

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie am
Zentrum für Nervenheilkunde
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen-Christian Krieg

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg,
Standort Marburg

**Pharmakologische Charakterisierung der Wirkungen
von Glukokortikoiden auf die Atmungskette und die
ATP-Synthese in adrenokortikotrophen
Hypophysenzellen (AtT 20)**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg



vorgelegt von
Christina Heinrich aus Hamburg
Marburg, 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 1.12.2005.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:

Prof. Dr. B. Maisch

Referent:

PD Dr. H. Vedder

Korreferent:

Prof. Dr. J. Koolman

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1.0	Einleitung	1
1.1	<i>Die mitochondriale Atmungskette</i>	1
1.1.1	Aufbau und Funktion der Mitochondrien und der Atmungskette	1
1.1.2	Schädigungsparadigmen der Atmungskette	2
1.1.3	Pathologische Veränderungen der Atmungskette	3
1.1.4	Therapieansätze bei Mitochondriopathien	5
1.2	<i>Glukokortikoide</i>	6
1.2.1	Struktur und Wirkungen von Glukokortikoiden (GC)	6
1.2.2	Physiologische Regulation der Freisetzung von Glukokortikoiden - die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse	8
1.2.3	Zelluläre Effektormechanismen und Effekte von Glukokortikoiden auf die Atmungskette	10
1.3	<i>Zielsetzung, Hypothesen und Arbeitsprogramm</i>	15
2.0	Methoden	18
2.1	<i>Zellkultur</i>	18
2.1.1	Kultivierung von AtT 20 Zellen	18
2.1.2	Aussaat von AtT 20 Zellen für die Experimente	18
2.2	<i>Verwendete Nachweisverfahren</i>	19
2.2.1	Nachweisverfahren zur Bestimmung der zellulären Reduktionskapazität	19
2.2.2	ATP-Nachweisverfahren	20
2.2.3	Quantitative Proteinbestimmung	21
2.3	<i>Versuchsdurchführung</i>	22
2.3.1	Behandlung der Zellen mit Steroiden	22
2.3.2	Behandlung der Zellen mit anderen Substanzen	32
2.4	<i>Statistische Auswertung</i>	32

3.0	Ergebnisse	36
3.1	<i>Substanz-Abhängigkeit der Effekte</i>	36
3.1.1	Wirkungen von Dexamethason auf die Atmungskette	36
3.1.2	Wirkungen von Dexamethason im Vergleich zu den Wirkungen von Methylprednisolon	41
3.1.3	Wirkungen von wasserlöslichem Dexamethason	42
3.2	<i>Zeitliche Charakterisierung der Dexamethason-Effekte</i>	44
3.2.1	Charakterisierung der Dosis-Effekte von Dexamethason bei unterschiedlichen Inkubationszeiten:	45
3.2.2	Die Dexamethason Dosis-Wirkungs-Kurve bei 0,25 h Inkubation	46
3.2.3	Die Dexamethason Dosis-Wirkungs-Kurve bei 0,5 h Inkubation	48
3.2.4	Die Dexamethason Dosis-Wirkungs-Kurve bei 24 h Inkubation	50
3.3	<i>Charakterisierung weiterer Variablen der Effekte von Dexamethason</i>	52
3.3.1	Der Einfluss des pH-Wertes auf die Wirkungen von Dexamethason	53
3.4	<i>Antagonisierung der Dexamethason-Effekte durch den Glukokortikoidrezeptor-Antagonisten RU38486</i>	55
3.5	<i>Dexamethason und Cycloheximid</i>	57
3.6	<i>Ergebniszusammenfassung</i>	58
4.0	Diskussion	59
4.1	<i>EZ4U-Test - Parameter mitochondrialer Funktion</i>	59
4.2	<i>Gegenüberstellung von Kurz- und Langzeiteffekten von Dexamethason</i>	60
4.3	<i>Kurzzeiteffekte von Dexamethason auf AtT 20 Zellen</i>	61
4.3.1	Dosisabhängigkeit der Dexamethason-Kurzzeiteffekte	61
4.3.2	pH-Abhängigkeit der Dexamethason-Kurzzeiteffekte	62
4.3.3	Antagonisierbarkeit der Dexamethason-Kurzzeiteffekte durch RU38486 und Cycloheximid	63
4.3.4	Berichte über Kurzzeiteffekte von GC auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel	64
4.3.5	<u>Zusammenfassung</u> - Kurzzeiteffekte als Modell nicht-genomischer	

	Effekte von Dexamethason auf die Atmungskette	66
4.4	<i>Langzeiteffekte von Dexamethason auf AtT 20 Zellen</i>	67
4.4.1	Dexamethason hat eine supprimierende Langzeitwirkung auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel	67
4.4.2	Berichte über supprimierende GC-Langzeiteffekte	67
4.4.3	Der supprimierende Dexamethason-Langzeiteffekt wird durch Atmungskettenhemmer vermindert	68
4.4.4	Berichte über Effekte von Atmungskettenhemmern auf die Wirkung von GC	68
4.4.5	Berichte über Langzeiteffekte von GC auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel	70
4.4.6	<u>Zusammenfassung</u> – Werden Langzeiteffekte von Dexamethason über Wirkungen auf die Proteinbiosynthese vermittelt?	73
4.5	<i>Weitere Aspekte der Dexamethason-Wirkungen</i>	73
4.5.1	Glutamat - Ein Schädigungsmodell für Dexamethason-Effekte auf AtT 20 Zellen?	73
4.5.2	Unspezifische Effekte auf zelluläre Membranen – Kein Modell für Dexamethason-Effekte auf AtT 20 Zellen	74
4.5.3	Die Glutathionperoxidase - Kein Modell für Dexamethason-Effekte auf AtT 20 Zellen	75
4.6	<i>GC und Mitochondriopathien</i>	76
4.7	<i>Effekte auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse</i>	76
5.0	Zusammenfassung und Ausblick	79
6.0	Literaturverzeichnis	81
7.0	Anhang	97

1.0 Einleitung

1.1 Die mitochondriale Atmungskette

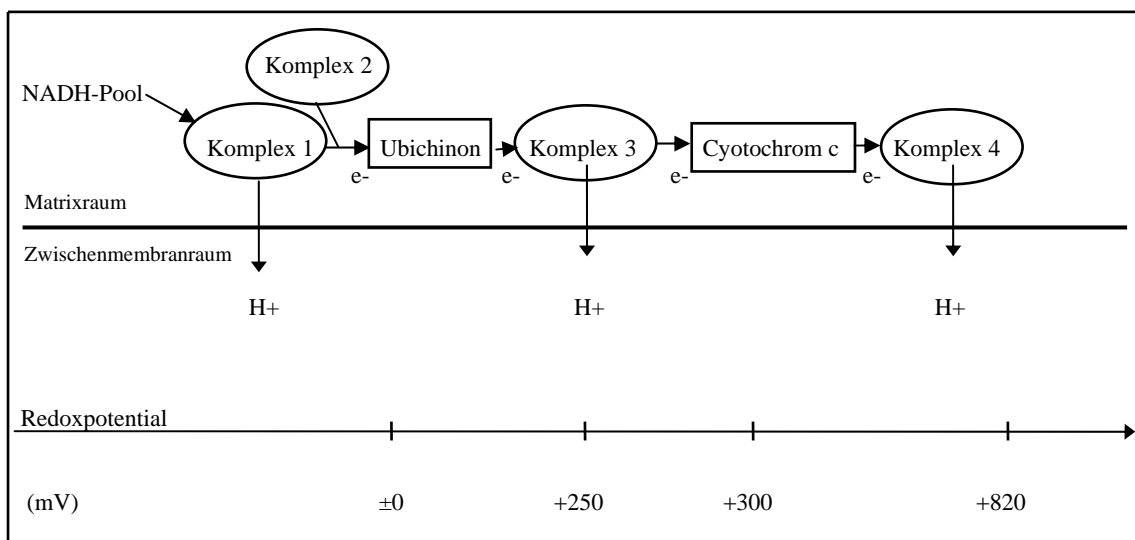
1.1.1 Aufbau und Funktion der Mitochondrien und der Atmungskette

Mitochondrien sind Organellen der Zellatmung, die über die Atmungskette den Energiespeicher und -überträger ATP (Adenosintriphosphat) synthetisieren und damit unter aeroben Umständen über 95% der Zellenergie produzieren (Scheller *et al.*, 2003). Sie sind zudem wesentlich am Kohlenhydrat-, Fett- und Aminosäurenstoffwechsel beteiligt und integrieren Stoffwechselprozesse wie den Zitratzyklus und die beta-Oxidation.

Mitochondrien bestehen aus einer äußeren und einer inneren Membran. Der innerhalb der inneren Membran befindliche Raum heißt Matrixraum. Der von äußerer und innerer Membran umschlossene Raum heißt Zwischenmembranraum und ist durch zahlreiche Einstülpungen der inneren Membran gekennzeichnet.

Die äußere Membran ist durch Membrankanäle relativ frei permeabel. Die innere Membran ist undurchlässig und besteht zu 20% aus Lipiden und 80% Proteinen, welche größtenteils konstitutionelle Bestandteile der Atmungskette und verschiedener Transportsysteme sind. Über die innere Membran wird ein elektrochemischer Gradient aufgebaut, der die ATP-Synthese ermöglicht.

Abbildung 1: Atmungskette



Mitochondrien verfügen über eine eigene DNS (Desoxyribonukleinsäure), welche im Matrixraum gelegen ist und für ca. 5% der mitochondrialen Strukturproteine, u.a. Untereinheiten der Atmungskettenenzyme kodiert (Attardi und Schatz, 1988).

Die Atmungskette ist eine funktionelle Abfolge von chemischen Reaktionen.

Sie ist ein hocheffektiver Mechanismus, Stoffwechselenergie durch Umwandlung in eine transportable Form in großen Mengen verwertbar zu machen.

Im Metabolismus anfallende energiereiche Produkte sind v.a. NADH_2 (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid+ H_2) und FADH_2 (Flavin-Adenin-Dinucleotid+ H_2). Sie stammen größtenteils aus dem Citratzyklus und der β -Oxidation der Fettsäuren.

In der Atmungskette wird vorwiegend das energiereiche Substrat NADH mit Sauerstoff oxidiert, wobei Wasser und freie Energie (-219 kJ pro Mol NADH) entstehen. Ein derart hoher Betrag an freier Energie ist für das System nicht auf einmal nutzbar, deshalb wird die Reaktion in kleinere Schritte aufgespalten. Dies gelingt, indem der Wasserstoff bzw. die Elektronen über einige Zwischenreaktionen schrittweise von einem System mit negativerem Redoxpotential (NADH oder FADH) zu einem System mit positiverem Redoxpotential (Sauerstoff) geführt werden. Dies geschieht funktionell über die einzelnen Enzyme der Atmungskette. Auf diese Weise können die Energiebeträge effektiver an endergone Reaktionen und den Transport von Wasserstoffionen in den Zwischenmembranraum gekoppelt werden. Der so entstehende elektrochemische Gradient, d. h. das Gefälle hoher Wasserstoffionenkonzentration im Zwischenmembranraum und niedriger Konzentrationen im Matrixraum wird zur Synthese von ATP verwendet.

Die einzelnen Bestandteile der Atmungskette können in vier Proteinkomplexe unterteilt werden. Enzymatisch handelt es sich hier um Oxidoreduktasen. Zwischen ihnen befinden sich die Hilfssubstrate Ubichinon und Cytochrom c, die als Sammelbecken für Wasserstoff bzw. Elektronen fungieren. Die Komplexe übernehmen nicht nur den Transport von Elektronen innerhalb der Membran, sondern (außer Komplex 2) auch den gerichteten Transport von Protonen durch die Membran (Karlson et al., 1994, Löffler und Petrides, 1997).

1.1.2 Schädigungsparadigmen der Atmungskette

Eine Schädigung der Atmungskette ist über die zwei Prinzipien Hemmung und Entkopplung möglich. Es gibt spezifische Substanzen, die den Elektronentransport an bestimmten Enzymen der Atmungskette hemmen. Das sind für Komplex 1 Rotenon und

Barbiturate, für Komplex 2 Malonat, für Komplex 3 Antimycin und Chinonanaloga sowie für Komplex 4 Cyanid und Kohlenmonoxid. Im Weiteren gibt es auch Inhibitoren der Phosphorylierung wie z.B. Oligomycin. Sie hemmen im Komplex 5 den Protonenrückstrom in den Matrixraum. Entkoppler lassen den Wasserstoff- und Elektronentransport unbeeinflusst, verhindern jedoch die Synthese von ATP, indem sie in der Membran einen offenen Nebenweg für Protonen schaffen. Dies führt zu einem Zusammenbruch des Konzentrationsgradienten. Die Atmungskette „läuft im Leerlauf“. Eine derartig wirkende Substanz ist z.B. Dinitrophenol (Karlson *et al.*, 1994, Löffler und Petrides, 1997).

1.1.3 Pathologische Veränderungen der Atmungskette

Defekte der mitochondrialen Energieproduktion wurden das erste Mal in den sechziger Jahren beschrieben (Luft *et al.*, 1962). Damals konnten hauptsächlich morphologisch veränderte Mitochondrien und histologische Veränderungen („Ragged-Red-Fibres“ nach Spezialfärbung) festgestellt werden (Engel und Cunningham, 1963). In den siebziger Jahren wurden dann einzelne Enzymdefekte der Atmungskette oder des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes beschrieben (Blass *et al.* 1970; Willems *et al.*, 1977). In den achtziger Jahren wurden die ersten Mutationen in der mitochondrialen Erbinformation nach vollständiger Entschlüsselung des mitochondrialen Genoms (Anderson *et al.*, 1981) entdeckt, was zu einem Studium der Mitochondriopathien auf DNS-Ebene führte.

Grundlage für die Diagnose einer Mitochondriopathie ist heute das Zusammentreffen von histologisch und histochemisch veränderten Mitochondrien und/oder ein eindeutig nachweisbarer Defekt auf biochemischer oder auf der Ebene der DNS. Die klinische Ausprägung sollte mit der mitochondrialen Pathologie vereinbar sein (Sengers *et al.*, 1984).

Auf biochemischer Ebene wurden vor allem Defekte der Atmungskettenkomplexe und des Pyruvatdehydrogenasekomplexes, seltener Störungen des Citratzyklus und mitochondrialer Transportproteine beschrieben. Alle Störungen haben gemeinsam, dass sie zu einer Akkumulation von Pyruvat und Laktat führen. Weitere pathophysiologische Konsequenzen eingeschränkter mitochondrialer Funktion bestehen in einer Beeinträchtigung der energieabhängigen Ionengradienten mit gesteigertem intrazellulären Calciumgehalt, Lipolyse, Proteolyse und einer gesteigerten Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (Peterson, 1995).

An dieser Stelle seien noch einige genetische Aspekte zu den Mitochondriopathien genannt, die für das Verständnis dieser Krankheiten wichtig sind:

Der Hauptteil der mitochondrialen Enzymproteine wird vom Zellkern kodiert, somit sind auch nukleäre Mutationen für Defekte des Energiestoffwechsels und zwar im Bereich der oxidativen Phosphorylierung verantwortlich (Sperl, 1997). Die mitochondriale DNS, die insgesamt nur etwa 1% des gesamten Genoms ausmacht, kodiert nur die 13 Proteine der Atmungskette sowie die ribosomale und die Transfer-RNS (Ribonukleinsäure). Die mitochondriale DNS hat jedoch eine hohe spontane Mutationsrate, was auf ihre unmittelbare Nachbarschaft zur Atmungskette mit ihrem hohen Umsatz an freien Radikalen, sowie das Fehlen protektiver Histone und eines Repairsystems zurückzuführen ist. Somit sind Defekte der mitochondrialen DNS die häufigeren Ursachen für mitochondriale Enzymdefekte als Mutationen der zellulären DNS (Sperl, 1997).

Grund für die heterogene Ausprägung von Mitochondriopathien ist der Vererbungsmodus mitochondrialer DNS. Sie wird beinahe ausschließlich über die mütterliche Eizelle weitervererbt (Egger und Wilson, 1983). Mutationen werden willkürlich an die Tochterzellen weitergegeben. Damit kann es zu einem gleichzeitigen Vorkommen von Wildtypen und mutierter mitochondrialer DNS kommen (Heteroplasmie). Je nach Sauerstoffbedarf eines Gewebetypes kann ein Schwellenwert angenommen werden, bei dessen Unterschreitung es zu einer Einschränkung der mitochondrialen Leistung, einem anschließenden Funktionsausfall der Zelle und der Ausbildung eines entsprechenden pathologischen Phänotyps kommt (Wallace *et al.*, 1988; Wallace, 1992; Wallace, 1995).

In einem Individuum können auch wenig zusammenhängende Organsysteme durch Störungen betroffen sein, was sich durch die willkürliche Streuung mitochondrialer DNS in verschiedene Gewebe in der Embryonalphase erklären lässt (Hurko *et al.*, 1990). Durch Spontanmutationen, deren Effekte sich zu bereits vorhandenen Störungen addieren, kann es erst im späteren Lebensalter zum Überschreiten eines Schwellenwertes und damit zum Ausbrechen der Krankheit kommen (Wallace *et al.*, 1988; Wallace, 1992).

Das klinische Bild von Mitochondriopathien zeichnet sich durch eine große Heterogenität aus. Wie bereits erwähnt, sind Gewebe mit großem Sauerstoff- und Energiebedarf wie das neuromuskuläre System und das Herz besonders stark betroffen. Von den zahlreichen beschriebenen Syndromen seien hier nur einige exemplarisch genannt: das MELAS-Syndrom mit Myopathie, Enzephalopathie, Laktatazidose,

"Stroke-Like-Episodes", das MERRF-Syndrom mit Myoklonus Epilepsie, "Ragged-Red-Fibres", sowie das CPEO-Syndrom, die chronisch progressive externe Ophthalmoplegie.

1.1.4 Therapieansätze bei Mitochondriopathien

Mitochondriopathien sind therapeutisch bisher nur schwer zu beeinflussen. Die derzeit empfohlenen Therapieansätze beruhen auf der Eliminierung von toxischen Substanzen oder der Supplementierung von Komponenten der Atmungskette. Verwendung finden Cofaktoren wie Thiamin, Riboflavin, Biotin und Liponsäure, Antioxidantien wie Vitamin C, Vitamin K3 und Coenzym Q10, Radikalfänger wie Vitamin E sowie L-Carnitin und Kreatin (Peterson, 1995; Przyrembel, 1987; Shoffner und Wallace, 1994, Sperrl *et al.*, 2004).

