

Aus der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Proopiomelanocortin RNA Expression
in Leukozyten
alkoholkranker Patienten
nach intravenöser hCRH Injektion

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitäts-Medizin
Berlin

von

Thomas Böttger
aus Erfurt

Dekan: Prof. Dr. med Martin Paul

Gutachter/in: 1 Prof. Dr. med. C. Spies
2. Prof. Dr. med. A. Heinz
3. Prof. Dr. med. E. Stüber

Datum der Promotion: 08.04.2011

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Alkoholmissbrauch	3
1.2	Immunsystem	4
1.3	Stressachse	5
1.3.1	CRH	6
1.3.2	ACTH	7
1.3.3	POMC	8
1.3.3.1	Funktion von POMC	8
1.3.3.2	Aufbau von POMC	9
2	ZIELE DER ARBEIT	11
3	MATERIAL UND METHODEN	12
3.1	Alkoholismusorientierte Diagnostik	12
3.1.1	Screening-Verfahren	12
3.1.2	Der CAGE-Fragebogen	13
3.2	Patienten	14
3.2.1	Gruppeneinteilung abstinent alkoholabhängig / nicht alkoholabhängig	14
3.2.2	Gruppeneinteilung Ltx	15
3.3	Protokoll der Blutentnahme und Stresstestung	15
3.4	Proopiomelanokortin-Ribonucleinsäure (POMC-mRNA)-Bestimmungen	17
3.4.1	RNA Gewinnung	17
3.4.2	Zubereitung der Standards und Erstellung einer Eichkurve	18
3.4.2.1	Linearisierung der Plasmidstandards	18
3.4.2.2	In-Vitro-Transkription (IVT)	20

3.4.2.3	Reverse Transkription (RT).....	23
3.4.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	24
3.4.2.5	Quantitative Bestimmung der Blut-RNA.....	28
3.4.2.6	Sichtbarmachen von POMC-mRNA.....	28
3.4.2.7	Solid-Phase-Minisequencing.....	29
3.4.2.8	Standardkurve.....	32
3.4.2.9	Die Untersuchung der mRNA von Leukozyten.....	33
3.5	Statistikmethoden.....	33
4	ERGEBNISSE.....	36
4.1	Basischarakteristika.....	36
4.2	Die Untersuchung der mRNA von Leukozyten.....	38
4.3	Die Expression der mRNA des POMC in Abhängigkeit des Trinkverhaltens und der Diagnose der untersuchten Patienten.....	39
4.3.1	Nichtalkoholranke / abstinente Alkoholranke nach Htx.....	39
4.3.1.1	Exogener Stresstest.....	39
4.3.1.2	Endogener Stresstest.....	41
4.3.2	Nichtalkoholranke / abstinente Alkoholranke und Ltx.....	43
4.3.2.1	Exogener Stress.....	43
4.3.2.2	Endogener Stress.....	44
4.3.3	Patientenkollektiv Gesamt.....	46
4.3.3.1	Exogener Stress.....	46
4.3.3.2	Endogener Stress.....	47
4.3.4	Nichtalkoholranke / abstinente Alkoholranke aus beiden Untersuchungsgruppen im Vergleich.....	49
4.3.4.1	Vergleich von abstinenten alkoholabhängigen Leber- und Herzpatienten beim exgenen Stresstest.....	50
4.3.4.2	Vergleich von nicht alkoholabhängigen Leber- und Herzpatienten beim endogenen Stresstest.....	50

4.3.4.3	Vergleich von abstinenten alkoholabhängigen Leber- und Herzpatienten beim exogenen Stresstest	50
4.3.4.4	Vergleich von nicht alkoholabhängigen Leber- und Herzpatienten beim exogenen Stresstest	51
4.3.4.5	Vergleich von abstinenten alkoholabhängigen Leber- und Herzpatienten beim endogenen und exogenen Stresstest.....	51
4.3.4.6	Vergleich von nicht alkoholabhängigen Leber- und Herzpatienten beim endogenen und exogenen Stresstest	52
4.3.4.7	Zusammenfassung des Vergleichs von abstinenten alkoholabhängigen und nicht alkoholabhängigen Leber- und Herzpatienten	52
5	DISKUSSION	55
5.1	Wichtigste Ergebnisse	55
5.2	Veränderungen der neuroendokrinen Immunantwort.....	55
5.3	Diskussion der Ergebnisse.....	56
5.3.1	Aussagefähigkeit der vorliegenden Arbeit	56
5.3.2	Diskussion der Ergebnisse im Vergleich mit früheren Studien	57
5.4	Diskussion der Methode.....	58
5.4.1	Statistik	58
5.4.2	RT und PCR	58
5.5	Einordnung der vorliegenden Arbeit in die Forschungsgeschichte	59
6	ZUSAMMENFASSUNG	61
7	LITERATUR.....	64
8	ANHANG	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: RNA-Agarosegel	18
Abbildung 2: Elektrophorese nach Plasmidlinearisierung.....	20
Abbildung 3: 2,5%iges Agarosegel mit 4% Formaldehyd; Laufzeit: 3h bei 5V/cm.	22
Abbildung 4: Exon 3 des humanen POMC Gens von Chromosom 2p2. .	25
Abbildung 5: Prinzip der RT-PCR.	27
Abbildung 6: Elektrophorese von PCR–Produkten im 2,5%igen Agarosegel; Laufzeit 2,5h bei fünf V/cm.	28
Abbildung 7: Das Prinzip des Solid Phase Minisequencing.....	30
Abbildung 8: Eichkurve der menschlichen POMC-Sequenz und eines mutierten Standards ermittelt durch RT-PCR und Solid Phase Minisequencing.....	32
Abbildung 9: Altersverteilung der Patientenkollektiv Ltx/Htx.	38
Abbildung 10: Grafische Darstellung des mRNA-POMC-Levels vor und nach endogener Stresstestung im Gesamtkollektiv alkoholkranker Pat	53
Abbildung 11: Grafische Darstellung des mRNA-POMC-Levels vor und nach endogener Stresstestung im Kollektiv LTX alkoholranke	53
<i>Abbildung 12: Grafische Darstellung der mRNA des POMC vor und nach endogenem Stresstest beim Verlauf im Patientenkollektiv abstinent al- koholranke/nichtalkoholkrank.....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 13: Grafische Darstellung der mRNA des POMC vor und nach exogenem Stresstest beim Verlauf im Patientenkollektiv HTX vs. LTX.....</i>	<i>54</i>

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Blutentnahmen.....	16
Tabelle 2: Linearisierungsansatz Wildtyp-DNA (IMAGp998M101924.	19
Tabelle 3: Linearisierungsansatz Mutierte DNA (pBSP8).	19
Tabelle 4: IVT-Ansatz der Wildtyp-POMC cDNA (Plasmid: IMAGp998M101924).	21
Tabelle 5: IVT-Ansatz der mutierten POMC cDNA (Plasmid: pBSP8).....	21
Tabelle 6: Mischung zweier RNA-Standards: Wildtypstandard und mutierter Standard.....	23
Tabelle 7: Protokoll zur Durchführung der Reversen Transkription.	24
Tabelle 8: Reaktionsansätze der PCR.....	26
Tabelle 9: Protokoll: Zyklen der Polymerase Kettenreaktion.	27
Tabelle 10: Das Reaktionsprotokoll des Solid Phase Minisequencing im Einzelnen.....	31
Tabelle 11: Signifikanzniveaus.	35
Tabelle 12: Basischarakteristika des Patientenkollektivs mit Alkoholanamnese (aktiv und abstinent) LTX/HTX.	36
Tabelle 13: Basischarakteristika des Patientenkollektivs ohne Alkoholanamnese mit LTX VIC und post HTX.....	37
Tabelle 14: Messwerte der Patienten Htx mit C2 und ohne C2 vor und nach der i.v. CRH-Gabe.	40
Tabelle 15: Messwerte der Patienten Htx mit C2 und ohne C2 vor und nach dem endogenen Stresstest.	42
Tabelle 16: Messwerte der Patienten Ltx mit C2 und ohne C2 vor und nach der i.v. CRH Gabe.....	44
Tabelle 17: Messwerte der Patienten Gesamt mit C2 und ohne C2 vor und nach dem endogenen Stresstest.....	45

Tabelle 18: Messwerte der Patientenkollektiv Gesamt mit C2 und ohne C2 vor und nach dem exogenem Stresstest..	46
Tabelle 19: Messwerte der Patienten Gesamt mit C2 und ohne C2 vor und nach dem endogenem Stresstest..	47
Tabelle 20: Friedman-Test.....	47
Tabelle 21: Statistik bei gepaarten Stichproben.	48
Tabelle 22: Friedman-Test.....	48
Tabelle 23: Wilcoxon-Test.	48
Tabelle 24: Vergleich der Anzahl von abstinente Alkoholranke und Nichtalkoholranke bei Patienten mit Htx vs. Ltx.	49

Verwendete Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum Albumin
CAGE	alkoholismusrelevanter Fragenkatalog
CDT	kohlenhydrat-defizientes Transferrin
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
CTP	Cytidintriphosphat
DATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonatbehandeltes Wasser
DGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dDNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DTTP	Desoxythymidintriphosphat
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GTP	Guanosintriphosphat
hCRH	humanes Corticotropin Releasing Hormon
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HPAA	Hypothalamisch-Hypophysär-Adrenale-Stressachse
(Htx) SPASS-Test	endogener Stresstest
Htx	Herztransplantation
IR	immunreaktiv
IVT	In-Vitro-Transkription

K-EDTA	Kalium-Ethylendiamintetraacetat
Ltx	Lebertransplantation
MCV	Mittleres Korpuskuläres Volumen
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	Messenger- oder Botenstoff-Ribonucleinsäure
NAC	N-Acetyl-L-Cysteine
NaOH	Natronlauge
NFW	Nuclease freies Wasser
PC1/2	Proconvertase 1/2
PCR	Polymerasekettenreaktion
POMC	Proopiomelanocortin
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TTP	Thymidintriphosphat
UTP	Uridintriphosphat
β-EP	β-Endorphin
μCi	Mikrocurie

1 Einleitung

Alkohol ist eine der meist benutzten legalen und sozial tolerierten Drogen in der Welt und stellt folglich ein großes Problem für das Gesundheitswesen dar. Über 20 Prozent aller stationären Patienten konsumieren mehr als 60g Alkohol täglich [51]. Die Letalität bei Patienten mit chronischem Alkoholmissbrauch auf einer Intensivstation liegt 23 bis 50 Prozent höher, als bei Patienten ohne täglichen Alkoholkonsum, deren Letalität zwischen 12 und 26 Prozent beträgt [40,71]. Spies et al. konnten in einer Untersuchung an alkoholkranken Patienten, die intensivstationär behandelt wurden, zeigen, dass die interkurrente Komplikationsrate mit 67 Prozent versus 14 Prozent um das Vierfache erhöht war und sich die Behandlungsdauer um acht Tage verlängerte [70]. Als eine Ursache für die verlängerte Behandlungsdauer ist die erhöhte perioperative Komplikationsrate zu diskutieren [92]. In der postoperativen Phase treten mit dem Alkoholismus assoziierte Komplikationen wie das Alkoholentzugssyndrom (AES), Infektionen, Blutungen und eine kardiopulmonale Insuffizienz zwei- bis fünffach häufiger auf [40,70].

Außer Patienten mit einer Alkoholanamnese (>60g/d) sind Patienten mit einer Hepatitis-B- und -C-Infektion mit anschließender Leberzirrhose am häufigsten für eine Lebertransplantation vorgesehen. Eggers et al. konnten 2006 in einer Studie zeigen, dass die präoperativen Infektionen in der Gruppe der Patienten mit alcoholic liver disease (ALD) signifikant häufiger waren (67 Prozent) als in der Patientengruppe mit virus induced zirrhosis (13 Prozent). Außerdem wurde ein erhöhter Endotoxinspiegel bei Patienten mit einer Alkoholanamnese im Vergleich zu Patienten mit virusinduzierter Leberzirrhose gemessen [102]. Durch die Stimulierung mit Endotoxin kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Zytokinen und diese können in der Leber eine Apoptose der Hepatozyten bewirken. Ebenso konnte die Studie von Eggers et al. zeigen, dass Patienten mit alkoholinduzierter Leberzirrhose trotz Alkoholabstinenz von mindestens 3,5 Jahren im Vergleich zu Patienten mit virusinduzierter Leberzirrhose, eine erhöhte antiinflammatorische Immunantwort nach Stress-Testung aufwiesen. Diese Immunsuppression könnte zu einer erhöhten Infektionsrate bei ALD-Patienten nach Lebertransplantation führen [OQ 1].

Als Ursache der erhöhten Komplikationsrate nach Operationen wird auch die Veränderung der Stressantwort als pathogenethischer Faktor bei chronischen Krankheiten, vor allem bei alkoholismusbasierten Erkrankungen, diskutiert [2,7,64]. Bereits in den 1930er Jahren definierte Selye Stress als einen Anpassungsmechanismus des menschlichen Körpers. Er erkannte, dass alle Einflussgrößen, denen ein Lebewesen ausgesetzt ist, neben ihren spezifischen Wirkungen auch ein unspezifisches erhöhtes Bedürfnis nach Anpassung zur Wiederherstellung des Normalzustandes zur Folge haben. Diese Reaktionsweise, welche den gesamten Organismus beeinflusst, nannte er unspezifisches Adaptationssyndrom, zu dessen Beschreibung er den Begriff Stress benutzte. In späteren Stressauffassungen wird die psychosoziale Komponente von Stress stärker betont. [48,50]

Der Anpassungsmechanismus wird als ein Regelkreis beschrieben, in dem die verschiedensten Körperfunktionen an die jeweiligen Reize der Umwelt angepasst werden. Das sogenannte HPAA-System stellt auf humoraler Ebene die zentrale Schalt- und Steuerstelle zur Aufrechterhaltung der Homöostase des Organismus dar. Dieses Steuersystem ist in Form einer von zentral nach peripher ausgerichteten, hormonalen Achse aufgebaut. Der Hauptsitz des HPAA-Systems befindet sich im Hypothalamus. An diesem Steuersystem sind die Hormone ACTH und CRH maßgeblich beteiligt. Von Yalow et al. wurde 1971 [99] die Existenz eines Vorläuferhormons Proopiomelanokortin (POMC) des ACTH in den Zellen der Hypophyse postuliert. CRH ist der physiologische Releasing-Faktor, sowohl für die Proopiomelanokortinfreisetzung und des daraus resultierenden Peptids β -Endorphin, als auch der ACTH Ausschüttung an der Hypophyse. Die Produktion der Vorstufe Proopiomelanokortin (POMC) sowie der von POMC abgeleiteten Peptide in Lymphozyten und Makrophagen ließ die Frage nach einem unabhängigen, endokrinen System aufkommen [11,17]. Bedingt durch diese neuen Erkenntnisse wurden in den folgenden Jahren umfangreiche Forschungen initiiert, um die Funktion von lymphozytären POMC und seinen Spaltprodukten in Bezug auf Infektionen und Schmerzübertragung zu erforschen [18,76,77].

Eine Studie von Spies et al. 2003 [66] wies nach, dass die Basiswerte von POMC mRNA in den Lymphozyten von chronischen Alkoholkranken im Gegen-

satz zu Nichtalkoholkranken deutlich erhöht sind. Das bedeutet, dass Alkoholkranken eine

deutlich veränderte neuroendokrine Immunachse bereits vor der i.v. hCRF-Gabe hatten und dass das Immunsystem dieser Patientengruppe nicht in der Lage war, durch die Produktion von mRNA POMC in den Lymphozyten wieder ein Gleichgewicht herzustellen. Obwohl die veränderte Wirkungsweise der HPA bei chronischem Alkoholmissbrauch und die potentielle Möglichkeit der Lymphozyten zur Produktion von POMC und den daraus resultierenden Hormonen bekannt sind [5], existieren keine Daten über die Veränderung der POMC Genexpression der Lymphozyten während endogen oder exogen induziertem Stresses.

1.1 Alkoholmissbrauch

Chronischer Alkoholkonsum ist mit einem vielfach höheren Risiko an negativen physiologischen und pharmakologischen Nebenwirkungen verbunden, er führt häufig zu Karzinomerkrankungen [2]. Seitz et al. stellten bei einer Untersuchung von Patienten auf Normalstationen, die an Karzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes erkrankt waren, eine Prävalenz des Alkoholmissbrauches von bis zu 92 Prozent fest [69]. Weiterhin übt Ethanol einen direkten toxischen Effekt auf den Stoffwechsel der Leber und des Immunsystems aus, sodass im Endstadium der Lebererkrankungen als ultima ratio eine Transplantation notwendig wird [4]. Der Anteil der Patienten mit Karzinomen, die einen chronischen Alkoholkonsum aufwiesen, betrug auf Intensivstationen 55 Prozent [70]. Diese Situation führte seit Ende der 1980er resp. Anfang der 1990er Jahre verstärkt zu einer Untersuchung der Folgen von Alkoholmissbrauch auf das Immunsystem [89], denn Alkohol unterdrückt eine Vielzahl von Vorgängen, die mit T-Zellen verbunden sind. Einige davon sind: Zellwanderung (lymphocyte migration), Zellbindung (cell to cell adhesion) und die Aktivitäten der Membran-Enzyme. Auch wird die Weitergabe von Signalen verhindert. Dies führt wiederum zu einer Veränderung der Immunleistungsfähigkeit. Auch werden die Mobilität, ebenso die phagozytische Fähigkeit von Monozyten und Makrophagen reduziert. [90] So kann summiert werden, dass chronischer Alkoholmissbrauch zu einer Herabsetzung des Immunsystems und zu einem erhöhten Infektionsrisiko führt [52,75].

1.2 Immunsystem

Das Immunsystem des menschlichen Körpers ist kein in sich abgeschlossenes Organ, sondern verschiedene körperliche Instanzen sind an der Steuerung und Modulation dieses Systems beteiligt. Es besteht aus einer Struktur von ineinander greifenden Mechanismen, die sich aus Leukozyten, löslichen Proteinen und Organen zusammensetzen. Das Immunsystem bildet das Abwehrsystem des Körpers, das Krankheitserreger, körperfremde Stoffe oder entartete körpereigene Zellen erkennt und bekämpft.

Voraussetzungen der Regulation und Modulation des Immunsystems sind Verarbeitungszentren und Regelkreise des Körpers, die Informationen an das Abwehrsystem senden. Zur Aufnahme und Verarbeitung dieser Informationen benötigt das Immunsystem adäquate Einrichtungen. Bisherige Ergebnisse legen nahe, dass das neuroendokrine System und die HPA-Achse einen regulierenden und modulierenden Einfluss auf das Immunsystem ausüben [16,23]. Die gegenseitige Beeinflussung von Immunsystem und neuroendokrinem System setzt voraus, dass geeignete Informationsträger im Körper vorhanden sind [11].

Hierbei ist vor allem ACTH zu nennen, das seit 1961 [34] bekannt ist. Die Ausschüttung des Hormons wird über das Corticotropinreleasinghormon (CRH) gesteuert. Die Synthese und Sekretion sind eng mit der des melanocytenstimulierenden Hormons MSH und der β -Endorphine gekoppelt, da diese Hormone sich aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül, dem Proopiomelanocortin (POMC) ableiten [100]. Lange wurde angenommen, dass die Sekretion neuroendokriner Hormone ausschließlich in Geweben wie der Hypophyse und der Epiphyse stattfindet. Seit Lacaze-Masmonteil et al. 1987 [47] und DeBold et al. 1988 [24] mRNA des POMC in Thymus, Hoden, Gewebeextrakten und Tumoren im Menschen nachweisen konnten, ist diese These vielfältiger Kritik ausgesetzt. Zusätzlich wurde Ende der 1970er Jahre die Produktion von ACTH und endorphinähnlicher Substanzen in Leukozyten des Menschen nachgewiesen [11,76].

1.3 Stressachse

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt haben sich zwei Schulen in der Stressforschung etabliert. Die interaktionistischen, handlungspsychologischen Ansätze berücksichtigen besonders interindividuelle kognitive Unterschiede der Stressbewältigung [48]. Dagegen versteht Levi [50] unter Stress eine gemeinsame Reaktionsform des Organismus auf Belastungen, die eine Störung des dynamischen Gleichgewichts der psychischen, biologischen und physiologischen Reaktionsabläufe bewirken kann. Die vorliegende Untersuchung beruht auf der Stressdefinition von Levi.

