^{-5} M, CRH 10^{-6} M oder LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) die Anzahl positiver Zellen für ICAM-1/CD54 und VCAM-1/CD106 bestimmt und ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt.

	% positive Zellen VCAM-1	% positive Zellen ICAM-1
Unstimulierte HMEC-1, Isotypkontrolle	0,33	0,56
Unstimulierte HMEC-1, anti-CD54, anti-CD106	0,37	73,99
Referenzlinie	0,37	0,42
CRH 10^{-5} M, HMEC-1, anti-CD54, anti-CD106	0,49	0,65
CRH 10^{-6} M, HMEC-1, anti-CD54, anti-CD106	0,38	0,47
1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, HMEC-1, anti-CD54, anti-CD106	5,49	21,25

Tab. 3: Effekt von CRH und LPS auf endotheliales ICAM-1 und VCAM-1

Die von der Größe und Granularität her homogene Zellpopulation HMEC-1 wies in unstimuliertem Zustand zu 73,99 % eine ICAM-1/CD54-Expression auf, im Gegensatz hierzu wurde VCAM-1/CD106 auf der Oberfläche nicht exprimiert.

Nach 6 stündiger Inkubation der Endothelzellen mit LPS (1 µg/ml) zeigten 5,49% der Zellen mehr VCAM-1/CD106 Signal und 21,25% der Zellen mehr ICAM-1/CD54 Expression als die unstimulierte Kontrolle wohingegen weder CRH 10^{-6} M noch CRH 10^{-5} M eine Zunahme der endothelialen Adhäsionsmoleküle induzieren konnte.

5 Diskussion

5.1 Methodendiskussion

5.1.1 Diskussion der Zellkulturversuche

Untersuchungen mit Zellkulturen haben in den letzten Jahren immer breitere Anwendung in der Grundlagenforschung gefunden. Sie ermöglichen die gezielte Betrachtung einzelner Aspekte, losgelöst von interagierenden Stoffwechselprozesse. Zudem wird durch die Verwendung einer homogene Zellpopulation eine Reproduzierbarkeit ermöglicht.

Die Verwendung von Zellkulturen ist allerdings differenzierter zu betrachten. Es handelt sich oft um artifizielle, immortalisierte oder passagierte primäre Zellen, die eine Vielzahl von ursprünglichen Eigenschaften der primären Zelle verloren und neue hinzugewonnen haben. Gerade durch die Herauslösung aus dem hoch komplexen physiologischen und pathophysiologischen Kontext sind Ergebnisse aus der Zellkultur als in-vitro-Modell zu verstehen. Das Fehlen von hormonalen und parakrinen Einflüssen sowie von Zellinteraktionen reduziert die Erkenntnisse aus der Zellkultur doch nur auf ein Modell.

Erkenntnisse aus in-vitro-Modellen stellen aber oft die Grundlage der Forschung und Entwicklung in der Medizin dar, sie dienen in der Regel als Voraussetzung für weitere Forschungsprojekte wie zum Beispiel die Übertragung auf ein Tiermodell.

5.1.2 Diskussion der entwickelten Methode zur Adhäsionsbestimmung

5.1.2.1 Geschichte der bisherigen etablierten Adhäsionsverfahren

Die Untersuchung der Adhäsion von Leukozyten und Monozyten am Endothel ist eine etablierte Methode in der Zellbiologie, die aufgrund von neuen Techniken stetig modifiziert wurden. Zu Beginn der Untersuchungen erfolgte eine zeitaufwendige mikroskopische Auszählung. In den 80er Jahren wurde dann, nach Entwicklung eines Radioimmunassay, die Adhäsion mit ^{51}Cr bestimmt (Gamble et al., 1985). Mit dem Aufkommen moderner Photometer folgten ELISA-Methoden (Gamble et Vadas, 1988), gefolgt von fluorometrischen Verfahren Mitte der 90er Jahre (Akeson et al., 1993) die Fluorochrome wie CFDA, CFSE, BCECF-AM oder calcein-AM benutzten, welche unterschiedliche Einfluss auf die Zellfunktionen ausüben können wie Hemmung der Lymphozytenproliferation, Störung der Chemotaxis oder Beeinflussbarkeit des basalen oder maximalen Adhäsionsniveaus (DeClerck et al., 1994)

5.1.2.2 Etablierung eines eigenen Verfahrens zur Adhäsionsbestimmung

In Anlehnung an Mertens et al. (1993) und Saarinen et al. (2000) wurde in der vorliegenden Arbeit ein neues fluorometrisches Verfahren entwickelt, um oben beschriebene störende Einflüsse auf die Zelladhäsion zu minimieren.

Die gemessene Fluoreszenz wurde nicht mehr mit einer Standardmonozytenverdünnungsreihe verglichen, sondern in Relation zu einer Referenzfluoreszenz gesetzt. Als ein mögliches Problem einer Standardmonozytenverdünnungsreihe ist die schlechte Vergleichbarkeit der Ergebnisse von mehreren Experimenten an verschiedenen Tagen oder auch von Messungen an einem Tag zu unterschiedlichen Zeiten, da ein Nachlassen der Fluoreszenzintensität der Fluorochrome zerfallsartig abläuft und zusätzlich die Lichtquelle im Fluoreszenzlesegerät an Intensität in Abhängigkeit der Nutzungsdauer abnimmt (Sugden, 2004).

In der hier vorgestellten Methode wurde daher ein Fluoreszenzstandard angefertigt. Für jedes Experiment wurde eine Standardfluoreszenzprobe mitgeführt und die gemessene Intensität der Probe hierzu in Relation gesetzt. Dies ermöglichte, Messungen immer mit optimalem Verstärkungsfaktor durchzuführen und die Ergebnisse dennoch direkt zu vergleichen.

Der fluorometrische Adhäsionsassay ist in einer 96-Well-Platte durchgeführt worden, sodass in einem Arbeitsgang simultan mehrere Proben untersucht und umgehend ausgewertet werden konnten. Bei der oben beschriebenen mikroskopischen Methode ist dies wegen des hohen personellen und zeitlichen Aufwand nicht möglich.

Ein Problem bei Adhäsionsversuchen ist die Intaktheit des Endothels am Ende des Versuchs. Bei der hier beschriebenen neuen Methode wurde der Überstand mittels 1-ml-Eppendorfpipette vorsichtig abpipettiert um die Intaktheit des Monolayers zu bewahren. Zur Kontrolle des Monolayers wurde zudem eine transparente Platte als Kontrolle mitgeführt, des Weiteren wurde ein Proteinassay angefertigt. Lag zum Beispiel ein nicht mehr intaktes Monolayer vor war der Proteingehalt deutlich erniedrigt, was ein Verwerfen der Probe zur Folge hatte.

Um zu differenzieren, ob CRH eine Adhäsion über Vermittlung von Endothelzellen oder Monozyten hervorruft, wurden zwei Varianten des Adhäsionsassays verglichen. Bei der ersten Variante wurde zuerst nur das Endothel stimuliert, dann folgte eine Kontaktphase mit den Monozyten. In der zweiten Variante erfolgte eine Koinkubation von Monozyten und Endothel mit der Stimulanz. Die Zellen befanden sich während des Experiments in reduziertem Medium zur Minimierung einer CRH-unabhängigen Stimulation, zum Beispiel durch fetales Kälberserum.