Ein weiteres Therapieprinzip besteht in der Gabe von Glukokortikoiden (GC). In mehreren Arbeiten wurde bei Patienten mit definierten Mitochondriopathien nach Gabe eines GC (Methylprednisolon) in verschiedenen Dosierungen (zum Teil 8 mg/d, zum Teil 30 mg/d) sowohl eine beeindruckende klinische Verbesserung, vor allem in Hinblick auf die Muskelkraft, als auch zum Teil eine weitgehende Normalisierung des Serumlaktatpiegels erzielt (Hsu *et al.*, 1995; Peterson *et al.*, 1986a und 1986b; Holliday *et al.*, 1984). Engel und Siekert fanden 1972 bei einer Patientin mit einer akuten Verschlechterung einer "Lipidspeichermyopathie" nach 6-wöchiger Therapie mit Prednison (zwischen 60 und 27,5 mg/d) neben der klinischen Besserung in einer vergleichenden Muskelbiopsie auch deutlich weniger Lipidspeicherungen, wie sie für viele Mitochondriopathien typisch sind.

Diese beobachteten Effekte von GC stehen in einem frappierenden Kontrast zu dem Muskelschwund, der als Nebenwirkung einer längeren und hochdosierten GC-Therapie beobachtet wird. In diesem Zusammenhang ist auch die Arbeit von Mitsui *et al.* (2002) bemerkenswert, in der von zwei Patienten berichtet wird, die nach langfristiger Corticosteroidtherapie klinische, histochemische und biochemische Befunde einer Mitochondriopathie, und zwar einer CPEO zeigten.

Diese widersprüchlichen Effekte lassen sich am ehesten durch die Annahme verschiedener Wirkmechanismen auf den Stoffwechsel der Muskelzellen erklären, die möglicherweise von der Art und Konzentration des GC abhängen (Martens *et al.*, 1991). In Hinblick auf die beobachtete Senkung des Laktatpiegels in den zitierten Studien nach GC-Gabe sowie der Tatsache, dass die Patienten an einem primären

Defekt des mitochondrialen Energiestoffwechsels litten, liegt die Annahme nahe, dass der positive Effekt der GC über eine unmittelbare Wirkung auf mitochondriale Funktionen vermittelt sein könnte.

Martens *et al.* haben daher in einer *in vitro* Studie die Effekte von GC auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel von Muskel-, Herz- und Leberzellen untersucht. Dabei fanden sie, dass bei Vorhandensein von NAD-verbundenen Substraten Methylprednisolon in einer relativ hohen Konzentration von 0,1 mM die Atmungskette hemmt, und zwar im Komplex 1 zwischen dem Flavoprotein der NADH-Dehydrogenase und dem Coenzym Q. Die Zellen wurden hier für wenige Minuten mit dem GC inkubiert. Bei einer niedrigeren Konzentration von 0,02 mM konnte kein Effekt mehr nachgewiesen werden.

(Anmerkung: Konzentrationen von 0,03 mM *in vitro* entsprechen Plasmaspiegeln eines 70 kg schweren Erwachsenen unter einer Tagesdosis von 60 mg Methylprednisolon).

Der gefundene Mechanismus scheint damit in den erwähnten Studien nicht als Erklärungsmodell für den GC-Effekt auf Patienten mit Mitochondriopathien geeignet zu sein, da Ihnen meist weniger als 60 mg/d Methylprednisolon/Prednison (Substanzen sind fast dosisäquivalent) verabreicht wurde. Im Weiteren hatte das GC bei den Patienten trotz der niedrigen Konzentrationen einen kurativen Effekt.

Zur Untersuchung und zum besseren Verständnis der Wirkungen von GC ist es daher im Hinblick auf die klinische Bedeutung sinnvoll, weitere *in vitro* Untersuchungen in Bezug auf die Effekte auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel durchzuführen.

1.2 Glukokortikoide

1.2.1 Struktur und Wirkungen von Glukokortikoiden (GC)

Glukokortikoide (GC) sind Steroidhormone, die für die Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase eines in einer sich verändernden Umwelt lebenden Organismus notwendig sind. Sie sind bei der Adaptation des Organismus an Stresssituationen wie Verletzungen oder Infektionen von essentieller Bedeutung. Die Summe ihrer Einzelwirkungen verhindert eine Überreaktion des Organismus auf Stress (de Munck *et al.*, 1984).

GC werden wie alle Steroidhormone aus Cholesterin synthetisiert. Die wichtigsten physiologischen Vertreter sind Cortisol, Corticosteron und Cortison, eine Vorstufe des Cortisols (Kaiser und Kley, 1992). Synthetisch hergestellte GC leiten sich überwiegend

vom Prednisolon ab. Ein wichtiger Vertreter ist Dexamethason. Es ist lang wirksam und hat die stärkste entzündungshemmende Wirkung aller GC (Kaiser und Kley, 1992). Synthetische GC zeigen prinzipiell das gleiche Wirkspektrum wie endogene GC, jedoch sind die meist unerwünschten Effekte auf den Wasser- und Elektrolythaushalt reduziert oder wie bei Dexamethason vollständig eliminiert (Rohdewald *et al.*, 1986). Derartige - sogenannte mineralocorticoide - Wirkungen werden über den Typ 1-Rezeptor, den sogenannten Mineralocorticoidrezeptor, vermittelt und bestehen in einer Steigerung der Natrium- und damit der Wasserretention und einer Förderung der Kaliumausscheidung. Der bedeutendere Rezeptor ist jedoch der Typ 2- oder GC-Rezeptor (de Kloet *et al.*, 1986, McEwen *et al.*, 1986). Über ihn werden die meisten GC-Effekte vermittelt. Dies sind die Wirkungen auf den Stoffwechsel wie die Förderung der Gluconeogenese, die Steigerung des Glucoseumsatzes, die Senkung der Glucoseutilisation und der Glucosetoleranz, sowie letztendlich die Steigerung der Glucosekonzentration im Plasma. Auf den Proteinstoffwechsel wirken GC katabol. Sie fördern die lipolytische Wirkung von Katecholaminen und bewirken eine Fettumverteilung von den Extremitäten zum Körperstamm. GC wirken antiinflammatorisch und immunsuppressiv. Sie beeinflussen zahlreiche andere endokrine Systeme wie die Schilddrüse, das Reproduktionssystem sowie das Wachstum (Charmandari *et al.*, 2003). GC können auch psychische Alterationen in Form von Euphorie und anderen Stimmungsveränderungen verursachen (Kaiser und Kley, 1992). Die erhöhte Cortisolsekretion im Rahmen einer dysregulierten Stressantwort wird als ein pathophysiologischer Faktor der depressiven Erkrankung angesehen (Gold *et al.*, 1988; Wong *et al.*, 2000).

Seit einigen Jahren haben die Effekte von GC auf die neuronale Zellvitalität vermehrte Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Sapolsky *et al.* (1990b) fanden bei Primaten unter chronischem Stress oder nach Langzeitapplikation von GC nachweisbare neuronale Schäden (Sapolsky *et al.*, 1985, Sapolsky, 1990a). Eine andere Arbeitsgruppe unter Watanabe (Watanabe *et al.*, 1992b) untersuchte Ratten nach Stress oder hohen Dosen Corticosteron und fand ebenfalls eine Atrophie hippocampaler Neurone. Später wurde bei Personen, die durch ein Cushing-Syndrom (Starkman *et al.*, 1992) oder als Patienten mit posttraumatischen Belastungsreaktionen (Bremner *et al.*, 1995; Gurvits *et al.*, 1996) über lange Zeit unter erhöhtem Cortisoleinfluss standen, eine Verminderung des Volumens der Formatio hippocampalis, einer für das Gedächtnis bedeutsamen Gehirnregion, festgestellt. Sauro *et al.* (2003) konnten in einer Meta-Analyse von 28 Studien eine eindeutige Assoziation von Stress, erhöhten Cortisol-Spiegeln und

eingeschränkten Gedächtnisfunktionen nachweisen. Cortisol beeinflusst auch weitere kognitive Funktionen wie Aufmerksamkeit, Perzeption und emotionale Verarbeitung, was möglicherweise bei pathologischen Ausprägungen mit einer durch Cortisol hervorgerufenen funktionellen und strukturellen Veränderung des Hippocampus, der Amygdala und des ventralen präfrontalen Cortex einhergeht (Erickson *et al.*, 2003). Coburn-Litvak *et al.* (2004) konnten nachweisen, dass eine chronische GC-Exposition von Ratten zu einem reduzierten mitochondrialen Volumen hippocampaler Zellen führt.

Diese *in vivo* untersuchten, mit GC möglicherweise in ursächlichem Zusammenhang stehenden neurodegenerativen Wirkungen zogen viele weitere *in vitro* Experimente nach sich, die vor allem den Wirkmechanismus der Schädigung erhellen sollten.

Bis jetzt gibt es jedoch noch kein entsprechendes eindeutiges Konzept, auf welche Art und Weise GC die Vitalität von Neuronen beeinflussen.

Eine der Möglichkeiten in diesem Zusammenhang ist jedoch eine direkte, nicht-genomische Wirkung auf den Energiestoffwechsel, wie sie auch in dieser Arbeit untersucht wird. Daher wird auf diese Effekte von GC im Kapitel 1.2.3 noch einmal näher eingegangen.

1.2.2 Physiologische Regulation der Freisetzung von Glukokortikoiden - die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

Die Sekretion von GC wird durch einen hormonellen Regelkreis, die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHNA), gesteuert.

Der Hypothalamus bildet "Corticotropin-releasing-hormone" (CRH), dessen Produktion von übergeordneten Zentren durch Neurotransmitter und über das Prinzip der negativen Rückkopplung gesteuert wird. CRH wird über ein venöses Pfortadersystem dem Hypophysenvorderlappen (HVL) zugeführt und reguliert dort die Synthese von ACTH (Adrenocorticotrophem Hormon) und weiteren Proteinen aus einem Vorläufer-Glykoprotein (Proopiomelanocortin). Zu einem kleinen Anteil wird ACTH auch extrahypophysär, u. a. in Lymphozyten, gebildet (Kley, 1985). Bereits 2 Minuten nach ACTH-Ausschüttung wird Cortisol in der Nebennierenrinde (NNR), vorwiegend in der Zona fasciculata, vermehrt gebildet und freigesetzt. Die Sekretionsrate von Cortisol liegt bei 1-4 mg/Tag. Die Cortisolkonzentration im Plasma unterliegt erheblichen tageszeitlichen Schwankungen. Der 8 Uhr-Normwert liegt bei 138-690 nmol/l (Thomas,

2000). Das Konzentrationsmaximum liegt bei 4.00 Uhr, das Minimum bei 23.00 Uhr (Weitzmann *et al.*, 1971).

CRH und ACTH unterliegen verschiedenen Regulationsmechanismen:

Einerseits erfolgt ca. 90-minütig eine pulsatile CRH- (damit auch ACTH und Cortisol) Sekretion mit gegen Abend sinkender Frequenz und Amplitude (Kaiser und Kley, 1992).

Andererseits besteht eine zirkadiane Rhythmik. In den frühen Morgenstunden reagieren HVL und NNR am empfindlichsten auf ihre physiologischen Stimuli. Daraus ergibt sich ein morgendlich hoher und ein abendlich niedriger Spiegel.

Zusätzlich werden alle übergeordneten Zentren durch negative Rückkopplungen beeinflusst. Hier unterscheidet man einen Zellmembran-abhängigen Mechanismus, der innerhalb von Minuten wirksam ist und keinen Effekt auf die Transkription aufweist und eine verzögerte Rückkopplung, die proportional zur Konzentration des Plasmacortisols ist. Die Empfindlichkeit der jeweils übergeordneten Zentren ist dabei während des Sekretionstiefs am höchsten. Von den vielen NNR-Hormonen ist lediglich Cortisol fähig, CRH und ACTH innerhalb des hormonellen Regelkreises zu supprimieren. GC spielen damit eine Schlüsselrolle in der basalen Kontrolle der HHNA und der Terminierung der Stressantwort (Charmandari *et al.*, 2003).

Zur Stress-Achse im weiteren Sinne gehört auch das im Hypothalamus gebildete Arginin-Vasopressin und von Zellgruppen im Hirnstamm gebildetes Noradrenalin, welche auf vielfache Weise v.a. mit CRH interagieren (Charmandari *et al.*, 2003).

Im Weiteren kann bei Bedarf eine Stressadaptation des Systems erfolgen, die in einer gesteigerten Frequenz und Höhe der Sekretionsspitzen sowie in einer Abschwächung der verzögerten Rückkopplung besteht (Kaiser und Kley, 1992). Abhängig von der Art des Stresses (akut versus repetitiv/chronisch) kann die neuroendokrine Antwort auch in einer Herabregulation der CRF-Rezeptoren und einer verminderten Cortisolausschüttung bestehen (Chaudhuri und Behan, 2004).

Störungen der HHNA haben eine weitreichende klinische Relevanz.

Bei der Hälfte aller Depressiven kann eine gestörte HHNA-Funktion in Form eines pathologischen Dexamethason-Hemmtests (fehlende Supprimierung endogener GC nach Dexamethason-Applikation) objektiviert werden (Holsboer, 1983; Arana *et al.*, 1985). Außerdem wurden bei Depressiven ein erniedrigtes Volumen des Hippocampus (Drevets *et al.*, 1997) und Dysfunktionen des präfrontalen Cortex (Sheline *et al.*, 1996) festgestellt. Beide Regionen verfügen über zahlreiche GC-Rezeptoren und sind in die

GC-Regulation involviert (Feldman und Conforti, 1985; Magarinos *et al.*, 1987, Diorio *et al.*, 1993, Feldman und Weidenfeld, 1999, Mizoguchi *et al.*, 2003). Es stellt sich die Frage, ob erhöhte GC-Spiegel nur die Folge oder möglicherweise auch die Ursache einer dysfunktionellen HHNA sein können, zumal belastende Lebensereignisse, die in der Regel mit erhöhter Cortisolexposition des Individuums einhergehen, häufig Depressionen anstoßen (Berger *et al.*, 1999).

Auch in Hinblick auf kognitive Veränderungen im Alter ist die HHNA bedeutend.

Es gibt Hinweise, dass Störungen der HHNA mit erhöhten Cortisol-Spiegel eine wichtige Rolle bei kognitiven Dysfunktionen im Alter spielen (Lupien *et al.*, 1994). Stress, bzw. eine hohe GC-Exposition scheinen für altersbezogene Störungen des Hippocampus bzw. den Verlust neuronaler Zellen im Alter mitverantwortlich zu sein (Smith, 1996; Reagan und McEwen, 1997). Auch bezüglich neuropsychologischer Defizite im Alter ist es denkbar, dass Cortisol eine ursächliche Rolle für eine Dysregulation des HHNA spielt und nicht nur mögliche Folge derselben ist.

1.2.3 Zelluläre Effektormechanismen und Effekte von GC auf die Atmungskette

GC üben auf zellulärer Ebene verschiedene Wirkungen aus. Sie passieren die Zellmembran und binden an spezifische intrazelluläre Rezeptoren, die Corticosteroidrezeptoren. Diese sind in nahezu allen Zellen vorhanden und befinden sich im Cytoplasma, im Nucleus und auch in den Mitochondrien (Demonakos *et al.*, 1993; Psarra *et al.*; 2002, Koufali 2002; Scheller *et al.* 2003). Die Anzahl der Rezeptoren kann durch verschiedene Mechanismen reguliert werden. Die hervorgerufenen Wirkungen der GC sind jedoch für jedes Organ spezifisch (Kaiser und Kley, 1992).

Es gibt - wie bereits erwähnt - verschiedene Corticosteroid-Rezeptortypen, den Typ 1- oder Mineralocorticoidrezeptor und den Typ 2- oder Glukokortikoidrezeptor (GC-Rezeptor), welche von verschiedenen Corticosteroiden bevorzugt werden und bevorzugt im Zytoplasma charakterisiert wurden. Bindet das Corticosteroid an den Rezeptor, ändert sich die Rezeptorkonformation. Der aktivierte Hormon-Rezeptorkomplex durchdringt die Kernmembran, bindet an DNS-verwandte Elemente ("glucocorticoid responsive elements"), interagiert mit Transkriptionsfaktoren, Koaktivatoren oder Korepressoren, bindet an die DNS und induziert - oder unterdrückt - die Transkription bestimmter Gene (Torchia *et al.*, 1998; Robyn *et al.*, 2000; Wolffe und Guschin, 2000). Die entsprechende mRNS ("messenger"-[Boten]

Ribonukleinsäure) wird in ein Protein, wie z.B. Lipocortin, transkribiert. Lipocortin wird in die äußere Plasmamembran integriert. Von hier aus entfaltet es seine Effekte (Browning *et al.*, 1990; Croxtall und Flower, 1992). Lipocortine hemmen beispielsweise die Phospholipase A2, einen Bestandteil der Arachidonsäurekaskade, die Cyclooxygenase, die Lipooxygenase und beeinflussen auch den sogenannten Plättchenaktivierenden Faktor (Flower, 1989, Goulding *et al.*, 1990; Hirata, 1989). Durch diese Mechanismen lassen sich teilweise die antiinflammatorischen Wirkungen erklären.

Neben der Stimulierung der Transkription über positiv wirkende "glucocorticoid responsive elements" bindet der GC-Rezeptor-Komplex auch an supprimierende "glucocorticoid responsive elements" und hemmt dadurch u. a. die Synthese verschiedener Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor α , Interleukin 2 oder Interleukin 6 (Barnes und Adcock, 1993, Buttgerit *et al.*, 1995).

GC induzieren auch die Transkription von Strukturproteinen. So konnte im Zellversuch ein stimulierender Effekt auf die Biogenese beispielsweise von Untereinheiten von Atmungskettenenzymen nachgewiesen werden, die teilweise in der nukleären, teilweise in der mitochondrialen DNS kodiert waren (Rachamin *et al.*, 1995; Djouadi *et al.*, 1994, 1996; Kadowaki und Kitagawa, 1988).

Die Effektormechanismen, die durch die DNS-Transkription und Proteinbiosynthese vermittelt werden, benötigen ungefähr 6 h bis Tage für ihre maximale Entfaltung, die ersten Effekte zeigen sich frühestens nach 30 Min. (Kaiser und Kley, 1992; Norman *et al.*, 2004).

Es konnten jedoch für Steroidhormone jedoch auch biologisch sinnvolle schnellere Wirkungen nachgewiesen werden, die in Zellen ohne funktionellen Nukleus wirksam wurden (Krausz *et al.*, 1995; Meizel *et al.*, 1997). Dies zeigt auf, dass für derartige nicht-genomische Wirkungen ein klassischer nukleärer Steroidrezeptor mit Effekten auf die Transkription nicht zwingend vorhanden sein muß und hier ein weiterer Signalvermittlungsweg postuliert werden kann.