In den letzten Jahren häuften sich die Hinweise für eine Schlüsselrolle endogener Opiate bei der Vermittlung der stressinduzierten Analgesie. Zu zahlreichen Arbeiten, bei denen eine Erhöhung der β -Endorphinspiegel unter länger dauernder starker Muskelarbeit beschrieben wird, demonstrieren einige Arbeiten die gleichzeitige Erhöhung der Schmerzschwelle [13]. Es zeigt sich, dass unabhängig von Art und Angriffsort multiple Formen von Stress zu einer Modulation der Stresswahrnehmung führen. Im Tierversuch sind Nahrungsentzug, Isolierung, Immobilisation [42], der Kalt-Wasser-Schwimmtest [61], Hitzeexposition, aber auch Schmerzreize [14, 25] häufig benutzte Stressoren, die eine Hypoanalgesie auslösen. Beim Menschen kann ebenfalls nachgewiesen werden, dass verschiedene Formen von Stress die Schmerzantwort herabsetzen [31]. Auf der anderen Seite unterstützen bisherige Studien die These von der Existenz eines endogenen Schmerzkontrollsystems auf der Basis endogener Opiate, welches mittels verschiedener Reize stimuliert werden kann [35].

Alkoholmissbrauch stellt ebenfalls einen äußeren Stressfaktor im menschlichen Organismus dar und aktiviert die Hypothalamisch – Hypophysär – Adrenale Stressachse und damit auch relativ zur Alkoholmenge die Ausschüttung des ACTH-Hormons [91]. Das Operationstrauma fördert die Stressantwort bei Alkoholkranken und führt so zu einer Herabsetzung des Immunsystems, geringer hämostatischer Funktionen und einer erhöhten Belastung des Herzens. All diese Faktoren führen wahrscheinlich auch zu einem erhöhten Sterberisiko nach Operationen [89]. Ebenso konnten diese Veränderungen der Stressantwort mit kardiovasku-

lärer Insuffizienz, Suchtverhalten und postoperativen Infektionen sowie neuroendokrinen Stoffwechselstörungen [72,91] in Verbindung gebracht werden.

Obwohl bereits ein breites Wissen über die Funktionen der HPA-Achse besteht, gibt es heute noch große Wissenslücken über die Eigenschaften und Funktionen der an dem Regelmechanismus beteiligten Substanzen [30]. Wichtige Bindeglieder in der Hypothalamisch – Hypophysär – Adrenalen Stressachse (HPA) sind das Cortikotrope Releasing Hormon (CRH), das Prohormon Proopiomelanokortin (POMC) und dessen Produkte Adrenokorticotrope Hormon (ACTH), MSH und β -Endorphin.

1.3.1 CRH

Unter Stress kommt es zur Erregung hypothalamischer Regionen und damit zunächst zur Ausschüttung von CRH. Der Hypothalamus wird seinerseits von übergeordneten Hirnabschnitten im Limbischen System beeinflusst. Man kann davon ausgehen, dass psychosoziale Stressoren eine hypothalamische CRH-Freisetzung primär durch limbische Aktivierung einleiten [55].

CRH wurde zuerst von Vale et al. (1981) [93] beschrieben. Es hat eine Peptidstruktur mit 41 Aminosäuren. Verschiedene Neurotransmitter - einschließlich Acetylcholin, Serotonin und Katecholamine - sind in der Lage, die CRH-Produktion zu stimulieren [56]. Das Hormon wird vorwiegend, aber nicht ausschließlich im Nucleus paraventricularis der Hypophyse synthetisiert und dann nach axonalem Transport an ein Kapillarnetz im Hypophysenstil abgegeben. Danach wird es weiter über ein Pfortadersystem zur Adenohypophyse geleitet. CRH ist der physiologische Releasing-Faktor für die Proopiomelanokortinfreisetzung und der daraus resultierenden Peptide β -Endorphin und ACTH-Ausschüttung an der Hypophyse. Zusätzlich zu einer hypophysären Wirkung besitzt CRH eine weitere extrahypothalamische Verteilung im ZNS [86]. Ob es dabei ebenfalls primär in hypothalamischen Regionen produziert und dann intrazerebral durch neuronalen Transfer verbreitet wird, ist noch nicht geklärt. Zentral appliziert, produziert CRH ein großes Spektrum von Effekten, die den unter Stress beobachteten biologischen Reaktionen entsprechen: (1) Autonome und metabolische Effekte: Stimu-

lation von Adrenalin, Noradrenalin und Glukagon, Regulation der Energiebilanz und des Körpergewichtes. (2) Cardiovasculäre Effekte: Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdruckes und der Herzfrequenz [37]. CRH besitzt somit eine funktionale Bedeutung als Neurotransmitter resp. Neuromodulator. Es spielt eine integrative Rolle in der Stressantwort des Organismus. In seiner teilweise regulativen Funktion des autonomen Nervensystems steht es als Stresshormon noch über den Katecholaminen. Hinsichtlich der Bedeutung von CRH im Prozess der stressvermittelten Analgesie konnten erstmals Hargreaves et al. (1987) [32] fundamentale Zusammenhänge nachweisen. Durch intravenöse Gabe von CRH provozierten Sie sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen eine Analgesie.

Von Fehm et al. stammen Hinweise für eine mögliche direkte periphere Wirkung von CRH (neben der zentralen und hypophysären). Bei Patienten mit nachgewiesener Defizienz der Hypophyse wurde zunächst die funktionelle Atrophie der Nebennieren durch Gabe von ACTH aufgehoben. Nach einer Applikationspause des ACTH erfolgte nun die Stimulation mit CRH. Hier zeigte sich ein Anstieg des Plasma-ACTH und auch von Cortisol. Beta-Endorphin wurde bei diesen Untersuchungen nicht gemessen. Falls periphere Pools von ACTH existieren, wird deren Freisetzung wahrscheinlich auch über POMC als Prekursormolekül vermittelt, evtl. mit gleichzeitiger β -Endorphinfreisetzung. Jahn et al. fanden 2002 heraus, dass unterschiedliche Formen von CRH mit unterschiedlichen Aufgaben existieren. So ist CRH-1 mit verantwortlich für die Lernkompetenz und CRH-2 eher für ein ängstliches Verhalten [38, 65].

1.3.2 ACTH

ACTH wird in den basophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens unter dem Einfluss des Corticotropin-Releasing-Hormons (CRH) aus dem Hypothalamus gebildet. Es regt die Nebennierenrinde zur Synthese von Glukokortikoiden an und nimmt indirekt Einfluss auf die Produktion von Insulin. Die ACTH-Ausschüttung unterliegt einem zirkadianen Rhythmus. Die ACTH-Produktion oder ACTH-Ausschüttung kann bei verschiedenen Erkrankungen gestört sein. Erhöhte ACTH-Werte ergeben sich u.a. auch bei Kälte oder Stress.

Bei alkoholabhängigen Individuen wird eine Veränderung der HPAA beschrieben, so sind die Basiswerte für ACTH signifikant höher als bei Nicht-Alkoholikern, die Cortisolwerte sind unverändert oder weisen erhöhte Basiswerte auf [7,28,65]. Die Veränderung dieser Funktionen der Stressantwort könnte mitverantwortlich für die erhöhte postoperative Komplikationsrate [89] sein. Im Gegensatz zur stimulierenden Aktivität von Ethanol in hypothalamischen Neuronen auf die POMC-Genexpression, steht die hemmende Wirkung chronischer Ethanolexposition auf Zellen der Hypophyse bei Ratten. [58,97]. Ebenso wurden unterschiedliche Basiswerte für die POMC-Genexpression bei chronischem Alkoholkonsum versus einer Vergleichsgruppe festgestellt, wobei die Basiswerte bei der alkoholkonsumierenden Population jene der Vergleichsgruppe um das Doppelte überstiegen [98]. Dies demonstriert die unterschiedlichen Effekte, die durch Ethanol im Gehirn hervorgerufen werden können.

1.3.3 POMC

1.3.3.1 Funktion von POMC

Bereits 1989 haben Buzetti et al. zeigen können, dass PBMC ACTH-LIR produziert, welches als Modulator auf Lymphokine einwirkt und dem adrenalen Gland signalisiert, Glukokortikoide abzusondern. Weiterhin wird vermutet, dass POMC abgeleitete Peptide, die von Immunzellen produziert werden, eine Rolle spielen unter pathologischen Bedingungen wie einem septischen Schock [17].

Eine der bis heute heftig diskutierten Fragen betreffen die Expression der POMC mRNA und ihrer relevanten Peptide in Zellen, die zur Abwehr von Fremdkörpern zuständig sind. Mehrere Untersuchungen haben ergeben, dass nicht nur PBMC Zellen, sondern auch Zellen der Haut POMC abgeleitete Peptide absondern [43, 44, 45, 17, 79]. Eine Studie von Woundenberg et al., die lymphatische Zellen im Blut untersuchte, kam zu einem gegenteiligen Ergebnis [94]. Allerdings wurden damit die vorherigen Ergebnisse nicht widerlegt, wenn man bedenkt, dass nur 2% der gesamten menschlichen lymphatischen Zellen im Blut enthalten sind [96]. Die physiologischen Funktionen dieser Peptide, vor allem ACTH und β -Endorphin konnten bisher noch nicht vollkommen bestimmt werden [83].

Neuere Forschungen bestätigen die Hypothese, dass CRH und POMC lokal in der Haut produziert werden und sowohl durch Entzündungsmediatoren, als auch durch autokrine Mechanismen gesteuert werden. Im Raum steht die Frage nach einem lokalen System der Stressantwort der Haut, das als Äquivalent zur HPA-Achse durch CRH und POMC abgeleitete Hormone gesteuert wird [46].

1.3.3.2 Aufbau von POMC

Das Gen des Prohormons POMC ist im haploiden Chromosomensatz des Menschen nur einmal vorhanden [27,47]. Es hat eine Länge von 7665Bp und weist in der Ausrichtung 5'-3' folgende Struktur auf: Exon 1 (86 Bp) – Intron A (3708Bp) – Exon 2 (152Bp) – Intron B (2886Bp) – Exon 3 (833Bp). Das 5' - Ende wird von einer 680Bp langen, das 3'-Ende von einer 313Bp langen Sequenz flankiert [87]. Das zweite Exon enthält die Information des Startcodons AUG der mRNA für die Initiation der Translation des POMC [21]. Zudem beinhaltet es die für das Signalpeptid des Prohormons POMC codierende Nukleotidsequenz [20]. Das dritte Exon enthält den größten Teil der Informationen des POMC und seiner Endprodukte [26,39].

Die Transkription dieses Gens führt zu der aus ca. 1200Bp bestehenden mRNA [20]. Die der Transkription folgende Translation beginnt am Startcodon AUG der mRNA und führt zu dem Vorläufermolekül POMC (MG 31000). Das N-terminale Signalpeptid hat eine essentielle Bedeutung für den Eintritt des Peptids in das Endoplasmatische Retikulum (E.R.) und in die Vesikel [20,85]. Es wird noch während der Translation – bei Eintritt des Peptids in das E.R. von den restlichen Aminosäuresequenzen entfernt [85,20]. Der Transport des Peptids in das E.R. und damit die Sekretion des Prohormons POMC und seiner Endprodukte ist unwahrscheinlich, wenn dieses Signalpeptid fehlt [20].

Neben der Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids wird das Produkt der Translation des POMC in vielerlei Schritten verändert. Dies geschieht einerseits im E. R. und im Golgi-Apparat. Andererseits wird das erwähnte Peptid auch in den Sekretionsvesikeln bearbeitet. Nach Smith und Funder (1988) [85] ist es wahrscheinlich, dass sowohl die Aufspaltung des Produkts der Translation durch

Endo- und Exopeptidasen, als auch die α -Amidation und die Acetylierung des Peptids in den erwähnten Vesikeln stattfinden. Nach der Translation führt die Bearbeitung des Prohormons POMC in Abhängigkeit vom jeweiligen Gewebe zur Freisetzung verschiedenster Endprodukte [85].

2 Ziele der Arbeit

Als Hypothese wird angenommen, dass sich bei abstinenten Alkoholkranken eine durch Stress induzierte höhere POMC-Expressionsrate in den Leukozyten als bei Nichtalkoholkranken findet. Durch die höhere POMC-Expressionsrate wird weniger β -Endorphin gebildet. Bei einer geringeren β -Endorphin-Synthese ist das Schmerzempfinden höher und die Komplikationsrate nach einer Operation steigt ebenso an.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Immunlage und -reaktion hinsichtlich der POMC-Genexpression von Lymphozyten während endogen und/oder exogen induzierte Stresses, um so eine mögliche Erklärung für die erhöhten Komplikations- und Infektionsraten der chronisch erkrankten Patienten über die Stressachse des Proopiomelanokortins, sowie der von POMC abgeleiteten Peptide zu finden.

3 Material und Methoden

Um die eingangs genannten Ziele zu erreichen, wurde folgender Studienaufbau konzipiert: Das untersuchte Patientenkollektiv setzte sich aus insgesamt 34 Probanden zusammen, darunter 13 Patienten nach Herztransplantation (Htx) und 21 Patienten in der Evaluationsphase zur Lebertransplantation (Ltx). Von den 13 Htx-Patienten konnten sieben als chronisch alkoholabhängig und sechs als nicht alkoholabhängig identifiziert werden. Bei den 21 Ltx-Patienten hatten 13 eine alkoholbedingte Leberzirrhose und acht eine virusinduzierte Zirrhose. Diese beiden Patientengruppen (Htx; Ltx) wurden jeweils nach gleichem Versuchsaufbau einem exogenem Stresstest (CRH – Zufuhr von außen) und/oder einem endogenem (SPASS-Test) Stresstest unterzogen. Wobei je zwei Basiswerte vor Stressintervention und fünf Verlaufswerte nach der Intervention gemessen wurden.

3.1 Alkoholismusorientierte Diagnostik

Die alkoholismusrelevante Diagnostik erfolgte präoperativ. Grundsätzlich existieren drei wesentliche Verfahrensweisen zur alkoholismusbezogenen Anamnese. Zum einen die Einordnung mit Hilfe von ICD10- bzw. DSM-IV-Kriterien, zum anderen Screening-Verfahren und drittens Laboruntersuchungen. In der Vergangenheit konnten mehrere Studien nachweisen, dass sich Screening-Verfahren, also direkte, auf Selbstaussagen beruhende Fragebogenverfahren, gegenüber klinischen Tests bewährt haben [10]. Ebenso weisen sie bessere Gütekriterien gegenüber Laborparametern [1] und indirekten Fragebogenverfahren auf, welche den Alkoholkonsum und dessen Folgen nicht thematisieren [33]. In der vorliegenden Studie wurden die DSM-IV-Kriterien und als Screening-Verfahren der CAGE-Fragebogen zur Bestimmung der Alkoholabhängigkeit zugrunde gelegt.

3.1.1 Screening-Verfahren

Screening-Verfahren, also Fragebogenverfahren, die auf direkten Selbstaussagen beruhen, haben sich trotz der Möglichkeit zur Verfälschung als valide bewährt. Die entsprechenden Verfahren weisen bessere Gütekriterien auf als klinische Tests

[10], als Laborparameter [1,9] und indirekte Fragebogenverfahren, welche den Alkoholkonsum und dessen Folgen nicht thematisieren [33,67]. Eine Ausnahme liegt vor bei Unfallpatienten, bei denen eine Laboruntersuchung sinnvoller ist [62], da bedingt durch Traumata eine Selbstaussage unmöglich wird. Ein Teil der Verfahren ist auf die Identifizierung von Alkoholabhängigkeit und -missbrauch ausgerichtet. Dazu gehören zum Beispiel DSM-IV-Kriterien und der CAGE-Test. Die Patientenanamnese in Bezug auf Alkoholmissbrauch wurde durch die Befragung der Patienten mit Hilfe des CAGE-Fragekatalogs [29] und einer psychologischen Evaluation erhoben. Der frühere Alkoholkonsum jedes einzelnen Patienten wurde dokumentiert und die Diagnosekriterien für Alkoholabhängigkeit und Alkoholmissbrauch wurden gemäß des Diagnostischen und Statistischen Handbuchs Psychischer Störungen der Amerikanischen Psychiatrischen Vereinigung 1991 (DSM-IV) rückblickend angewandt. Die Patienten mussten mindestens sechs Monate abstinent sein, um für eine Lebertransplantation vorgesehen zu werden und Aufnahme in diese Studie zu finden (Garner et al. 1988).

3.1.2 Der CAGE-Fragebogen

Obwohl in den letzten Jahren Bemühungen stattgefunden haben, den gesundheitsgefährdenden Alkoholkonsum in Abhängigkeit, Missbrauch und in Risikokonsum [6] zu differenzieren, hat der CAGE-Test, der auf die Identifizierung von Abhängigkeit und Missbrauch ausgerichtet ist, nichts von seiner Gültigkeit verloren.

Bei diesem Test wird jede Frage mit einem Punkt bewertet. Die maximal erreichbare Punktzahl beträgt vier. Ab einem Wert von zwei ist eine Gefährdung durch Alkohol sehr wahrscheinlich.

Der CAGE-Test beinhaltet folgende Fragestellungen:

- ✦ Haben Sie jemals versucht ihren Alkoholkonsum zu reduzieren (**cut down**)?
- ✦ Haben Sie sich jemals über die Kritik der Umgebung an ihrem Trinkverhalten geärgert (**annoyed**)?

- ✘ Hatten Sie jemals Schuldgefühle wegen ihres Alkoholkonsums (**felt guilty**)?
- ✘ Haben Sie jemals am Morgen Alkohol getrunken um richtig leistungsfähig zu werden oder Entzugssymptome zu vermeiden (**eye opener**)?

3.2 Patienten

Diese Studie wurde in der Universitätsklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Charité - Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Die Genehmigung der Ethikkommission der Humboldt Universität wurde für die Untersuchungen erteilt. Aus einer Anzahl von ca. 100 Patienten wurden nach einem Auswahlverfahren insgesamt 34 Patienten ausgesucht. Patienten, bei denen keine eindeutige Ursache für die Leberzirrhose festgestellt werden konnte, als auch Patienten, die zum Beginn der Studie noch alkoholabhängig waren und einen BMI unter 20kg/m^2 aufwiesen, wurden nicht aufgenommen. Außerdem konnten Patienten nicht eingeschlossen werden, die 14 Tage vor Studienbeginn eine Infektion aufwiesen oder die den HIV-Virus in sich trugen. Auch Patienten unter 18 Jahren wurden nicht aufgenommen.

Für die Teilnahme an der Studie mussten die Patienten folgende Kriterien erfüllen: Elektive Herztransplantation oder Lebertransplantation, keine Anzeichen einer alkoholischen Intoxikation im Sinne der DSM-IV-Kriterien oder Entzugssymptome anhand des „Clinical Institute Withdrawal Assessment for Alcohol Scale“ (CIWA-Ar <10) [52,63]. Alle ausgewählten Patienten gaben ihre schriftliche Einwilligung für die Durchführung der Studie.

3.2.1 Gruppeneinteilung abstinent alkoholabhängig / nicht alkoholabhängig

Die Patienten wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Basischarakteristika aller Patienten wie Größe, Gewicht und Geschlecht, wurden dokumentiert und verglichen. Folgende Bedingungen mussten für Aufnahme in die Gruppe der alkoholkranken Patienten erfüllt sein:

1. Alkoholkonsum von 60g oder mehr pro Tag während der letzten 12 Monate vor der Abstinenz.
2. Positive DSM-IV-Kriterien [15]

Patienten, die nicht die DSM-IV-Kriterien erfüllten, ohne Alkoholanamnese waren oder einen Alkoholkonsum von <20g/d aufwiesen, wurden als Nicht-Alkoholranke klassifiziert.

3.2.2 Gruppeneinteilung Ltx

Leberzirrhose wurde durch Sonographie, CT der Bauchhöhle und/oder Biopsie der Leber sowie der klinischen Parameter festgestellt. Patienten, deren Leberzirrhose nicht eindeutig einer Ursache zugeordnet werden konnte oder Patienten, deren Diagnose sowohl eine alkoholbedingte Leberzirrhose als auch eine virusinduzierte Zirrhose war, wurden nicht in die Studie aufgenommen.

Sechs Patienten mit virusinduzierter Zirrhose hatten eine positive Serologie auf Hepatitis C und zwei auf Hepatitis B. Der Befund Hepatitis C wurde anhand von Antikörpern (anti-HCV-IgG und HCV-RNA) im Serum diagnostiziert, das durchschnittlich mit 1.087.490IU/ml (650.523-7.800.500) belastet war. Die quantitative Bestimmung der HBV-DANN wurde durch den Roche Monitor Amplicor Test (Indianapolis, IN) durchgeführt; HBsAg wurde durch einen Enzym Immunoassay ermittelt.

3.3 Protokoll der Blutentnahme und Stresstestung

Die Blutentnahmen erfolgten präoperativ, mindestens 24 Stunden vor Narkoseeinleitung. Ab Beginn der Stresstestung bis zu ihrem Ende wurden die Patienten flach gelagert. Die Patienten erhielten gegen sieben Uhr eine venöse Verweilkanüle. Gegen 8.00 Uhr und 10.30 Uhr vor der Stresstestung erfolgte eine Blutentnahme. Die beiden ersten Werte bildeten den Basalmesswert. Um 10.30 Uhr erfolgte eine endogene bzw. exogene Stressintervention.