Mit beiden beschriebenen Varianten konnte eine basale sowie maximale Adhäsion durch LPS (Positivkontrolle), vergleichbar mit Ergebnissen aus der Literatur (Doherty et al., 1989) sowie aus unseren eigenen mikroskopischen Adhäsionsversuchen, gemessen werden.

Im Vergleich mit dem mikroskopischen Verfahren ist die fluorometrische Methode aufgrund des deutlich niedrigeren Intra- und Interassayvariationskoeffizienten verlässlicher und die Ergebnisse reproduzierbarer. Die hohen Variationskoeffizienten bei der mikroskopischen Auszählung beruhen vermutlich auf der zufälligen Auswahl der Blickfelder, die gezählt wurden. In den Kammerobjektträgern neigen die Monozyten zudem dazu, am Rand im Vergleich zur Mitte vermehrt zu adhären, was eine Fehlerquelle darstellt und nur durch eine noch höhere Anzahl an Blickfeldern minimiert werden kann. Die fluorometrische Methode erfasst die Emission der gesamten Kammer und ist somit von distributiven Einflüssen unabhängig. Hier wird die gesamte Fluoreszenz im Ansatz gemessen, die proportional zur Monozytenzahl ist.

Es ist somit gelungen, eine neue modifizierte Form des Adhäsionsassays zu etablieren, mit dem schnell und zuverlässig Daten zur Monozyten-Endothel-

Interaktion erhoben werden können. Die entwickelte Methode erfüllt somit die Voraussetzung, um auf dem Gebiet der Zellinteraktion für die Adhäsionsbestimmung eingesetzt zu werden.

5.1.3 Diskussion der verwendeten Methoden zum CRH-Rezeptornachweis

5.1.3.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion geht auf Kary B. Mullis zurück, der 1985 die Methode etablierte (Mullis et al., 1986), er erhielt dafür 1993 den Nobelpreis für Chemie. Das Prinzip der PCR ist unverändert, allerdings sind heute eine Vielzahl von weiterentwickelten Verfahren, wie die Real-Time-PCR, hinzugekommen.

Mullis arbeitete mit einer hitzelabilen Polymerase, dem Klenow-Fragment, das aus *Escherichia coli* gewonnen wurde. Eine ständige Substitution der während der Zyklen denaturierten Polymerase war notwendig und aufwendig. Heute steht uns die hitzestabile *Thermus-aquaticus*-Polymerase (Taq-Polymerase) zur Verfügung, die die Methode sehr vereinfacht. Die richtige Konzentration der Taq-Polymerase muss allerdings auch heute noch für jedes Primerpaar in Vorversuchen ermittelt werden um die Reinheit des PCR-Produktes zu optimieren.

Die von uns durchgeführte RT-PCR dient zum Nachweis von RNA, sie ist somit in der Lage, die Expression bestimmter Gene in der Zelle darzustellen. Der eigentlichen Polymerase-Kettenreaktion ist noch der Schritt der reversen Transkription der mRNA zur Synthese einer komplementären DNA (cDNA) vorgeschaltet. Diese dient als Template. Zur Kontrolle des mittels Gelelektrophorese ermittelten PCR-Produktes wurde eine Sequenzierung der entsprechenden Banden von einer institutsfremden Firma durchgeführt, die Sequenzen wurden anschließend mit der Genbank des NCBI verglichen.

Zusammenfassend ist zu postulieren, dass die hier verwendete RT-PCR-Methode in der Lage ist, qualitativ die Expression eines bestimmten Gens als mRNA nachzuweisen. Sie macht keine Aussage über die Quantität oder Expressivität auf translationaler Ebene.

5.1.3.2 CRH-Rezeptornachweis auf Proteinebene

Um den Nachweis anzutreten, ob ein Rezeptor tatsächlich an der Zellmembran exprimiert wird, ist die PCR allein nicht ausreichend. Hier ist ein Nachweis auf Proteinebene notwendig, da posttranskriptionale, translationale und posttranslationale Prozesse bei der PCR unberücksichtigt bleiben. Hierzu stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung wie Immunhistochemie, Immunzytochemie, Immunfluoreszenzzytochemie, Durchflusszytometrie und Westernblot.

Limitierender Faktor des CRH-R1 und CRH-R2 Nachweises auf Proteinebene ist das Fehlen eines spezifischen Antikörpers, der für alle oben genannten Verfahren benötigt wird, verfügbar war nur ein polyklonaler Antikörper. Diese werden von unterschiedlichen Zellen produziert und reagieren folglich mit verschiedenen Epitopen des gesuchten Proteins. Eine Kreuzreaktivität wurde zwar mittels Affinitätschromatographie durch Reduktion antigenunspezifischer Antikörper vermindert, dennoch ist eine Kreuzreaktion häufiger als bei monoklonalen Antikörpern.

Der von uns verwendete Antikörper ist geeignet zum Nachweis von CRH-R1 und -R2 an Mensch, Maus oder Ratte.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum Rezeptornachweis auf Proteinebene die Immunfluoreszenzzytologie in Form des indirekten Verfahrens unter Verwendung eines sekundären Antikörpers verwendet. Diese Methode ist heute weit verbreitet da

durch Einsatz eines zweiten Antikörpers eine Potenzierung des Signals im Vergleich zum gelabelten Primärantikörper hervorgerufen werden kann.

Nachteilig ist die Untersucherabhängigkeit des mikroskopischen immunzytologischen Verfahrens (Taylor, 2000).

Da es notwendig war, das Präperat zunächst zu konservieren, wurden verschiedene Fixierungsarten in Vorversuchen getestet. Hierbei ist als Problem zu nennen, dass es nach Fixierung mit Glutaraldehyd und Formaldehyd zur Autofluoreszenz der Zellen kam, da beide Substanzen eine unspezifische Bindung von Fluorochromen oder Antikörpern induzierten (Baschong et al., 2001). Erst die Fixierung mit 100% Methanol für 10 Minuten bei -20°C reduzierte die Autofluoreszenz auf ein Minimum.

Immunfluoreszenzverfahren machen generell im Vergleich zum Westernblot eine höhere Konzentration des Primärantikörpers notwendig. Bei unserem Ansatz wurden die Suspensionszellen zunächst zur Konservierung einer Trocknung unterworfen, was eine Detektierbarkeit von Monozytenantigenen auch nach Tagen noch gewährleistet allerdings auf Kosten einer Verminderung der Antigendichte (Banks et al., 1983). Hieraus resultiert die ermittelte, relativ hohe Antikörperkonzentration von 1:50.

Um eine unspezifische Bindung auszuschließen, wurde eine Affinitätsabsorption mit hochreinem Immunglobulinantigen, das als Blockierungspeptid von der Herstellerfirma bezogen wurde, im Verhältnis 1:10 durchgeführt. Eine Auslöschung des Signals konnte somit erreicht werden.

Eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an die untersuchten Zellen wurde durch mitgeführte Probenansätze ohne Primärantikörper kontrolliert. Gerade bei der Immunfluoreszenzzytologie sind diese Kontrollen unumgänglich, um eine Subjektivität auch bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung zu minimieren.

Zusammenfassend ist somit die Kombination beider oben beschriebenen Methoden geeignet, um den Beweis der Expression des CRH-Rezeptorgens auf THP-1 Zellen anzutreten.