Auch die Beobachtung, dass bei i.v.-Applikation von 200-300 mg Prednisolonäquivalenten alle GC-Rezeptoren eines Erwachsenen besetzt sind, aber trotzdem ein zusätzlicher klinisch-therapeutischer Nutzen bei weiterer Dosissteigerung erzielt werden kann, legt die Vermutung nahe, dass weitere Effekte auch über andere Mechanismen vermittelt werden könnten (Buttgerit *et al.*, 1996).

In diesem Zusammenhang wurden unter anderem Wirkungen auf die zellulären Membranen diskutiert. Es handelt sich hierbei einerseits um unspezifische Veränderungen, die vermutlich durch eine Einlagerung der Steroide in Zell- und Organellenmembranen mit nachfolgender Änderung der physikochemischen Eigenschaften (Buttgereit *et al.*, 1993, 1994a, 1994b; Hall *et al.*, 1994; Hall, 1992), des lokalen Ionentransportes (Bangham *et al.*, 1965; Cronstein *et al.*, 1992; Sessa und Weissmann, 1968) und der Membranlipide (Hall, 1992) zu erklären sind. Diese Wirkungen treten nach wenigen Minuten ein und halten nur für einen kurzen Zeitraum an.

Andererseits wird derzeit intensiv ein Wirkungskonzept diskutiert, nach dem bestimmte Sofortwirkungen auch über einen membranständigen Rezeptor vermittelt werden können. In diesem Zusammenhang konnten für zahlreiche Steroidhormone, mit schnellen Effekten in Zusammenhang stehende Rezeptoren identifiziert, charakterisiert und ihre subzelluläre Lokalisation beschrieben werden (Norman *et al.*, 2004). So scheint es einerseits membranständige Rezeptoren zu geben, die strukturell mit klassischen nukleären Rezeptoren identisch oder enge Varianten derselben sind. Dieses Konzept wurde vor allem anhand von Östrogen- und Vitamin-D-Rezeptoren entwickelt (Chambliss *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2002; Norman *et al.*, 2002; Huhtakangas *et al.*, 2004, Boonyaratanakornkit *et al.*, 2004).

Zusätzlich wurden membranständige, in schnelle Steroideffekte involvierte Rezeptoren identifiziert, die keinerlei strukturelle Verwandtschaft zu den klassischen nukleären Steroidrezeptoren erkennen lassen. Eine komplette Klonierung und Charakterisierung liegt zum Beispiel für den Brassinosteroidhormon-Rezeptor der Pflanze *Arabidopsis* (Li *et al.*, 1997, He *et al.*, 2000) und für den Progesteron-Rezeptor aus Ovarien des Fisches *Xenopus* (Zhu *et al.*, 2003) vor.

Auch für andere Steroidhormone legen zahlreiche Untersuchungen die Existenz von Membranrezeptoren nahe, die keine Verwandtschaft zur Superfamilie der klassischen nukleären Steroidrezeptoren zeigen (Norman *et al.*, 2004; Boonyaratanakornkit *et al.*, 2004; Luconi *et al.*, 2004).

In Hinblick auf die weitere zelluläre Antwort nach Aktivierung membranerger Rezeptoren wurden Beteiligungen zahlreicher Signaltransduktionswege beschrieben, zum Beispiel die Proteinkinasen A (PKA) und C (PKC), die Phospholipase C, die

mitogen aktivierte Proteinkinase (MAP), die endotheliale Stickstoffoxyd Synthase (e-NOS) und der epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR). Diese "second-messenger" befinden sich im Zytoplasma (teilweise nahe der Plasmamembran) und vermitteln zelluläre Wirkungen im Zytoplasma, an der Zellmembran oder am Nukleus, indem sie die Gentranskription modulieren (Norman *et al.*, 2004). Es bestehen mittlerweile Hinweise, dass zwischen den membran-initiierten Steroidsignalen und den klassischen genomischen Mechanismen zahlreiche Querverbindungen existieren (Farach-Carson *et al.*, 2003, Daufeldt *et al.*, 2003).

Im Weiteren gibt es auch spezifisch für GC Arbeiten, die membranständige GC-Rezeptoren beschreiben:

1991 gelang Orchinik *et al.* in Form von Ligandenbindungsstudien der Nachweis eines Plasmamembranrezeptors für Corticosteron in neuronalen Zellen von Salamandern und anderen Amphibien (Moore *et al.*, 1994, Moore *et al.*, 1995). Die gleiche Gruppe (Evans *et al.*, 2000) konnte später die besagten Rezeptoren partiell aufreinigen und biochemisch weiter charakterisieren. Dabei gelang eine klare strukturelle Abgrenzung zum klassischen nukleären GR.

Powell *et al.* (1999) konnten in Maus-Lymphomzellen einen membranständigen Rezeptor partiell aufreinigen, biochemisch und bzgl. seines Bindungsverhaltens charakterisieren und stellten fest, dass dieser Rezeptor dem klassischen nukleären GR ähnlich, aber nicht mit ihm identisch ist.

Der erste Nachweis von membrangebundenen GC-Rezeptoren in menschlichen Zellen gelang Bartholome *et al.* (2004). Diese Rezeptoren konnten auf Monozyten und B-Zellen nach Immunstimulation in Immunfluoreszenzfärbung dargestellt werden.

Zahlreiche Veröffentlichungen beschreiben schnelle GC-Effekte, die mutmaßlich ebenfalls über einen membranständigen GC-Rezeptor vermittelt werden könnten:

Qui *et al.* (1998) konnten in Experimenten mit PC12-Zellen aufzeigen, dass Corticosteron zu einer schnellen Hemmung des Nikotin-induzierten Calcium-Einstromes führt, wobei eine Beteiligung der Proteinkinase C an dem GC-Effekt nachgewiesen werden konnte. Eine Involvierung des Membranrezeptors wurde von den Autoren angenommen.

Han *et al.* (2005) zeigten in Neuroblastomzellen von Mäusen nach Kurzzeitinkubation mit GC eine Hemmung des ATP-induzierten Calcium-Einstromes. Diese Effekte waren durch RU38486 oder PKA-Hemmer nicht antagonisierbar, weshalb die Autoren auf

einen membraninitiierten, nicht-genomischen, PKA-abhängigen Wirkmechanismus schlossen.

Yukawa et al. (2005) zeigten dagegen schnelle permissive GC-Effekte auf den ATP-induzierten Calcium-Einstrom in neuronale Zellen. Die Autoren schlossen auf eine Interaktion zwischen dem membranständigen GC-Rezeptor und den P2X (ATP)-Rezeptor.

Im Weiteren konnten schnelle GC-Effekte auf Entzündungszellen (Degranulation von Neutrophilen, Phagozytose/Superoxydproduktion von Makrophagen) aufgezeigt werden, die nicht durch GC-Rezeptorantagonisten bzw. Proteinbiosynthesehemmer antagonisierbar waren und damit als nicht-genomisch beurteilt wurden (Liu *et al.*, 2005, Long *et al.*, 2005).

Ein ergänzender Aspekt schneller GC-Effekte ist die Hypothese, dass über klassische, sich im Cytoplasma befindende GC-Rezeptoren ebenfalls schnelle nicht-genomische Effekte vermittelt werden können (Buttgereit *et al.*, 2002, Limbourg *et al.*, 2002, Limbourg *et al.*, 2003, Croxtall *et al.*, 2002).

Ein weiterer Bereich möglicher nicht-genomischer, schneller GC-Wirkungen besteht in unmittelbaren Effekten auf den zellulären Energiestoffwechsel. Es wurden diesbezüglich bereits Effekte auf die ATP-Bildung (Hemmung der Atmungskette), das mitochondriale Membranpotential und auf ATP-verbrauchende Prozesse (z.B. Hemmung der Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase, RNS/DNS-Synthese) beschrieben (Buttgereit *et al.*, 1996, Motoyama *et al.*, 2003, Schuchmann *et al.*, 2004).

Bezüglich der schon im Kapitel 1.2.1 angesprochenen neurotoxischen Wirkungen von GC sind ebenfalls verschiedene Mechanismen diskutiert worden:

Hier wurden Wirkungen über den klassischen Weg des GC-Rezeptors mit anschließender Modulation der Gentranskription postuliert, eine durch GC induzierte Steigerung der durch Glutamat vermittelten Neurotoxizität angenommen, sowie eine durch GC induzierte Beeinträchtigung des Glucosetransportes mit nachfolgendem Energiedefizit und eine nicht-genomische, direkte Hemmung der mitochondrialen Aktivität (Literaturverweise siehe in der Diskussion) als mögliche Wirkmechanismen in Betracht gezogen.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass GC ihre zellulären und systemischen Wirkungen über eine Vielzahl von Wegen auf den Organismus ausüben, deren

Mechanismen bisher noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Zeitlich lassen sich schnelle Effekte wie unspezifische Membraneffekte, Effekte über membranständige GC-Rezeptoren (klassischen Rezeptoren identisch/ähnlich oder strukturell andersartig) und unmittelbare Effekte auf den Energiestoffwechsel gegenüber langsamen, im Laufe von Stunden erfolgenden Wirkungen über klassische nukleäre Rezeptoren mit genomischen Effekten abgrenzen.

In dieser Arbeit soll daher u. a. das Konzept von Kurz- und Langzeiteffekten von GC in Bezug auf zelluläre Wirkungen im System der hypophysären adrenocorticotrophen AtT 20 Zellen untersucht werden. Bereits im Kapitel 1.2.2 wurde erwähnt, dass GC-induzierte zelluläre Veränderungen an den adrenocorticotrophen Zellen des HVL (Hypophysenvorderlappen) möglicherweise zu einer Modulation des negativen Rückkopplungsmechanismus führen, die den endogenen GC-Haushalt stören könnten. Auf diese Weise könnten pathologisch erhöhte GC-Spiegel entstehen, die u.a. zu einer weiteren Fehlregulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse und damit sekundär auch zu neuronaler Degeneration beitragen könnte. Das hypophysäre System stellt somit das wesentliche Bindeglied zwischen zentralem Nervensystem und dem neuroendokrinen System dar und soll in dieser Arbeit unter dem Aspekt der zellulären Wirkungen von GC untersucht werden.

Hier sind es insbesondere die adrenocorticotrophen Zellen des HVL, die eine wesentliche Schnittstelle für eine Vielzahl der beschriebenen Wirkungsmechanismen von GC darstellen. Dies gilt auf zellulärer Ebene insbesondere für das Modellsystem der hypophysären adrenocorticotrophen AtT 20-Zellen, an denen viele wichtige Befunde zu den Wirkungen von GC erarbeitet wurden (Axelrod und Reisine, 1984; Reisine und Affolter, 1987; Lundblad und Roberts, 1988; Vedder, 1990, van Wijk *et al.*, 1995).

1.3 Zielsetzung, Hypothesen und Arbeitsprogramm

Der klassische Weg der Glukokortikoid (GC)-Wirkung besteht in einer Aktivierung des GC-Rezeptors, der Translokation des Rezeptorligandkomplexes in den Zellkern und der Regulation von Genen, die entsprechende "glucocorticoid responsive elements" aufweisen. Daneben konnten in den letzten Jahren zahlreiche schnelle GC-Wirkungen über membranständige Rezeptoren nachgewiesen werden und es gibt zunehmend

Hinweise auf unmittelbare Wirkungen von Steroiden auf einzelne Zellbestandteile wie die Plasmamembran und auch mitochondriale Strukturen.

Obwohl Effekte von GC auf den Energiestoffwechsel von Zellen nachgewiesen wurden, ist hier der zugrunde liegende Mechanismus bisher weitgehend unklar. Pathophysiologische Beziehungen lassen sich in diesem Zusammenhang aus den klinischen Wirkungen von GC bei Mitochondriopathien ableiten, eine weitere Bedeutung könnte in der Wirkung von GC auf Zellen des Hypophysen-Vorderlappens liegen, die in die Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHNA) eingebettet sind. Nicht-genomische Effekte von GC könnten hier an Störungen des Mechanismus der negativen Rückkopplung beteiligt sein.

Das übergeordnete Ziel der hier vorgelegten Untersuchung besteht in der Aufklärung der Wirkungen von GC und insbesondere von Dexamethason auf das Atmungskettensystem in adrenokortikotropen AtT 20-Zellen.

Damit sollen zum einen grundlegende Wirkungen von GC auf das mitochondriale System in einem gut etablierten Modell GC-vermittelter zellulärer Effekte, der adrenokortikotropen AtT 20-Hypophysenzelllinie, untersucht werden.

Zum anderen sollen genomische von nicht-genomischen, direkten Effekte auf zelluläre Funktionen untersucht und zumindest ansatzweise abgegrenzt werden, die möglicherweise in Regulationsvorgänge der HHNA involviert sind.

Auf diese Weise sollte es möglich werden, gleichzeitig verschiedene potentielle Wirkungsmechanismen von GC auf die Mitochondrien und den Stoffwechsel zu untersuchen und über die Art der Effekte besser zu verstehen.

Diese Vorgaben werden durch folgende Hypothesen eingegrenzt:

- Dexamethason und andere GC beeinflussen die mitochondriale Aktivität und die Atmungskette in adrenokortikotropen hypophysären AtT 20-Zellen.
- Die Veränderung der mitochondrialen Aktivität hat Veränderungen des zellulären ATP-Gehaltes zur Folge.
- Die Effekte werden nicht über den klassischen Mechanismus genomischer Aktionen von Glukokortikoiden vermittelt, sondern es handelt sich um nicht-genomische Effekte auf die Atmungskette.

Inhaltlich besteht das Arbeitsprogramm aus der pharmakologischen Charakterisierung der Effekte in folgenden Bereichen:

Es werden

- die mitochondriale Reduktionskapazität,
- die Proteinbiosynthese und
- der ATP-Gehalt

hinsichtlich der Wirkungen von Dexamethason und anderen Glukokortikoiden im Hinblick auf

- unterschiedliche Konzentrationen,
- unterschiedliche Inkubationszeiten und
- die Abhängigkeit von unterschiedlichen pH-Werten

charakterisiert.

Eine weitere Charakterisierung erfolgt durch die Anwendung von Atmungskettenhemmern, Hemmern der Proteinbiosynthese und GC-Rezeptorantagonisten.

(Methodisch wurde in Voruntersuchungen geklärt, ob sich die Methode der Reduktion eines Farbstoffmoleküls (Formazanmethode nach Slater *et al.*, 1963; EZ4U-Test) eignet, um Veränderungen der Atmungskettenaktivität zu erfassen. Diese Experimente wurden mit spezifischen Atmungskettenhemmern durchgeführt.)

2.0 Methoden

2.1 Die Zellkultur

Sämtliche Experimente dieser Arbeit wurden mit adrenocorticotropen AtT 20 Zellen durchgeführt. Sie sind Abkömmlinge eines strahleninduzierten Hypophysenvorderlappentumors der Maus. Die AtT 20 Zelllinie repräsentiert funktionell den adrenocorticotropen Adenohypophysenzelltyp. Die Zellen produzieren Vorläufersubstanzen des ACTH. Dieser Prozess unterliegt auch unter definierten Zellkulturbedingungen physiologischen Regelvorgängen (Vedder, 1990).

2.1.1 Kultivierung von AtT 20 Zellen

Die AtT 20 Zellen wurden in 250 ml Kulturflaschen (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) in MEM Earle's Medium ("Minimal Essential Medium", Seromed, Berlin), versetzt mit 10% Natrium Pyruvat (Gibco/BRL, Paisley, Schottland), 5% fetalem Kälberserum (Seromed, Berlin) und einem Antibiotikagemisch (Penicillin Natrium, Streptomycinsulfat, Amphotericin B, Gibco/BRL, Paisley, Schottland) gezüchtet. Die Inkubatoren (Heraeus, Hanau und Forma Scientific, Labortect, Göttingen) hielt die Luft bei einer Temperatur von 37° Celsius, den Kohlendioxidanteil bei 5% und die Feuchtigkeit bei 95%.

Die Zellen wurden zwei Mal pro Woche mit 13 ml neuem Medium gefüttert.

2.1.2 Aussaat von AtT 20 Zellen für die Experimente

Das verwendete Verbrauchsmaterial wie Einmalpipetten mit Wattestopfen, Pipettenspitzen, Kunststoffröhrchen und 96-Vertiefungen-Mikrotiterplatten wurden von der Firma Greiner (Frickenhausen), 24-Vertiefungen-Platten von der Firma Nunc (Roskilde, Dänemark) bezogen. Verschiedene Pipetten wurden von Eppendorf (Hamburg) elektrische Pipettierhilfen (Pipetboy) von Integra Biosciences (Wallisellen, Schweiz) bezogen.

Für die Experimente wurden die Zellen aus der Kulturflasche abgeschlagen, in ein 15 ml Röhrchen überführt und vorsichtig gemischt. 100 µl der Suspension wurden mit der gleichen Menge Trypanblau (Sigma, Deisenhofen) versetzt und in einer Zählkammer ausgezählt. Die errechneten Mengen an Zellen und Medium wurden zu einer Lösung

mit definierter Zelldichte gemischt. Als Medium diente das bereits beschriebene MEM Earle's Medium.

Für die Versuche wurden die Zellen auf Mikrotiterplatten mit 24- oder 96-Vertiefungen ausgesät. Auf den 24-Loch-Platten kamen auf eine Vertiefung 40.000 AtT 20 Zellen, bei den 96-Loch-Platten waren es jeweils 1.500 AtT 20 Zellen.

Die Kultivierungszeit im Inkubator bis zum Versuchstag betrug stets 4 Tage.

2.2 Verwendete Nachweisverfahren

2.2.1 Nachweisverfahren zur Bestimmung der zellulären Reduktionskapazität

Als Indikator mitochondrialer Vitalität wurde der EZ4U-Test (Biomedica-Gruppe, Wien, Lagerung bei 4°C) verwendet.

Das EZ4U-Substrat ist ein farbloses Tetrazoliumsalz mit dem Namen Natrium-3,3'-(1-(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium)-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzol-sulfonsäure-hydrat, $C_{22}H_{12}N_7O_{13}S_2Na$. Es wird von Mitochondrien zu einem intensiv orangefarbigem Formazanderivat umgewandelt. Diese Reduktion erfordert intakte Mitochondrien. Stirbt eine Zelle, so werden die Mitochondrien innerhalb weniger Minuten inaktiviert und damit wird auch weniger Farbstoff produziert.