Das intravenös applizierte CRH wurde von allen Probanden gut toleriert. Zu den häufigsten Symptomen nach Hormongabe zählte bei ca. 80 Prozent ein Wärmegefühl, was nach ca. ein bis drei Minuten zunächst im Stirnbereich einsetzte, sich dann meist auf weitere Teile des Kopfes ausbreitete und vier bis fünf Minuten anhielt. Fast alle Patienten reagierten mit einem Flush des Gesichtes, welcher maximal 45 Minuten zu beobachten war. Es existierte keine Verbindung zwischen dem subjektiven Ausprägungsgrad dieser Symptome und der Zugehörigkeit zu einer der untersuchten Gruppen.

Der präoperative endogene Stresstest [28] ist in drei Teile aufgeteilt. Der erste Teil besteht aus Rechenaufgaben, die der Patient während der gesamten Dauer von fünf Minuten lösen muss (aktiv psychologischer Test). Der zweite Teil besteht aus lauten Hintergrundgeräuschen, die aus Alarmsignalen von Einsatzfahrzeugen der Polizei, Feuerwehr oder Krankenwagen bestehen (passiv psychologischer Test). Der letzte Teil besteht aus dem Eintauchen des Patientenfußes in acht Grad Celsius kaltes Wasser für drei Minuten (Kältestress).

Der präoperative exogene Stresstest besteht aus einer intravenösen CRH-Gabe. Hierfür wurde CRH der Firma Ferring (100µg in 5ml 0,9 prozentiges NaCl) über 30 Sekunden gegeben. Nachdem um 10.30 Uhr vor der Stresstestung eine Blutabnahme, gleich anschließend um 10.30 Uhr die Stresstestung erfolgte, wurden weitere Blutabnahmen um 10.40 Uhr, 11.00 Uhr, 12.00 Uhr, 13.00 Uhr und 14.00 Uhr vorgenommen.

Tabelle 1: Blutentnahmen.

Blutentnahme	1	2	0	3	4	5	6	7
Uhrzeit	08:00	10:30	10:35	10:40	11:00	12:00	13:00	14:00

Pro Messzeitpunkt wurden zwei 5ml EDTA-Röhrchen abgenommen, die anschließend separat aufgearbeitet wurden. Für den Transport ins Labor wurden die Blutproben auf Eis gelegt.

3.4 Proopiomelanokortin-Ribonucleinsäure (POMC-mRNA)-Bestimmungen

3.4.1 RNA Gewinnung

Die RNA-Gewinnung geht wie folgt vonstatten: In einem ersten Schritt wurden unter Zugabe von 9ml RBCL-Puffer die Erythrozyten lysiert und bei 1400 U/min für fünf Minuten von den intakten Leukozyten abzentrifugiert. Dieser Arbeitsgang wurde drei bis viermal wiederholt. Das am Boden befindliche Pellet wurde vom Überstand separiert. Das Pellet wurde in einem nächsten Schritt mit 900µl Guanidin-Isothiocyanat-Puffer (GTC) versetzt: Das Leukozyten-GTC-Gemisch wurde gelöst und 7µl Mercaptoethanol hinzugegeben. Bis zur RNA-Extraktion wurde das so gewonnene Gemisch bei minus 80 Grad Celsius tiefgefroren.

Zur RNA-Isolierung wurden die aufgetauten Proben mit 450µl Phenol, 450µl Chloroform sowie 90µl zweimolarem Natriumacetat gemischt, zwei Minuten gevortext und 15 Minuten auf Eis gestellt, danach bei 12.000 U/min für 20 Minuten zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen mit 900µl Isopropanol gemischt und für eineinhalb Stunden bei minus 80 Grad Celsius zur Fällung gebracht. Erneut wurde mit 12.000 U/min 15 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das sich am Boden befindliche Pellet wurde nochmals mit 600µl GTC-Lösung sowie 600µl Isopropanol und 60µl zweimolarem Na-Acetat versetzt, fünf Minuten gevortext und für 12 Stunden bei minus 80 Grad Celsius gefällt. Wieder wurde zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet nun zweimal mit 200µl 75-prozentigem (v/v) DEPC-Ethanol gewaschen. Bei Raumtemperatur wurden die Proben zehn Minuten vakuumgetrocknet (Vakuum bis auf 0,05 bar; Firma/Gerät: Christ beta 1-8k).

Das getrocknete Pellet wurde mit 60µl DEPC-Wasser gelöst und nun zur vollständigen Elimination noch vorhandener DNA-Kontaminationen einem DNA-Verdau durch DNase 1 unterzogen (DNA-free™ von Ambion Austin/USA; Behandlung nach Angaben des Herstellers). Der RNA Gehalt der Proben wurde bei 260nm, die Reinheit der RNA bei 280nm gemessen. 1µg der so gewonnenen Patienten-RNA wurden ohne Reverse Transkription zur Überprüfung auf DNA-

Kontamination in eine PCR mit den spezifischen POMC-Primern eingeschleust und anschließend auf einem 2,5-prozentigen Agarosegel untersucht (Gellaufzeit: 2,5h; Spannung: 80mV). Stichprobenartig wurden zum Ausschluss einer RNA-Degradierung (Kontrolle der RNA-Qualität) 5µg RNA auf einem 1,5-prozentigen RNA-Agarosegel untersucht (Abbildung 1).

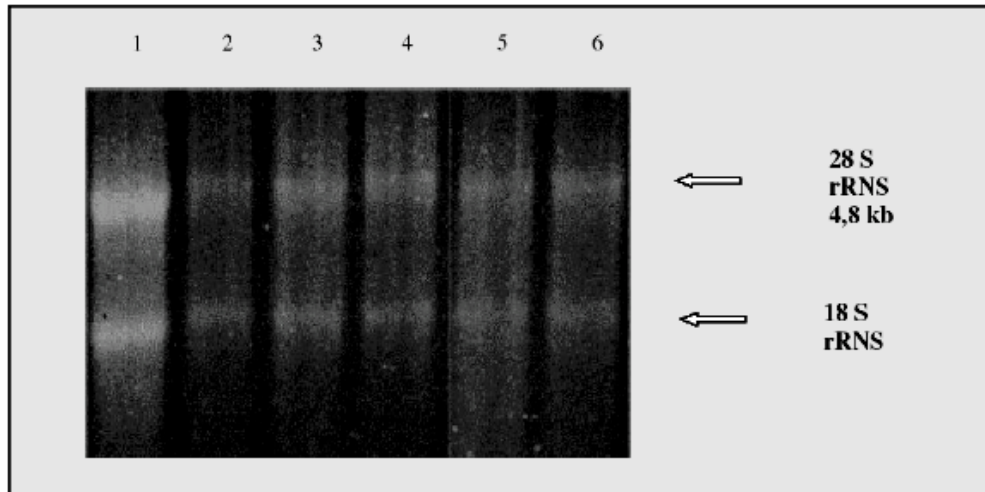


Abbildung 1: RNA-Agarosegel

Deutlich sichtbare 18-S- und 28-S-rRNS-Banden (Pfeile) der Leukozyten-RNA auf einem 1,5-prozentigen Agarosegel mit 3,3 Prozent Formaldehyd. Bahn1: RNA-Standard aus Neuroblastomzell-RNA; Bahnen 2 bis 6 Leukozyten-RNA. Laufzeit 2,5h bei 5 V/cm.

3.4.2 Zubereitung der Standards und Erstellung einer Eichkurve

3.4.2.1 Linearisierung der Plasmidstandards

Exon 3 der POMC-Sequenz wurde als Wildtyp-Standard (1924) und als mutierter Standard (P8), mit einer Punktmutation an bekannter Stelle (Position 7797 der publizierten Sequenz; C-G Austausch), beide als cDNAs in Plasmid pT7/T3D-Pac (Pharmacia) bzw. pBluescript KS (Stratagene) in E.-coli-K12 (Stamm DH5) vermehrt. E.Coli-Anzucht und DNA-Isolierung erfolgte nach Standardmethoden durch alkalische Lysis der Zellen [5]. Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA wurde ein Säulen-Adsorptionssystem von Qiagen (Qiagen Plasmid Maxi Kit) ein-

gesetzt. Für die spätere in-Vitro-Herstellung der RNA durch Phagen-RNA-Polymerasen aus den beiden Plasmiden war es erforderlich, diese zunächst zu linearisieren:

Tabelle 2: Linearisierungsansatz Wildtyp-DNA (IMAGp998M101924).

Linearisierungsansatz Wildtyp-DNA	Zugabe Vol.: (µl)
Plasmid-DNA (=6µg)	x
Not 1 (Restriktionsenzym)	1
Restriktions-Puffer D	4
BSA	0,4
Nucleasefreies Wasser	Y

Tabelle 3: Linearisierungsansatz Mutierte DNA (pBSP8).

Linearisierungsansatz Mutierte DNA	Zugabe Vol.: (µl)
Plasmid-DNA (=6µg)	x
Eco R1 (Restriktionsenzym)	8
Restriktions-Puffer H	4
Nucleasefreies Wasser	Y

Beide Linearisierungsansätze wurden für sechs Stunden bei 37 Grad Celsius inkubiert. Die kleinvolumigen Linearisierungsansätze wurden für die anschließende Phenolextraktion mit 160µl DEPC-Wasser aufgefüllt. 200µl Phenol und 20µl dreimolares Na-Acetat wurden pro Ansatz zugegeben, für fünf Minuten gevortext, 15 Minuten auf Eis gelagert und anschließend bei 12.000 U/min 20 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit dem 2,2-fachen Volumen 100-prozentigen (v/v) Ethanol zur Fällung gebracht. Wie bei der Isolation der Gesamt-Blut-RNA erfolgten Zentrifugation, zweifache Waschung des Pellets und im Anschluß eine 10-minütige Vakuumtrocknung (Vakuum bis auf 0,05 bar).

Das getrocknete Pellet wurde erneut mit einigen μl DEPC-Wasser versetzt, so dass sich eine Konzentration von $0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ergab. Zur Kontrolle wurde für beide Standards jeweils $1\mu\text{g}$ des linearisierten Plasmids neben dem ursprünglichen nicht linearisierten Plasmid auf einem 1,5-prozentigen Agarosegel untersucht (Abbildung 2).

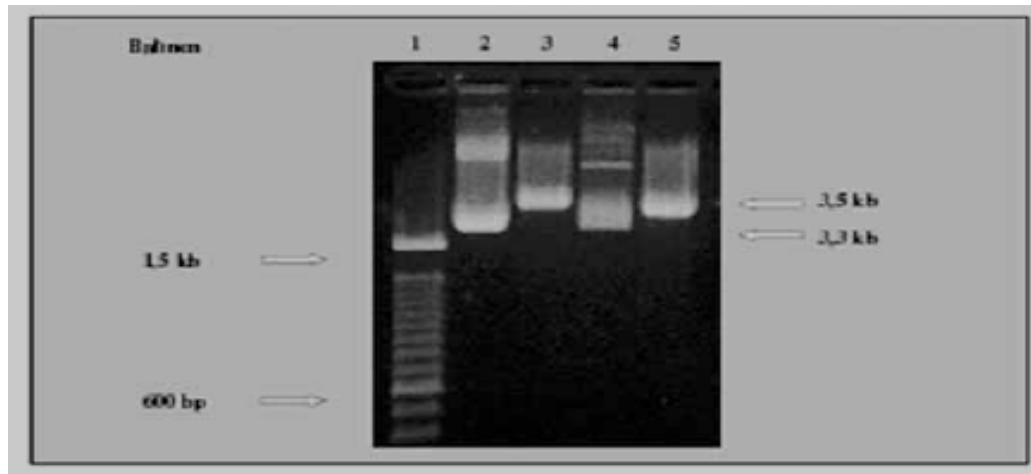


Abbildung 2: Elektrophorese nach Plasmidlinearisierung.

Linke Bahn (1): DNA-Leiter; Bahn 2.: Wildtyp-DNA in pT7/T3-Pac (Plasmid 1924) in ringförmiger Form, ungeschnitten, daneben nach Linearisierung mit dem Restriktionsenzym Not I (Bahn 3); Bahn 4: Mutierte POMC-Variante in p Bluescript (P8) in ursprünglicher ringförmiger Form, daneben nach Linearisierung mit dem Restriktionsenzym Eco R1 (Bahn 5).

3.4.2.2 In-Vitro-Transkription (IVT)

Zur Herstellung ausreichend großer Mengen von Standard-RNA wurden die linearisierten Plasmide in eine In-Vitro-Transkription eingeschleust. Dabei fertigt eine spezifische (T3, T6 oder T7) RNA-Polymerase von der klonierten cDNA des linearisierten Plasmids RNA-Kopien. Spezifische Promotoren für die RNA-Polymerasen der verwendeten Plasmide sind dabei Startpunkte für den Transkriptionsstart. Die Schnittstelle gibt den jeweilige Transkriptionsstop vor, um eine de-

finierte Produktlänge zu gewährleisten (Phage RNA Polymerase Kit, Promega Inc., Madison, USA. Durchführung nach Anweisungen des Herstellers).

Tabelle 4: IVT-Ansatz der Wildtyp-POMC cDNA (Plasmid: IMAGp998M101924).

IVT-Ansatz der Wildtyp-POMC cDNA	Zugabe Vol.:
5 x Transkriptionspuffer	20 µl
100 mM DTT (Dithiothreitol)	10 µl
RNAsin	5 µl
ATP, GTP, CTP, UTP (je 2,5mM)	20 µl
Plasmid 1924 Not1 Linearisiert (0,5 µg/µl)	10 µl
T7 Polymerase	4 µl
Nucleasefreies Wasser	31 µl

Tabelle 5: IVT-Ansatz der mutierten POMC cDNA (Plasmid: pBSP8).

IVT-Ansatz der mutierten POMC cDNA	Zugabe Vol.:
5 x Transkriptionspuffer	20 µl
100 mM DTT (Dithiothreitol)	10 µl
RNAsin	5 µl
ATP, GTP, CTP, UTP (je 2,5mM)	20 µl
Plasmid P8 EcoR1 Linearisiert (0,5 µg/µl)	10 µl
T7 Polymerase	4 µl
Nucleasefreies Wasser	31 µl

Die Transkriptionsansätze wurden eineinhalb Stunden bei 37 Grad Celsius inkubiert. Die linearisierte Plasmid-DNA wurde anschließend einem DNase-Verdau unterzogen (DNA-free™ Removal Kit, Texas/USA; Anleitung nach Herstellerangaben), um so eine DNA-Kontamination für die folgenden Schritte auszuschließen.

Zur Aufreinigung der RNA-Standards wurden die Proben wie oben beschrieben erneut gefällt: Zunächst wurde der IVT-Ansatz mit DEPC-Wasser auf 100µl aufgefüllt, mit 10µl dreimolarem Natrium-Acetat und 200µl unvergälltem Ethanol versetzt, gevortext und über Nacht bei minus 20 Grad Celsius zur Fällung gebracht, zentrifugiert, gewaschen und anschließend vakuumgetrocknet. Die getrockneten Pellets wurden in 50µl DEPC-Wasser gelöst. Die RNA-Konzentrationen der IVT-Ansätze wurden bei 260nm photometrisch bestimmt und der Reinheitsgrad durch Messung bei 280nm und 320nm ermittelt. In einer Kontroll-PCR erfolgte der Nachweis auf vollständige Freiheit der RNA von DNA-Kontamination. Die Transkriptionsprodukte wurden direkt untersucht, indem 10µg RNA auf einem 1,5-prozentigen denaturierenden RNA-Agarosegel aufgetragen wurden (Abbildung 3).



Abbildung 3: 2,5%iges Agarosegel mit 4% Formaldehyd; Laufzeit: 3h bei 5V/cm.

Bahn eins zeigt einen Molekulargrößenstandard. Bahnen zwei und drei zeigen die in vitro transkribierte RNA des mutierten Standard P8 mit linearisiertem Plasmid (2), daneben nach DNase-Behandlung (3). Bahnen vier und fünf zeigen analog dazu den Wildtypstandard. Die RNA-Transkripte des mutierten Standards haben eine Größe zwischen 300 und 400bp. Die RNA des Wildtypstandards liegt mit ihrer Größe bei ca. 600 bp.

3.4.2.3 Reverse Transkription (RT)

Für die Anfertigung einer Eichkurve wurden zwei RNA-Standards aus mutiertem Standard und Wildtypstandard in folgendem Verhältnis gemischt:

Tabelle 6: Mischung zweier RNA-Standards: Wildtypstandard und mutierter Standard.

Wildtypstandard	:	Mutierter Standard
1	:	100
1	:	50
1	:	10
1	:	5
1	:	1
5	:	1

Die aus der IVT gewonnenen RNA-Standards sind nun zur Erstellung der Eichkurve in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen revers transkribiert worden. Jedes Verhältnis wurde in fünf Wiederholungen revers transkribiert:

Tabelle 7: Protokoll zur Durchführung der Reversen Transkription.

Protokoll zur Durchführung der Reversen Transkription	Zugabe Vol.:
First-Strand-Buffer	4 µl
0,1M DTT (Dithiothreitol)	2 µl
Hexanucleotidprimer(1µg/µl)	1 µl
Rnasin	1 µl
Gemisch aus dATP, dCTP, dTTP, dGTP (je 10 mM)	1 µl
RNA	x µl
Nucleasefreies Wasser	x µl
Reverse Transkriptase (Superscript TM ®)	1 µl

Zunächst wurde die Standard-RNA zusammen mit den Nucleotidtriphosphaten, dem nucleasefreien Wasser sowie dem Hexanucleotidprimer für zehn Minuten bei 70 Grad Celsius erhitzt (um Sekundärstrukturen der RNA aufzubrechen) und im Anschluss fünf Minuten auf Eis gekühlt. First strand buffer (Erststrangsynthesepuffer), Rnasin und DTT wurden zusammen mit der Reversen Transkriptase in einem nächsten Schritt dem Reaktionsansatz zugegeben, gevortext und eine Stunde bei 37 Grad Celsius inkubiert.

3.4.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zum quantitativen Nachweis der in vitro transkribierten POMC-mRNA durch PCR und zur Erstellung der Eichkurve des RT-Reaktionsansatzes aus den Standard-RNA-Verdünnungen sind 10 µl in einer PCR mit amplifiziert worden. Die Primer Sequenzen waren 5'-GTCTCAGCGGAAGACTGCG-3' für den sense Primer, analog zu den Nucleotiden 7698-7717 des menschlichen POMC Gens und biotin-5'-tcttgcccaccggettgcgcc-3' für den antisense Primer, der mit den Nucleotiden 7817-7837 korrespondiert (Abbildung 6). Das Biotin-Addukt des Primers

dient zur Anheftung an Streptavidin der Mikrotiterplatte während der Minisequenzierung (Abbildung 4).

```
Attcagtagactttggtcctgttcacaaaagctaggggtggctagatggctagaca
aaccatggaatgggaaggaagtgtgttcagttgcaggcagaagcatga
gggatgggacaaaagaggcggtggcaagatcttagatgcccacgagtgcca
gaaagcaggtgggcagacctgcctgtagggaggcctcgacgcttgacacgccc
gacactgtgccctgtgtcctcggcacgtggcgagggcgccagggccaggcgc
agtgacgggcgcgccagccgggcccgggtgccccggcagggctgccctcatg
ccctcgcgtcttccccaggagtgcacccgggacctgcaagcccacctctcggcc
gagactcccatgttcccgggaaatggcgacgagcagcctctgaccgagaacccc
cggaaagtagtcatgggccacttccgctgggaccgattcggccgcccgaacagc
agcagcagcggcagcagcggcgagggcagaagcgcgaggacGTCTC
AGCGGGCGAAGACTGCGGcccgetgcctgagggcggeccc
gagccccgcagcgatggtgccaagccgggcccGCGCGAGGGCAA
GCGCTCCTActccatggagcacttccgctggggcaagccgggtgggca
agaagcggcgcccagtgaaagtgtaccctaacggcgccgaggacgagtcggc
cgaggccttccccctggagttcaagagggagctgactggccagcgactccggga
gggagatggccccgacggccctgccgatgacggcgaggggcccaggccga
cctggagcacagcctgctggtggcgccgagaagaaggacgagggcccctac
aggatggagcacttccgctggggcagcccccccaaggacaagcgctacggcg
gtttcatgacctcagagaagagccagacgcccctggtgacgctgttcaaaaacgc
catcatcaagaacgcctacaagaagggcgagtgagggcacagcgggccccag
ggctacctccccaggaggtgacccccaaagcccccttgcctcctccctgcctgc
tgccgcctcccagcctggggggtcgtggcagataatcagcctcttaaagctgct
gtagttaggaaataaaaccttcaaatteacatccacctctgactttgaatgtaaacc
gtgtgaataaagtaaaaaatacgtagccgcaata
```

Abbildung 4: Exon 3 des humanen POMC Gens von Chromosom 2p2.