5.1.4 Diskussion der verwendeten Methoden zur Adhäsionsmoleküldetektion

5.1.4.1 Das monozytäre Adhäsionsmolekül MAC-1

Die Anfänge der Durchflusszytometrie liegen rund 70 Jahre zurück. Moldovan hat als erster eine photoelektrische Methode zur Analyse einzelner Zellen beschrieben (Moldovan, 1934), Gucker modifizierte das Verfahren zur Detektion von Staub oder Sporen (Gucker et al., 1947), was sich die Amerikaner im zweiten Weltkrieg zu Nutze machten. Mitte der 50er Jahre entwickelte Coulter ein Gerät zur Zellvolumenbestimmung (Davey et Kell, 1996) und erst Ende der 70er Jahre, nach Entwicklung des Ethidiumbromid, wurden Fluorochrome in der Durchflusszytometrie Goldstandard (Pauu et al., 1977). Die quantitative Durchflusszytometrie begann Anfang der 80er Jahre (v. Oostveldt et al., 1979).

Die Expression des monozytären Adhäsionsmoleküls MAC-1 wurde mittels monoklonalem PE-markierten Antikörper der Immunglobulingruppe IgG1 bestimmt. Um den Effekt einer unspezifischen Bindung der gleichen Antikörperklasse IgG1 zu kontrollieren, wurde eine IgG1-Isotypkontrolle gleicher Fluoreszenz bei jedem Experiment mitgeführt.

Die Identifizierung der Monozytenfraktion erfolgte mit anti-CD14-FITC mit entsprechender IgG2a-Isotypkontrolle. In jeder untersuchten Probe befanden sich

gleiches Volumen, gleiche Zellzahl und gleiche Antikörpermenge, alle Proben wurden zeitgleich mit dem Antikörper inkubiert. Die Fluoreszenzintensität, die innerhalb eines weiten Spektrums linear verläuft, verhält sich deshalb proportional zur gebundenen Antikörperzahl. Somit war es möglich, Aussagen über die Modifizierung der Antigendichte, in diesem Fall MAC-1, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu treffen.

Zur Gerinnungshemmung wurde Heparin statt EDTA eingesetzt, da EDTA zweiwertige Kationen komplexiert, die zum Teil für die Integrität von Adhäsionsmolekülen wichtig sind (Dransfield et al., 1992). Untersuchungen in in vivo-Modellen zeigten eine blockierende Wirkung von Heparin auf die MAC-1 Expression, die Ergebnisse konnten in in vitro-Untersuchungen nicht bestätigt werden (Peter et al., 1999).

Um nach CRH-Stimulation des Vollblutes die Oberflächenmarker auf Monozyten stabil zu halten (Lundahl et al., 1995) wurden die Zellen zunächst mit 0,4% Formaldehydlösung schnell und kurz fixiert, im Anschluß erfolgte die Lysierung der Erythrozyten mit einer Ammoniumchloridlösung (Hamblin et al., 1992).

Kritisch muss in der vorliegenden Arbeit an bemerkt werden, dass Vollblut verwendet wurde. Einerseits ist dies ein physiologischerer Ansatz als die Monozyten-Zellkultur, da eine Interaktion der Zellen mit den Substanzen ermöglicht wird. Andererseits kann nicht mit Sicherheit geschlossen werden, dass CRH nur über monozytäre Rezeptoren eine Zunahme der MAC-1 Expression bewirkt oder ob es sich um eine Interaktion mit anderen, im Vollblut vorkommenden Zellen, handelt, die ebenfalls CRH-Rezeptoren besitzen. Denkbar wäre zum Beispiel eine Bindung von CRH an neutrophile Granulozyten, die TNF- α oder IL-6 ausschütten und somit, also sekundär, eine MAC-1 Stimulation auf Monozyten bewirken (Angioni et al., 1993).

5.1.4.2 Die endothelialen Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1

Die Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle auf der immortalisierten Zelllinie HMEC-1 wurde ebenfalls mittels Durchflusszytometrie untersucht, das bevorzugte Verfahren zur Detektion von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Endothelzellen (Gräbner et al., 2000).

Da es sich um einen Zellverband in Form eines endothelialen Monolayers handelt, war zunächst ein Schritt zur Zellvereinzellung, d.h. Auflösen des Monolayers, notwendig. In der Literatur wurden hierzu Methoden mittels Trypsin/EDTA (Huang et al., 1997), EDTA allein (Ritchie et al., 1991) oder mechanische Methoden (Kalra et al., 1994) beschrieben. Da die enzymatische Lösung der Zellen aus dem Zellverband, zum Beispiel mit Trypsin, mit einer Beeinflussung der Detektierbarkeit von Oberflächenmolekülen einhergehen kann (Corver et al., 1995), wurde hier die mechanische Lösung mittels Schaber verwendet.

Untersucht wurde die Expression von ICAM-1 und VCAM-1, da sie zum die Adhäsion von Monozyten am Endothel vermitteln, zum anderen auch an HMEC-1 Zellen gut untersucht und dokumentiert sind (Lee et al., 1992; Xu et al., 1994) .

Die mit den Fluorochromen PE und FITC markierten monoklonalen Antikörper wurden auf unspezifische Bindungsaktivität mittels entsprechenden Isotypkontrollen gleicher Immunglobulinklassen kontrolliert. Da auf HMEC-1 das Adhäsionsmolekül VCAM-1 konstitutiv nicht exprimiert wird (Xu et al., 1994), erfolgte die Auswertung nicht über den Bezug der mittleren Fluoreszenzintensität zur unstimulierten Kontrolle sondern es wurden die Anteile der positiven Zellen an allen gezählten Zellen pro Ansatz ermittelt.

5.1.4.3 Die verwendeten CRH-Konzentrationen

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten CRH-Konzentrationen scheinen hoch gewählt worden zu sein. Hierzu ist zu sagen, dass es in der Literatur keine standardisierten Normwerte gibt, die Konzentrationen variieren stattdessen je nach Extraktions- und Radioimmunverfahren zwischen 10^{-11} bis 10^{-6} M (Ruckert et al., 1990; Stephanou et al., 1990). Die großen Unterschiede der peripheren CRH-Konzentrationen sind daneben auch durch die Anwesenheit von aktiven CRH-abbauenden Enzymen erklärbar, die CRH in stoffwechselaktive Fragmente überführen. Einzelne Fragmente können dabei vom jeweils verwendeten Antikörpern nicht erkannt werden, sodass „falsch negative“ Werte ermittelt werden. Der Vergleich von Konzentrationsangaben unterschiedlicher Autoren ist somit schwierig, wenn nicht unmöglich, ein Problem, das auch von anderen Autoren beschrieben wurde (Stephanou et al., 1990; Ekman et al., 1993; Crofford et al., 1993; Woods et al., 1996, Cunnah et al., 1987).

Außerdem sagt die Konzentration von CRH im peripher venösen Blut wenig über die lokale Konzentration im Gewebe aus, die häufig deutlich höher liegen wie z. B. Slominski et al. (2001) in Untersuchungen von Plasma und Haut zeigen konnte.

Die in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen liegen in einem Bereich, die denen in publizierten in-vitro-Untersuchungen entsprechen.

5.2 Diskussion der Ergebnisse hinsichtlich der Fragestellung

5.2.1 Werden auf der monozytären Zelllinie THP-1 CRH Rezeptoren exprimiert?

Die THP-1 Zellen wurden in einem neuen, modifizierten Verfahren zur Adhäsionsbestimmung von Monozyten am endothelialen Monolayer erfolgreich

eingesetzt, somit ist diese Zelllinie auch zur Untersuchung von Zellinteraktionen im lokalen CRH-System geeignet.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Beweis erbracht, dass CRH-Rezeptoren auf der THP-1 Zelllinie exprimiert werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungen an primären Monozyten oder Leukozyten, auf dessen Oberfläche ebenfalls CRH-Rezeptoren nachgewiesen werden konnten (Simon et al., 2003; Mousa et al., 2003).