Slater *et al.* haben untersucht, wo Tetrazoliumsalze reduziert werden und konnten mehrere Orte der Atmungskette als Reaktionsort ausmachen. Der Kopplungspunkt variierte mit Verwendung verschiedener Salze. Die Autoren gaben zu bedenken, dass der Wirkort der Tetrazoliumsalze sich auch mit dem verwendeten Zelltyp ändern könnte (Slater *et al.*, 1963).

In dieser Arbeit wurde der Ort der Reduktion des EZ4U-Tetrazoliumsalzes in AtT 20 Zellen durch Versuche mit Atmungskettenhemmstoffen weiter untersucht.

Der EZ4U-Test wurde auf folgende Weise durchgeführt:

2,7 ml (3 ml bei 96-Loch- Mikrotiterplatten) Aktivatorlösung wurden zum trockenen Substrat gegeben. Es wurde einige Minuten gewartet, bis das Pulver aufgelöst war. Auf eine Zellkulturvertiefung einer 24-Loch-Platte mit 500 μ l (100 μ l) Inhalt wurden 50 μ l (10 μ l) gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 3,5 h bei 37° Celsius und

5% CO₂. Nach dieser Zeitspanne wurden jeweils 100 µl aus einer Vertiefung abgenommen und in die Vertiefung einer neuen Platte gegeben. Abschließend wurde mit einem 490 nm-Filter die Absorption gemessen (MRX, Dynatech Laboratories, Nürtingen).

2.2.2 ATP-Nachweisverfahren

Zum Nachweis des zellulären ATP-Gehaltes wurde der ATP Biolumineszenz Test (ATP Biolumineszenz Test Kit CLS II, Boehringer Mannheim, Lagerung bei -20° C) verwendet.

Diese ATP-Nachweismethode beruht auf dem Verbrauch von ATP bei der Oxidation von Luziferin. Katalysator ist die sogenannte Luziferase, ein Enzym der Amerikanischen Feuerfliege (*Photinus pyralis*).

Die der Reaktion zugrunde liegende chemische Gleichung lautet:



Das entstehende grüne Licht hat ein Emissionsmaximum bei 562 nm. Die Lichtemission ist direkt proportional zu der ATP-Konzentration. Sie wird nach einer Verweildauer von 20 Min. bei 18° C über 3 Sekunden im Photonen-zähler gemessen. Der ausgegebene Wert besteht aus Lichtquanten pro Sekunde. Der Test ist bei einer Konzentration von 1 µM bis 10 pM ATP aussagekräftig. Die Photonenaussendung bleibt über 30 Min. konstant.

Vor der Durchführung des ATP-Tests wurde ein Aufarbeitungspuffer hergestellt, der sich aus 10 % 1 M Trisma-Puffer (Tris-hydroxymethyl-aminomethan, Roth, Karlsruhe), 4% 0,1 M EDTA (NA₂-Ethyldiamin-Tetraacetat-2H₂O, Merck, Darmstadt), 86% bidestilliertem Wasser und 0,1 % Triton-X100 (Merck, Darmstadt) zusammensetzte. Als nächstes erfolgte die Erstellung einer Standardkurve. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Der Inhalt des Standardfläschchens wurde mit einer jeweils definierten Menge destillierten Wassers aufgelöst. Nach einem weiteren Verdünnungsschritt mit 940 µl Puffer auf 60 µl Standardlösung ergab sich ein 100 µM ATP-Standard. Diese Lösung wurde mit dem Puffer weiter verdünnt, so dass eine Standardkurve der Konzentrationen

zwischen 100 nM und 10 pM entstand. Anschließend wurden die Zellen bearbeitet. Das Medium wurde aus den Vertiefungen mit dem Zellmaterial abgesaugt und die verbliebenen Zellen sofort mit 400 µl (200 µl bei 96-Loch-Mikrotiterplatten) Aufarbeitungspuffer versetzt. Die Zellsuspension wurde mit der Pipette mehrfach resuspendiert, so dass ein Zellhomogenat entstand. Jeweils 50 µl Lösung aus einer Vertiefung wurden in eine Vertiefung einer weißen vorgekühlten Mikrotiterplatte (Packard, Deutschland) überführt. In die ersten drei Vertiefungen wurde reiner Aufarbeitungspuffer gebracht, dann folgten die Standards, anschließend die Proben. Als nächstes wurde die Luziferase vorbereitet. Der Inhalt der Luziferaseflasche wurde in 10 ml gekühltem bidestilliertem Wasser gelöst. Die Luziferase wurde dabei 10 Min. ruhig im Eis stehen gelassen. Jeweils 50 µl Luziferase wurde in jede Vertiefung gegeben. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte in einem Lumineszenzzähler (TopCount, Packard, Deutschland) gemessen und so die Lichtemission der einzelnen Vertiefungen quantifiziert.

2.2.3 Quantitative Proteinbestimmung

Der verwendete Proteintest (Bio-Rad DC Protein Test, BioRad, München) beruht auf einer Farbreaktion ähnlich dem Lowry-Test. Er besteht aus zwei Reagenzien: einer alkalischen Kupfer-Tartrat Lösung und einem Folin Reagenz. Zunächst reagieren die Proteine mit Kupfer in einem alkalischen Medium (Reagenz A). Anschließend reduzieren die vorbehandelten Proteine das Folin (Reagenz B). Vorwiegend die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, weniger Cystein, Histidin und das Dipeptid Cystin bewirken durch die Veränderung von Sauerstoffatomen (Reduktion) die Blaufärbung. Mit einem Photometer (MRX, Dynatech Laboratories, Nürtingen) wurde die Absorption bei 620 nm gemessen.

Für die Durchführung des Proteintests wurden zunächst die Standards hergestellt. Hier diente bovines Serumalbumin als Ausgangssubstanz. Es wurde auf Konzentrationen von 100 µg/40 µl bis 1,56 µg/40 µl verdünnt. Das in dem Test vorhandene Reagenz A wurde mit dem Reagenz S versetzt (=A`) und bei 37° C aufgewärmt, um eine Ausfällung zu vermeiden. Das Reagenz B bedurfte keiner weiteren Vorbereitung.

ATP-Test und Proteinbestimmung wurden stets zusammen an der gleichen Zellsuspensionsprobe durchgeführt. Die Vorbereitung der Zellsuspensionsproben war identisch. Beim Proteintest wurden lediglich 40 µl von der Probe entnommen und in

eine neue 96-Loch-Mikrotiterplatte gefüllt. Die ersten Vertiefungen dienten als Leerwert und wurden nur mit Aufarbeitungspuffer gefüllt. In die nächsten Vertiefungen wurden die Standards, in die weiteren die Proben pipettiert. Anschließend wurde in jede Vertiefung 25 µl Reagenz A` pipettiert, danach 200 µl Reagenz B. Nach 20 Min. wurde die Absorption bei 630 nm gemessen.

2.3 Versuchsdurchführung

2.3.1 Behandlung der Zellen mit Steroiden

In dieser Arbeit wurde die Wirkung der Steroidhormone Dexamethason (Sigma, Deisenhofen) und Methylprednisolon (Sigma, Deisenhofen) untersucht. Beide Steroide wurden in einer 1:100 verdünnten Ethanollösung im Eisschrank bei -20° Celsius maximal 3 Monate lang aufbewahrt. Die zu untersuchenden Substanzen wurden stets in DMEM mit Hepes Pufferlösung ("Dulbecco's Modified Eagle's Medium" mit 25 mM Hepes, [DMEM/Hepes] Gibco/BRL, Paisley, Schottland) verdünnt, bevor sie auf das Zellmaterial gebracht wurden. Der DMEM/Hepes-Lösung war kein fetales Kälberserum zugesetzt. Das Medium wurde vor seiner Verwendung angewärmt und in Röhrchen mit dem Steroidhormon auf die gewünschte Verdünnung gebracht.

In dieser Arbeit wurden zunächst Vorversuche zur Verwendung und Aussagekraft des EZ4U-Tests gemacht. Im weiteren Verlauf wurden verschiedene GC getestet; so wurden Versuche mit Dexamethason (Dex) mit unterschiedlicher Inkubationsdauer, unterschiedlichen Konzentrationen und zur Testung anderer Variablen durchgeführt. Es wurden dabei Effekte auf den ATP-Gehalt und die mitochondriale Reduktionskapazität untersucht.

Die Versuche werden im Folgenden mit den dazugehörigen Abbildungen im Ergebnisteil schematisch vorgestellt:

1. Dex und Atmungskettenhemmer (Abbildung 1a-1d)

In diesem Versuch wurden Interaktionen zwischen Dex und Hemmern der Atmungskette in Hinblick auf die Erfassung der induzierten Veränderungen bezüglich der *mitochondrialen Reduktionskapazität* im EZ4U-Test untersucht.

Dazu wurden die Zellen mit Dex in einer Konzentration von 100 μM für 24 h inkubiert, in den letzten 30 Min. wurde ein Atmungskettenhemmer (50 μM) hinzugefügt. Dann wurde der EZ4U Test durchgeführt.

2. Dex und Methylprednisolon (Abbildung 2)

Hier wurden die beiden GC bezüglich ihrer *mitochondrialen Reduktionskapazität* miteinander verglichen.

Beide Steroide wurden in einer Konzentration von 1 μM 24 h inkubiert, anschließend wurde der EZ4U Test durchgeführt.

3. Wasserlösliches Dex (Abbildung 3)

In diesem Versuch wurde der Effekt von wasserlöslichem Dex auf die *mitochondriale Reduktionskapazität* untersucht.

Das wasserlösliche Dex wurde in den Konzentrationen 100 μM , 1 μM und 0,01 μM für 24 h inkubiert, danach wurde der EZ4U Test durchgeführt.

4. Dex-Zeitkurve (Abbildung 4)

Hier wurde der Effekt von Dex auf die *mitochondriale Reduktionskapazität* im zeitlichen Verlauf getestet.

Dex 100 μM wurde 4 h, 27,5 h und 47 h inkubiert, anschließend erfolgte der EZ4U Test.

5a. Dex Dosis-Wirkungs-Kurve bei 0,25 h Inkubation (Abbildung 5a)

In diesem Versuch wurde der Effekt auf die *mitochondriale Reduktionskapazität* von Dex in verschiedenen Konzentrationen über einen Inkubationszeitraum von 0,25 h getestet.

Dex wurde in den Dosen 100 μM , 1 μM und 0,01 μM 0,25 h verwendet, anschließend wurde der EZ4U Test durchgeführt.

5b. Dosis-Wirkungs-Kurve bei 0,25 h Inkubation (Abbildung 5b)

In diesem Versuch wurde bei gleichem Versuchsaufbau der Effekt auf den *zellulären ATP-Gehalt* gemessen.

Dex wurde in Dosen 100 μM , 1 μM und 0,01 μM über 0,25 h verwendet, anschließend wurde der ATP-Biolumineszenz-Test durchgeführt.

6a. Dex Dosis-Wirkungs-Kurve bei 0,5 h Inkubation (Abbildung 6a)

In diesem Versuch wurde der Effekt von Dex in verschiedenen Konzentrationen über einen Inkubationszeitraum von 0,5 h auf die *mitochondriale Reduktionskapazität* getestet.

Dex wurde in den Dosen 10 nM, 0,1 nM und 0,001 nM über 0,5 h verwendet, anschließend wurde der EZ4U Test durchgeführt.

6b. Dosis-Wirkungs-Kurve bei 0,5 h Inkubation (Abbildung 6b)

In diesem Versuch wurde bei gleichem Versuchsaufbau der Effekt auf den *zellulären ATP-Gehalt* gemessen.

Dex wurde in den Dosen 10 nM, 0,1 nM und 0,001 nM über 24 h inkubiert, anschließend wurde der ATP-Biolumineszenz-Test durchgeführt.

7a. Dex Dosis-Wirkungs-Kurve bei 24 h Inkubation (Abbildung 7a)

In diesem Versuch wurde der Effekt von Dex in verschiedenen Konzentrationen auf die *mitochondriale Reduktionskapazität* über einen "langen" Inkubationszeitraum von 24 h getestet.

Dex wurde in den Dosen 100 μM , 10 μM und 0,1 μM über 24 h verwendet, anschließend wurde der EZ4U Test durchgeführt.

7b. Dosis-Wirkungs-Kurve bei 24 h Inkubation (Abbildung 7b)

In diesem Versuch wurde bei gleichem Versuchsaufbau der Effekt auf den *zellulären ATP-Gehalt* gemessen.

Dex wurde in den Dosen 100 μM , 1 μM und 0,01 μM über 24 h inkubiert, anschließend wurde der ATP-Biolumineszenz-Test durchgeführt.

8a. Der Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf den Dex Effekt (Abbildung 8a)

Durch diesen Versuch sollte der Einfluss von pH-Veränderungen auf Dex-Effekte auf die *mitochondriale Reduktionskapazität* geklärt werden.

Dex 10 nM wurde für 0,5 h bei verschiedenen pH-Werten (pH 7.0, 7.4, 8.0) inkubiert, dann erfolgte die Durchführung des EZ4U Tests.

8b. Der Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf den Dex Effekt (Abbildung 8b)

In diesem Versuch wurde bei gleichem Versuchsaufbau der Effekt auf den *zellulären ATP-Gehalt* gemessen.

Dex 10 nM wurde für 0,5 h bei verschiedenen pH-Werten (pH 7.0, 7.4, 8.0) inkubiert, dann erfolgte die Durchführung des ATP Biolumineszenz Tests.

9a. Interaktionen zwischen Dex und RU38486 (Abbildung 9a)

In diesem Versuch sollte der Dex-Effekt auf die *mitochondriale Reduktionskapazität* nach Blockierung des GC-Rezeptors durch RU38486 untersucht werden.

Dazu wurde Dex (1 μM) zusammen mit RU38486 1 μM über 0,5 h inkubiert, danach wurde der EZ4U Test durchgeführt.

9b. Interaktionen zwischen Dex und RU38486 (Abb. 9b)

In diesem Versuch wurde bei gleichem Versuchsaufbau der Effekt auf den *zellulären ATP-Gehalt* gemessen.

Dex 1 μM wurde zusammen mit RU38486 1 μM über 0,5 h inkubiert, danach wurde der ATP-Biolumineszenz Test durchgeführt.

10. Interaktionen zwischen Dex und Cycloheximid (Abbildung 10)

In diesem Versuch sollte der Dex-Effekt auf den *zellulären ATP-Gehalt* nach Blockierung der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid untersucht werden.

Die Zellen wurden zusammen mit Dex 1 μM und Cycloheximid 1 μM für 0,5 h inkubiert, dann wurde der ATP Biolumineszenz Test durchgeführt.

Praktische Durchführung der Versuche:

Die verschiedenen Varianten des Versuchsablaufes werden nach der schematischen Darstellung nun im Hinblick auf die praktische Durchführung genau geschildert, dabei werden die Versuche mit identischem Aufbau zum besseren Verständnis gemeinsam dargestellt:

Zunächst werden die Versuche dargestellt, bei denen der primär EZ4U Test (siehe Kapitel 2.2.1) durchgeführt wurde und damit die Atmungskettenaktivität untersucht wurde:

1. Für die Versuche

-Dexamethason (Dex) und Methylprednisolon

-Dex Dosis-Wirkungs-Kurve bei 0,5 h Inkubation

-Interaktionen zwischen Dex und RU38486

gilt dabei folgende Vorgehensweise:

Das Medium der Mikrotiterplattenvertiefungen, in denen die Zellen kultiviert wurden, wurde abgesaugt. Zu den Zellen wurden 500 µl (bei der 24-Loch-Mikrotiterplatte) bzw. 100 µl (bei der 96-Loch-Mikrotiterplatte) in DMEM gelöstes Hormon bzw. Ethanol (bei Kontrollgruppe) in eine entsprechende Vertiefung gebracht. Bei dem Versuch Dex und RU38486 wurden 10 µl RU38486 hinzugefügt. Anschließend wurde die Platte bei einer Temperatur von 37° Celsius, einem Kohlendioxidanteil von 5% und einer Feuchtigkeit von 95% (Standardbedingungen) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium aus den Vertiefungen abgesaugt, dann diese wieder mit 500 µl bzw. 100 µl DMEM aufgefüllt. Abschließend wurde das EZ4U Reagenz hinzugefügt (siehe Kapitel 2.2.1).

2. Für den Versuch

-Dex Dosis-Wirkungs-Kurve bei 0,25 h Inkubation

gilt folgende Vorgehensweise:

Das Medium wurde aus den Mikrotiterplattenvertiefungen abgesaugt, die Vertiefungen mit den am Boden verbliebenen Zellen wurden anschließend mit 500 µl bzw. 100 µl reinem DMEM wieder gefüllt. Nach 5 Min. Inkubation unter Standardbedingungen wurde das Medium wieder abgesaugt. Jeweils 500 µl (bei der 24-Loch-Mikrotiterplatte) bzw. 100 µl (bei der 96-Loch-Mikrotiterplatte) in DMEM gelöstes Hormon bzw. Ethanol (bei Kontrollgruppe) wurden vorsichtig in eine entsprechende Vertiefung pipettiert, inkubiert und anschließend wieder abgesaugt. Dann wurden die Vertiefungen mit 500 µl bzw. 100 µl DMEM gefüllt, und das EZ4U Reagenz wurde hinzugefügt (siehe Kapitel 2.2.1).

3. Für die Versuche

-Wasserlösliches Dex

-Dex und Atmungskettenhemmer

-Dex Dosis-Wirkungs-Kurve bei 24 h Inkubation

gilt folgende Vorgehensweise:

Das Medium in den Mikrotiterplatten wurde abgesaugt und diese anschließend mit 500 µl bzw. 100 µl reinem DMEM gefüllt. Nach 5 Min. Inkubation wurde das DMEM wieder abgesaugt. 500 µl (bei der 24-Loch-Mikrotiterplatte) bzw. 100 µl (bei der 96-Loch-Mikrotiterplatte) in DMEM gelöstes Hormon bzw. Kontrollsubstanz (Ethanol oder β-Cyclodextrin, siehe Kapitel 2.3.2) wurde vorsichtig in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert.

Anschließend wurde die Platte unter Standardbedingungen inkubiert.

(Anmerkung: Bei dem Versuch Dex und Atmungskettenhemmer wurden die Atmungskettenhemmer 30 Min. vor Ablauf der Dex-Inkubationszeit hinzugefügt, siehe auch Kapitel 2.3.2).

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde wiederum das Medium aus den Vertiefungen gesaugt, diese anschließend mit reinem DMEM gefüllt, dieses erneut

abgesaugt und die Vertiefungen dann wieder mit 500 μ l bzw. 100 μ l DMEM gefüllt. Abschließend wurde das EZ4U Reagenz hinzugefügt (siehe Kapitel 2.2.1).