Sense Primer (fett) und Primer für das Solid Phase Minisequencing (fett & unterstrichen) sind in Großbuchstaben dargestellt. Der antisense Primer mit seiner korrespondierenden Basensequenz ist fett & kursiv dargestellt.

Die einzelnen PCR-Reaktionsansätze wurden nach folgendem Protokoll pipetiert:

Tabelle 8: Reaktionsansätze der PCR.

Reaktionsansätze der PCR	Zugabe Vol. (µl):
Nucleasefreies Wasser (NFW)	X
Downstream Primer (14286nmol/l)	1,4
Upstream Primer Biotin-positiv (7143nmol/l)	0,7
dATP, dGTP, dCTP, dTTP (100 mM)	4,0
10 x PCR-Puffer	5,0
Magnesiumchlorid (50 mM)	2,0
Taq-Polymerase	0,5
DNA-Template	10,0

Die Amplifikation der Volumenansätze verläuft in drei Schritten: 1. Denaturierung; 2. Primerbindung; 3. Synthese (Elongation). Initial wurde eine zweiminütige Denaturierungsphase bei 95 Grad Celsius vorgenommen. Im Anschluss folgten 32 Zyklen nach folgendem Protokoll:

Tabelle 9: Protokoll: Zyklen der Polymerase Kettenreaktion.

Zyklen der Polymerasen Kettenreaktion	Temperatur in Grad Celsius (°C)	Zeit in Sekunden (s)
Denaturierung	95	45
Primerbindung	61	45

Um sicher zu gehen, dass an allen DNA-Strängen vollständig synthetisiert wurde, wurde im letzten Zyklus die Synthesedauer auf sieben Minuten verlängert. Zehn µl der PCR-Ansätze wurden auf einem 2,5-prozentigen Agarosegel untersucht.

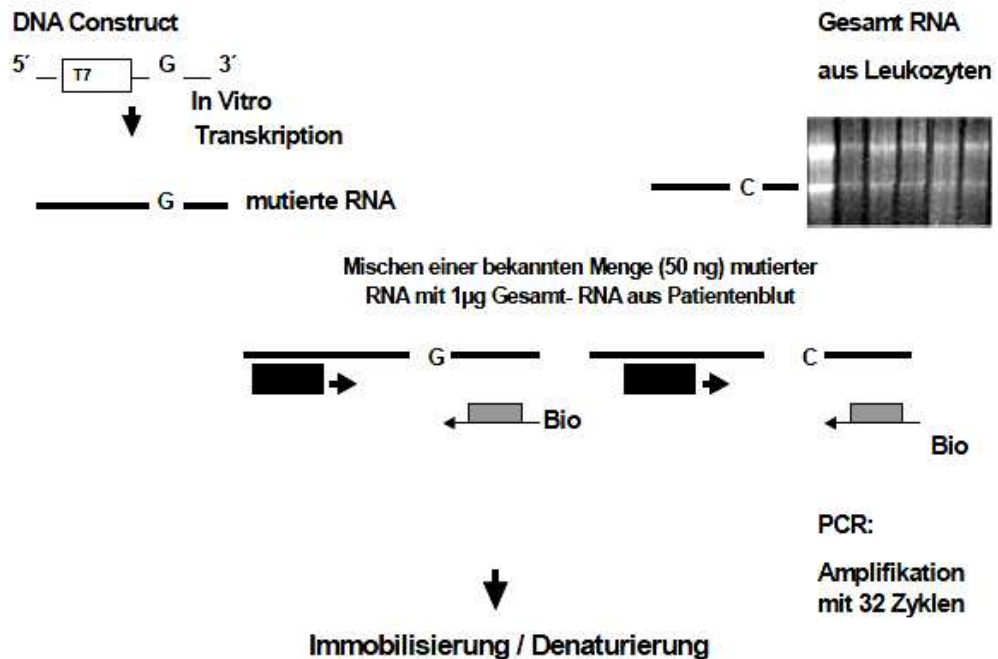


Abbildung 5: Prinzip der RT-PCR.

3.4.2.5 Quantitative Bestimmung der Blut-RNA

Für die Messung der Blut-RNA wurde, analog zur Erstellung der Eichkurve, ein Verhältnis zwischen Blut-Gesamt-RNA und mutiertem Standard gebildet: 1,0µg Gesamt-RNA aus dem Blut wurden zusammen mit 0,05µg mutiertem Standard gemischt und revers transkribiert. Die gebildete cDNA wurde mit einem Volumen von 20µl in die PCR gegeben. Die einzelnen Schritte des Versuchsablaufs entsprechen denen der im Vorfeld beschriebenen Erstellung der Eichkurve.

3.4.2.6 Sichtbarmachen von POMC-mRNA

Das Sichtbarmachen von Proopiomelanokortin Ribonucleinsäure (POMC-mRNA) wurde wie folgt realisiert: Nach Reverse Transkription von 1µg Gesamt RNA und anschließender PCR ohne mutierten Standard waren Amplifikate mit der erwarteten Größe von 138bp zu erkennen (Abbildung 6). Auf einem 2,5-prozentigen Agarosegel variierte die Stärke der Banden in den einzelnen Proben von klar erkennbaren Amplifikaten bis zu nicht sichtbaren Signalen. Die Sequenzierung der 138bp PCR Produkte ergab endgültigen Aufschluss darüber, dass es sich bei den Amplifikaten um POMC mRNA handelte (Abbildung 6).



Abbildung 6: Elektrophorese von PCR-Produkten im 2,5%igen Agarosegel; Laufzeit 2,5h bei fünf V/cm.

Bahn eins: Standard DNA-Leiter; Bahnen zwei bis fünf zeigen Basalwertmessungen von alkoholkranken Patienten (Bahnen drei und fünf) verglichen mit Nicht-Alkoholikern (Bahnen zwei und vier) nach RT-PCR. Deutlich zu erkennen sind Unterschiede in der Stärke der Amplifikate. Bahnen sechs bis neun zeigen

eine Kontroll-PCR der Blut-RNA Proben ohne vorherige Reverse Transkription: Es sind keine Amplifikate sichtbar, ergo keine DNA-Verunreinigung. Bahn zehn zeigt eine Negativkontrolle (Wasser), Bahn 11 eine Positiv-Kontrolle: Das Transkript wurde direkt vom Plasmid mit POMC-cDNA-Insert amplifiziert.

3.4.2.7 Solid-Phase-Minisequencing

Je 20µl eines RT-PCR-Ansatzes wurden auf zwei benachbarte streptavidinbeschichtete 96-Loch Mikrotiterplatten gegeben und die Reaktionsprodukte mit dem Biotin-Ende an die Platten gebunden. Der DNA-Doppel-Strang wurde mit Natronlauge denaturiert und der biotin-negative Einzel-Strang mit einem Waschpuffer (TENT) ausgewaschen.

Der spezifische Detektions-Primer, der unmittelbar vor der Punktmutation an die jeweiligen DNA-Stränge bindet, hat folgende Sequenz:

5'-GCCGAGGGCAAGCGCTCCTA-3'

In den zwei unabhängigen Minisequencing-Reaktionen wurde jeweils ein ³H-markiertes Nucleotridtriphosphat zugegeben. Die eigentliche Minisequencing-Reaktion besteht nun darin, dass mit Hilfe einer Polymerase (nämlich der Taq-DNA-Polymerase) nur eine einzige weitere Base an den Primer gebunden wird. So kommt es zur Verlängerung der Primersequenz um jeweils eine Base. Für die erste Minisequencing-Reaktion bedeutet dies, dass unter Zugabe von ³HdCTP nur der Primer, welcher am Wildtypstrang gebunden ist, um diese Base verlängert wird - da komplementär zum GTP im Gegenstrang. Zusätzlich wird in einer parallelen Reaktion durch die Zugabe von ³HdGTP nur die Primersequenz verlängert, die am mutierten DNA-Strang gebunden war (Abbildung 7: Prinzip des Solid Phase Minisequencing). In einem letzten Schritt wurden Primer und gebundenes radioaktives Nucleotid mit Natronlauge vom an der Platte haftenden biotin-positiven DNA-Strang gelöst.

Zweite Reaktion : Zugabe von 3HdGTP

Hier synthetisiert die DNA-Polymerase das zugegebene Nucleotridriphosphat dGTP nur am mutierten DNA-Strang, der in unmittelbarer Nachbarschaft zum gebundenen Primer eine Cytosinbase aufweist.

Beide Reaktionen liefern eine Minisequenz, die im Vergleich zum Primer jeweils um eine radioaktiv markierte Base verlängert wurde.

Tabelle 10: Das Reaktionsprotokoll des Solid Phase Minisequencing im Einzelnen.

Versuchsaufbau	Solid Phase Minesequencing
1	20µl des RT-PCR-Ansatzes werden pro Loch auf die Streptavidinplatte gegeben
2	Zugabe von 30µl Natriumphosphatpuffer
3	Inkubation für 1,5h bei 37,0°C
4	Lösung abnehmen und viermal waschen mit 200µl TENT-Puffer
5	Zugabe von 100µl 50mM NaOH → 3 min. bei Raumtemperatur inkubieren
6	Lösung abnehmen und viermal mit 200µl TENT-Puffer waschen
7	Zugabe von 50µl Sequenzierungsmix pro Ansatz bestehend aus: 45µl Nuclasefreies Wasser 5µl PCR-Puffer 1µl Sequenzierungsprimer (µmol/µl) 0,1µl 3HdCTP bzw. 3HdGTP (=0,1µCi)

	0,1µl Tag-Polymerase (=0,5 U) 2 µl Magnesiumchlorid (50mM)
8	Inkubation bei 60°C für 15 min.
9	Lösung abnehmen und viermal mit 200µl TENT-Puffer waschen
10	Zugabe von 100µl 50mM NaOH → Inkubation für 3 min. bei Raumtemperatur
11	90µl der NaOH-Lösung zu 3ml Scintillationsflüssigkeit geben

3.4.2.8 Standardkurve

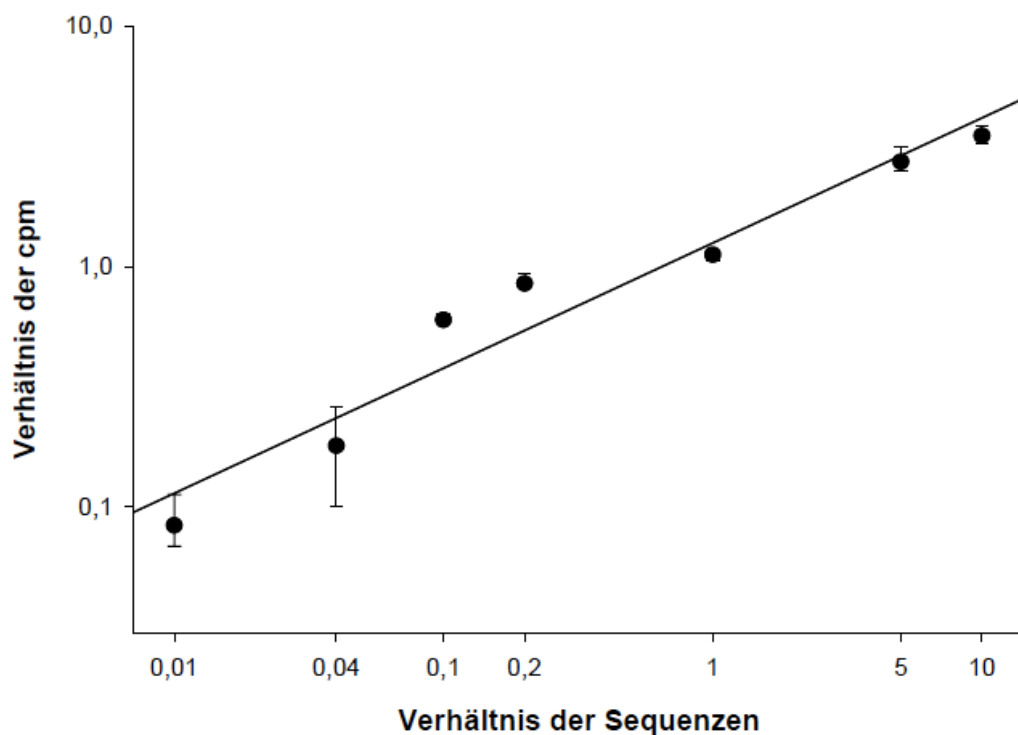


Abbildung 8: Eichkurve der menschlichen POMC-Sequenz und eines mutierten Standards ermittelt durch RT-PCR und Solid Phase Minisequencing.

Die x-Achse beschreibt das in die RT-PCR eingeschleuste Verhältnis des Wildtypstandards im Vergleich zum Standard mit Punktmutation. Die y-Achse zeigt

das Verhältnis der im β -counter ermittelten cpm von Wildtyp-Standard zum Mutierten Standard.

3.4.2.9 Die Untersuchung der mRNA von Leukozyten

Es gelang, nach RT und anschließender PCR, Amplifikate mit einer Größe von 138 bp zu erkennen. Bei der Sequenzierung der 138 bp PCR Produkte bestätigte sich die Annahme, dass es sich hierbei um Amplifikate von mRNA des POMC handelte.

3.5 Statistikmethoden

Die statischen Auswertungen werden mit Hilfe von SPSS für Windows, Version 15.0 (SPSS Inc., U.S.A.) durchgeführt. Die Darstellung der kontinuierlichen Variablen erfolgt in Form von Mittelwerten, während als Indikator für die Streumaße der Parameter Standardabweichung gewählt wird.

Die Analyse der Ergebnisse zeigt, dass einige Signifikanzen ($p < 0,05$) sind, also die Stichproben somit nicht normalverteilt sind. Andere Stichproben dagegen weisen eine Normalverteilung auf ($p > 0,05$). Es werden durchgehend Tests für nicht normalverteilte Stichproben verwendet, da die Werte von SPASS überwiegend nicht normalverteilt sind. Beim CRH werden Messungen für die drei bis fünf Tests für nicht normalverteilte Stichproben verwendet, für die übrigen Messungen kommen Tests für normalverteilte Stichproben zum Einsatz. Die Parameter Alter, Größe und Gewicht sind normalverteilt, der BMI dagegen nicht.

Bei den folgenden Mittelwertvergleichen der vorliegenden Stichproben liegen zum Teil unabhängige Stichproben vor, d.h., die Werte stehen in keinem direkten Zusammenhang. Im Gegensatz dazu haben Messungen in einem Kollektiv, etwa vor und nach einer Therapie, eine direkte Verbindung. Dies ist der Fall beim Vergleich von CRH 1-7 bzw. SPASS 1-7 der Fall. Bei unabhängigen und verbundenen Stichproben kommen unterschiedliche Testverfahren zum Einsatz.

Die Durchführung von Normalverteilungstests erfolgt am häufigsten mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test. Beträgt die Gesamtzahl der Stichprobe allerdings

<50, so sollte man auf den Shapiro-Wilk-Test zurückgreifen. Die kontinuierlichen Variablen werden mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests hinsichtlich ihrer Normalverteilung überprüft. Während einige der getesteten Variablen keine Normalverteilung aufweisen (Shapiro-Wilk-Test: $p < 0,05$), kann für andere Variablen eine Normalverteilung berechnet werden (Shapiro-Wilk-Test: $p \geq 0,05$). Bei den Mittelwertvergleichen wurden daher Tests für normalverteilte Stichproben und nicht-parametrische Tests für nicht normalverteilte Stichproben herangezogen. Normalverteilungstests überprüfen die Verteilungsform von stetigen Zahlen einer Stichprobe. Eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung besteht bei $p < 0,05$; in diesem Falle sind für die betreffenden Variablen nichtparametrische Tests zu benutzen.

Beim Vergleich von zwei unabhängigen, normalverteilten Stichproben wird der t-Test verwendet, während bei nicht normalverteilten Stichproben der Mann-Whitney-U-Test als nichtparametrisches Verfahren zur Anwendung kommt. Auch zwei verbundene, normalverteilte Stichproben werden mittels des t-Tests für gepaarte Stichproben verglichen, dagegen werden zwei verbundene, nicht normalverteilte Stichproben durch den Wilcoxon-Test überprüft. Beim Vergleich von mehr als zwei verbundenen, nicht normalverteilten Stichproben findet der Friedman-Test Anwendung. Die kategorisierten Daten dagegen werden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests bzw. des exakten Tests nach Fisher ausgewertet. In Einzelfällen, in denen diese Testvoraussetzung nicht gegeben ist, wird dies jeweils bei der Ergebnisdarstellung erläutert.

Bei allen durchgeführten Tests erfolgte eine zweiseitige Signifikanzüberprüfung, wobei für alle statistischen Tests ($p < 0,05$) als statistisch signifikant angenommen wird. Eine Signifikanz bei einer statistischen Berechnung besteht, wenn ($p \leq 0,05$) beträgt. Bei Angabe der Signifikanz kann entweder der exakte p-Wert (z.B. 0,003) oder das Signifikanzniveau (z.B. $p < 0,01$) angegeben werden. Es existieren folgende Signifikanzniveaus:

Tabelle 11: Signifikanzniveaus.

p-Wert	Signifikanz
$p > 0,05$	nicht signifikant
$p < 0,05$	signifikant
$p < 0,01$	sehr signifikant

In den graphischen Darstellungen, die ebenfalls von SPSS ausgegeben werden, kommen zur Veranschaulichung der Mittelwerte Fehlerbalken zum Einsatz, wobei als Streumaß aufgrund der großen Streubreite die Standardfehler aufgeführt wird. Die kategorisierten Daten werden graphisch mit Hilfe von Balkendiagrammen dargestellt. P-Werte, die knapp über 0,05 liegen (z.B. $p=0,06$ oder $p=0,07$) sind statistisch nicht signifikant. Bei der Beschreibung dieser Ergebnisse ist häufig der Ausdruck „grenzwertige Signifikanz“ zu finden, besser ist es jedoch, von einem „deutlichen Trend“ zu sprechen.

4 Ergebnisse

Bei Patienten mit ehemals chronischem Alkoholkonsum sind die Basiswerte von POMC-mRNA in den Leukozyten vor der Operation erhöht. Die Werte von POMC-mRNA der Vergleichsgruppe der Nichtalkoholkranken unterscheiden sich deutlich von den Patienten mit Alkoholanamnese. Die Stressachse wird sowohl mittels i.v. CRH als auch mittels endogener Stresstest aktiviert und die Stressantwort des Organismus mittels POMC-Expressionsrate bestimmt. Von den insgesamt 31 Patienten werden 11 nach einer Herztransplantation und 20 während der Evaluationsphase zu einer Lebertransplantation im Universitätsklinikum Campus Mitte und Virchow Klinikum der Charité Berlin untersucht. Insgesamt waren 17 Patienten mit und 14 Patienten ohne Alkoholanamnese vertreten, d.h. in beiden Gruppen befinden sich Patienten mit und ohne Alkoholanamnese.

4.1 Basischarakteristika

Die Basischarakteristika aller Patienten, wie Größe, Gewicht und Geschlecht, unterscheiden sich bis auf die alkoholismusrelevanten Daten nicht signifikant zwischen den Gruppen.

Tabelle 12: Basischarakteristika des Patientenkollektivs mit Alkoholanamnese (aktiv und abstinent) LTX und HTX.

	Einheiten	Patienten n=17
Alter	Jahre	50 (39-66)
Geschlecht	m / w	13 / 4
Größe	cm	174,30 (152-188)
Gewicht	kg	77 (52-122)

BMI	kg/m ²	25,4 (19,8-39,4)
Abstinent seit:	Monate	6 (6-84)
Infekte bei Aufnahme		Hypertensive Entgleisung, Hautkrebs, Kammerflimmern, Kreislaufbeschwerden, Harnröhrenstriktur, Pneumonie, Hepatitis B und C, Bronchitis, Herpes Zoster, Pankreatitis

Tabelle 13: Basischarakteristika des Patientenkollektivs ohne Alkoholanamnese mit LTX und HTX.