5.2.2 Kann CRH die Adhäsion von Monozyten am Endothel beeinflussen und, wenn ja, welche Mediatoren sind dabei beteiligt?

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es unter Einfluss von CRH zu einer Adhäsionszunahme von THP-1 Zellen an HMEC-1 kommt. Als involvierter Mediator wurde der monozytäre Oberflächenmarker MAC-1/CD11b identifiziert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungen von Redwine et al. (2003), der eine MAC-1/CD11b Mobilisation nach mentalen Stresstest aufzeigte.

Eine mögliche Bedeutung von MAC-1/CD11b im Sinne einer vermehrten Expression wurde von Kassirer et al. bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung beschrieben (Kassirer et al., 1999). Somit könnte die hier gezeigte Zunahme des monozytären Adhäsionsmoleküls MAC-1/CD11b durch das chronische Stresshormon CRH eine mögliche Erklärung im Mosaik einer Stress-induzierten Zunahme der Arteriosklerose sein.

Die endothelialen Adhäsionsmoleküle VCAM-1/CD106 und ICAM-1/CD54 wurden in den hier vorgestellten Untersuchungen durch CRH nicht vermehrt exprimiert, wobei LPS den zu erwartenden Effekt in Form einer deutlichen Zunahme beider Adhäsionsmoleküle aufzeigte. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Mills et al.

(1995), der nach mentalem Stresstest ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf die ICAM-1/CD54-Expression nachweisen konnte.

Zusammenfassend ist aus den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnissen zu postulieren, dass es eine CRH-vermittelte Outside-In-Signalkaskade geben muss, ähnlich der Mobilisierung von MAC-1/CD11b durch LPS (Heinzelmann et al., 2000).

6 Zusammenfassung

Neben den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie oder Hypercholesterinämie kommen den psychosozialen Faktoren wie Stress oder Depression eine entscheidene Rolle als Risikofaktor für die Entwicklung der Atherosklerose zu. Obwohl das chronische Stresshormon Corticotropin-Releasing-Hormon im Rahmen der adaptiven Stressantwort als Hauptvertreter der Effektorhormone angesehen wird, sind die pathophysiologischen Mechanismen, die zu einer CRH/Stress-bedingten endothelialen Dysfunktion führen, weitgehend unbekannt. Diese Arbeit hatte zum Ziel, den Effekt von peripherem CRH auf die Monozyten/Endothel-Interaktion, beispielhaft die Adhäsion, herauszuarbeiten.

Die Untersuchungen der Monozyten-Endothel-Adhäsion wurde in einem in-vitro-Modell unter Verwendung der Zelllinien HMEC-1 und THP-1 mit einer neuen, modifizierten fluorometrischen Methode untersucht, monozytäres MAC-1/CD11b, endotheliales ICAM-1/CD54 und VCAM-1/CD106 mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Der Nachweis der vermittelnden monozytären CRH-Rezeptoren R1/-R2 erfolgte mittels RT-PCR- und Immunfluoreszenztechnik.

THP-1 konnte als Zielzelle für CRH mit Nachweis der CRH-Rezeptoren auf mRNA- und Proteinebene identifiziert werden. CRH induzierte eine signifikante zeit- und konzentrationsabhängige Adhäsionszunahme der THP-1 Zellen am HMEC-1 Monolayer. Der Effekt scheint Monozyten-vermittelt, da CRH, konzentrationsabhängig, zu einer monozytären MAC-1/CD11b-Freisetzung führte. Eine CRH-Stimulation nur von HMEC-1 führte hingegen zu keiner Adhäsionszunahme, erklärbar z. B. durch die hier dokumentierte fehlende Veränderung von endotheliale ICAM-1/CD54 und VCAM-1/CD106 unter Einfluß von CRH.

Die Ergebnisse unterstreichen somit die Relevanz von peripherem CRH auf die Monozytenfunktion und Monozyten/Endothel-Interaktion. Sie können einen Beitrag zur Erklärung eines möglichen Zusammenhangs von chronischem Stress (mit konsekutiver Erhöhung des Stresshormons CRH) und der Initiation / Progression der endothelialen Dysfunktion leisten (Wilbert-Lampen, Straube et al., 2006).

7 Literaturverzeichnis

- Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ. HMEC-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol.* 1992;99:683-90.
- 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(11):6068-74
- Akeson AL, Woods CW. A fluorometric assay for the quantitation of cell adherence to endothelial cells. *J Imm Meth.* 1993;163:181-5
- 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
- Baigent SM. Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in control of the immune response. *Peptides.* 2001;22:809-20
- 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
- Banks PM, Caron BL, Morgen TW. Use of imprints for monoclonal antibody studies: suitability of air-dried preparations from lymphoid tissues with an immunohistochemical method. *Am J Clin Pathol.* 1983;79(4):438-42
- Baschong W, Suetterlin R, Laeng RH. Control of Autofluorescence of Archival Formaldehyde-fixed, paraffin-embedded Tissue in Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). *J Histochem Cytochem.* 2001;49(12):1565-71

- Behan DP, Linton EA, Lowry PJ. Isolation of the human plasma corticotrophin-releasing factor-binding protein. *J Endocrinol.* 1989;122:23-31
- Bishop RE, Fundamentals of Endotoxin Structure and Function. *Contrib Microbiol.* 2005;12:1-27
- Bouis D, Hospers GAP, Meijer C, Molema G, Mulder NH. Endothelium in vitro: A review of human vascular endothelial cell lines for blood-vessel-related research. *Review. Angiogenesis* 2001;4:91-102
- Cantarella G, Lempereur L, Lombardo G, Chiarenza A, Pafumi C, Zappala G, Bernardini R. 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
- Cervilla J, Prince M, Rabe-Hesketh S. Vascular disease risk factors as determinants of incident depressive symptoms: a prospective community-based study. *Psychol Med.* 2004;34(4):635-41
- Claes SJ. Corticotropin-releasing hormone (CRH) in psychiatry: from stress to psychopathology. *Review. Ann Med.* 2004;36:50-61
- Clifton VL, Read MA, Leitch IM, et al. Corticotropin-releasing hormone induced vasodilatation in human fetal placental circulation: involvement of nitric oxide-cyclic guanosine 3',5'-monophosphate-mediated pathway. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:2888-93
- Corver WE, Cornelisse CJ, Hermans J, Fleuren GJ. Limited loss of nine tumor-associated surface antigenic determinants after tryptic cell dissociation. *Cytometry* 1995;19:267-72
- Coste SC, Kesterson RA, Heldwein KA, et al. Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nature Genet.* 2000;24:403-9
- Coste SC, Quintos RF, Stenzel-Poore MP. Corticotropin-Releasing-Hormone-Related Peptides and Receptors: Emergent Regulators of Cardiovascular Adaptations to Stress. *Review. Trends Cardio Med.* 2002;12(4):176-82