Die aufgeführten Verfahrensweisen unterscheiden sich somit in den Waschsritten vor und nach der Steroidapplikation. Am Anfang der Versuchsreihen wurde getestet, ob geringe Mengen Hormone aus dem fetalen Kälberserum bzw. Rückstände des Dex nach dem ersten Absaugen die Versuchsergebnisse beeinflussen. Dies konnte nicht nachgewiesen werden, so dass diese Waschsritte in der Folge nicht mehr durchgeführt wurden.

4. Für den Versuch

-Dex Zeitkurve

gilt folgende Vorgehensweise:

Das Medium der Mikrotiterplattenvertiefungen wurde abgesaugt, die Vertiefungen wurden dann mit 500 μ l reinem DMEM gefüllt. Zu den jeweils vorgegebenen Zeitpunkten wurde das Medium aus den Vertiefungen abgesaugt und danach mit 500 μ l (24-Loch-Mikrotiterplatten) in DMEM gelöstem Hormon bzw. Ethanol (bei Kontrollgruppe) versetzt. Die Inkubationszeit endete somit für alle Gruppen zum gleichen Zeitpunkt. Am Ende dieser Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt, die Vertiefungen wurden mit reinem DMEM gefüllt, wieder abgesaugt und mit 500 μ l DMEM gefüllt. Dann wurde das EZ4U Reagenz hinzugefügt (siehe Kapitel 2.2.1).

5. Für den Versuch

-Der Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf die Dex Effekte

gilt folgende Vorgehensweise:

Das in den Mikrotiterplattenvertiefungen vorhandene Medium wurde abgesaugt. 100 μ l auf einen bestimmten pH eingestelltes DMEM mit gelöstem Hormon bzw. Ethanol (bei Kontrollgruppe) wurde in die entsprechenden Vertiefungen gebracht. Die Platte wurde bei Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Medium aus den

Vertiefungen abgesaugt, diese erneut mit reinem DMEM gefüllt, wiederum abgesaugt und nochmals mit 100 µl DMEM gefüllt. Dann wurde das EZ4U Reagenz hinzugefügt (siehe Kapitel 2.2.1).

Übersicht über die Varianten der Versuchsabläufe (entsprechend dem Text):

	1.	2.	3.	4.	5.
Medium absaugen	+	+	+	+	+
Medium zufügen	o	+	+	+	o
Inkubation	o	+	+	+	o
Absaugen	o	+	+	+	o
Behandlung zufügen	+	+	+	+	+
Inkubation	+	+	+	+	+
Absaugen	+	+	+	+	+
Medium zufügen	+	+	+	+	+
Absaugen	o	o	+	+	+
Medium zufügen	o	o	+	+	+
Zufügen des EZ4U+ Reagenz	+	+	+	+	+

Im Folgenden werden die Abläufe für Versuche, bei denen ein ATP Biolumineszenz Test (siehe Kapitel 2.2.2) mit begleitender Proteinbestimmung (siehe Kapitel 2.2.3) durchgeführt wurde, beschrieben:

1. Für die Versuche

- Dex Dosis-Wirkungs-Kurve bei 24 h Inkubation
- Dex Dosis-Wirkungs-Kurve bei 0,25 h Inkubation
- Interaktionen zwischen Dex und RU38486
- Interaktionen zwischen Dex und Cycloheximid

gilt folgende Verfahrensweise:

Das Medium aus den Mikrotiterplattenvertiefungen wurde abgesaugt und diese dann mit 500 µl reinem DMEM gefüllt. Nach 5 Min. Inkubation wurde das Medium wieder abgesaugt und 500 µl (24-Loch-Mikrotiterplatte) in DMEM gelöstes Hormon bzw. Ethanol (bei Kontrollgruppe) und evtl. weitere Substanzen (50 µl RU38486 oder Cycloheximid, siehe Kapitel 2.3.2) in die entsprechenden Vertiefungen eingebracht. Die Platte wurde inkubiert, anschließend wurde das Medium aus den Vertiefungen abgesaugt und diese mit 500 µl PBS (=Phosphat gepufferte Salzlösung, Gibco/BRL, Paisley, Schottland) wieder gefüllt. Das Medium aus den Vertiefungen wurde erneut abgesaugt und diese dann mit 400 µl ATP-Puffer (siehe Kapitel 2.2.2) gefüllt. Die ATP- und parallel die Proteinbestimmung wurden anschließend durchgeführt.

2. Für den Versuch

-Dex Dosis-Wirkungs-Kurve bei 0,5 h Inkubation

gilt folgende Vorgehensweise:

Das Medium wurde nicht abgesaugt, sondern 10 µl (96-Loch-Mikrotiterplatte) in DMEM gelöstes Hormon bzw. Ethanol (bei Kontrollgruppe) wurde direkt in die entsprechende Vertiefung gebracht. So ergab sich in der Vertiefung, die schon 100 µl DMEM enthielt, eine Hormon bzw. Ethanolverdünnung von 1:10. Die Platte wurde inkubiert, dann wurde das Medium aus den Vertiefungen abgesaugt und mit 200 µl ATP-Puffer (siehe Kapitel 2.2.2) gefüllt. Die ATP- und parallel die Proteinbestimmung wurden anschließend durchgeführt.

(Anmerkung: Auch beim ATP-Test wurden am Anfang zur Kontrolle mehr Waschschriffe durchgeführt, die später wie unter 2. beschrieben kontrolliert vermindert werden konnten.

Im Weiteren erhöhten zu viele und damit zu lange Arbeitsabläufe, wie sie vor allem bei den Platten mit 96 Vertiefungen notwendig waren, den pH-Wert des Mediums. Er war v.a. bei so einem empfindlichen Parameter wie dem zellulären ATP-Gehalt ein erheblicher Störfaktor. Deshalb wurde auch bei den Versuchsreihen, die mit 96-Loch-

Mikrotiterplatten durchgeführt wurden, nur in sehr geringen Mediummengen gelöste Substanzen appliziert, anstatt das gesamte Medium auszutauschen).

3. Für den Versuch:

-Der Einfluss verschiedener pH-Werte auf die Dex Effekte

gilt folgende Vorgehensweise:

Das Medium aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurde abgesaugt. Jeweils 100 µl auf einen bestimmten pH eingestelltes (96-Loch-Mikrotiterplatte) DMEM mit gelöstem Hormon bzw. Ethanol (bei Kontrollgruppe) wurde in eine entsprechende Vertiefung eingebracht. Die Platte wurde unter Standardbedingungen inkubiert. Danach wurden das Medium aus den Vertiefungen abgesaugt und mit 200 µl ATP-Puffer (siehe Kapitel 2.2.2) gefüllt. Die ATP- und die Proteinbestimmung wurden anschließend parallel durchgeführt.

Übersicht über die Varianten der Versuchsabläufe (Nummerierung entsprechend dem Text):

	1.	2.	3.
Medium absaugen	+	o	+
Medium zufügen	+	o	o
Inkubation	+	o	o
Absaugen	+	o	o
Behandlung zufügen	+	+	+
Inkubation	+	+	+
Absaugen	+	o	o
PBS zufügen	+	o	o
Absaugen	+	+	+
ATP-Puffer zufügen	+	+	+
Durchführung des ATP/Protein-Tests	+	+	+

2.3.2 Behandlung der Zellen mit anderen Substanzen

In einem weiteren Versuch wurde ethanollösliches Dex wasserlöslichem Hormon gegenübergestellt. Das wasserlösliche Dex ist in ein Molekül des Zuckers β -Cyclodextrin (Sigma, Deisenhofen) eingelagert. Es wurde nicht als Vorrat aufbewahrt, sondern immer frisch angesetzt. Als Kontrollgruppe diente reines β -Cyclodextrin (Sigma, Deisenhofen), welches genau wie das Steroid mit DMEM Medium in Lösung gebracht und verdünnt wurde.

In weiteren Versuchen fanden die Atmungskettenhemmstoffe Rotenon (Komplex 1), Malonsäure (Komplex 2), Antimycin A (Komplex 3) und Kaliumcyanid (Komplex 4) (alles Sigma, Deisenhofen, außer Antimycin A: Merck, Darmstadt) Verwendung. Bei diesen Versuchen wurden die Zellen zunächst 24 h mit Dex inkubiert. In den letzten 30 Min. wurden 50 μ l einer 500 μ M DMEM-Lösung der Hemmsubstanz den 500 μ l Medium in der Vertiefung hinzugefügt, so dass eine Verdünnung von 1:10 entstand und die Hemmstoffkonzentration in der Vertiefung letztendlich 50 μ M betrug.

Des Weiteren wurden RU38486 und Cycloheximid verwendet. RU38486 (Roussel Uclaf, Frankreich) oder Mifepriston ist ein Gestagen- und GC-Rezeptorantagonist. RU38486 findet als Präparat zum Schwangerschaftsabbruch praktische Anwendung. Cycloheximid (Sigma, Deisenhofen) hemmt die Translokaseaktivität der Ribosomen und damit die Translation bzw. die Proteinbiosynthese.

Beide Substanzen wurden als 1:100 in Ethanol gelöster Stocklösung bei -20° C aufbewahrt. Sie wurden mit DMEM auf eine Konzentration von 10 μ M verdünnt, anschließend wurden 50 μ l (bzw. 10 μ l) auf die bereits vorhandenen 500 μ l (bzw. 100 μ l) der Dex-Lösung in der Vertiefung hinzugefügt. Daraus ergab sich eine Konzentration von 1 μ M. Die Inkubationszeit betrug wie bei dem Steroid 0,5 h.

2.4 Die statistische Auswertung

Die Auswertung wurde mit einem handelsüblichen PC (Pentium) durchgeführt. Das Photometer wurde durch die Software MikroWin (Mikrotek, Overath) gesteuert. Das Programm erstellte auch die Interpolationskurven des Proteintests. Alle anderen Berechnungen und statistische Auswertungen wurden mit der Software QuattroPro (Borland, Langen) gemacht.

Die Daten aus dem EZ4U-Test wurden roh in weitere Berechnungen übernommen, da der Farbumschlag direkt eine Quantifizierung erlaubte. Im ATP-Test entsprachen die Messwerte den emittierten Photonen pro Sekunde. Über die interpolierte Standardkurve wurden die entsprechenden ATP-Konzentrationen der Messwerte errechnet. Die Werte im Proteintest gaben die optische Dichte der Proben wieder. Sie wurden anhand der interpolierten Standardkurve als Proteinkonzentration in der Probe ausgedrückt. Auf diese Weise war es möglich, auf ATP- und Proteingehalt in der ursprünglichen Vertiefung zu schließen. Der ATP-Gehalt wurde immer als ATP in mol pro μg Protein ausgedrückt. Damit war eine Bestimmung des ATP-Gehaltes unabhängig von der absoluten Zellzahl möglich.

Im Folgenden wird aufgelistet, auf wie viele Messungen pro Parameter sich die weitere statistische Auswertung in den einzelnen Versuchen bezieht:

Dex und Atmungskettenhemmer (Abb. 1a-d):

$n=6$, wobei aus einer Vertiefung der Mikrotiterplatte drei Proben entnommen wurden, so dass ursprünglich 18 Messwerte bestanden. Es wurden dann jeweils die 3 zusammengehörigen Proben gemittelt, so dass letztendlich 6 Werte in die statistische Auswertung eingingen.

Dex und Methylprednisolon (Abb. 2):

$n=6$ (bei ursprünglich 18 Messwerten, siehe Erklärung oben)

Wasserlösliches Dex (Abb. 3):

$n=6$ (bei ursprünglich 18 Messwerten, siehe Erklärung oben)

Dex-Zeitkurve (Abb. 4):

$n=6$ (bei ursprünglich 18 Messwerten, siehe Erklärung oben)

Dex Dosis-Wirkungs-Kurve bei 0,25 h Inkubation (Abb. 5a):

$n=4$ (bei ursprünglich 12 Messwerten, siehe Erklärung oben)

Dex Dosis-Wirkungs-Kurve bei 0,25 h Inkubation (Abb. 5b):

$n=6$

Dex Dosis-Wirkungs-Kurve bei 0,5 h Inkubation (Abb. 6a):
n=36

Dex Dosis-Wirkungs-Kurve bei 0,5 h Inkubation (Abb. 6b):
Bei Dex 10 nM und 0,1 nM: n=23, bei Dex 0,001 nM: n=19

Dex Dosis-Wirkungs-Kurve bei 24 h Inkubation (Abb. 7a):
n=6 (bei ursprünglich 18 Messwerten, siehe Erklärung oben)

Dex Dosis-Wirkungs-Kurve bei 24 h Inkubation (Abb. 7b):
n=6

Der Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf den Dex-Effekt (Abb. 8a):
n=18

Der Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf den Dex-Effekt (Abb. 8b):
Bei Dex pH 7.4: n=12, bei Dex pH 7 und pH 8: n= 18

Interaktionen zwischen Dex und RU38486 (Abb. 9a):
n=12

Interaktionen zwischen Dex und RU38486 (Abb. 9b):
n=6 (bei ursprünglich 18 Messwerten, siehe Erklärung oben)

Interaktionen zwischen Dex und Cycloheximid (Abb. 10):
n=12

Die statistische Analyse wurde mit dem t-Test für gepaarte Stichproben mit ungleicher Varianz durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde bei 5% angesetzt.

Zur graphischen Darstellung wurde die Wirkung einer Substanz bezüglich der (meist aus Ethanol bestehenden) Kontrolle ermittelt. Die Standardabweichung wurde dann als prozentuale Standardabweichung der behandelten Gruppen bezogen auf den Mittelwert der behandelten Gruppe ausgedrückt. Wurden Werte mehrerer ATP-Tests zusammen verwendet, wurden für die weiteren Berechnungen alle Einzelwerte einer Platte relativ zum Mittelwert der Kontrolle ausgedrückt.

Beim statistischen Vergleich von zwei Effekten (Versuche mit Dex mit Atmungskettenhemmern, RU38486 oder Cycloheximid) wurden zunächst prozentuale Differenzen der Einzelwerte (z.B. zwischen Dex alleine und Kontrolle einerseits und Dex+Ru38486 und Kontrolle andererseits) gebildet, welche dann die Grundlage für die weitere statistische Auswertung bildeten.

3.0 Ergebnisse

3.1 Substanz-Abhängigkeit der Effekte

3.1.1. Wirkungen von Dexamethason auf die Atmungskette

Um die Wirkungen von Dexamethason auf die Atmungskette zu untersuchen, wurde Dexamethason mit Hemmern der Atmungskette zu den Zellen gegeben und die Reduktionskapazität der Zellen quantifiziert. Dazu wurden die Zellen mit Dexamethason (100 μM) bzw. die Kontrollgruppe mit Ethanol 24 h inkubiert. In den letzten 30 Min. wurde ein Hemmstoff (Rotenon, Malonsäure, AntimycinA oder Kaliumcyanid 50 μM), der eine bestimmte Komponente der Atmungskette inhibiert, hinzugefügt. Dazu war es notwendig, eine mittlere Effektdosis für die Atmungskettenhemmstoffe einzusetzen, um die Modulation durch Dexamethason in beide Richtungen darstellen zu können.

Ein weiteres Ziel dieses Versuches war die Eingrenzung des Reduktionsortes des EZ4U-Farbstoffes. Deshalb werden zunächst die Effekte der Atmungskettenhemmer gegenüber der jeweiligen Ethanolkontrollgruppe beschrieben:

Rotenon (hemmt Komplex 1) senkte die mitochondriale Reduktionskapazität von AtT 20 Zellen um -12% (Standardfehler=SF 4.5, $p < 0.05$), Malonsäure (hemmt Komplex 2) um -6% (SF 5.9, $p = 0.09$), Antimycin A (hemmt Komplex 3) um -7% (SF 2.4, $p = 0.08$) und Kaliumcyanid (hemmt Komplex 4) um -10% (SF 6.7, $p = 0.055$).

Alle Atmungskettenhemmstoffe haben also eine Minderung der Farbstoffproduktion erzeugt, die bei Rotenon signifikant mit einem Signifikanzniveau von 5% war, die anderen Atmungskettenhemmstoffe erreichten in der gewählten Konzentration nur ein Signifikanzniveau von 10% (Abbildung 1a bis 1d).

Des Weiteren sollten in diesem Versuch die Wirkung von Dexamethason allein und von Dexamethason in Anwesenheit von Atmungskettenhemmstoffen miteinander verglichen werden.

Bei dieser Gegenüberstellung ergab sich folgendes Bild:

Dexamethason senkte die mitochondriale Reduktionskapazität ohne Hemmstoffe gegenüber der Ethanolkontrollgruppe signifikant immer um ca. -30 % (SF zwischen 4.6 und 6, $p < 0.05$). Waren sowohl Dexamethason als auch ein Hemmstoff anwesend, betrug die Hemmung der mitochondrialen Reduktionskapazität bei Rotenon und AntimycinA nur noch -23% (SF 5.4 und 6.6, $p < 0.05$), bei Malonsäure -22% (SF 3.5, $p < 0.05$) und bei Kaliumcyanid -25% (SF 5.5, $p < 0.05$). Die Effekte gegenüber der Ethanolkontrollgruppe waren stets signifikant. Der Unterschied der Effekte Dexamethason alleine versus Dexamethason mit Malonsäure, Antimycin A bzw. Kaliumcyanid war signifikant mit einem $p < 0.05$, in dem Experiment mit Rotenon wurde ein $p = 0.07$ erreicht (Abbildung 1a bis 1d).