	Einheiten	Patientenkollektiv n=14
Alter	Jahre	50 (32-61)
Geschlecht	m / w	10 / 4
Größe	cm	172 (150-189)
Gewicht	kg	71 (59-94)
BMI	kg/m ²	25,6 (20,2-34,1)
Abstinent seit:	Monate	k.A.
Infekte bei Aufnahme		Netzimplantation wg. Hernie, Herzabstoßung, Nasen-OP, Struma OP, FrakturUS, bakterielle Peritonitis

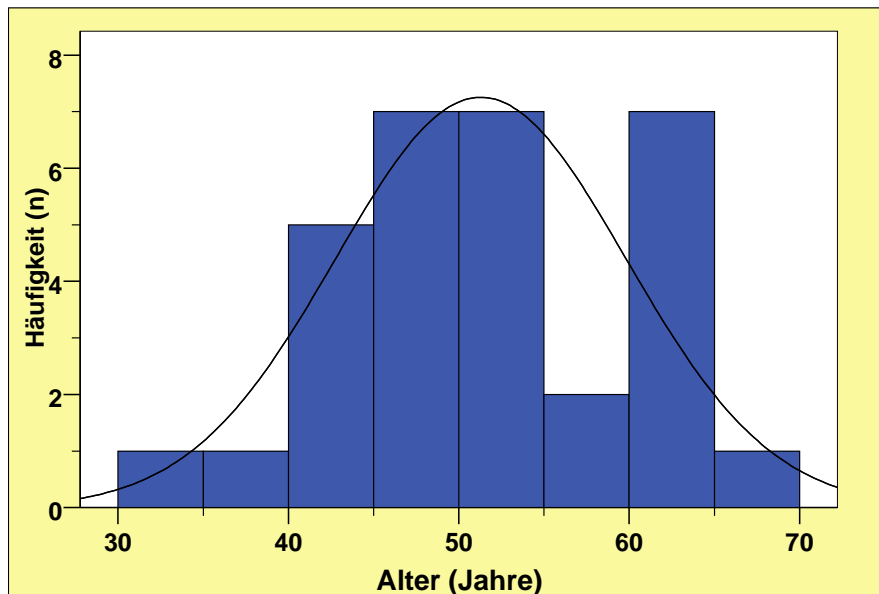


Abbildung 9: Altersverteilung der Patientenkollektiv Ltx/Htx.

Die Basischarakteristika unterscheiden sich nicht in der Gruppe der Leber- bzw. Herztransplantierten Patienten. Bei der Gegenüberstellung von alkoholabhängigen und nicht alkoholabhängigen Patienten in beiden Gruppen lassen sich erste Unterschiede erkennen. So kann die Tendenz erkannt werden, dass alkoholabhängige Patienten bereits bei der Aufnahme weit mehr Infekte aufweisen als nicht alkoholabhängige Patienten. Die abstinenten alkoholabhängigen Patienten sind bei der Aufnahme acht Jahre älter und in beiden Gruppen überwiegt der Anteil der Männer - im Vergleich zu den nicht alkoholabhängigen Patienten.

4.2 Die Untersuchung der mRNA von Leukozyten

Bei jedem/r Probanden/in werden zu jedem Messzeitpunkt der Blutentnahme die in dieser Studie untersuchten Transkripte des POMC nachgewiesen. Es kann also in der mRNA der stimulierten und unstimulierten menschlichen Lymphozyten und Monozyten zu jedem Zeitpunkt der Entnahme der Zellen aus den Kulturflaschen der in dieser Studie untersuchte Anteil des Exons 3 des POMC nachgewiesen werden.

Da aber die Leukozyten bei der Extraktion vermischt werden, ist es nicht möglich festzustellen, ob das Transkript des Exons 3 des POMC durch die Lymphozyten und/oder die Monozyten produziert wird. Aufgrund methodischer Vorausset-

zungen kann nur ein Teil des Exons 3 von mRNA des POMC nachgewiesen werden. Damit erlaubt das Resultat dieser Studie keine Aussage über die tatsächliche Länge des Transkripts des POMC, das in menschlichen Leukozyten gefunden wird.

4.3 Die Expression der mRNA des POMC in Abhängigkeit des Trinkverhaltens und der Diagnose der untersuchten Patienten

Bei der ersten Messung nach der i.v. Gabe von CRH wird ein deutlicher Anstieg der mRNA des POMC ($p < 0,05$) in der Gruppe der nicht alkoholabhängigen Patienten gemessen (Abb. 12).

In der Gruppe der abstinenten alkoholabhängigen Patienten wird dagegen ein deutlicher Abfall der mRNA des POMC ($p < 0,05$) nach CRH gemessen (Abb. 12).

4.3.1 Nichtalkoholranke / abstinente Alkoholranke nach Htx

In diesem Abschnitt werden Ergebnisse von Herztransplantations-Patienten (Htx) vorgestellt.

4.3.1.1 Endogener Stresstest

In den Leukozyten der Blutproben, die 11 Patienten nach der Herztransplantation entnommen werden, konnte der in dieser Studie untersuchte Teil des Exon 3 des POMC bei allen Probanden in der mRNA festgestellt und quantifiziert werden.

Unter den 11 ausschließlich männlichen Patienten waren fünf abstinente Alkoholranke und sechs Nichtalkoholranke differenzierbar.

Die zur Beginn der Untersuchung gemessenen Basalwerte der mRNA des POMC liegen in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten (Herz) zwischen 0,17-0,32 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Dabei lag der Mittelwert zwischen 0,22 und 0,23 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Nach der exogenen Stresstestung (CRH) sank die Kurve deutlich ab. Bei der ersten Mes-

sung nach der CRH-Gabe lag der Mittelwert nur noch bei 1,64 µg/µl. Die zweite Messung nach der Intervention zeigte einen deutlichen Abfall der Konzentration von mRNA des POMC; bei den letzten drei Messungen stieg der Mittelwert wieder an.

Tabelle 14: Messwerte der Patienten Htx mit C2 und ohne C2 vor und nach der i.v. CRH-Gabe.

Messzeitpunkt in Minuten	POMC (µg/µl) Htx mit C2	POMC (µg/µl) Htx ohne C2	p-Wert
- 155	0,233 (0,17-0,32)	0,144 (0,09-0,21)	<0,05
- 5	0,227 (0,18-0,32)	0,134 (0,10-0,18)	<0,05
+ 5	0,164 (0,13-0,25)	0,181 (0,16-0,20)	0,186
+ 25	0,130 (0,09-0,21)	0,189 (0,17-0,20)	<0,05
+ 85	0,155 (0,12-0,23)	0,173 (0,13-0,22)	0,091
+ 145	0,181 (0,15-0,27)	0,154 (0,11-0,19)	0,125
+ 205	0,214 (0,11-0,25)	0,153 (0,10-0,26)	<0,05

Mittelwert (Min-Max); Intervention: nach zwei Messzeitpunkten; p<0,05 (signifikant); Mann-Whitney-U-Test

Bei den Htx Patienten ohne C2 lagen die gemessenen Basalwerte der mRNA des POMC zwischen 0,09-0,21µg/µl. Dabei lag der Mittelwert zwischen 0,14 bis 0,13µg/µl. Der Basalwert der nicht alkoholabhängigen Patienten war deutlich niedriger als der von alkoholabhängigen Patienten. Nach der Stresstestung stieg die Kurve zunächst auf 0,188µg/µl an und sank dann wiederum ab (p=<0,05). Die Werte stabilisierten sich sehr schnell und hielten abschließend ein Niveau von ca. 0,15µg/µl.

Nach Gabe des CRH kam es in beiden Gruppen zu einer deutlichen, aber unterschiedlichen Reaktion. Bei den alkoholabhängigen Patienten war ein signifikanter Abfall ($p < 0,05$) und bei den nicht alkoholabhängigen Patienten ein nicht signifikanter Anstieg der POMC-Expressrate zu beobachten.

Die POMC-Expressrate unterlag bei den alkoholabhängigen Patienten einer deutlichen Schwankung (Mittelwert: $0,22-0,13-0,18 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), hingegen veränderte sich die Kurve der nicht alkoholabhängigen Patienten gleichmäßiger und sank schneller wieder auf das Ausgangsniveau zurück (Mittelwert: $0,14-0,188-0,15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Hierbei fällt auf, dass bei alkoholabhängigen Patienten der Basalwert (Mittelwert) mit $0,22 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ deutlich höher war als der von nicht alkoholabhängigen Patienten mit $0,14 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($p=0,001$). Dagegen ist in beiden Gruppen festzustellen, dass sich die POMC-Expressrate nach der Intervention (i.v. CRH-Gabe) wieder an das Ausgangsniveau anglich. Bei den alkoholabhängigen Patienten lag der Wert der letzten Messung mit $0,11 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (205 Minuten nach der endogenen Stresstestung) jedoch unter dem Ausgangswert mit $0,22 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (siehe Tabelle 14). Diese Differenzen sind mit $p < 0,005$ signifikant. Anders verhält es sich bei den nicht alkoholabhängigen Patienten: Hier gleicht der Basalwert mit $0,14 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ dem Wert der letzten Messung mit $0,15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

4.3.1.2 Exogener Stresstest

In den Leukozyten aus den Blutproben von 11 Patienten, drei mit einer Kardiomyopathie, einer mit Mitralinsuffizienz, drei mit Dilatation, zwei mit Myokardinfarkt und drei mit Myokardischämie erkrankte Patienten; die sich einer Herztransplantation unterzogen, konnte der in dieser Studie untersuchte Teil des Exon 3 des POMC bei allen Probanden in der mRNA festgestellt und quantifiziert werden.

Unter den 11 ausschließlich männlichen Patienten waren fünf abstinenten Alkoholkranken und sechs Nichtalkoholkranken quantifizierbar

Die zur Beginn der Untersuchung gemessenen Basalwerte der mRNA des POMC lagen in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten (Herz) zwischen $0,17$ und $0,57 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Dabei lag der Mittelwert zwischen $0,37$ und $0,10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Nach der Stresstestung blieb die Kurve zunächst auf nahezu gleichem Niveau und sank

dann bei der zweiten Messung (25 Minuten nach dem Stresstest) deutlich ab. Bei der ersten Messung nach dem Endogener Stresstest lag der Mittelwert noch bei ca. 0,10µg/µl. Die zwei folgenden Messungen zeigten einen Abfall der Konzentration der mRNA des POMC auf ca. die Hälfte der Basiswerte bei der letzten Messung stieg der Mittelwert wieder auf das Niveau von 0,24µg/µl an.

Tabelle 15: Messwerte der Patienten Htx mit C2 und ohne C2 vor und nach dem exogenen Stresstest.

Messzeitpunkt in Minuten	POMC (µg/µl) Htx mit C2	POMC (µg/µl) Htx ohne C2	p-Wert
- 155	0,374 (0,17-0,57)	0,125 (0,09-0,19)	<0,05
- 5	0,102 (0,10-0,10)	0,107 (0,08-0,13)	0,577
+ 5	0,102 (0,10-0,05)	0,124 (0,08-0,17)	0,253
+ 25	0,054 (0,05-0,06)	0,116 (0,07-0,14)	0,981
+ 85	0,066 (0,06-0,22)	0,110 (0,07-0,13)	0,961
+ 145	0,106 (0,10-0,10)	0,111 (0,8-0,13)	0,593
+ 205	0,248 (0,121-0,352)	0,112 (0,07-0,14)	<0,05

Mittelwert (Min-Max); Intervention: nach zwei Messzeitpunkten; p<0,05 (signifikant) nach Mann-Whitney-U-Test.

Bei der Gruppe der nichtalkoholabhängigen Patienten lag der Basalwert deutlich niedriger (p<0,05) als der Vergleichswert der abstinenten alkoholabhängigen Patienten. Nach der Stresstestung ergaben sich im gesamten Verlauf keine signifikanten Änderungen und die Werte lagen bei der letzten Messung etwas niedriger als das Ausgangsniveau.

4.3.2 Nichtalkoholkranke / abstinente Alkoholkranke und Ltx

In den Leukozyten aus den Blutproben von 20 Patienten, die in der Evaluationsphase vor der Lebertransplantation waren, konnte der in dieser Studie untersuchte Teil des Exon 3 des POMC bei allen Probanden in der mRNA festgestellt und quantifiziert werden.

4.3.2.1 Endogener Stress

Die zur Beginn der Untersuchung gemessenen Basalwerte der mRNA des POMC lagen in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten zwischen 0,17-0,32µg/µl. Dabei lag der Mittelwert bei 0,22µg/µl. Nach der Stresstestung fiel die Kurve signifikant ab ($p < 0,05$), um dann bei den Messungen fünf, sechs und sieben wieder auf das hohe Ausgangsniveau anzusteigen. Die erste Messung nach der CRH-Gabe (plus fünf Minuten) ergab den Mittelwert 1,64µg/µl. Die nächste Messung vier (plus 25 Minuten) verzeichnete den niedrigsten Stand der mRNA des PPOMC. Bei Messung fünf (plus 85 Minuten) lag der Mittelwert bei 0,15µg/µl, bei Messung sechs (plus 145 Minuten) bei 0,18µg/µl, und bei Messung sieben (plus 205 Minuten) bei 0,21µg/µl.

Die zur Beginn der Untersuchung gemessenen Basalwerte der mRNA des POMC lagen in der Gruppe der Patienten Ltx ohne Alkoholanamnese zwischen 0,09-0,21µg/µl. Dabei lag der Mittelwert bei 0,14µg/µl. Nach der Stresstestung stieg die Kurve nichtsignifikant an (Messungen drei und vier), um dann bei den nachfolgenden Messungen fünf, sechs und sieben wieder auf das niedrige Ausgangsniveau abzufallen. Bei der ersten Messung nach der CRH Gabe (plus fünf Minuten) lag der Mittelwert bei 0,181µg/µl. Die nächste Messung (plus 25 Minuten) verzeichnete den höchsten Stand der mRNA des PPOMC bei 0,188µg/µl. Ab Messung fünf (plus 85 Minuten) sank der Mittelwert wieder, und lag bei Messung sieben (plus 205 Minuten) bei 0,15µg/µl.

Tabelle 16: Messwerte der Patienten Ltx mit C2 und ohne C2 vor und nach der i.v. CRH Gabe.

Messzeitpunkt in Minuten	POMC ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) Ltx mit C2	POMC ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) Ltx ohne C2	p-Wert
- 155	0,223 (0,17-0,32)	0,144 (0,09-0,21)	<0,05
- 5	0,217 (0,18-0,30)	0,134 (0,10-0,18)	<0,05
+ 5	0,164 (0,13-0,25)	0,181 (0,16-0,20)	0,054
+ 25	0,130 (0,09-0,21)	0,189 (0,17-0,20)	<0,05
+ 85	0,155 (0,12-0,23)	0,173 (0,13-0,22)	0,167
+ 145	0,181 (0,15-0,27)	0,154 (0,11-0,19)	0,182
+ 205	0,219 (0,16-0,31)	0,156(0,12-0,18)	<0,05

Mittelwert (Min-Max); Intervention: nach zwei Messzeitpunkten; $p < 0,05$ (signifikant); Mann-Whitney-U-Test

4.3.2.2 Exogener Stress

Die zur Beginn der Untersuchung gemessenen Basalwerte der mRNA des POMC lagen in der Gruppe der Patienten Ltx ALD zwischen 0,09 und 0,30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Dabei lag der Mittelwert bei 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Nach der Durchführung des exogenen Stresstests fiel die Kurve (Tab. 17) nichtsignifikant ab, um dann bei den folgenden Messungen vier, fünf, sechs und sieben wieder auf das Ausgangsniveau anzusteigen. Die erste Messung nach dem Endogener Stresstest ergibt den Mittelwert 0,19 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die nächste Messung verzeichnete schon wieder ein Ansteigen der mRNA des PPOMC auf 0,19 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Bei den folgenden Messungen stieg der Wert kontinuierlich auf das Ausgangsniveau von 0,20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ an.

Tabelle 17: Messwerte der Patienten Gesamt mit C2 und ohne C2 vor und nach dem exogenen Stresstest.

Messzeitpunkt in Minuten	POMC ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) Ltx mit C2	POMC ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) Ltx ohne C2	p-Wert
- 155	0,208 (0,09-0,30)	0,334 (0,15-0,90)	0,765
- 5	0,204 (0,08-0,30)	0,217 (0,10-0,30)	0,966
+ 5	0,195 (0,08-0,24)	0,305 (0,09-0,80)	0,468
+ 25	0,196 (0,09-0,31)	0,342 (0,12-0,90)	0,444
+ 85	0,200 (0,10-0,30)	0,222 (0,10-0,30)	0,968
+ 145	0,202 (0,09-0,30)	0,207 (0,10-0,28)	0,349
+ 205	0,226 (0,12-0,35)	0,259 (0,18-0,33)	0,829

Mittelwert (Min-Max); Intervention: nach zwei Messzeitpunkten; $p < 0,05$ (signifikant); # t-Test; * Mann-Whitney-U-Test

Die zur Beginn der Untersuchung gemessenen Basalwerte der mRNA des POMC lagen in der Patientengruppe Ltx VIC zwischen $0,15\text{-}0,90\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Dabei lag der Mittelwert bei $0,33\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Nach der Durchführung des Endogener Stresstests stieg die Kurve leicht an (Messungen drei und vier), um dann bei der folgenden Messung fünf abzufallen, wobei danach das Niveau gehalten wurde (Messung sechs und sieben), das leicht niedriger lag als das Ausgangsniveau. Bei der ersten Messung nach dem Endogener Stresstest (plus fünf Minuten) lag der Mittelwert bei $0,30\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die nächste Messung (plus 25 Minuten) verzeichnete auch ein Ansteigen der mRNA des PPOMC auf $0,34\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Bei Messung fünf (plus 85 Minuten) fiel der Mittelwert auf $0,22\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zurück, bei Messung sechs (plus 145 Minuten) lag er bei $0,20\mu\text{g}/\mu\text{l}$, und bei Messung sieben (plus 205 Minuten) bei $0,25\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

4.3.3 Patientenkollektiv Gesamt

In den nachstehenden Darstellungen sind die Messwerte für das gesamte Patientenkollektiv aufgeführt. Hierbei wird ebenso in endogenen und exogenen Stress-test unterschieden.

4.3.3.1 Endogener Stress

Tabelle 18: Messwerte der Patientenkollektiv Gesamt mit C2 und ohne C2 vor und nach endgenem Stresstest..

Messzeitpunkt in Minuten	POMC ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) Gesamt ohne C2	POMC ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) Gesamt mit C2	p-Wert
- 155	0,185 (0,15)	0,267 (0,17)	0,009
- 5	0,159 (0,15)	0,245 (0,11)	0,004
+ 5	0,208 (0,18)	0,254 (0,17)	0,046
+ 25	0,119 (0,05)	0,265 (0,18)	0,001
+ 85	0,118 (0,04)	0,233 (0,14)	0,001
+ 145	0,131 (0,05)	0,234 (0,08)	0,002
+ 205	0,168 (0,08)	0,239 (0,06)	0,034

Mittelwert (Standardabweichung); Intervention: nach zwei Messzeitpunkten; $p < 0,05$ (signifikant) nach Mann-Whitney-U-Test.

Patienten hatten mit C2 zeigen durchgehend signifikant höhere mRNA-Werte nach Stress als Patienten ohne C2

4.3.3.2 Exogener Stress

Tabelle 19: Messwerte der Patienten Gesamt mit C2 und ohne C2 vor und nach exogem Stresstest.

Messzeitpunkt in Minuten	POMC ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) Gesamt ohne C2	POMC ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) Gesamt mit C2	p-Wert
- 155	0,173 (0,85)	0,198 (0,06)	0,466
- 5	0,183 (0,10)	0,189 (0,10)	0,871
+ 5	0,209 (0,10)	0,177 (0,03)	0,887
+ 25	0,180 (0,96)	0,168 (0,06)	0,672
+ 85	0,175 (0,77)	0,168 (0,04)	0,792
+ 145	0,163 (0,07)	0,168 (0,04)	0,847
+ 205	0,147 (0,06)	0,192 (0,05)	0,093

Mittelwert (Standardabweichung); Intervention: nach zwei Messzeitpunkten; $p < 0,05$ (signifikant); Mann-Whitney-U-Test

Beim Vergleich aller Werte lässt sich keine statistische Signifikanz nachweisen (Friedman-Test; $p = 0,606$).

Tabelle 20: Friedman-Test.

N	Chi-Quadrat	df	Asymptotische Signifikanz
24	4,526	6	0,606

Tabelle 21: Statistik bei gepaarten Stichproben.

		Mittelwert	N	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Paaren 1	CRH	0,1895	26	0,06905	0,01354
	CRH 6	0,1669	26	0,05205	0,01021

Vergleicht man den höchsten Wert zum Messzeitpunkt 1 vs. dem niedrigsten zum Messzeitpunkt 6, besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den 26 Paaren (t-Test für gepaarte Stichproben: CRH1=0,19 vs. CRH6=0,17; $p=0,043$).

Tabelle 22: Friedman-Test.

N	Chi-Quadrat	df	Asymptotische Signifikanz
25	8,316	6	0,216

Tabelle 23: Wilcoxon-Test.

	Spass 5-Spass 1
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,015

Exogener Stresstest= CRH, SPASS-Test=endogener Stresstest

4.3.4 Nichtalkoholranke / abstinente Alkoholranke aus beiden Untersuchungsgruppen im Vergleich

Tabelle 24: Vergleich der Anzahl von abstinent Alkoholranke und Nichtalkoholranke bei Patienten mit Htx vs. Ltx.

	Htx Alkoholranke		Ltx Alkoholranke		p
	nein	ja	nein	ja	
Anzahl	6/11	5/11	8/20	12/20	0,477
Geschlecht (m)	6/11	5/11	4/12	8/12	0,240
Geschlecht (w)	0/0	0/0	4/8	4/8	0,459

Es gibt keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der mRNA des POMC vor und nach CRH-Gabe bei Patienten mit Htx vs. Ltx. Lediglich die letzte Messung lässt einen Trend zu höheren Werten bei Patienten nach Ltx erkennen ($p=0,09$).