- Crofford LJ, Sano H, Karalis K, et al. Corticotropin-releasing hormone in synovial fluids and tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Immunol.* 1993;151:1587-96
- Cunnah D, Jessop DS, Besser GM, Rees LH. Measurement of circulating corticotrophin-releasing factor in man. *J Endocrinol.* 1987;113(1):123-31
- Cybulsky MI, Iiyama K, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Inv.* 2001;107:1255-62
- Davey HM, Kell DB. Flow Cytometry and Cell Sorting of Heterogeneous Microbial Populations: the Importance of Single-Cell Analyses. *Microbiol Rev.* 1996;60(4):641-96
- Davies MJ, Woolf N, Rowles PM, Pepper J. Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Br Heart J* 1988;60:459-64
- DeClerck LS, Bridts CH, Mertens AM, Moens MM, Stevens WJ. Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromes on cellular function. *J Imm Meth.* 1994;172:115-24
- Doherty DE, Zagarella L, Henson PM, Worthen GS. Lipopolysaccharide stimulates monocyte adherence by effects on both the monocyte and the endothelial cell. *J Imm.* 1989;143:3673-9
- Dransfield I, Cabanas C, Craig A, Hogg N. Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. *J Cell Biol.* 1992;116(1):219-26
- Ekman R, Serenius B, Castro MG, et al. Biosynthesis of corticotropin-releasing hormone in human T-lymphocytes. *J Neuroimmunol.* 1993;44:7-13
- Ellis MJ, Livesey JH, Donald RA. Circulating plasma corticotrophin-releasing factor-like immunoreactivity. *J Endocrinol* 1988;117:299-307
- Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA et al. Atherosclerotic Vascular Disease Conference. Writing Group III: Pathophysiology. *Circulation* 2004;109:2617-25
- Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 2002;90:251–262.

- Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ, Vadas MA. Simulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *PNAS* 1985;82:8667-71
- Gamble JR, Vadas MA. A new assay for the measurement of the attachment of neutrophils and other cell types to endothelial cells. *J Imm Meth.* 1988;109:175-84
- Genedani S, Bernardi M, Baldini M, Bertolini A. Influence of CRH and α -MSH on the Migration of Human Monocytes in vitro. *Neuropeptides.* 1992;23:99-102
- Ghiadoni L, Donald AE, et al. Mental Stress Induces Transient Endothelial Dysfunctions in Humans. *Circulation* 2000;102:2473-8
- Gräbner R, Till U, Heller R. Flow Cytometric Determination of E-selectin, Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 in Formaldehyde-fixed Endothelial Cell Monolayers. *Cytometry* 2000;40:238-44
- Grunt M, Glaser J., Schmidhuber H., et al. Effects of corticotropin-releasing foactor on isolated rat heart activity. *Am J Physiol.* 1993;264: H1124-H1129
- Grunt M, Haug C, Duntas L, et al. Dilatory and inotropic effects of corticotropin-releasing factor on the isolated heard. *Horm Metab Res.* 1992;24:56-59
- Gucker F. T., O'Konski C, Pickard HB, Pitts JN. A photoelectric counter for colloidal particles. *Am J Chem.* 1947;69:2422–2431.
- Habib KE, Weld KP et al. Oral administration of a corticotropin-releasing hormone receptro antagonist significantly attenuates behavioral, neuroendocrine, and autonomic responses to stress in primates. *PNAS.* 2000;97(11):6079-84
- Hamblin A, Taylor M, Bernhagen J, Shakoor Z, Mayall S, Noble G, McCarty DA. Method of preparing blood leucocytes for flow cytometry which prevents upregulation of leucocyte integrins. *J Imm Meth.* 1992;146:219-28
- Haynes SG, Feinleib M, Kannel WB. The relationship of psychosocial factors to coronary heart disease in the Framingham study: 3. Eight year incidence of coronary heart disease. *Am J Epidemiol.* 1980;111:37-58

- Heinzelmann M, Polk HC, Chernobelsky A, Stites TP, Gordon LE. Endotoxin and muramyl dipeptide modulate surface receptor expression on human mononuclear cells. *Immunopharm.* 2000;48:117-28
- Hemingway H, Marmot M. Evidence based cardiology: Psychosocial factors in the aetiology and prognosis of coronary heart disease: systematic review of prospective cohort studies. *BMJ* 1999;318:1460-7
- Hemingway H, Shipley M, Mullen MJ, Kumari M, Brunner E, Taylor M, Donald AE, Deanfield JE, Marmot M. Social and Psychosocial Influences on Inflammatory Markers and Vascular Function in Civil Servants (The Whitehall II Study). *Am J Cardiol.* 2003;92:984-7
- Huang ZH, Bates EJ, Ferrante JV, Hii CS, Poulos A, Robinson BS, Ferrante A. Inhibition of stimulus-induced endothelial cell intercellular adhesion molecule-1, E-selectin and vascular cellular adhesion molecule-1 expression by arachidonic acid and its hydroxy and hydroperoxy derivatives. *Circ Res.* 1997;80:149-58
- Imhof BA, Aurrand-Lions M. Adhesion Mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nature Reviews Imm.* 2004;4:432-44
- Kalra VK, Ying Y, Deemer K, Natrajan R, Nadler JL, Coates TD. Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1994;160:154-62
- Kaplan JR, Manuck SB, Clarkson TB, Lusso FM, Taub DM, Miller EW. Social stress and atherosclerosis in normocholesterolemic monkeys. *Science* 1983;220(4598):733-5
- Kassirer M, Zeltser D, Prochorov V, Schoenman G, et al., Increased expression of the CD 11b/CD18 antigen on the surface of peripheral white blood cells in patients with ischemic heart disease: Further evidence for smoldering inflammation in patients with atherosclerosis. *Am Heart J.* 1999;138:555-9
- Kehne J, De Lombaert S Review: Non-peptidic CRF1 receptor antagonists for the treatment of anxiety, depression and stress disorders. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2002;1(5):467-93

- Kielcolt-Glaser JK, Preacher KJ, MacCallum R, Atkinson C, Malarkey WB, Glaser R. Chronic stress and age-related increases in proinflammatory cytokine IL-6. *PNAS* 2003;100(15):9090-5
- Kimura Y, Takahashi K, et al. Expression of urocortin and corticotropin-releasing factor receptor subtypes in human heart. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(6):340-6
- Kishimoto T, Pearse RV, Lin CR, Rosenfeld MG. A sauvagine/corticotropin-releasing factor receptor expressed in heart and skeletal muscle. *PNAS* 1995;92:1108-12
- Kivimäki M, Leino-Arjas P, Luukkonen R, Riihimäki H, Vahtera J, Kirjonen J. Work stress and risk of cardiovascular mortality: prospective cohort study of industrial employees. *BMJ* 2002;325:857-61
- Konstantopoulos K, McIntyre LV. Effects of fluid dynamic forces on vascular cell adhesion. *J Clin Invest.* 1996;98:2261-65
- Kuper H, Marmot M., Hemingway H. Systematic Review of Prospective Cohort Studies of Psychosocial Factors in The Etiology and Prognosis of Coronary Heart Disease. *Sem Vasc Med.* 2002;02:267-314
- Lee KH, Lawley TJ, Xu YL, Swerlick RA. VCAM-1-, ELAM-1- and ICAM-1-independent adhesion of melanoma cells to cultured human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol.* 1992;98(1):79-85
- Lenz HJ, Fischer LA, Vale WW, Brown MR. Corticotropin-releasing factor, sauvagine and urotensin I: effects on blood flow. *Am J Physiol.* 1985;249:R85-R90
- Lespérance F, Frasere-Smith N, Thérioux P, Irwin M. The Association Between Major Depression and Levels of Soluble Intercellular Adhesion Molecule 1, Interleukin-6 and C-Reactive Protein in Patients with recent Acute Coronary Syndrom. *Am J Psych* 2004;161:271-7
- Leu SJ, Singh VK. Modulation of natural killer cell-mediated lysis by corticotropin-releasing neurohormone. *J Neuroimmunol.* 1991;33(3):253-60
- Leu SJ, Singh VK. Stimulation of interleukin-6 production by corticotropin-releasing factor. *Cell Immunol.* 1992;143(1):220-7