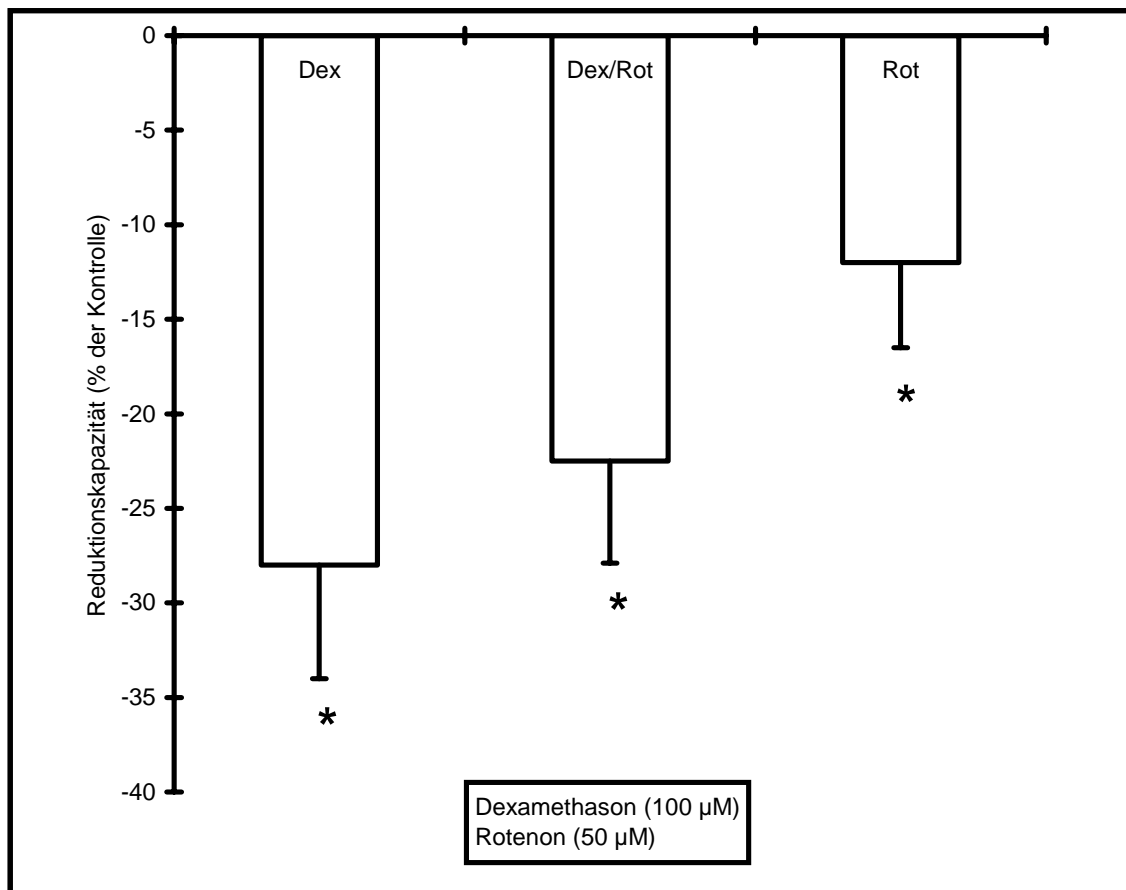


Abbildung 1a: Effekte von Dexamethason (Dex) ohne und mit Rotenon (Rot) und von Rotenon allein auf die zelluläre Reduktionskapazität hypophysärer AtT 20 Zellen im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle. Dexamethason wurde 24 h inkubiert, Rotenon wurde in den letzten 30 Min. hinzugefügt.

Signifikante Effekte gegenüber der Kontrollgruppe wurden mit einem * markiert (t-Test für gepaarte Stichproben ungleicher Varianz mit Signifikanzniveau von 5%).

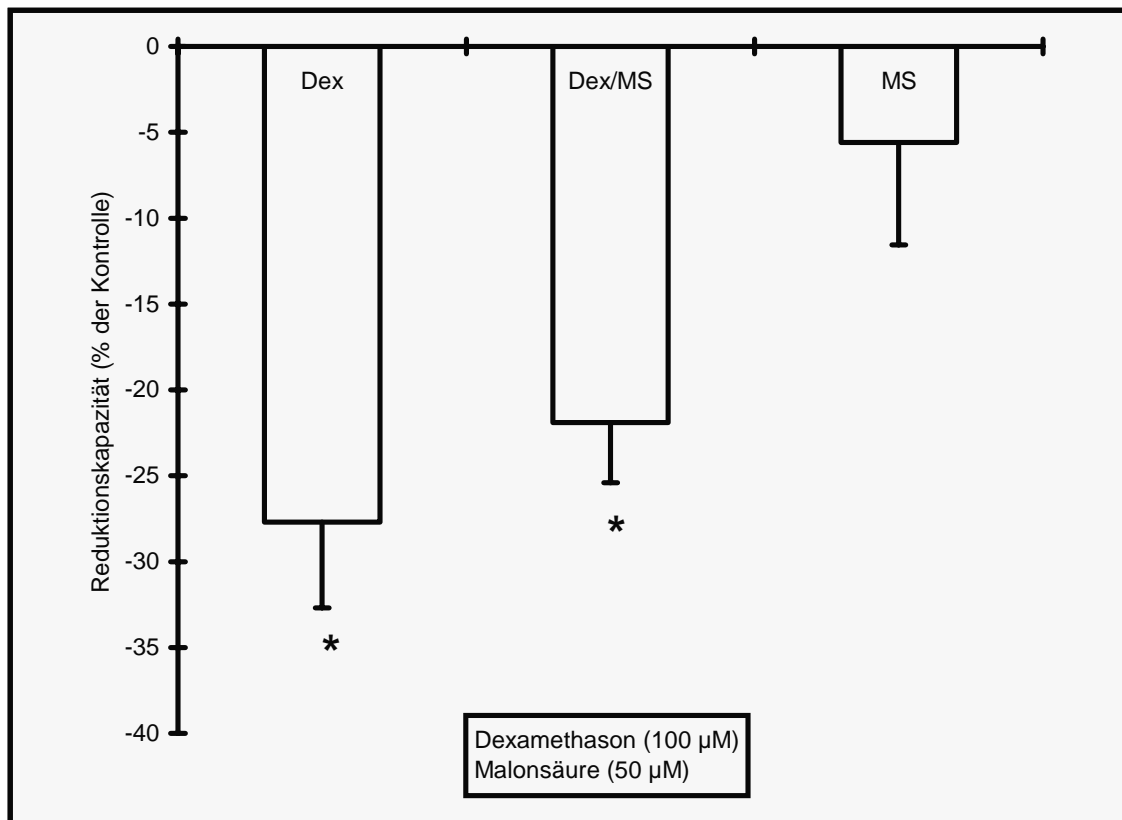


Abbildung 1b: Effekte von Dexamethason (Dex) ohne und mit Malonsäure (MS) und von Malonsäure allein auf die zelluläre Reduktionskapazität hypophysärer AtT 20 Zellen im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle. Dexamethason wurde 24 h inkubiert, Malonsäure wurde in den letzten 30 Min. hinzugefügt.

Signifikante Effekte gegenüber der Kontrollgruppe wurden mit einem * markiert (t-Test für gepaarte Stichproben ungleicher Varianz mit Signifikanzniveau von 5%).

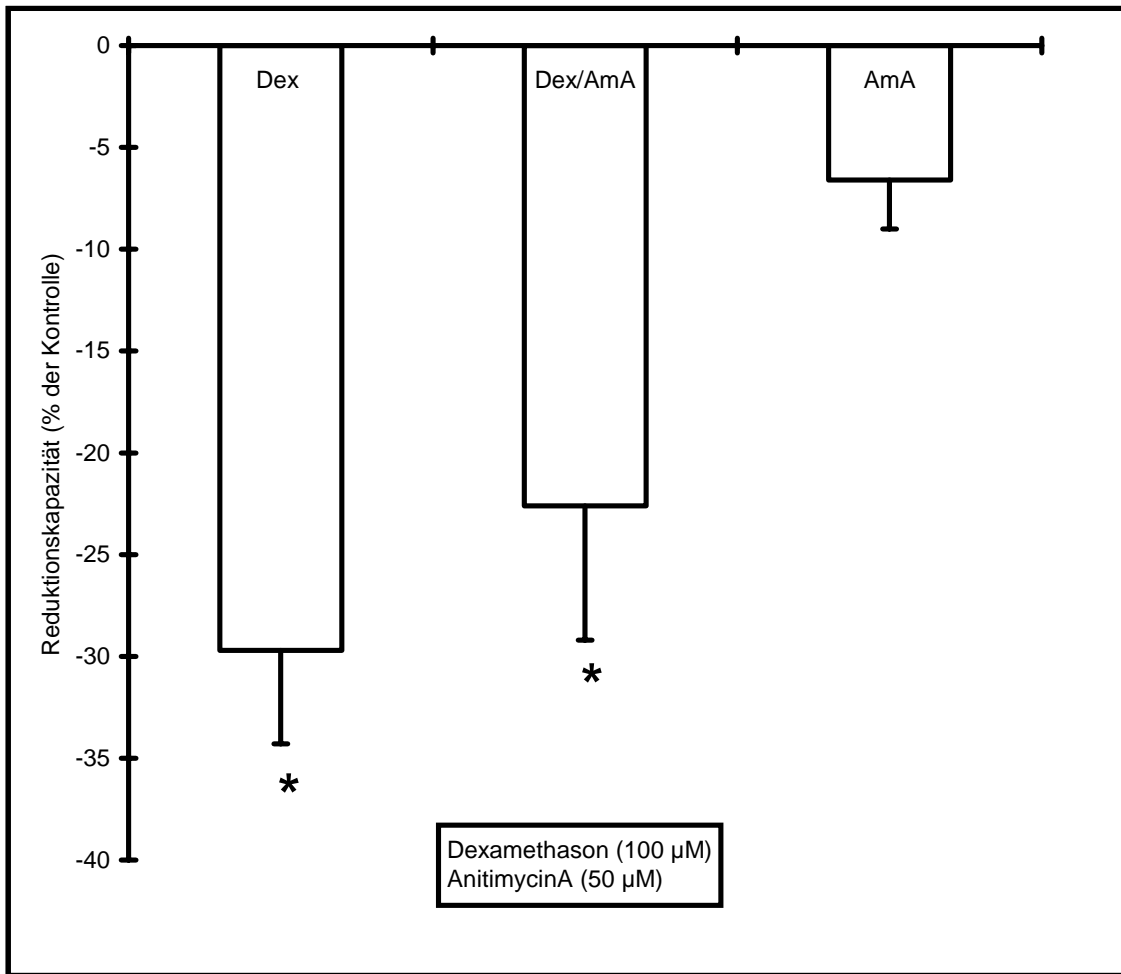


Abbildung 1c: Effekte von Dexamethason (Dex) ohne und mit AntimycinA (AmA) und von AntimycinA allein auf die zelluläre Reduktionskapazität hypophysärer AtT 20 Zellen im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle. Dexamethason wurde 24 h inkubiert, AntimycinA wurde in den letzten 30 Min. hinzugefügt.

Signifikante Effekte gegenüber der Kontrollgruppe wurden mit einem * markiert (t-Test für gepaarte Stichproben ungleicher Varianz mit Signifikanzniveau von 5%).

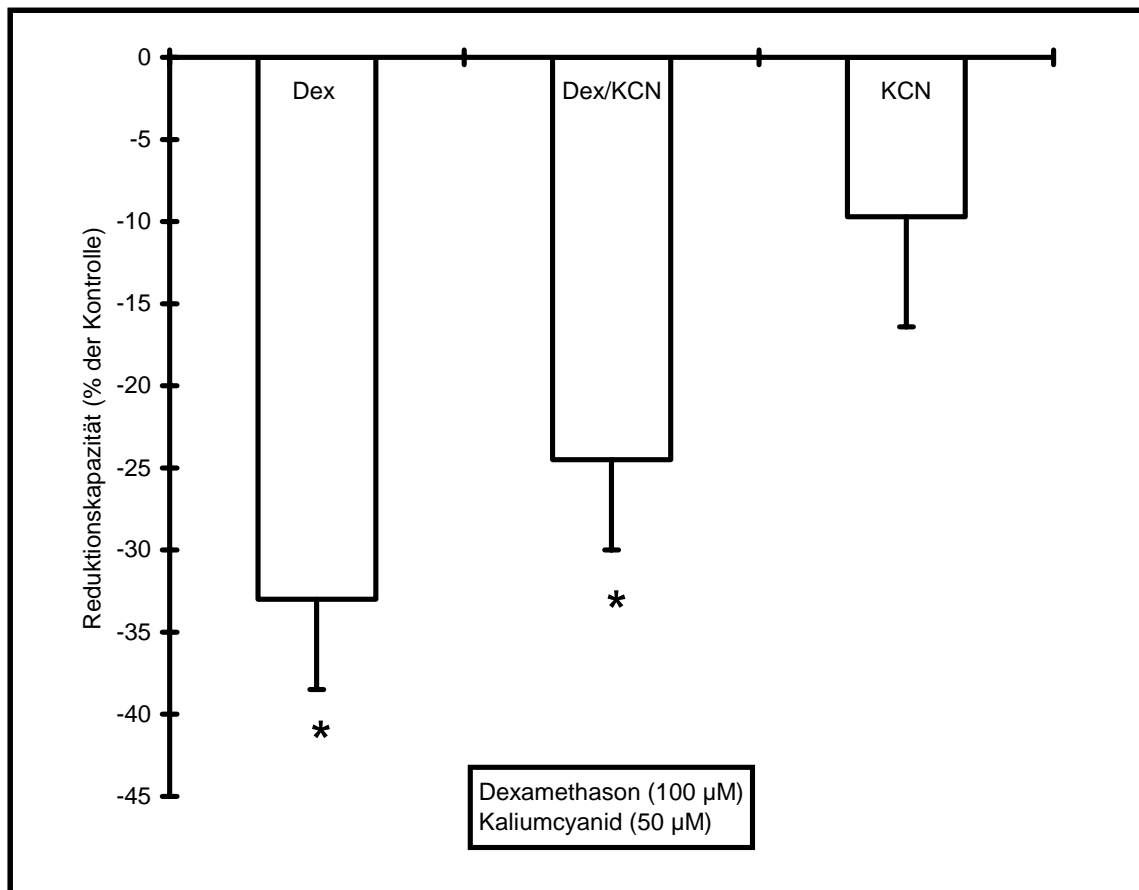


Abbildung 1d: Effekte von Dexamethason (Dex) ohne und mit Kaliumcyanid (KCN) und von Kaliumcyanid allein auf die zelluläre Reduktionskapazität hypophysärer AtT 20 Zellen im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle. Dexamethason wurde 24 h inkubiert, Kaliumcyanid wurde in den letzten 30 Min. hinzugefügt.

Signifikante Effekte gegenüber der Kontrollgruppe wurden mit einem * markiert (t-Test für gepaarte Stichproben ungleicher Varianz mit Signifikanzniveau von 5%).

3.1.2 Wirkungen von Dexamethason im Vergleich zu den Wirkungen von Methylprednisolon

Bei dem Versuch Dexamethason und Methylprednisolon wurde zunächst die Wirkung von Dexamethason und Methylprednisolon auf AtT 20 Zellen im EZ4U-Test untersucht. Dabei wurde eine Konzentration von 1 μM und eine Inkubationszeit von 24 h verwendet.

Die beiden Substanzen führten unter diesen Bedingungen gegenüber der jeweiligen Ethanolkontrollgruppe zu einer signifikanten Senkung der mitochondrialen Reduktionskapazität um -21% (Dexamethason, SF 4, $p < 0.05$) bzw. -23% (Methylprednisolon, SF 3.3, $p < 0.05$) (Abbildung 2). Es bestand somit kein wesentlicher Unterschied in Bezug auf den hier untersuchten Parameter.

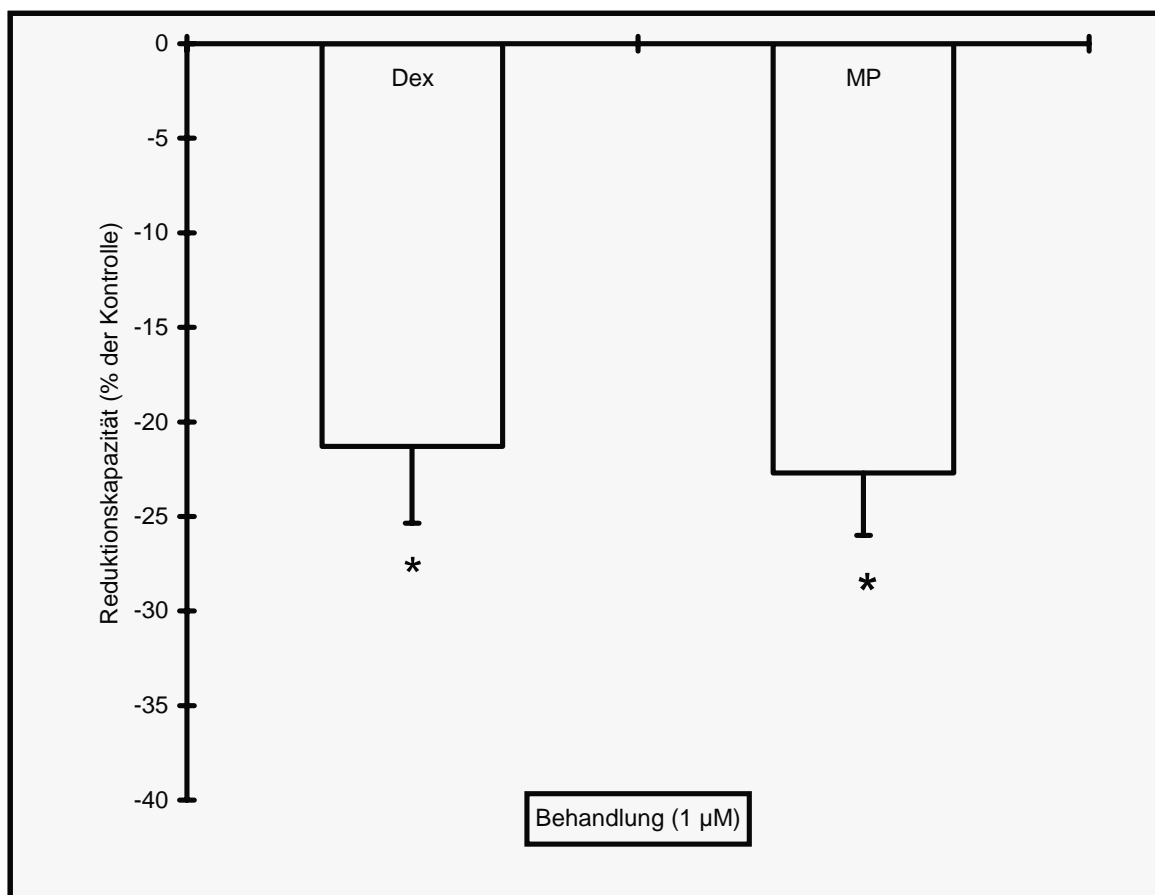


Abbildung 2: Effekte von Dexamethason (Dex) und Methylprednisolon (MP) auf die zelluläre Reduktionskapazität hypophysärer AtT 20 Zellen im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle. Beide Steroide wurden 24 h inkubiert.

Signifikante Effekte gegenüber der Kontrolle wurden mit einem * markiert (t-Test für gepaarte Stichproben ungleicher Varianz mit Signifikanzniveau von 5%).