Hinsichtlich des Alters besteht ein signifikanter Unterschied zwischen abstinenten Alkoholranke und Nichtalkoholranke, wobei abstinenten Alkoholranke im Mittel annähernd acht Jahre älter sind als Nichtalkoholranke (t-Test; $p=0,006$).

Chi-Quadrat-Test: Eine Zelle (25 Prozent) hat eine erwartete Häufigkeit kleiner fünf. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 4,97. Zwischen der Häufigkeit von abstinenten Alkoholranke besteht kein Unterschied bei Patienten mit Htx vs. Ltx (Fisher-test; $p=0,477$).

4.3.4.1 Vergleich von abstinenten alkoholabhängigen Leber- und Herzpatienten beim endogenen Stresstest

Im Vergleich zwischen den abstinenten alkoholabhängigen und nicht alkoholabhängigen Patienten, die sich einer Herz- bzw. Lebertransplantation unterziehen oder bereits unterzogen haben, wird zunächst wiederum deutlich, was bereits die einzelnen Ergebnisse schon vermuten ließen. Ausgehend von erhöhten Basalwerten, zeigten die Leberpatienten jedoch einen weniger starken Abfall der POMC-Expressrate bei der ersten Messung nach der Stresstestung. Die Verlaufskurve ist weniger deutlich ausgeprägt als die der Herzpatienten. Bei den Leberpatienten stieg die POMC-Expressionsrate auf ein höheres Niveau wieder an, als die der Herzpatienten zum letzten Messzeitpunkt.

4.3.4.2 Vergleich von nicht alkoholabhängigen Leber- und Herzpatienten beim endogenen Stresstest

Bei den nicht alkoholabhängigen Patienten, die sich einem endogenen Stresstest unterziehen, sind die Basalwerte der Leberpatienten erhöht und die POMC-Expressrate zeigte eine deutlich niedrigere Kurve in den POMC-Werten nach der endogenen Stresstestung als die Werte der Herzpatienten. Bei der letzten Messung waren aber beide Kurven (POMC-Expressrate) wieder auf gleichem Niveau. Für die endogene Stresstestung kann festgehalten werden, dass die Amplitude der POMC-Expressionsrate bei den Herzpatienten vor und nach der Intervention deutlich höher und niedriger ausgeprägt war als die der Leberpatienten.

4.3.4.3 Vergleich von abstinenten alkoholabhängigen Leber- und Herzpatienten beim exogenen Stresstest

Bei den abstinenten alkoholabhängigen Patienten, die sich einem exogenen Stresstest unterzogen, waren die Basalwerte der Herzpatienten erhöht und die POMC-Expressrate zeigte eine deutlich ausgeprägtere Kurve in den POMC-Werten nach der exogenen Stresstestung als die Werte bei Leberpatienten. Bei der letzten Messung lag die POMC-Expressrate der Herzpatienten unter dem Niveau der Leberpa-

tienten. Die Basalwerte bei Leberpatienten lagen unter denen der Herzpatienten und es gab nur einen minimalen Abfall der POMC-Expressrate nach der Intervention. Die Kurve blieb während der gesamten Messdauer auf konstant niedrigem Niveau.

4.3.4.4 Vergleich von nicht alkoholabhängigen Leber- und Herzpatienten beim exogenen Stresstest

Bei den nicht alkoholabhängigen Patienten, die sich einem exogenen Stresstest unterziehen, waren die Basalwerte der Leberpatienten stark erhöht und die POMC- Expressrate zeigte eine deutlich ausgeprägte Kurve in den POMC-Werten nach der exogenen Stresstestung als die Werte der Leberpatienten. Bei der letzten Messung lag die POMC-Expressrate der Herzpatienten deutlich unter dem Niveau der Leberpatienten. Die Basalwerte der Leberpatienten lagen unter denen der Herzpatienten und es gab nur einen minimalen Anstieg der POMC-Expressrate nach der Intervention. Die Kurve blieb während der gesamten Messdauer konstant auf niedrigem Niveau.

4.3.4.5 Vergleich von abstinenten alkoholabhängigen Leber- und Herzpatienten beim endogenen und exogenen Stresstest

Beim Vergleich von alkoholabhängigen Patienten, deren Daten sowohl vom endogenen wie exogenen Stresstest zusammengefasst werden, lagen die Basalwerte der Leberpatienten wenig niedriger als die der Herzpatienten. Die POMC-Expressrate zeigte eine wenig deutlich ausgeprägte Kurve in den POMC-Werten nach der Stresstestung als die Werte der Herzpatienten. Die letzte Messung zeigt die POMC-Expressrate der Leberpatienten leicht über dem Niveau der Herzpatienten. Die Basalwerte der Herzpatienten befanden sich minimal über denen der Leberpatienten und es gab einen deutlichen Abfall der POMC-Expressrate nach der Intervention. Zum letzten Messzeitpunkt der POMC-Expressrate erreichten die Werte der Herzpatienten nicht das Niveau der Leberpatienten.

4.3.4.6 Vergleich von nicht alkoholabhängigen Leber- und Herzpatienten beim endogenen und exogenen Stresstest

Der Vergleich von nicht alkoholabhängigen Patienten, deren Daten sowohl vom endogenen wie exogenen Stresstest zusammengefasst werden, zeigten beide Kurven einen parallelen Verlauf. Die Basalwerte der Leberpatienten waren leicht erhöht gegenüber denen der Herzpatienten. Die POMC-Expressrate der Leberpatienten war wenig stärker ausgeprägt nach der Stresstestung als die Werte der Herzpatienten. Die letzte Messung zeigt die POMC-Expressrate der Leberpatienten leicht über dem Niveau der Herzpatienten. Die Basalwerte der Herzpatienten lagen deutlich unter denen der Leberpatienten und es war ein leichter Anstieg der POMC-Expressrate nach der Intervention messbar. Bei der letzten Messung der POMC-Expressrate erreichten die Werte der Herzpatienten nicht das Niveau der Leberpatienten.

4.3.4.7 Zusammenfassung des Vergleichs von abstinenten alkoholabhängigen und nicht alkoholabhängigen Leber- und Herzpatienten

In der Zusammenfassung wird ersichtlich, dass die nicht alkoholabhängigen Patienten, deren Daten sowohl vom endogenen wie exogenen Stresstest zusammengefasst werden, für die Gruppe der Leber wie für die Gruppe der Herzpatienten sich sehr ähnlich sind. Beide Kurven der POMC-Expressrate zeigten einen parallelen Verlauf. Die Basalwerte der Leberpatienten waren signifikant erhöht gegenüber denen der Herzpatienten. Auch bei der letzten Messung der POMC-Expressrate erreichten die Werte der Herzpatienten nicht das Niveau der Leberpatienten. Insgesamt war die Verlaufskurve der POMC-Expressrate nach der Intervention bei den Leberpatienten stärker ausgeprägt als die Herzpatienten.

So kann man festhalten, dass die nicht alkoholabhängigen Patienten, unabhängig von der jeweiligen Diagnose, eine adäquatere Reaktion auf Stressintervention zeigten, als die abstinent alkoholabhängigen Patienten. Dabei war es irrelevant, ob der Patient endogenem oder exogenem Stress ausgesetzt war.

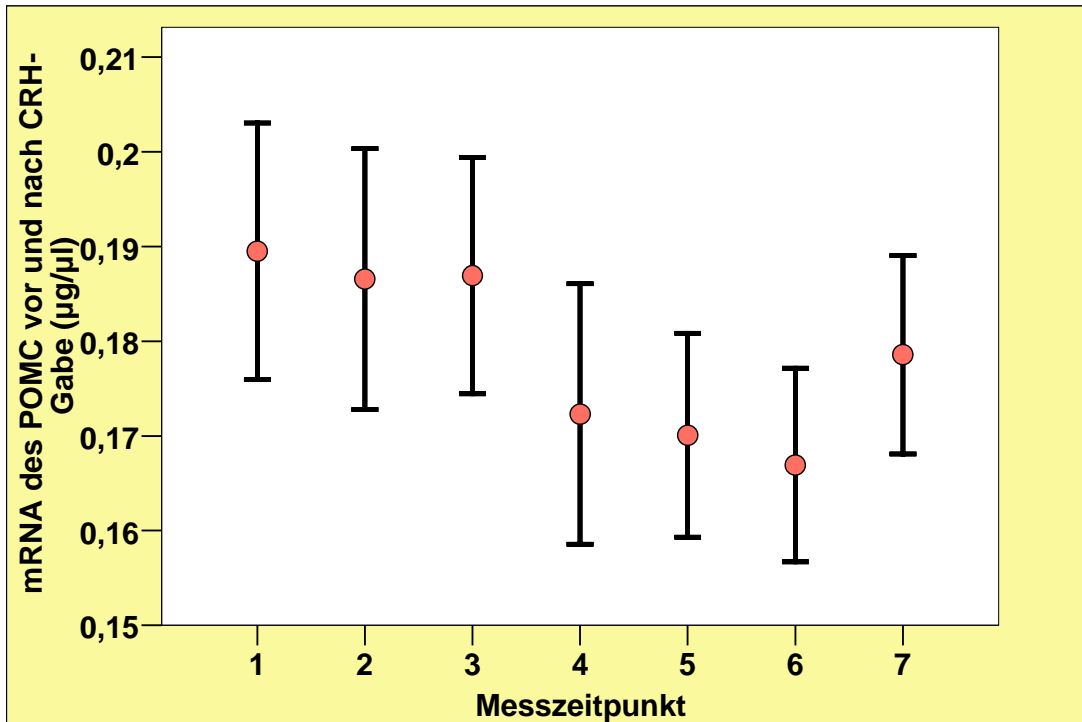


Abbildung 10: Grafische Darstellung des mRNA-POMC-Levels vor und nach endogener Stresstestung, im Gesamtkollektiv alkoholkranker Pat.

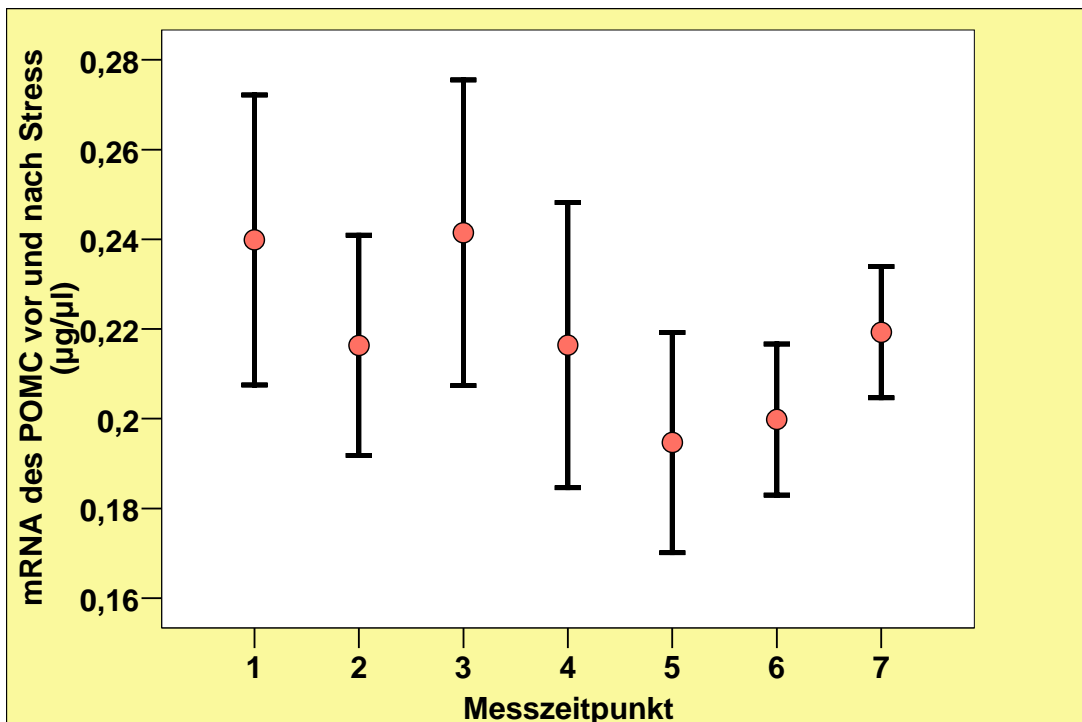


Abbildung 11: Grafische Darstellung des mRNA-POMC-Levels vor und nach endogener Stresstestung im Kollektiv LTX alkoholkranke

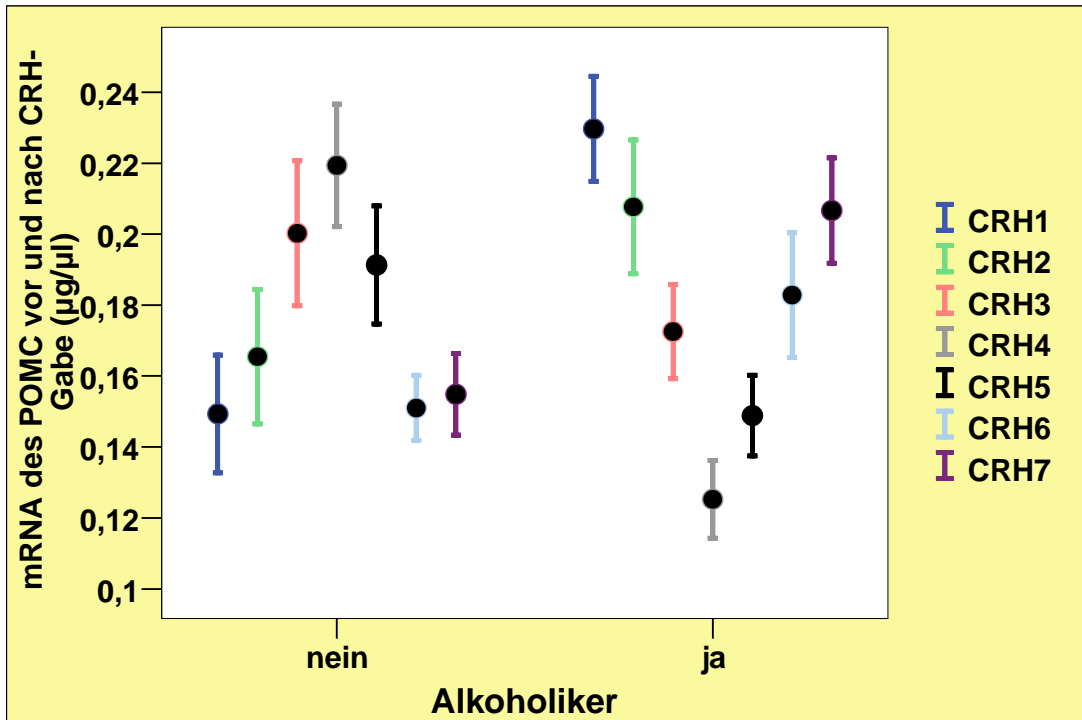


Abbildung 12: Grafische Darstellung der mRNA des POMC vor und nach endogenem Stresstest beim Verlauf im Patientenkollektiv abstinent alkoholkrank/nichtalkoholkrank.

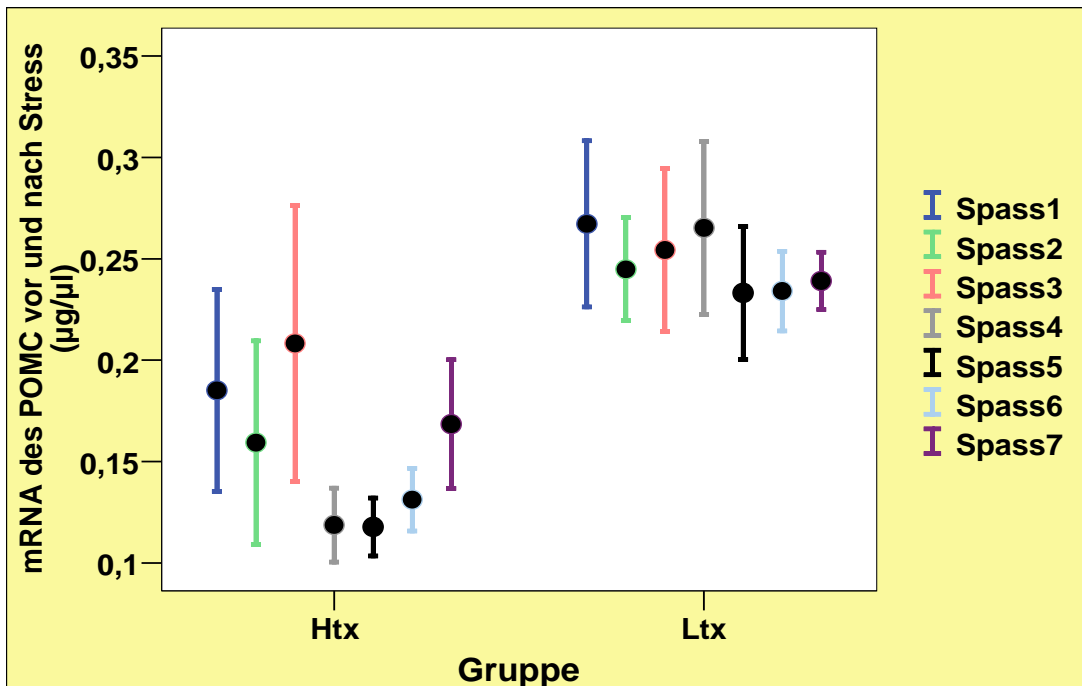


Abbildung 13: Grafische Darstellung der mRNA des POMC vor und nach exogenem Stresstest beim Verlauf im Patientenkollektiv HTX vs. LTX

5 Diskussion

5.1 Wichtigste Ergebnisse

Die wichtigsten Erkenntnisse der vorliegenden Studie sind: Die Basalwerte sind deutlich erhöht von mRNA des POMC in den Lymphozyten von chronisch alkoholabhängigen Patienten (Htx und Ltx) trotz einer durchschnittlichen Abstinenzphase von 26 Monaten, jedoch mindestens sechs Monate im Vergleich zu Patienten ohne Alkoholanamnese ($p < 0.01$). Dreißig Minuten nach der i.v. Gabe von hCRH wird ein deutlicher Anstieg der lymphatischen POMC-mRNA bei den nicht alkoholabhängigen Patienten gemessen ($p < 0.05$).

Die abstinent alkoholabhängigen Patienten zeigen eine veränderte Stressachse, da bei diesen Patienten ein deutlicher Abfall der POMC-mRNA-Konzentration festgestellt wird ($p < 0.05$). Diese Studie kommt zu dem Schluss, dass abstinent alkoholabhängige Patienten demzufolge eine deutlich veränderte neuroendokrine Immunachse vor der i.v. Gabe von hCRF haben und nicht in der Lage sind, auf die i.v. Gabe von hCRF angemessen mit einer erhöhten Produktion von mRNA des POMC zu reagieren. Im Gegenteil, der POMC-Spiegel fällt ab [66] (2003).

5.2 Veränderungen der neuroendokrinen Immunantwort

Die gefundenen Ergebnisse bestätigen eine Untersuchung der Arbeitsgruppe Rosenberger, Spies et al. von 2003. Weissmüller (2006) [95a] fand in einem ähnlichen Versuchsaufbau wie dem vorliegenden heraus, dass bei Alkoholkrankheit der POMC-mRNA-Spiegel in den Leukozyten deutlich erhöht ist, wobei nach der i.v. verabreichten hCRH-Gabe eine signifikante Depression des leukozytären POMC-mRNA-Spiegels beobachtet wird.

Bereits eine frühere Studie aus dem Jahr 2004 ergab, dass bei chronisch alkoholabhängigen Patienten nicht nur die mRNA der POMC-Expressrate verändert ist, sondern auch die T-Zellen einen veränderten Einfluss auf das Immunsystem ausüben. Ebenso kann eine veränderte Reaktion auf operativen Stress an Hand der veränderten T-Zellen festgestellt werden. Das durch T-Zellen gesteuerte Immun-

system ist vor der Operation deutlich unterdrückt und wahrscheinlich führte diese Situation zu einer inadäquaten zytotoxischen, lymphatischen Reaktion und insgesamt zu einer inadäquaten Antwort der Blutzellen nach der Operation. Diese veränderte Immunantwort wird wahrscheinlich verantwortlich sein für die erhöhte Infektionsrate bei chronisch alkoholabhängigen Patienten. Spies et al. 2004 [75].

Andere Studien zeigen, dass die Expressionsrate des mRNA des POMC nicht nur durch übermäßigen Alkoholkonsum dauerhaft erhöht sein kann, sondern so zeigte ein Tierversuch, dass sich diese Rate auch durch umweltbedingten Stress wie elektrische Schocks dauerhaft erhöhen kann [55] (2004).