- Leu SJ, Singh VK. Suppression of in vitro antibody production by corticotropin-releasing factor neurohormone. *J Neuroimmunol.* 1993;45(1-2):23-9
- Löffler, Petrides. *Biochemie und Pathobiochemie.* 6. Auflage, 1998:815,827ff.
- Lundahl J, Halldén G, Hallgren M, Sköld CM, Hed J. Altered expression of CD11b/CD18 and CD62L on human monocytes after cell preparation procedures. *J Immunol Meth.* 1995;180:93-100
- Mangiafico RA, Malatino LS, Attina T, Messina R, Fiore CE. Exaggerated endothelin release in response to acute mental stress in patients with intermittent claudication. *Angiol.* 2002;53(4):383-90
- Marmot MG, Bosma H, Hemingway H, Brunner E, Stansfeld S. Contribution of job control and other risk factors to social variation in coronary heart disease incidence. *Lancet* 1997;350:235-39
- McEver RP, Moore KL, Cummings RD. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrated interactions. *J Biol Chem.* 1995;270:11025-8
- Meisel SR, Kutz I, Dayan KI, Pauzner H, Chetboun I, Arbel Y, David D. Effect of Iraqi missile war on incidence of acute myocardial infarction and sudden death in Israeli civilians. *Lancet* 1991;338(8768):660-1
- Mertens AV, DeClerck LS, Moens MM, Bridts CH, Stevens WJ. Study of eosinophil-endothelial adhesion, production of oxygen radicals and release of eosinophil cationic protein by peripheral blood eosinophils of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Allergy.* 1993;23(10):868-73
- Miller GE, Stetler CA, Carney RM, Freedland KE, Banks WA. Clinical Depression and Inflammatory Risk Markers for Coronary Artery Disease. *Am J Cardiol.* 2002;90:1279-83
- Miller LJ, Bainton DF, Borregaard N, Springer T. Stimulated Mobilisation of Monocyte Mac-1 and p150,95 Adhesion Proteins from an Intracellular Vesicular Compartment to the Cell Surface. *J Clin Inv.* 1987;80:535-44

- Miller LJ, Bainton DF, Borregaard N, Springer TA. Stimulated Mobilization on Monocyte Mac-1 and p150,95 Adhesion Proteins from an Intracellular Vesicular Compartment to the Cell Surface. *J Clin Inv.* 1987;80:535-44
- Mills PJ, Dimsdale JE. The effects of acute psychologic stress on cellular adhesion molecules. *J Psychosom Res.* 1996;41(1):49-53
- Moldovan, A. Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. *Science* 1934;80:188–189.
- Möller J, Therorell T, de Faire U, Ahlbom A, Hallqvist J. Work related stressful life events and the risk of myocardial infarction. Case-control and case-crossover analyses within the Stockholm heart epidemiology programme (SHEEP). *J Epid Comm Health* 2005;59:23-30
- Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implication for plaque rupture. *Circulation* 1994;90:775-8
- Mousa SA, Bopaiah CP, Stein C, Schafer M. Involvement of corticotropin-releasing hormone receptor subtypes 1 and 2 in peripheral opioid-mediated inhibition of inflammatory pain. *Pain* 2003;106(3):297-307
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51(1):263-73
- O'Malley P, Jones DL, Feuerstein M, Taylor AJ. Lack of correlation between psychological factors and subclinical coronary artery disease. *NEJM* 2000;343:1298-304
- Osborn MJ, Rosen SM, Rothfield L, Zeleznick LD, Horecker BL. Lipopolysaccharide of the gram-negative cell wall. *Science.* 1964;145:783-9
- Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, et al. Inflammation, coagulation and depressive symptomatology in cardiovascular disease-free people; the ATTICA study. *Eur Heart J* 2004;25:492-9

- Parkes DG, Weisinger RS, May CN. Cardiovascular actions of CRH and urocortin: an update. *Peptides*. 2001;22:821-7
- Pauu AS, Cowles JR, Oro J. Flow-microfluorometric analysis of *Escherichia coli*, *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium japonicum* at different stages of the growth cycle. *Can J Microbiol*. 1977;23:1165–1169.
- Peter KH, Schwarz M, Conradt C, Nordt T, Moser M, Kübler W, Bode C. Heparin inhibits Ligand Binding to the Leukocyte Integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *Circulation* 1999;100:1533-1539
- Price DT, Loscalzo J. Physiology in Medicine. Cellular Adhesion Molecules and Atherogenesis. *Am J Med*. 1999;107:85-97
- Price DT, Loscalzo J. Physiology in Medicine. Cellular Adhesion Molecules and Atherogenesis. *Am J Med*. 1999;107:85-97
- Rajagopalan S, Brook R, Rubenfire M, Pitt E, Young E, Pitt B. abnormal Brachial Artery Flow-Mediated Vasodilation in Young Adults with Major Depression. *Am J Card* 2001;88:196-8
- Redwine L, Snow S, Mills P, Irwin M. Acute Psychological Stress: Effectos on Chemotaxis and Cellular Adhesion Molecule Expression. *Psychosom Med*. 2003;65:598-603
- Ritchie AJ, Johnson DR, Ewenstein BM, Pober JS. Tumor necrosis factor induction of endothelial cell surface antigens is independent of protein kinase C activation or inactivation. Studies with phorbol myristate acetate and staurosporine. *J Immunol*. 1991;146:3056-62
- Rosengren A, Hawken S, Öunpuu S, Sliwa K, Zubaid M, Almahmeed WA, Blackett KN, Sitthi-Amorn C, Sato H, Yusuf S. Association of psychosocial risk factors with risk of acute myocardial infarction in 11119 cases and 13648 controls from 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004;364:953-62
- Rosenman RH, Brand RJ, Sholtz RI, Friedman M. Multivariate prediction of coronary heart disease during 8,5 year follow-up in Western Collaborative Group Study. *Am J Cardiol*. 1976;37:903-9

- Ross R. Atherosclerosis – An Inflammatory Disease. *NEJM* 1999; 340(2):115-126
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 1993, 362:801-809
- Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000;132:365-86
- Ruckert Y, Rhode W, Furkert J. Radioimmunoassay of corticotropin-releasing hormone. *Exp Clin Endocrinol.* 1990;96(2):129-37
- 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(1):51-61
- Scheer R, Pyrogene und Limulustest. *Pharmazie in unserer Zeit.* 1984:137-46
- Schoenhagen P, Ziada KM, Vince DG, et al. Arterial remodeling and coronary artery disease: the concept of "dilated" versus "obstructive" coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:297-306
- Schulte HM, Bamberger CM, Elsen H, Herrmann G, Bamberger AM, Barth J. Systemic interleukin-1 alpha and interleukin-2 secretion in response to acute stress and to corticotropin-releasing hormone in humans. *Eur J Clin Invest.* 1994;24(11):773-7
- Schurmeyer TH, Avgerinos PC, Gold PW et al. Human corticotropin-releasing factor in man: pharmacokinetic properties and dose-response of plasma adrenocorticotropin and cortisol secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984;59:1103-8
- Simon EB, Besancon R, Benetollo C, Nicolino M, Saez JM, Li, JY. Human corticotropin-releasing factor type 1 receptor analysis with white blood cells mRNAs and DNA. *Mol Cell Endocrin.* 2003;199:189-93
- Slominski A, Wortsman J, Pisarchik A, et al. Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors. *FASEB J.* 2001;15:1678-93

- Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*.1990;346:425– 434
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76:301–314
- Stephanou A, Jessop DS, Knight RA, Lightman SL. Corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity and mRNA in human leukocytes. *BBI*. 1990;4(1):67-73
- Stephanou A, Jessop DS, Knight RA, Lightman SL. Corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity and mRNA in human leukocytes. *BBI*. 1990;4(1):67-73
- Stephane A, Magid K, Edwards S, Brydon L, Hong Y, Erusalimsky J. The influence of psychological stress and socioeconomic status on platelet activation in men. *Atheroscl* 2003;168(1):57-63
- Stewart RAH, North FM, West TM, Sharples KJ, Simes RJ, Colquhoun DM, White HD, Tonkin AM. Depression and cardiovascular morbidity and mortality: cause or consequence? *Eur Heart J* 2003;24:2027-37
- Suarez EC, Krishnan RR, Lewis JG. The Relation of Severity of Depressive Symptoms to Monocyte-Associated Proinflammatory Cytokines and Chemokine in Apparently Healthy Men. *Circ* 2003;65(3):362-8
- Sugden JK. Photochemistry of dyes and fluorochromes used in biology and medicine: some physicochemical background and current applications. *Biotech Histochem*. 2004;79(2):71-90
- Taylor CR. The total test Approach to Standardization of Immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124:945-51
- Todaro JF, Shen BJ, Niaura R, Spiro A, Ward KD. Effect of Negative Emotions on Frequency of Coronary Heart Disease (The Normative Aging Study). *Am J Card*. 2003;92:901-6
- Tschuchiya S, Yamabe M., Yamaguchi Y. et. al. Establishment and characterization of an human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 1980;26:171-6
- Unger RE, Krump-Konvalinkova V, Peters K, Kirkpatrick CJ. In Vitro Expression of the Endothelial Phenotype: Comparative Study of Primary Isolated Cells and

- Cell Lines, Including the Novel Cell Line HPMEC-ST1.6R. Review. *Microvasc Research* 2002;64: 384-97
- Uphoff CC, Drexler HG. Detection of mycoplasma contaminations. *Methods Mol Biol.* 2005;290:13-23
- van Oostveldt PM, Tanke HJ, Ploem JS, Boeken G. Relation between fluorescent intensity and extinction in quantitative microfluorometry. *Acta Histochem Suppl.* 1979;20:59-63
- von Känel R, Mills PJ, Fainman C, Dimsdale JE. Effects of Psychological Stress and Psychiatric Disorders on Blood Coagulation and Fibrinolysis: A Biobehavioral Pathway to Coronary Artery Disease? *Psychosom Med.* 2001;63:531-44
- Wassertheil-Smoller S, Shumaker S, Ockene J, Talavera GA, Greenland P, Cochrane B, Robbins J, Aragaki A, Dunbar-Jacob J. Depression and cardiovascular sequelae in postmenopausal women. The Women's Health Initiative (WHI). *Arch Intern Med.* 2004;164(3):289-98
- 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 of corticotropin-releasing hormone (CRH) 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.
- Woods RJ, David J, Baigent S, et al. Elevated levels of corticotrophin-releasing factor binding protein in blood of patients suffering from arthritis and septicaemia and the presence of novel ligands in synovial fluid. *Br J Rheumatol.* 1996;35:120-124
- Wulsin LR, Singal BM. Do Depressive Symptoms Increase the Risk for the Onset of Coronary Disease? A Systematic Quantitative Review. *Psychosom Med.* 2003;65(2):201-10

- Xu Y, Swerlick RA, Characterization of Expression and Modulation of Cell Adhesion Molecules on an Immortalized Human Dermal Microvascular Endothelial Cell Line (HMEC-1). *J Invest Dermatol.* 1994;102:833-37
- Yu R, Kim CS, Kawada T et al. Involvement of leukotactin-1, a novel CC chemokine, in human atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2004;174:35-42
- Yusuf S, Hawken S, Öunpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case control study. *Lancet* 2004;364:937-52
- Zobel AW, Nickel T, Kunzel HE, Ackl N, Sonntag A, Ising M, Holsboer F. Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist R121919 in major depression: the first 20 patients treated. *J Psychiatr Res.* 2000;34(3):171-81

8 Legenden

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Response-to-Injury-Hypothese	14
Abb. 2: Schritte der Adhäsion und Transmigration	17
Abb. 3: Berechnung der prozentualen monozytären Adhäsion am Endothel	44
Abb. 4: PCR-Elektrophorese für CRH-R1/2 auf THP-1 Zellen	49
Abb. 5: CRH-R1 Referenzsequenz NM_004382 versus Produktsequenz aus THP	50
Abb. 6: CRH-R2 Referenzsequenz NM_001883.2 versus Produktsequenz aus THP	51
Abb. 7 a-c: Immunfluoreszenz-Nachweis von CRH-R1/2 auf primären Monozyten	53
Abb. 8: Adhärente THP-1 auf HMEC-1 Monolayer (Phasenkontrast)	54
Abb. 9 a,b: LPS induzierte Adhäsionszunahme der THP-1 an HMEC-1. Fluoreszenzmikroskopisches Bild (100fach) in Doublelayer-Technik (100fach). Solitär mit DAPI (blau) gefärbte Zellkern DNA und FITC markiertes Zytoplasma der THP-1 Zellen	55
Abb. 11: Linearität der Fluoreszenz (mit THP-1 Zellen, n=5)	56
Abb. 12: Vergleich mikroskopische und fluorometrischen Adhäsionsbestimmung	58
Abb. 13: Zeitkinetik der Adhäsion von THP-1 an stimulierten HMEC-1	61
Abb. 14: Zeitkinetik der Kostimulation von THP-1 und HMEC-1. Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabh. Versuchen mit je 4 Ansätzen pro Zeit und Stimulanz. Signifikanzniveau $p < 0,01$, Mann-Whitney-U-Test.	63
Abb. 15: MAC-1-Mobilisierung aus primären Monozyten durch CRH	64

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Intraassay-Kontrollen der mikroskopischen und fluorometrischen Adhäsionsbestimmung	59
Tab. 2: Interassay-Kontrollen der mikroskopischen und fluorometrischen Adhäsionsbestimmung	59
Tab. 3: Effekt von CRH und LPS auf endotheliales ICAM-1 und VCAM-1	65

9 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. Steinbeck als mein Doktorvater gebührt mein Dank für die Annahme als Doktoranden, die Überlassung des Themas und den reibungslosen Ablauf. Außerdem danke ich ihm als Direktor der Medizinischen Klinik I dafür, mir die Infrastruktur der Klinik für diese Arbeit zur Verfügung gestellt zu haben.