3.1.3 Wirkungen von wasserlöslichem Dexamethason

Neben ethanollöslichem Dexamethason gibt es auch wasserlösliche Formen, in denen Dexamethason in das Stärkederivat β -Cyclodextrin eingelagert ist. β -Cyclodextrin verbessert die physikochemischen Eigenschaften von schwer wasserlöslichen Arzneimitteln, indem es die gebundene Substanz durch wässrige Barrieren zu lipophilen Oberflächen biologischer Membranen transportiert, wo das Arzneimittelmolekül sich aus dem Komplex löst und in die biologische Membran dringt (Uekama *et al.*, 1983; Dilova *et al.*, 2004; Brewster *et al.*, 2002).

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob eine möglicherweise gesteigerte zelluläre Verfügbarkeit durch β -Cyclodextrin zu wesentlichen Unterschieden zum ethanollöslichen Dexamethason in Hinblick auf Effekte auf die mitochondriale Reduktionskapazität im AtT20-System führt. Das wasserlösliche, in β -Cyclodextrin eingelagerte Dexamethason wurde für 24 h inkubiert. Es senkte die Farbstoffproduktion im EZ4U-Test bezüglich der nur mit Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe in einer Konzentration von 1 μ M lediglich um -15% (SF 5.3). Bei 100-fach niedriger Konzentration blieb der Effekt der gleiche. Bei 100-fach höherer Konzentration verstärkte er sich auf -20% (SF 5.4) (Abbildung 3).

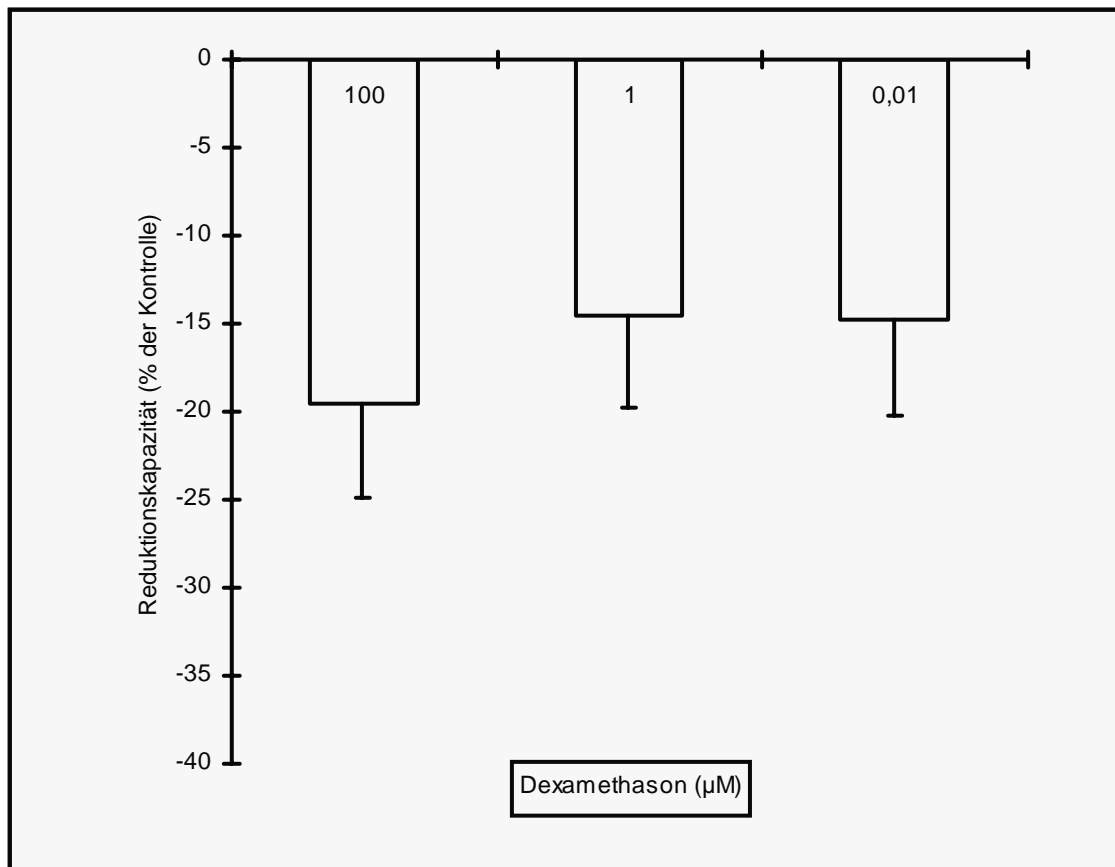


Abbildung 3: Effekte wasserlöslichen Dexamethasons (Dex) auf die zelluläre Reduktionskapazität hypophysärer AtT 20 Zellen im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle. Dexamethason wurde 24 h inkubiert.

Es konnte im Vergleich zu dem ethanollöslichen Dexamethason kein ausgeprägterer Effekt nachgewiesen werden. Deshalb wurde für alle weiteren Versuche nur noch ethanollösliches Dexamethason verwendet.

3.2 Zeitliche Charakterisierung der Dexamethason-Effekte

Um die Dexamethason-Effekte zeitlich weiter zu charakterisieren, wurde eine Zeitkurve erarbeitet. Dabei wurde die Wirkung von Dexamethason auf die mitochondriale Reduktionskapazität von AtT 20 Zellen bei einer Konzentration von 100 μM nach verschiedenen langen Inkubationszeiten getestet.

Die maximale Wirkung war nach 47 h (-30 % der Ethanolkontrolle, SF 1.4, $p < 0.05$) zu verzeichnen. Der Dexamethason-Effekt nach 27,5 h betrug -22% (SF 2.2, $p < 0.05$), nach 4 h lag er bei -14% (SF 3.9, $p < 0.05$) der Ethanolkontrolle. Alle Effekte waren statistisch signifikant (Abbildung 4).

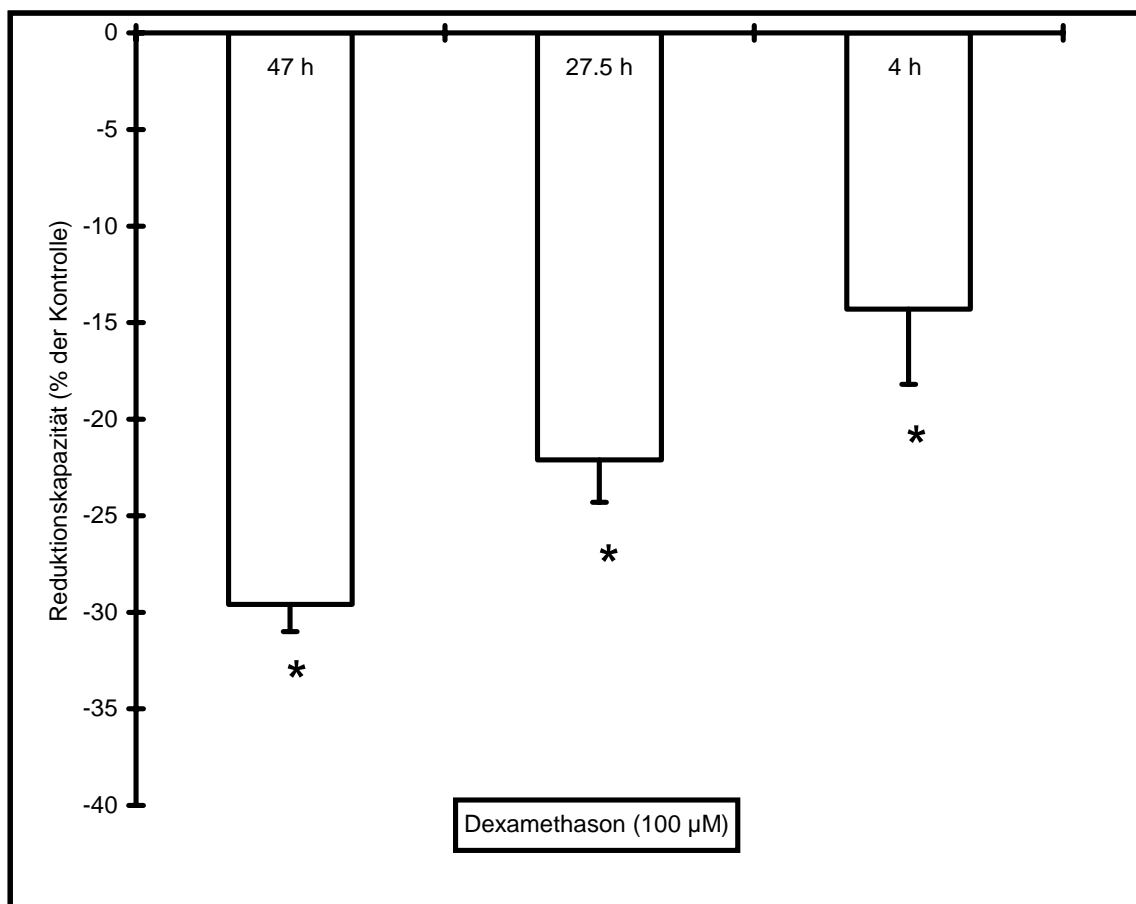


Abbildung 4: Effekte von Dexamethason auf die zelluläre Reduktionskapazität hypophysärer AtT 20 Zellen nach 47 h, 27,5 h und 4 h Inkubation im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle. Signifikante Effekte gegenüber der Kontrollgruppe wurden mit einem * markiert (t-Test für gepaarte Stichproben ungleicher Varianz mit Signifikanzniveau von 5%).

3.2.1 Charakterisierung der Dosis-Effekte von Dexamethason bei unterschiedlichen Inkubationszeiten

In dieser Versuchsreihe wurden die Effekte von Dexamethason weiter pharmakologisch charakterisiert. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen von Dexamethason mit unterschiedlich langen Inkubationszeiten verwendet, um eine zeitliche und konzentrationsabhängige Beschreibung der Wirkungen zu erreichen. Zusätzlich wurde bei diesen Versuchen ATP gemessen, um herauszuarbeiten, ob zwischen den Effekten auf die Reduktionskapazität und Wirkungen auf den Energiehaushalt der Zelle Zusammenhänge bestehen.

3.2.2 Die Dexamethason Dosis-Wirkungs-Kurve bei 0,25 h Inkubation

Bei dem Versuch Dexamethason Dosis-Wirkungs-Kurve bei 0,25 h Inkubation wurden die Zellen mit Dexamethason in Konzentrationen von 100 μM , 1 μM und 0,01 μM 15 Min. (0,25 h) lang inkubiert. Es wurden die Veränderungen der mitochondrialen Reduktionskapazität und des ATP-Gehalts gemessen.

Im EZ4U-Test hatte die niedrigste Dexamethasondosis (0,01 μM) gegenüber der Ethanolkontrolle den stärksten Effekt (-21%, SF 18.8, mit $p < 0.05$ signifikant), die nächsthöhere Dosis (1 μM) zeigte einen schwächeren (-16%, SF 11.7, mit $p < 0.05$ signifikant) und die höchste Dosis (100 μM) den niedrigsten Effekt bezüglich der Ethanolkontrolle (-11%, SF 20.4) (Abbildung 5a).

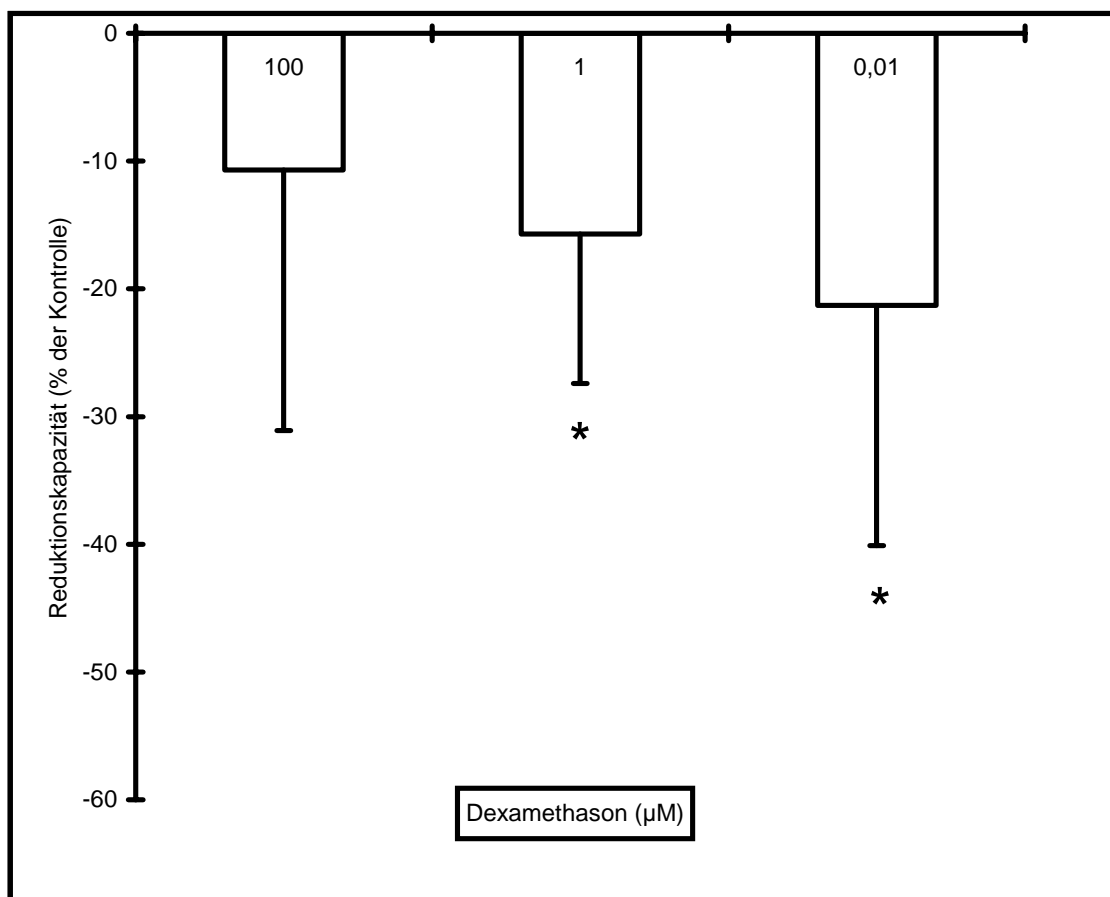


Abbildung 5a: Effekte von Dexamethason auf die zelluläre Reduktionskapazität hypophysärer AtT 20 Zellen im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle. **Dexamethason wurde 0,25 h inkubiert.**

Signifikante Effekte gegenüber der Kontrollgruppe wurden mit einem * markiert (t-Test für gepaarte Stichproben ungleicher Varianz mit Signifikanzniveau von 5%).

Die Veränderungen des ATP-Gehaltes waren nach einer Dexamethason-Inkubation von 15 Min. wesentlich stärker ausgeprägt. Die niedrigste Konzentration (0,01 μM) bewirkte gegenüber der Ethanolkontrolle eine signifikante Abnahme des ATP-Gehaltes um -44% (SF 39.6, $p < 0.05$). Die mittlere Dosis zeigte keine signifikanten Effekte auf die ATP-Konzentration. Die höchste Dosis in diesem Versuch (100 μM) steigerte den ATP-Gehalt signifikant um +72% (SF 44, $p < 0.05$) (Abbildung 5b).

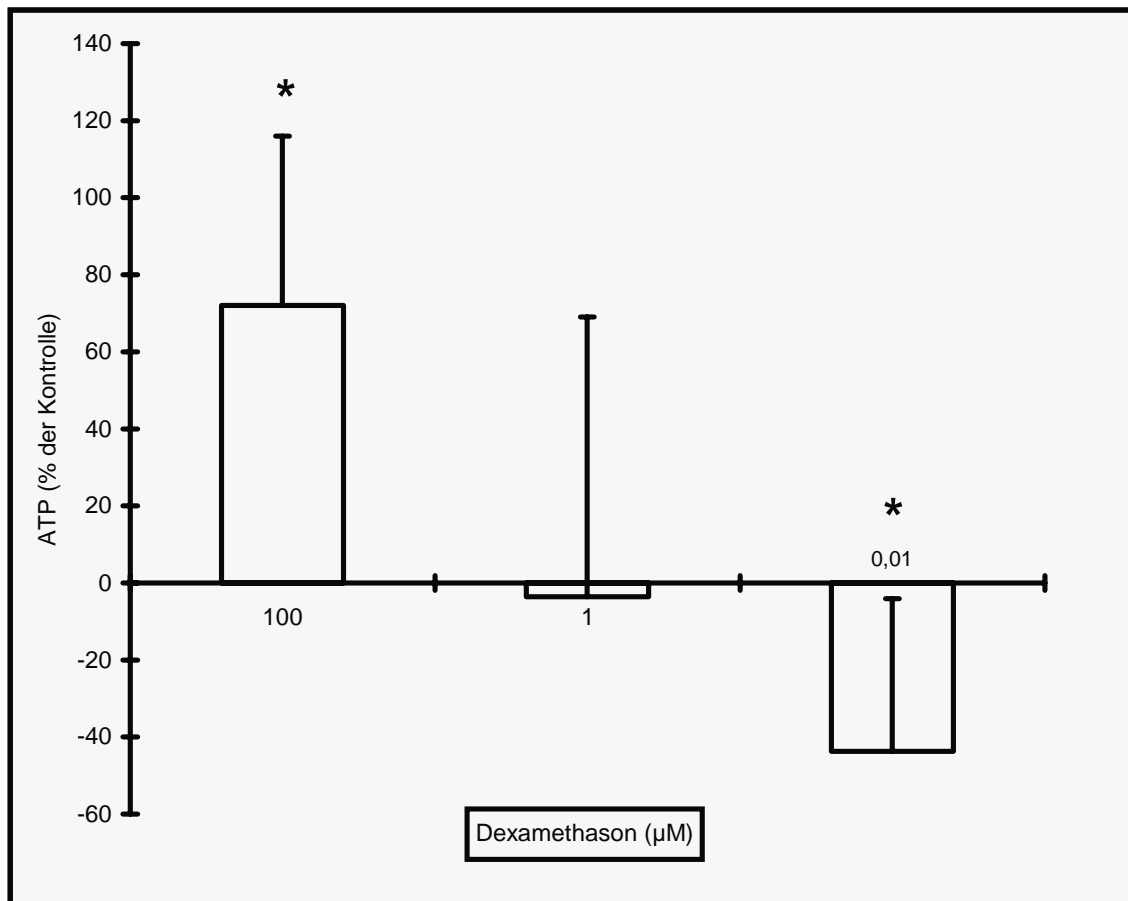


Abbildung 5b: Effekte von Dexamethason auf die zelluläre ATP-Konzentration hypophysärer AtT 20 Zellen im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle. **Dexamethason wurde 0,25 h inkubiert.**

Signifikante Effekte gegenüber der Kontrollgruppe wurden mit einem * markiert (t-Test für gepaarte Stichproben ungleicher Varianz mit Signifikanzniveau von 5%).