Chronisch alkoholabhängige Patienten weisen auch einen niedrigeren Level von Plasma IL-8 während des Ausbruchs einer Infektion auf - im Gegensatz zu nicht alkoholabhängigen Patienten. Im frühen Stadium eines septischen Schocks haben chronisch alkoholabhängige Patienten ein heruntergesetztes Level der Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-8. Dagegen unterscheiden die entzündungshemmenden Parameter IL-10 und der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) I und II nicht zwischen abstinent alkoholabhängigen und nicht alkoholabhängigen Patienten [95] (2004). Die Veränderung der Zytokine ist aber nicht allein durch Alkoholmissbrauch gegeben, wie jüngste Untersuchungen ergaben, sondern auch durch andere Stressformen [81] (2005).

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Aussagefähigkeit der vorliegenden Arbeit

Die Fragestellung und die Methodik der vorliegenden Arbeit wurden so gewählt, dass die erarbeiteten Resultate eine Aussage über die Produktion der mRNA des POMC während eines endogenen und exogenen Stresstestes bei abstinent alkoholabhängigen versus nicht alkoholabhängigen Patienten erlauben. Damit will die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur Beleuchtung der Funktion der POMC-Expressrate leisten. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung ist es jedoch nicht möglich, Art, Dauer und Häufigkeit von Komplikationen in der klinischen Routine zu bestimmen. Es wird aber aufgrund vorhergehender Untersuchungen davon

ausgegangen, dass eine erhöhte POMC-Expressrate zu einer erhöhten postoperativen Komplikationsrate führt.

5.3.2 Diskussion der Ergebnisse im Vergleich mit früheren Studien

Die gefundenen Ergebnisse bestätigen eine Untersuchung der Arbeitsgruppe Rosenberger, Spies et al. von 2003. In einem ähnlichen Versuchsaufbau wie dem vorliegenden fanden sie heraus, dass die Basalwerte der mRNA des POMC in den Lymphozyten von chronisch alkoholabhängigen Patienten deutlich erhöht waren im Vergleich zu nicht alkoholabhängigen Patienten ($p < 0.01$). Dreißig Minuten nach der i.v. Gabe von hCRH wurde ein deutlicher Anstieg der lymphatischen POMC-mRNA in nicht alkoholabhängigen Patienten gemessen ($p < 0.05$).

Die abstinent alkoholabhängigen Patienten zeigen eine veränderte Stressachse, bei diesen Patienten wird ein deutlicher Abfall der POMC-mRNA-Konzentration festgestellt ($p < 0.05$). Diese Studie kommt zu dem Fazit, dass abstinent alkoholabhängige Patienten demzufolge eine deutlich veränderte neuroendokrine Immunachse vor der i.v. Gabe von hCRF haben und nicht in der Lage sind, auf die i.v. Gabe von hCRF angemessen mit einer erhöhten Produktion von mRNA des POMC zu reagieren. Im Gegenteil, der POMC Spiegel fällt ab. [66] (2003)

Eine Studie von Spies et al. 2004 ergab, dass bei chronisch alkoholabhängigen Patienten nicht nur die mRNA der POMC-Expressrate verändert ist, sondern auch die T-Zellen einen veränderten Einfluss auf das Immunsystem ausübten. Ebenso kann eine veränderte Reaktion auf operativen Stress anhand der veränderten T-Zellen festgestellt werden. Das durch T-Zellen gesteuerte Immunsystem ist vor der Operation deutlich unterdrückt und wahrscheinlich führt dies zu einer inadäquaten zytotoxischen lymphischen Reaktion und insgesamt zu einer inadäquaten Antwort der Blutzellen nach der Operation. Diese veränderte Immunantwort wird wahrscheinlich für die erhöhte Infektionsrate bei chronisch alkoholabhängigen Patienten verantwortlich sein. [75]

Andere Studien zeigen, dass die Expressionsrate des mRNA des POMC nicht nur durch übermäßigen Alkoholkonsum dauerhaft erhöht sein kann, sondern so

zeigt ein Tierversuch, dass sich diese Rate auch durch umweltbedingten Stress wie elektrische Schocks dauerhaft erhöhen kann [55] (2004).

Chronisch alkoholabhängige Patienten weisen auch ein niedrigeres Level von Plasma IL-8 während des Ausbruchs einer Infektion auf im Gegensatz zu nicht alkoholabhängigen Patienten. Im frühen Stadium eines septischen Schocks haben chronisch alkoholabhängige Patienten ein heruntergesetztes Level der Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-8. Dagegen unterschieden sich die entzündungshemmenden Parameter IL-10 und der Tumor Nekrose Faktor (TNF) I und II nicht zwischen alkoholabhängigen und nicht alkoholabhängigen Patienten [95] (2004). Die Veränderung der Zytokine ist aber nicht alleine durch Alkohol gegeben, wie jüngste Untersuchungen ergaben, sondern auch durch andere Stressformen [81] (2005).

5.4 Diskussion der Methode

5.4.1 Statistik

Die Anzahl der Patienten und damit der entnommenen Probenanzahl ist zu gering, um einer statistischen Untersuchung als Grundlage dienen zu können. Die Auswertung der Resultate hat damit eher deskriptiven qualitativen Charakter. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erlauben dennoch die Beurteilung der Ergebnisse und Hypothesen früherer Studien im Zusammenhang mit der POMC-Expressionsrate und das Formulieren eigener Schlussfolgerungen und Hypothesen.

5.4.2 RT und PCR

In dieser Studie wurde mit Hilfe der RT und PCR nach einem Transkript des POMC in der mRNA in Zellen des Immunsystems gesucht. Bei der Durchführung dieser Methoden fanden zwei Primer des dritten Exons des POMC Verwendung. Nach der Durchführung der RT und PCR wurde die amplifizierte DNA des untersuchten Abschnitts des Exons 3 des POMC nachgewiesen. Dies war ein Beweis für die Anwesenheit dieser Abschnitte in der mRNA der untersuchten Zellen. Sofort nach der Isolation der Leukozyten, die sowohl Lymphozyten als auch Mono-

zyten enthielten, aus dem Blut des Spenders, wurde die mRNA der unstimulierten Zellen extrahiert. Obwohl keine Stimulation vorlag, konnte in der von diesen Zellen exprimierten mRNA das Transkript des erwähnten Anteils des Exons 3 des POMC nachgewiesen werden.

Mit den Methoden RT und PVR wurden bei der Anwesenheit der entsprechenden Anteile der mRNA des POMC in den untersuchten Zellen immer nur Teile des dritten Exons des POMC amplifiziert. Damit ließ das Ergebnis dieser Untersuchung streng genommen keine Aussagen über die Expression des gesamten dritten Exons zu. Aufgrund theoretischer Grundlagen darf jedoch angenommen werden, dass Zellen, die den Teil des dritten Exons des POMC exprimierten, das gesamte Exon 3 des POMC produzierten. Dies gibt Anlass zu der Vermutung, dass unstimulierte Leukozyten mindestens teilweise das gesamte Exon 3 des POMC produzieren könnten. Die mRNA des POMC wurde in allen untersuchten Leukozyten gefunden, aber nur in wenigen Granulozyten. [3] (2005)

5.5 Einordnung der vorliegenden Arbeit in die Forschungsgeschichte

Neuere Forschungen versuchen, die Wirkungsweise der HPA-Achse auf die Verarbeitung von Stress in den Zellen der Haut nachzuweisen. Dahinter steht die Vermutung, dass die Haut ein eigenes Antistress-System beherbergt [22]. Im Jahr 2000 arbeiteten zwei Gruppen mit großem Erfolg an dieser These.

Kono et al. fanden CRH und POMC-Peptide außerhalb des Zentralnervensystems - eben in Zellen der Haut. Ihre Frage, die sie aus diesen Erkenntnis formulierten, suchte nach dem Entstehungsort der Peptide: Werden CRH und POMC vom zentralen Nervensystem in die Zellen der Haut transportiert oder lokal in der Haut produziert? Ihre Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass CRH und POMC lokal erzeugt werden. Damit schufen sie eine Arbeitshypothese, die von einem hauteigenen stressregulierenden System ausgeht [46]. Die deutsche Arbeitsgruppe Scholzen et al. bestätigte die Ergebnisse. Sie fand heraus, dass POMC verwandte Peptide die Produktion von humanen Zytokinen beeinflussen und dass sie zu einem erheblichen Anteil Einfluss auf Hautentzündungen nehmen [79].

Slominski et al. kommen zu dem Ergebnis, dass normale epidermische Zellen, wenn sie durch CRH stimuliert werden, einen Prozess in Gang setzen, der ähnlich hierarchisch strukturiert ist wie der HPA-Achse. Ein anderer Effekt ist, dass diese Zellen als Reaktion auf Stress die Produktion von POMC erhöhen. [84] (2005)

In Tierversuchen wird durch Kannan et al. 2004 [41] festgestellt, dass eine Überdosis an Alkohol nicht nur die Expressionsrate von POMC verändert, sondern auch z.B. die Bildung von Glutathionen (GSH) im Herzen herabsetzt. Diese durch Alkohol verursachten Herzdysfunktionen durch oxidativen Stress zeigen sich nicht bei Gabe von N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) vor der Alkoholzufuhr. Trotzdem verursachte NAC nicht die Erhöhung des Alkoholspiegels im Blut. Diese Studie demonstrierte, dass akute Alkoholzufuhr Herzstörungen durch die Zuführung von oxidativem Stress verursacht. Ein schnelles Abfallen des GSH-Levels kann möglicherweise für die beobachtete mitochondriale (Herz) Dysfunktion verantwortlich sein.

6 Zusammenfassung

Chronisch alkoholabhängige Patienten unterliegen einem zusätzlichen äußeren Stressfaktor, der im menschlichen Organismus wirkt und der die Hypothalamisch-Hypophysär-Adrenale-Stressachse (HPAA) aktiviert. Hierdurch wird die Ausschüttung des ACTH-Hormons in Relation zur Alkoholmenge bewirkt. Die HPAA-Stressachse bildet ACTH und β -Endorphin aus dem Vorläufermolekül POMC. Sie ist wesentlich an der Stressmodulation beteiligt. In der klinischen Praxis fördert das Operationstrauma die Stressantwort bei abstinent Alkoholkranken und führt so zu einer Herabsetzung des Immunsystems oder anders ausgedrückt: Es führt zu einer veränderten Stressantwort. Die vorliegende Studie kann nachweisen, dass chronisch alkoholabhängige Patienten eine veränderte neuroendokrine Stressachse vor dem endogenen und exogenen Stresstest besitzen und ihr Immunsystem nicht in der Lage ist, den Stress auszugleichen, indem es einen hohen Level von mRNA des POMC produziert.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Immunlage und -reaktion hinsichtlich der POMC-Genexpression von Lymphozyten vor und nach endogen oder exogen induziertem Stress im Vergleich von abstinent alkoholabhängigen und nicht alkoholabhängigen Patienten. Es wurden insgesamt 34 Patienten untersucht, von denen 20 abstinent alkoholabhängig und 14 nicht alkoholabhängig waren. Darüber hinaus teilten sich die Patienten auf zwei Gruppen auf, die Gruppe der herztransplantierten und die Gruppe der lebertransplantierten Patienten, wobei in jeder Gruppe sowohl abstinent alkoholabhängige wie auch nicht alkoholabhängige Patienten sind. Zusätzlich wird versucht, eine mögliche Erklärung für die erhöhten Komplikations- und Infektionsraten von chronisch erkrankten Patienten über die Stressachse des Proopiomelanokortin sowie der von POMC abgeleiteten Peptide zu finden.

Die Alkoholabhängigkeit wird bei positiven Kriterien des ICD 10/DSM-IV-Kriterien mit Hilfe des CAGE-Screening-Verfahrens und einer Alkoholaufnahme von mehr als 60g pro Tag diagnostiziert. Die Quantifizierung der POMC-mRNA aus den Leukozyten erfolgt mit Hilfe von reverser Transkription mit nachfolgender Polymerase-Kettenreaktion und solid-phase-minisequencing. Die statistische

Analyse erfolgt mit Hilfe des Statistikprogramms SAS der Charité Berlin. Zur Prüfung der Datenverteilung wird der Kolmogorov-Smirnov-Test angewandt. Ein $p < 0,05$ wird als statistisch signifikant angesehen.

Bezüglich der Basischarakteristika unterscheiden sich die Gruppe der leber- bzw. herztransplantierten Patienten nicht. Im Vergleich der abstinent alkohol- und nicht alkoholabhängigen Patienten unterscheiden sich die Basischarakteristika insofern, als bei den alkoholabhängigen Patienten das Alter bei Aufnahme höher 52,7 (39-66), der BMI niedriger 25,36 (19,8-39,4) war und mehr Männer als Frauen betroffen waren (16/4) - im Vergleich zu den nicht alkoholabhängigen Patienten [Alter 50, 35 (32-61); BMI 25, 58 (20,2-34,1); Geschlecht 10/4].

Bei den abstinent alkoholabhängigen Patienten sind die Basalwerte der POMC-mRNA im Vergleich mit der Gruppe der nicht alkoholabhängigen Patienten bereits erhöht. Die Basalwerte der alkoholabhängigen Patienten lagen zwischen 0,17 und 0,32 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Dabei lag der Mittelwert zwischen 0,21 und 0,22 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die Basalwerte der nicht alkoholabhängigen Patienten lagen zwischen 0,09 und 0,21 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Dabei lag der Mittelwert zwischen 0,14 und 0,13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

25 Minuten nach der Stresstestung (endogen und exogen) zeigte sich ein signifikanter Anstieg des POMC-mRNA-Spiegels in der Gruppe der nicht alkoholabhängigen Patienten (Herz: Mittelwert 0.054, Spannweite 0.054 bis 0.066; Leber: Mittelwert 0.188, Spannweite 0.17 bis 0.20). Bei den abstinent alkoholabhängigen Patienten fällt der POMC-mRNA-Spiegel deutlich ab (Herz: Mittelwert 0.116, Spannweite 0.07 bis 0.140, Leber: Mittelwert 0.13, Spannweite 0.09 bis 0.21).

In der Zusammenfassung wird folgendes ersichtlich: Die Daten der nicht alkoholabhängigen Patienten wurden sowohl vom endogenen wie exogenen Stresstest zusammengefasst. Die Ergebnisse sind sich sehr ähnlich, sowohl für die Gruppe der Leber wie für die Gruppe der Herzpatienten. Beide Kurven der POMC-Expressrate zeigen einen parallelen Verlauf. Die Basalwerte der Leberpatienten sind erhöht gegenüber denen der Herzpatienten. Auch bei der letzten Messung der POMC-Expressrate erreichen die Werte der Herzpatienten nicht das Niveau der Leberpatienten. Insgesamt ist die Verlaufskurve der POMC-Expressrate nach der Intervention bei den Leberpatienten stärker ausgeprägt als bei Herzpatienten.

So kann festgehalten werden, dass die nicht alkoholabhängigen Patienten, unabhängig von der jeweiligen Diagnose, eine adäquatere Reaktion auf Stressintervention zeigen als die abstinent alkoholabhängigen Patienten. Dabei ist es unerheblich, ob der Patient endogenem oder exogenem Stress ausgesetzt wird.

7 Literatur

[1] Aertgeerts B, Buntinx F, Ansoms S, & Fevery J: Screening properties of questionnaires and laboratory tests for the detection of alcohol abuse or dependence in a general practice population. *British Journal of General Practice* 2001;51:206–217.

[2] Adinoff B, Risher-Flower D, De Jong J, Ravitz B, Bone GH, Nutt DJ, Roehrich L, Martin PR, Linnoila M: Disturbances of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function during ethanol withdrawal in six men. *Am j Psychiatry* 1991;148:1023-5.

[3] Andersen GN, Hagglund M, Nagaeva O, Frangsmyr L, Petrovska R, Mincheva-Nilson L, Wikberg JE: Quantitative measurement of the levels of melanocortin receptor subtype 1, 2, 3 and 5 and pro-opio-melanocortin peptide gene expression, *Scand J Immunol* 2005;61(3):279-84.

[4] Anyanwu E, Watson N: Alcohol dependence: a critical look at the effects of alcohol metabolism. *Rev Environ Health*. 1997;12(3):201-13.

[5] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (Hg.). *Short Protocols in Molecular Biology*, New York 2005.

[6] Babor, T. F., de la Fuente, J. R., Saunders, J. & Grant, M.: *The Alcohol Use Disorders Identification Test: Guidelines for use in primary health care*. Geneva: World Health Organization 1992.

[7] Bardeleben von U, Heuser I, Holsboer F: Human: CRH stimulation response during acute withdrawal and after medium-term abstention from alcohol abuse. *Psychoneuroendocrinology* 1989; 14:441-9.

- [8] Benjannet S, Rondeau N, Day R, Chretien M, Seidah NG: PC1 and PC2 are pro-protein convertases capable of cleaving proopiomelanokortin at distinct pairs of basic residues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3564-8.
- [9] Beresford TP, Blow FC, Hill E, Singer K & Lucey MR: Comparison of CAGE questionnaire and computerassisted laboratory profiles in screening for covert alcoholism. *The Lancet UK* 1990; 336: 482–485.
- [10] Bohn MJ, Babor TF & Kranzler HR: The Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): Validation of a screening instrument for use in medical settings. *Journal of Studies on Alcohol* 1995;56:423–432.
- [11] Blalock JE: Proopiomelanokortin and the immune-neuroendocrine connection. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 16:1-72.
- [12] Blot WJ: Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988; 48:3282-3287.
- [13] Bogdanov AI, Yarushkina NI: Mechanisms of the effects of adrenocorticotrophic hormone on pain sensitivity in rats, *Neurosci Behav Physiol*, 2003;8:795-8.
- [14] Bomholt SF, Mikkelsen JD, Blackburn-Munro G: Normal hypothalamo-pituitary-adrenal axis function in a rat model of peripheral neuropathic pain, *Brain Research* 2005;1044(2):216-26.
- [15] Breuer JP, Neumann T, Heinz A, Kox WJ, Spies C: The alcoholic patient in the daily routine. *Wien Klin Wochenschr.* 2003; 115(17-18):618-33.
- [16] Brooks WH, Cross RJ, Roszman TL, Markesbery WR: Neuroimmunomodulation: neural anatomical basis for impairment and facilitation. *Ann neurol* 12: 56-61, 1982.

[17] Buzetti R, McLoughlin L, Lavender PM, Clark A JL, Rees LH. Expression of Pro-opiomelanocortin Gene and Quantification of Adrenocorticotrophic Hormone – like Immunoreactivity in Human Normal Peripheral Mononuclear Cells and Lymphoid and Myeloid Malignancies. Clin Invest 1989;83:733-737.

[18] Cabot PJ, Carter L, Gaiddon C, Zhang Q, Schafer M, Loeffler JP, Stein C: Immune cell-derived betaendorphin. Produktion, release and control of inflammatory pain in rats. J Clin Invest 1997;100:142-8.

[19] Chhajlani V, Muceniece R, Wikberg JE: Molecular cloning of a novel human melanocortin receptor. Biochem Biophys Res Commun 1993;195(2):866-73.

[20] Clark AJL, Lavender PM, Coates P, Johnson MR, Rees LH: In Vitro and in Vivo Analysis of the Processing and Fate of the Peptide Products of the Short Proopiome-lanocortin mRNA. Mol Endocrinol 1990;4:1737-1743.

[21] Cochet M, Chang ACY, Cohen SN: Characterization of the structural gene and putative 5'-regulatory sequences for human proopiome-lanocortin. Nature 1982;297:335-339.

[22] Cone RD: Anatomy and regulation of the central melanocortin system, Nature Neuroscience 2005;8:571-578.

[23] Cross RJ, Markesbery WR, Brooks WH, Roszman TL: Hypothalamic immune interactions. I. The acute effect of anterior hypothalamic lesions on the immune response. Brain Res 1980;196:79-87.

[24] DeBold CR, Menefee JK, Nicholson WE, Orth DN: Proopiome-lanocortin Gene is Expressed in many Normal Human Tissues and in Tumors not Associated with Ec-topic Adrenocorticotropin Syndrom. Mol Endocrinol 1988;2:862-870.

[25] Dronjak S, Gavrilovic L, Filipovic D, Radojic MB: Immobilization and cold stress affect sympatho-adrenomedullary system and pituitary-adrenocortical axis of rats exposed to long-term isolation and crowding. *Physiol Behav* 2004;81(3)409-15.

[26] Drouin J, Goodman HM: Most of the coding region of rat ACTH beta--LPH precursor gene lacks intervening sequences. *Nature* 1980;288(5791):610-613.

[27] Eberwine JH, Roberts JL: Analysis of pro-opiomelanocortin gene structure and function. *DNA* 1983;2(1):1-8.

[28] Ehrenreich H, Schuck J, Stender N, Pilz J, Gefeller O, Schilling L, Poser W, Kaw S: Endocrin and hemodynamic effects of stress versus systemic CRF in alcoholics during early and medium term abstinence. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21:1285-93.