Mein besonderer Dank geht an Frau Dr. med. Ute Wilbert-Lampen. Ich lernte Frau Dr. Wilbert-Lampen während einer Famulatur in der Medizinischen Klinik I kennen. Sie hat mit ihrer mitreißenden Art sofort mein wissenschaftliches Interesse an Ihrem Forschungsprojekt geweckt. Als Mentorin hat sie mich sowohl während der experimentellen Phase, als auch beim Verfassen dieser Schrift von ihrer jahrelangen Erfahrung als Wissenschaftlerin profitieren lassen. Während meiner Zeit in ihrer Arbeitsgruppe ist eine Freundschaft entstanden, in der sie mich persönlich immer gefördert und unterstützt hat. Vielen Dank dafür.

Herzlichen Dank gebührt Frau Andrea Plasse, die mir die Grundzüge des Arbeitens im Forschungslabor beibrachte und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, wenn es Probleme gab. Besonders ihre Erfahrung in der Zellkultur und PCR-Technik kam mir zu gute. Wegen ihrer freundlichen und geduldigen Art haben mich viele Doktoranden um sie als Kollegin beneidet.

Vielen Dank an Frau Heike Kartmann, Frau Cornelia Grimm und Frau Bianca Hildebrand für viel technische Hilfe und für eine wirklich schöne Arbeitsatmosphäre.

Danke auch an Frau Dr. hum. biol. Anja Trapp, die mir in wissenschaftlichen Fragen immer gerne weitergeholfen hat und auch immer um gute Musik besorgt war.

Schließlich möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern und Brüdern danken. Viel Liebe, Verständnis, Geduld und Förderung haben die Voraussetzungen geschaffen, diese Arbeit zu vollenden. Ohne ihre Hilfe wären weder das Medizinstudium, noch diese Arbeit für mich denkbar gewesen.

10 Lebenslauf

Geburtsdatum/-ort: 15. März 1979 in Bielefeld

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Religion: römisch-katholisch

Eltern: Roland Straube
Wirtschaftsinformatiker
Ingrid Straube, geb. Lehne
Kinder- und Jugendpsychotherapeutin

Geschwister: Benjamin Straube (26 Jahre), Dipl. Psychologe
Sebastian Straube (22 Jahre), Abiturientia 2006

Nächstes angestrebtes berufliches Ziel

Facharzt für Innere Medizin mit Schwerpunkt Kardiologie

Beruflicher Werdegang

seit Mai 2006 Assistenzarzt in Weiterbildung
Klinik für Kardiologie und internistische Intensivmedizin
Chefärztin Prof. Dr. med. E. Hoffmann
Städtisches Klinikum München Bogenhausen

Januar 2006 – April 2006 Wissenschaftlicher Assistenzarzt
Medizinische Klinik und Poliklinik II
Direktor Prof. Dr. med. G. Nickenig
Universitätsklinikum Bonn

01. Dezember 2005 Approbation als Arzt, Regierung von Oberbayern

Praktisches Jahr

Mai 2005 - September 2005	3. Tertial - Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie Prof. Dr. med. R. Ketterl, Klinikum Traunstein
Februar 2005 - Mai 2005	2. Tertial - Kardiologie, Nephrologie, Pneumologie Medizinische Klinik und Poliklinik I, Direktor Prof. med. G. Steinbeck, Ludwig-Maximilians-Universität, Großhadern
Oktober 2004 - Februar 2005	1. Tertial - NCH-ICU, orthopädische und urologische Anästhesie Klinik für Anästhesiologie, Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Ludwig-Maximilians-Universität, Großhadern

Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität München

29. November 2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01. September 2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
19. September 2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04. September 2001	Ärztliche Vorprüfung
September 1999	Beginn des Studiums der Humanmedizin

Famulaturen und Praktika

19.02.04 - 19.03.04	Ministry of Health, Government Hospital Suhum Ghana, West-Afrika, Dr. Setsoafia
24.02.03 - 25.03.03	Gynäkologische Gemeinschaftspraxis, Bielefeld Dres. med. D. Tormann und S. Worms

- 12.09.02 - 13.10.02 Medizinische Nothilfe der LMU Großhadern
 OA Prof. Dr. med. U. Beuers, Med. Klinik II
- 11.02.02 - 12.03.02 Kardiologie, Nephrologie, Pneumologie
 Medizinische Klinik und Poliklinik I, LMU Großhadern
 Direktor Prof. med. G. Steinbeck
- Juli 1999 - August 1999 Krankenpflegepraktikum auf der interdisziplinären
 Intensivstation des Bröderkrankenhaus Paderborn

Wissenschaftliche Aktivitäten

- April 2004 70. Jahrestagung der DGK, Mannheim, Präsentation von
 Teilaspekten der Dissertation als Mitautor des Vortrags über
 „Effects of CRH on monocyte / endothelium interactions,
 mediated by CRF-R1 and CRF-R2“
- Oktober 2003 Teilnahme am „Einführungskurs für molekularbiologisches
 Arbeiten“ der Klinischen Forschung Chirurgie,
 Klinikum Großhadern, LMU
05. Februar 2003 Präsentation der Dissertationsthematik und der
 entwickelten Methoden (wissenschaftliches Kolloquium)
- Seit Mai 2002 Beginn der Dissertation bei Prof. Dr. med. G. Steinbeck,
 Medizinische Klinik und Poliklinik I, LMU Großhadern,
 Arbeitsgruppe von Frau Dr. med. U. Wilbert-Lampen über die
 proatherogene Wirkung von CRH auf die Monozyten-Endothel-
 Interaktion als Modell für chronischen Stress.

Bibliographie

U. Wilbert-Lampen, A. Trapp, M. Modrzik, B. Fiedler, F. Straube, A. Plasse. „Effects of corticotropin-releasing hormone (CRH) on endothelin-1 and NO release, mediated by CRH receptor subtype R2: a potential link between stress and endothelial dysfunction?“ J Psychosom Res., 2006, Vol. 61(4):453-60.

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

U. Wilbert-Lampen, C. Seliger, A. Trapp, F. Straube, A. Plasse. „Female Sex Hormones Decrease Constitutive Endothelin-1 Release via Endothelial Sigma-1/Cocaine Receptors: An Action Independent of the Steroid Hormone Receptors. Endoth 2005;12(4):185-91

U. Wilbert-Lampen, F. Straube, A. Deutschmann, A. Plasse. „Effects of Corticotropin Releasing Hormone (CRH) on monocyte / endothelium interactions, mediated by CRH-R1 und CRH-R2 receptors“, Abstract, German J Cardiology, 2004, Vol. 93, III/405-6

Stipendium

2003

Erhalt des Oskar-Karl-Forster-Stipendiums

Zivildienst

August 1998 - Oktober 1998	Staatl. Rettungsdienstschule, Bielefeld
23. Oktober 1998	Prüfung zum staatl. anerkannten Rettungssanitäter
Juli 1998 - August 1999	Rettungsdienst DRK, OV Bad Lippspringe

Schulbildung und schulische Aktivitäten

03. Juni 1998	Allgemeine Hochschulreife
1995 - 1997	Schülersprecher, Pelizaeus-Gymnasium Paderborn
1993	Schüleraustausch, Boston Latin School Boston, Massachusetts, USA
1989 - 1998	Städt. Pelizaeus-Gymnasium, Paderborn
1985 - 1989	Kath. Concordia Grundschule, Bad Lippspringe

Nebentätigkeiten

seit September 2006	Forensischer Leichenschauendienst München
2003 - 2004	Studentische Hilfskraft im Labor Wilbert-Lampen Medizinische Klinik I, Großhadern

Freizeitaktivitäten

Langstreckenlauf, Marathon, Fotografieren, Reisen