[29] Ewing JA: Detecting alcoholism. The CAGE questionnaire. *JAMA* 1984; 252:1905–1907.

[30] George P, Kino C, Kino T: Ikaros transcription factors: flying between stress and inflammation. *J Clin Invest.* 2005;115(4):844–848.

[31] Girdler SS, Maixner W, Naftel HA, Stewart PW, Moretz RL, Light KC: Cigarette smoking, stress-induced analgesia and pain perception in men and women, *Pain* 2005;114 (3):372-85.

[32] Hargreaves KM, Müller GP, Dubner R, Goldstein D, Dionne RA: Corticotropin-releasing factor (CRF) produces analgesia in humans and rats. *Brain Research* 1987;422(1):154-7.

[33] Hays R D, Revetto J P: Old and new MMPI-derived scales and the short- MAST as screening tools for alcohol disorder. *Alcohol and Alcoholism* 1992;27: 685–695.

[34] Danowski TS, Hofmann K, Yajima H, Moses C: ACTH-like activity in man of a synthetic 23 amino acid polypeptide. *Metabolism* 1961;10:835-47.

[35] Holden JE, Jeong Y, Forrest JM: The endogenous opioid system and clinical pain management, *AACN Clin Issues* 2005;3:291-301.

[36] Huges J, Smith T, Kosterlitz H, Fothergill L, Morgan B, Morris, H:
Identification of two related pentapeptides from brain with potent opiate
agonist activity. *Nature* 1975;258:577-579.

[37] Ireland MA, Vandongen R, Davidson L, Beilin LJ, Rouse IL: Acute effects of moderate alcohol consumption on blood pressure and plasma catecholamines. *Clin Science* 1984;66:643-648.

[38] Jahn O, Eckart K, Brauns O, Spiess, J: The binding protein of corticotropin-releasing factor: Ligand-binding site and subunit structure, *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(19):12055–12060.

[39] Jeannotte L, Burbach JP, Drouin J: Unusual proopiomelanocortin ribonucleic acids in extrapituitary tissues: intronless transcripts in testes and long poly(A) tails in hypothalamus. *Mol Endocrinol* 1987;10:749-57.

[40] Jensen NH, Dragsted I, Christensen JK, Joergensen JC, Qvist J: Severity of illness and outcome in alcoholic patients in the intensive care unit. *Intensive Care Med* 1988;15:19-22.

[41] Kannan M, Wang L, Kang J: Myocardial Oxidative Stress and Toxicity Induced by Acute Ethanol Exposure in Mice, *Experimental Biology and Medicine* 2004;229: 553-559.

[42] Karsi A, Waldbieser GC, Small BC, Wolters WR: Genomic structure of the proopiomelanocortin gene and expression during acute low-water stress in channel catfish, *Gen Comp Endocrinol* 2005;143(2):104-112.

[43] Kavelaars A, Ballieux RE, Heijnen CJ: Two different signalling pathways for the induction of immunoreactive beta-endorphin secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *Endocrinology* 1991;128(2):765-770.

[44] Kavelaars A, Ballieux RE, Heijnen CJ: In vitro beta-adrenergic stimulation of lymphocytes induces the release of immunoreactive beta-endorphin. *Endocrinology* 1990;126(6):3028-32.

[45] Kavelaars A, Ballieux RE, Heijnen CJ: The role of IL-1 in the corticotropin-releasing factor and arginine- vasopressin-induced secretion of immunoreactive beta-endorphin by human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 1989; 142(7):2338-42.

[46] Kono M, Nagata H, Umemura S, Kawana S, Osamura RY: In situ expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) and proopiomelanocortin (POMC) genes in human skin. *FASEB J.* 2000;12:2297-9.

[47] Lacaze-Masmonteil T, DeKeyser V, Luton JP, Kahn A, Bertagna X: Characterization of proopiomelanocortin transcripts in human nonpituitary tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7261-7265.

[48] Lazarus R S: *Emotion and adaption*, Oxford University Press, New York u. Oxford 1991.

[49] Lê AD, Harding S, Juzytsch W, Fletcher PJ, and Shaham Y: The Role of Corticotropin-Releasing Factor in the Median Raphe Nucleus in Relapse to Alcohol, *The Journal of Neuroscience* 2002; 22(18):7844-7849.

[50] Levi, L: Stress and distress in response to psychosocial stimuli. Laboratory and real-life studies on sympatho-adrenomedullary and related reactions, Pergamon Pr. (Internat. Series of monographs in experimental psychology. 17.), Braunschweig u. a. 1973.

[51] Lieber CS: Medical disorders of alcoholism. *N Engl J Med* 1995; 333:1058-65.

[52] Nakanishhi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang AC, Cohen SN, Numa S: Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovin corticotrophin-beta-lipoprotein precursor. *Nature* 1979; 278:423-7.

[53] Navarro M, Cubero I, Chen A, Chen HY, Knapp D, Breese G, Marsh D, Thiele T: Effects of Melanocortin Receptor Activation and Blockade on Ethanol Intake: A Possible Role for the Melanocortin-4 Receptor, *Alcohol Clin Exp Res.* 2005; 29(6):949–957.

[54] Newell-Price J: Proopiomelanocortin gene expression and DNA methylation: implications for Cushing's syndrome and beyond, *J Endocrinol* 2003; 177(3):365-72.

[55] O'Connor KA, Ginsberg AB, Maksimova E, Wieseler Frank JL, Johnson JD, Spencer RL, Campeau S, Watkins LR, Maier SF: Stress-induced sensitization of the hypothalamic-pituitary adrenal axis is associated with alterations of hypothalamic and pituitary gene expression, *Neuroendocrinology*, 2004;80(4):252-63.

[56] Onali P, Olanas MC: Identification and characterization of muscarinic receptors potentiating the stimulation of adenylyl cyclase activity by corticotropin-releasing hormone in membranes of rat frontal cortex, *J Pharmacol Experimental Therapy* 1998;286(2):753-9.

[57] Pacak, K, Palkovits, M: Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders 2001;22(4):502-48.

[58] Pastorcic M, Boyadjieva N, Sarkar DK: Comparisson of the effekts of alcohol and acetaldehyde on proopiomelanocortin mRNA levels and beta-endorfin secretion from hypothalamic neurons in primary Cultures. *Mol Cell Neurosci* 1994;5: 580-6.

[59] Picon A, Bertagna X, de Keyzer Y: Analysis of the human proopiomelanocortin gene promoter in a small cell lung carcinoma cell line reveals an unusual role for E2F transcription factors, *Oncogene* 1999;18(16):2627-33.

[60] Pruetz SB, Fan R, Zheng Q, Myers PL, Hébert P: Modeling and Predicting Immunological Effects of Chemical Stressors: Characterization of a Quantitative Biomarker for Immunological Changes caused by Atrazine and Ethanol, *Toxicological Sciences* 2003;75:343-354.

[61] Racca S, Spaccamiglio A, Esculapio P, Abbadessa G, Gangemi L, Dicarolo F, Portalenone P: Effects of swim stress and alpha-MSH acute pre-treatment on brain 5-HT transporter and corticosterone receptor, *Pharmacol Biochem Behav.* 2005;12. Juli

[62] Rauchenzauner M, Kountchev J, Ulmer H, Pechlaner C, Bellmann R, Wiedermann CJ, Joannidis M: Disturbances of electrolytes and blood chemistry in acute alcohol intoxication, *Wien Klin Wochenschr* 2005;117(3):83–91.

[63] Rist, Fred: Westfälische Wilhelms-Universität Münster. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften:

<http://www.uni-duesseldorf.de/awmf/II/076-003.htm>. AWMF online, zitierbare Quelle: Sucht 50 (2) 102-112 (2004) (Stand vom 2.1.2006).

[64] Rivier C: Effects of pretreatment with alcohol on subsequent endocrine and immune response in the adult male rat. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;148:1023-5.

[65] Rivier C, Dimitri E, Rivier G, Rivier J: Role of Corticotropin-Releasing Factor Receptors Type 1 and 2 in Modulating the Rat Adrenocorticotropin Response to Stressors, *Endocrinology* 2003;144(6):2396-2403.

[66] Rosenberger P, Muhlbauer E, Weissmüller T, Rommelspacher H, Sinha P, Wernecke KD, Finckh U, Rettig J, Kox WJ, Spies CD: Decreased proopiomelanocortin mRNA in lymphocytes of chronic alcoholics after intravenous human corticotropin releasing factor injection. *Alcohol Clin Exp Res* 2003;11:1693-700.

[67] Rumpf HJ, Hapke U, Erfurth A, John U: Screening questionnaires in the detection of hazardous alcohol consumption in the general hospital: Direct or disguised assessment? *Journal of Studies on Alcohol* 1998;59:698–703.

[68] Saitz R, Ghali WA, Moskowitz Ma. The impact of alcoholrelated diagnosis on pneumonia outcomes. *Arch Intern Med* 1997;157:1446-52.

[69] Seitz HK, Simanowski UA: Ethanol and carcinogenesis of the alimentary tract. *Alcohol Clin Exp Res*.1986;10:33S-40S.

[70] Spies C, Nordmann A, Brunner G, Marks C, Conrad C, Berger G, Runkel N, Neumann T, Müller C, Rommelsbacher H, Specht M, Hannemann L, Striebel HW, Schaffartzik W: Intensive care unit is prolonged in chronic alcohol men following tumor resection of the upper digestive tract. *Acta Anaesthesiol Scand* 1996;40:649-656.

[71] Spies C, Neuner B, Neumann T, Blum S, Müller C, Rommelsbacher H, Rieger A, Sanft C, Specht M, Hannemann L, Striebel HW, Schaffartzik W: Intercurrent complications in chronic alcoholic men admitted to the intensive care unit following trauma. *Intensive Care Med* 1996; 22:286-293.

[72] Spies C, Rommelsbacher H: Alcohol withdrawal in the surgical patient: prevention and treatment. *Anästh Analg* 1999; 88:946-54.

[73] Spies C, Neumann T, Sinha P, Müller C, Schmidt L, Kox W, Schönfeld H: Perioperative Diagnostik der Alkoholkrankheit bei männlichen Patienten mit einem Tumor des Gastrointestinaltraktes, *www.scientificjournals.com* 1999;(1):39-46.

[74] Spies C, Neumann T, Otter H, Kox W: Klinische Relevanz der Suchterkrankungen in operativen Einrichtungen, *www.scientificjournals.com* 2003;(1):7-12.

[75] Spies CD, von Dossow V, Eggers V, Jetschmann G, El-Hilali R, Egert J, Fischer M, Schroder T, Hoflich C, Sinha P, Paschen C, Mirsalim P, Brunsch R, Hopf J, Marks C, Wernecke KD, Pragst F, Ehrenreich H, Müller C, Tonnesen H, Oelkers W, Rohde W, Stein C, Kox WJ: Altered cell-mediated immunity and increased postoperative infection rate in long-term alcoholic patients. *Anesthesiology*. 2004;100(5):1088-100.

[76] Schafer M, Carter L, Stein C: Interleukin 1 beta and corticotrophin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4219-23.

[77] Schafer M, Mousa SA, Zhang Q, Carter L, Stein C: Expression of corticotrophin-releasing factor in inflamed tissue is required for intrinsic peripheral opioid analgesia. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 6096-100.

[78] Scheuch K, Schröder H: Mensch unter Belastung. Stress als humanwissenschaftliches Integrationskonzept, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1990.

[79] Scholzen TE, Kalden DH, Brzoska T, Fisbeck T, Fastrich M, Schiller M, Bohm M, Schwarz T, Armstrong CA, Ansel JC, Luger TA: Expression of proopiomelanocortin peptides in human dermal microvascular endothelial cells: evidence for a regulation by ultraviolet light and interleukin-1. J Invest Dermatol. 2000; 115(6):1021-8.

[80] Schwab CL, Fan R, Zheng Q, Myers LP, Hébert P, Pruett SB: Modeling and Predicting Stress-Induced Immunosuppression in Mice Using Blood Parameters, Toxicological Sciences 2005;83(1):101-113.

[81] Sekiyama A, Ueda H, Kashiwamura S, Nishida K, Kawai K, Teshima-kondo S, Rokutan K, and Okamura H: IL-18; a cytokine translates a stress into medical Science, The Journal of Medical Investigation 2005;52:236-239.

[82] Selzer ML: The Michigan Alcoholism Screening Test: The quest for a new diagnostic instrument. American Journal of Psychiatry 1971;127:1653-1658.

[83] Sharp B, Linner K: What do we know about the Expression of Proopiomelanocortin Transcripts and related Peptides in lymphoid Tissue? Endocrinology 1993;133(5):1921A-B.

[84] Slominski A, Zbytek B, Szczesniewski A, Semak I, Kaminski J, Sweatman T, Wortsman J: CRH stimulation of corticosteroids production in melanocytes is mediated by ACTH, J Physiol Endocrinol Metab, 2005;288(4):E701-6.

[85] Smith AI, Funder JW: Proopiomelanocortin Processing in the Pituitary, Central nervous System and Peripheral Tissues. *Endocr Rev* 1988;9:159-179.

[86] Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW: Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 1983;36(3):165-86.

[87] Takahashi H, Hakamata Y, Watanabe Y, Kikuno R, Miyata T, Numa S: Complete nucleotide sequence of the human corticotropin- β -lipotropin precursor gene. *Nucleic Acids Res* 1983;11:6847-6858.

[88] Takemura R, Inoue Y, Izawa S: Stress response in yeast mRNA export factor: reversible changes in Rat8p localization are caused by ethanol stress but not heat shock, *Journal of Cell Science* 2004;117:4189-4197.

[89] Toennesen H, Petersen KR, Hojgard L, Stockholm KH, Nielsen HJ, Knigge U, Kehlet H: Postoperativ morbidity among symptom-free misusers. *Lancet* 1992;340:334-7.

[90] Toennesen H, Möller H, Andersen JR, Jensen E, JuelK. Cancer morbidity in alcohol abusers. *Br J Cancer* 1994;69:327-32.

[91] Toennesen H, Kehlet H: Preoperativ alcoholism and postoperative morbidity. *Br J Surg* 1999;86:869-74.

[92] Vagts DA, Iber T, Noldge-Schomburg GF: Alcohol - a perioperative problem of Anaesthesia and intensive care medicine. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2003;38(12):747-61.

[93] Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J: Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin, *Science*, 1981; 213(4514): 1394-7.

[94] van Woudenberg Ad, metzelaar MJ, van der Kleij AA, de Wied D, Burbach JP, Wiegant VM: Analysis of proopiomelanocortin (POMC) messenger ribonucleic acid and POMC-derived peptides in human peripheral blood mononuclear cells: no evidence for a lymphocyte-derived POMC system. *Endocrinology* 1993;133(5): 1922-33.

[95] von Dossow V, Schilling C, Beller S, Spies C: Altered immune parameters in chronic alcoholic patients at the onset of infection and of septic shock, *Crit Care* 2004;8(5):R312–R321.

[95a] Weissmüller T: Proopiomelanocortin RNA Expression in Leukozyten alkoholkranker Patienten nach intravenöser hCRH Injektion. *Dissertationsschrift Berlin* 2006.

[96] Westermann J, Pabst R: Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system? *Immunol Today* 1990; 11: 406-410.

[97] Winkler A, Roske I, Furkert j, Fickel J, Melzig Mf: Effects of voluntary ethanol ingestion on the POMC gene expression in the rat pituitary and on the plasma beta-endorphin content. *Alcohol Alcohol* 1995;30:231-8.

[98] Winkler A, Schmidt LG, Rommelspacher H, Melzig MF: Quantification of Proopiomelanocortin mRNA in Peripheral Lymphocytes of Alcoholics. *Alcohol* 1998;15(1):43-50.

[99] Yalow RS, Berson SA,: Size heterogeneity of immunoreaktiv human ACTH in plasma and in extracts of pituitary glands and ACTH-producing thymoma. Biochem Biophys Res Commun 1971; 44: 439-45.

[100] Young E, Bronstein D, Akil H: Proopiomelanotropin biosynthesis, processing, and secretion: Functional implications. Handbook of experimental Pharmacology, Vol. 104/I, Ed. A. Herz 1993.

[101] Xiu L, Weiss F: Additive Effect of Stress and Drug Cues on Reinstatement of Ethanol Seeking: Exacerbation by History of Dependence and Role of Concurrent Activation of Corticotropin-Releasing Factor and Opioid Mechanisms, The Journal of Neuroscience 2002; 22(18): 7856-7861.

[102] Rudell WAS, Axon ATR, Findlay JM. Effect of cimetidine on the gastric bacterial flora. Lancet 1980; 1: 672- 74.

Online Quellen

[OQ:1] Thiele, Stefanie: Stressinduzierte Veränderungen in den Plasmaspiegeln von TNFalpha, IL-6, IL-10 bei Patienten mit ethyltoxischer und virusinduzierter Leberzirrhose vor Lebertransplantation.

(http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000002881) abgefragt am 1.7.09

THOMAS BÖTTGER

Auf einen Lebenslauf wird in dieser elektronischen Veröffentlichung verzichtet.

Danksagung

Nach dem Abschluss der Untersuchung und Tests sowie Fertigstellung der Dissertation ist es mir ein besonderes Bedürfnis, mich bei den nachfolgend aufgeführten Personen zu bedanken.

Mein besonderer Dank geht an dieser Stelle an meine Doktormutter, Frau Professor Dr. med. Claudia Spies, Leitung der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Charité–Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité-Mitte. Das gilt sowohl für die Überlassung des Dissertationsthemas, die uneingeschränkt engagierte Betreuung und gute Beratung als auch für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. med. H. Rommelspacher, Institut für klinische Neurobiologie der Charité, – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, danke ich für die bereitwillige Aufnahme im Labor für Neurobiologie und für die Bereitstellung von Gerätschaften und Laborchemikalien.

Herrn Dr. med. P. Rosenberger, Resident, Department of Anesthesiology and Critical Care, Brigham and Women’s Hospital, Boston/Harvard Medical School, ehemals Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Charité–Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité-Mitte, danke ich für die hervorragende Einarbeitung und Betreuung bei der Durchführung des experimentellen Teils sowie für die kritische Durchsicht des Manuskriptes. Seine stets vorhandene Bereitschaft Teilergebnisse meiner Arbeit kontrovers zu diskutieren, waren von unschätzbarem Wert und halfen bei der Erkennung und Beseitigung von so manchen experimentellen Anlaufschwierigkeiten.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Dr. rer. nat. E. Mühlbauer, Abteilung für Anatomie und Zellbiologie der Universität Halle und Wittenberg herzlich bedanken: Seine molekularbiologische Erfahrung verhalf mir zu einem größeren und differenzierteren Verständnis der experimentellen Methodik. Seine Hilfestellung in der täglichen Laborarbeit befähigte mich zu einem genaueren und effizienteren Vorgehen. Weiterhin danke ich Ihm für die kritische Durchsicht des Manuskriptes, insbesondere der experimentellen Methodik. Frau Strauss, MTA der Abteilung für klinische Neurobiologie, Universitätsmedizin Berlin, Charité Campus

Benjamin Franklin, danke ich für ihre umfassende Hilfe bei der Quantifizierung der POMC mRNA.

Frau Dipl.-Math. G. Siebert, Wissenschaftliche Mitarbeiterin des Instituts für Biomedizin (Leiter: Prof. Dr. K.-D. Wernecke) der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum, danke ich für die Beratung der statistischen Analyse der Ergebnisse. Ihre Bereitschaft meine Arbeit, mehr als nur einmal, methodisch zu erfassen, war von großem Wert.

Ebenso möchte ich ganz herzlich folgenden Doktorandinnen und Doktoranden der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin des Klinikums Charité Mitte der Humboldt Universität Berlin für deren Zusammenarbeit, insbesondere bei der Abnahme unzähliger Blutproben, danken: Ratiba El-Hilali, Dr. Julia Egert, Marc Fischer, Nina Hagemann, Dr. Gesine Jetschmann, Birgit Bohm, Tanja Freund, Dr. Katrin Gertig, Petra Muschinski, Michaela Hartmann, Eugen Eliasch. Besonders möchte ich mich auch in diesem Zusammenhang bei Frau Dr. Alexandra Lau, Assistenzärztin, Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité-Mitte bedanken. Ihre ausführlichen Anmerkungen zu Rechtschreibung und Layout dieser Arbeit waren von immensem Wert.

Ich bedanke mich weiter bei dem ärztlich und pflegerisch tätigen Personal der entsprechenden Abteilungen für die Kooperation und Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Abschließend bedanke ich mich noch bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der aufgeführten Kliniken und Institute, die mir in irgendeiner Art und Weise geholfen haben, ohne dass ich sie persönlich namentlich aufgeführt habe.

Zuletzt, gilt meiner Familie Dank für Ihre verständnisvolle und vielseitige Unterstützung.

11. Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass die Dissertation von mir, Thomas Böttger, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Erfurt, den 29.09.2009