3.2.3 Die Dexamethason Dosis-Wirkungs-Kurve bei 0,5 h Inkubation

Für den Versuch Dexamethason Dosis-Wirkungs-Kurve bei 0,5 h Inkubation wurden im EZ4U- und im ATP-Test die Effekte von Dexamethason in den Konzentrationen 10 nM, 0,1 nM und 0,001 nM und bei einer Inkubationszeit von 30 Min. gemessen.

Im EZ4U-Test war lediglich bei einer Konzentration von 10 nM ein signifikanter negativer Effekt in Bezug auf die Ethanolkontrolle von -8% (SF 5.8, $p < 0.05$) zu finden. In einer Konzentration von 0,001 nM wurde die mitochondriale Reduktionskapazität signifikant um +4% (SF 5.3, $p < 0.05$) gesteigert (Abbildung 6a).

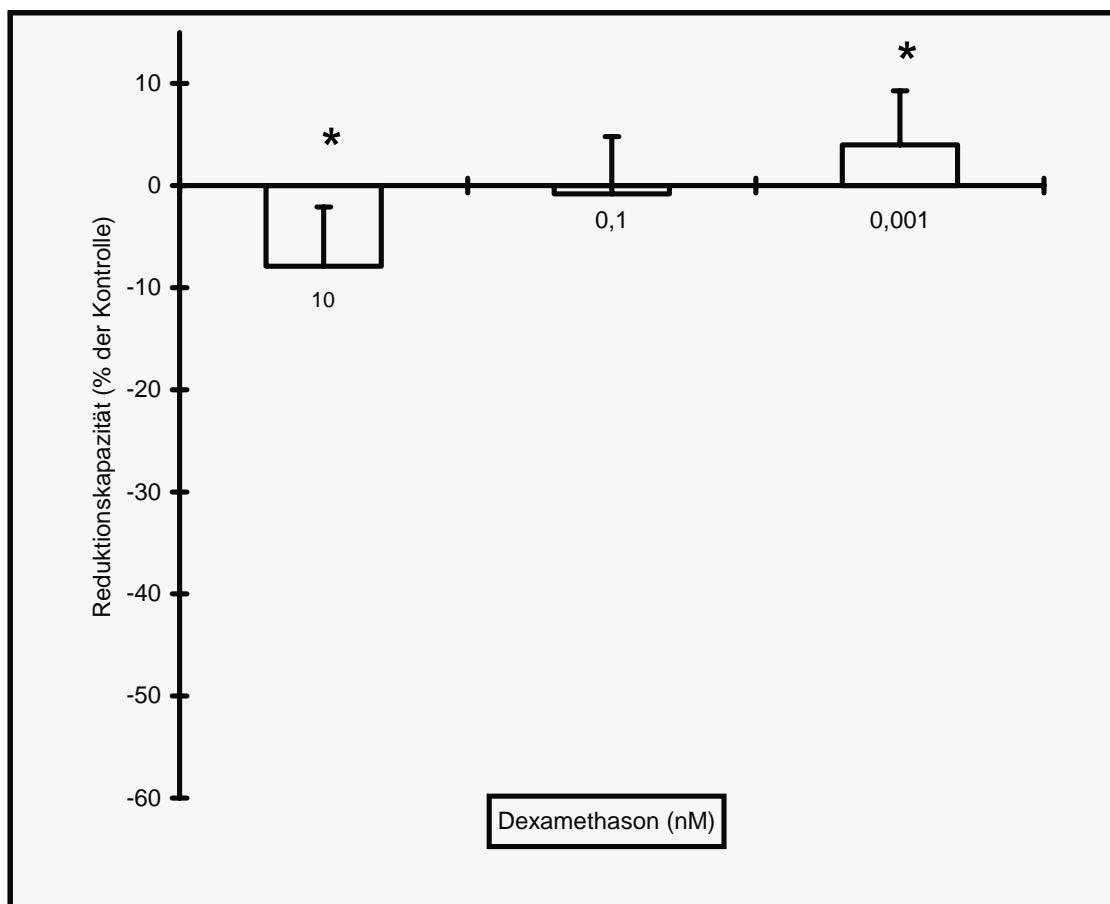


Abbildung 6a: Effekte von Dexamethason auf die zelluläre Reduktionskapazität hypophysärer AtT 20 Zellen im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle. **Dexamethason wurde 0,5 h inkubiert.**

Signifikante Effekte gegenüber der Kontrollgruppe wurden mit einem * markiert (t-Test für gepaarte Stichproben ungleicher Varianz mit Signifikanzniveau von 5%).

Der ATP-Gehalt veränderte sich unter verschiedenen Dexamethason-Konzentrationen auf eine andere Weise. Hier fanden wir den stärksten Rückgang des ATP-Gehaltes bezüglich der Ethanolkontrolle bei einer Konzentration von 0,1 nM (-35%, SF 14.9, mit $p < 0.05$ signifikant). Selbst bei einer noch niedrigeren Konzentration von 0,001 nM lag der Effekt noch bei -16% (SF 12.3), was aber nicht mehr signifikant war. Bei der höheren Dosis von 10 nM war der Dexamethason-Effekt wesentlich geringer und ebenfalls nicht signifikant (Abbildung 6b).

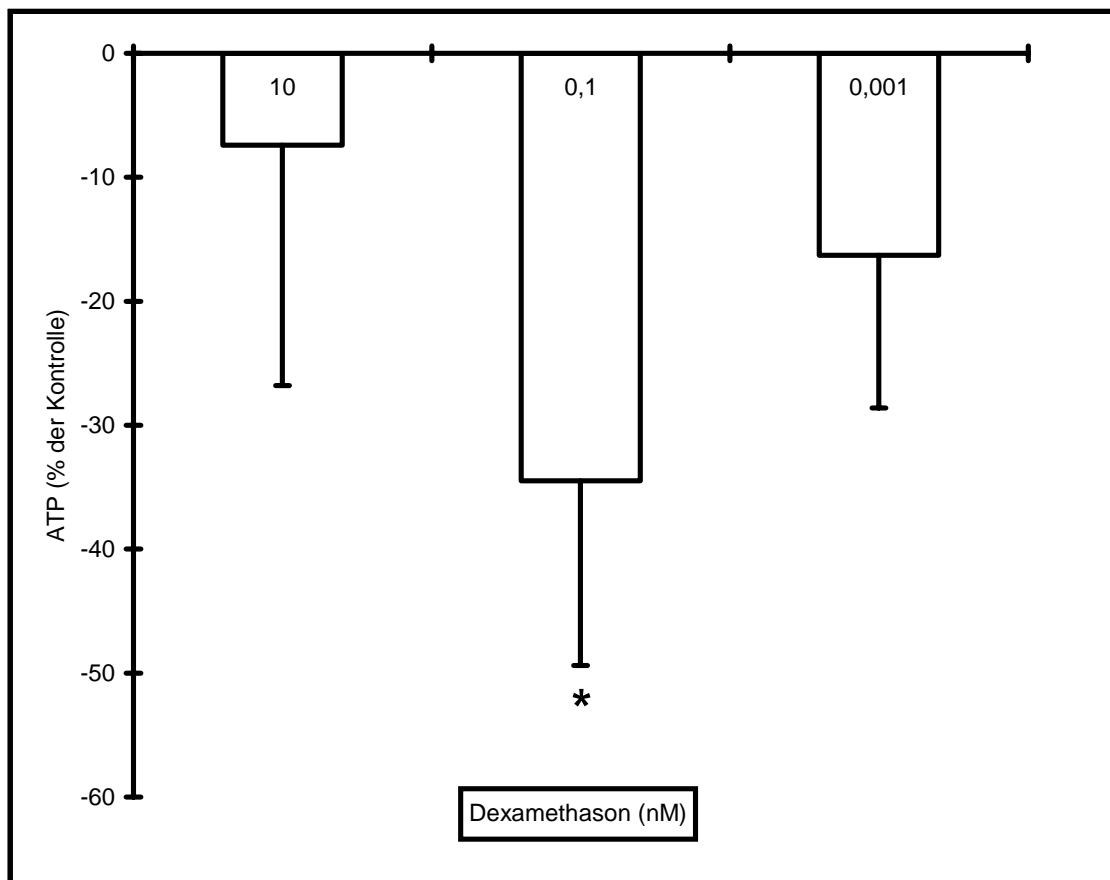


Abbildung 6b: Effekte von Dexamethason auf die zelluläre ATP-Konzentration hypophysärer AtT 20 Zellen im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle. **Dexamethason wurde 0,5 h inkubiert.**

Signifikante Effekte gegenüber der Kontrollgruppe wurden mit einem * markiert (t-Test für gepaarte Stichproben ungleicher Varianz mit Signifikanzniveau von 5%).

3.2.4 Die Dexamethason Dosis-Wirkungs-Kurve bei 24 h Inkubation

Für die Dexamethason Dosis-Wirkungs-Kurve bei 24 h Inkubation wurde der Effekt von Dexamethason gegenüber der Ethanolkontrollgruppe nach 24-stündiger Inkubation im EZ4U-Test in den Konzentrationen 100 μM , 10 μM und 0,1 μM ermittelt.

Bei der höchsten Konzentration (100 μM) war der Effekt auf die mitochondriale Reduktionskapazität stark supprimierend (-35%, SF 5.5, $p < 0.05$). Bei schwächeren Konzentrationen wurde der negative Effekt mit -21% (SF 2.4, $p < 0.05$) bei 10 μM und -14% (SF 6.3, $p < 0.05$) bei 0,1 μM kleiner (Abbildung 7a). Alle beschriebenen Effekte sind statistisch signifikant.

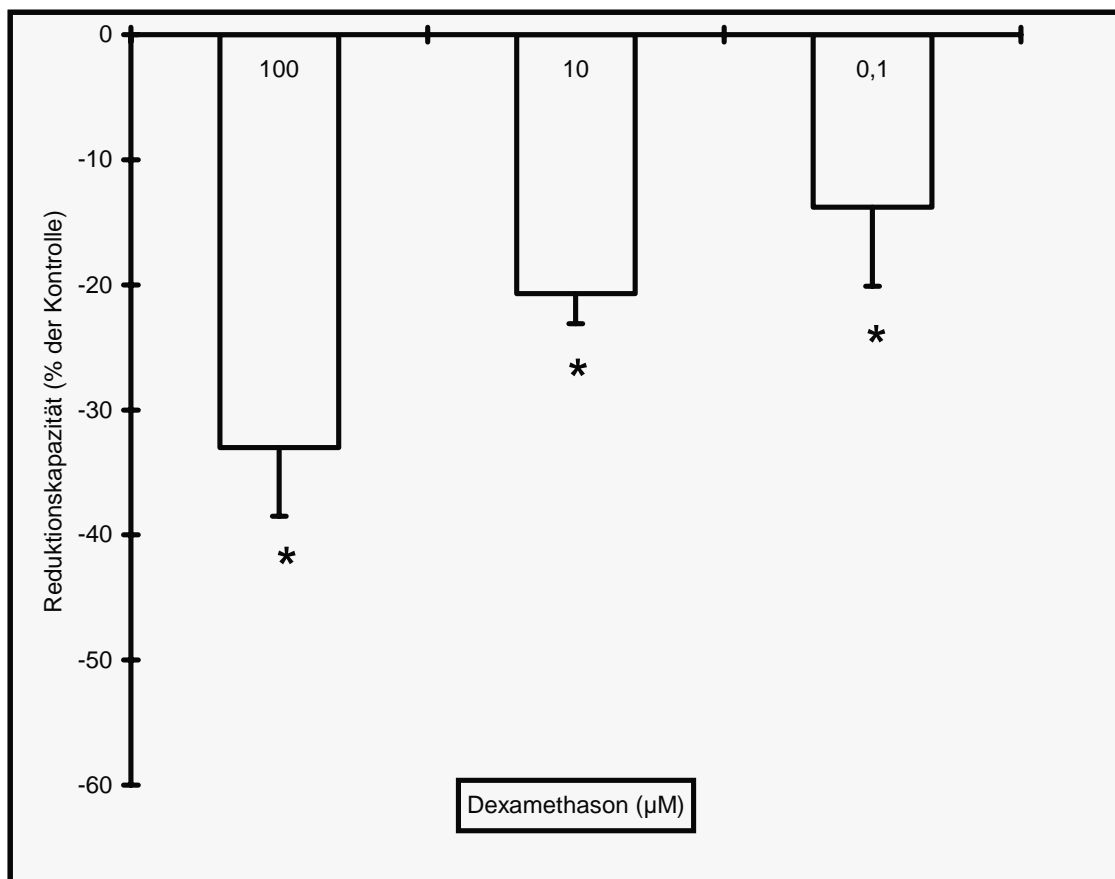


Abbildung 7a: Effekte von Dexamethason auf die zelluläre Reduktionskapazität hypophysärer AtT 20 Zellen im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle. **Dexamethason wurde 24 h inkubiert.**

Signifikante Effekte gegenüber der Kontrollgruppe wurden mit einem * markiert (t-Test für gepaarte Stichproben ungleicher Varianz mit Signifikanzniveau von 5%).

Es wurden auch Dexamethason-Effekte nach 24-stündiger Inkubation im ATP-Test gemessen. Dabei wurden die Konzentrationen 100 μM , 1 μM , 0,01 μM verwendet. Bei einer Konzentration von 100 μM war kein Effekt gegenüber der Ethanolkontrolle auf den ATP-Gehalt auszumachen. Eine Konzentration von 1 μM Dexamethason senkte den ATP-Gehalt bezüglich der Ethanolkontrolle um -14% (SF 41.6), eine von 10 nM signifikant um -35% (SF 20.3, $p < 0.05$). Niedrige Konzentrationen hatten also im Gegensatz zu den Ergebnissen im EZ4U-Test einen größeren Effekt als höhere (Abbildung 7b).

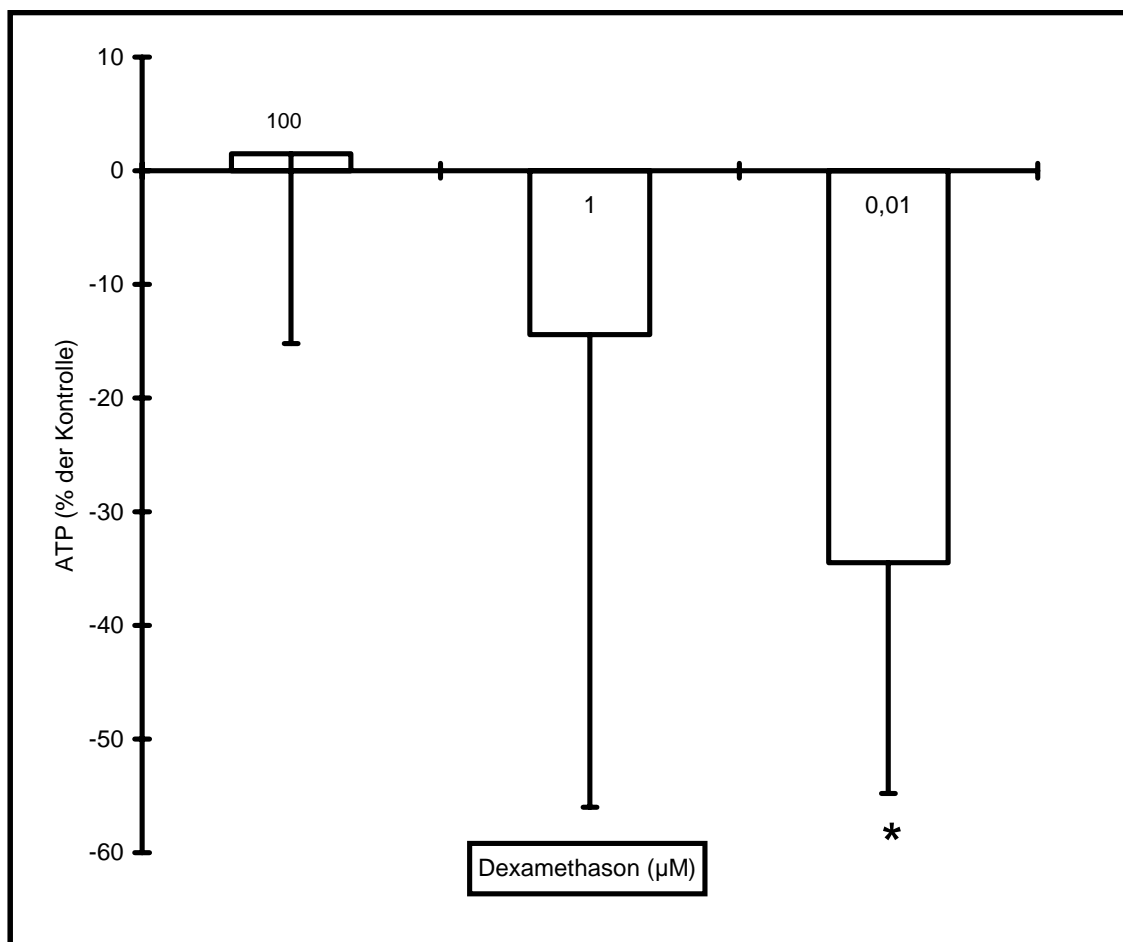


Abbildung 7b: Effekte von Dexamethason auf die zelluläre ATP-Konzentration hypophysärer AtT 20 Zellen im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle. **Dexamethason wurde 24 h inkubiert.**

Signifikante Effekte gegenüber der Kontrollgruppe wurden mit einem * markiert (t-Test für gepaarte Stichproben ungleicher Varianz mit Signifikanzniveau von 5%).

3.3 Charakterisierung weiterer Variablen der Effekte von Dexamethason

Die folgenden Untersuchungen sollten die Bedeutung weiterer Variablen (Wasserstoffionenkonzentration [pH], Glukokortikoidrezeptor, Proteinsynthese) auf die Dexamethason-Wirkungen darstellen. Hier wurde ebenfalls die ATP-Konzentration als funktioneller Parameter mit in die Untersuchungen einbezogen.

3.3.1 Der Einfluss des pH-Wertes auf die Wirkungen von Dexamethason

Zur Untersuchung der modulierenden Wirkungen von verschiedenen pH-Werten auf die Dexamethason-Effekte wurden 10 nM Dexamethason nach 0,5 h Inkubation bei den pH-Werten 7.0, 7.4 und 8.0 untersucht.

Eine Senkung der Reduktionskapazität gegenüber der Ethanolkontrolle konnte nur bei einem physiologischen pH-Wert von 7.4 festgestellt werden. Sie betrug -14% (SF 3.5, $p < 0.05$) und war signifikant (Abbildung 8a).

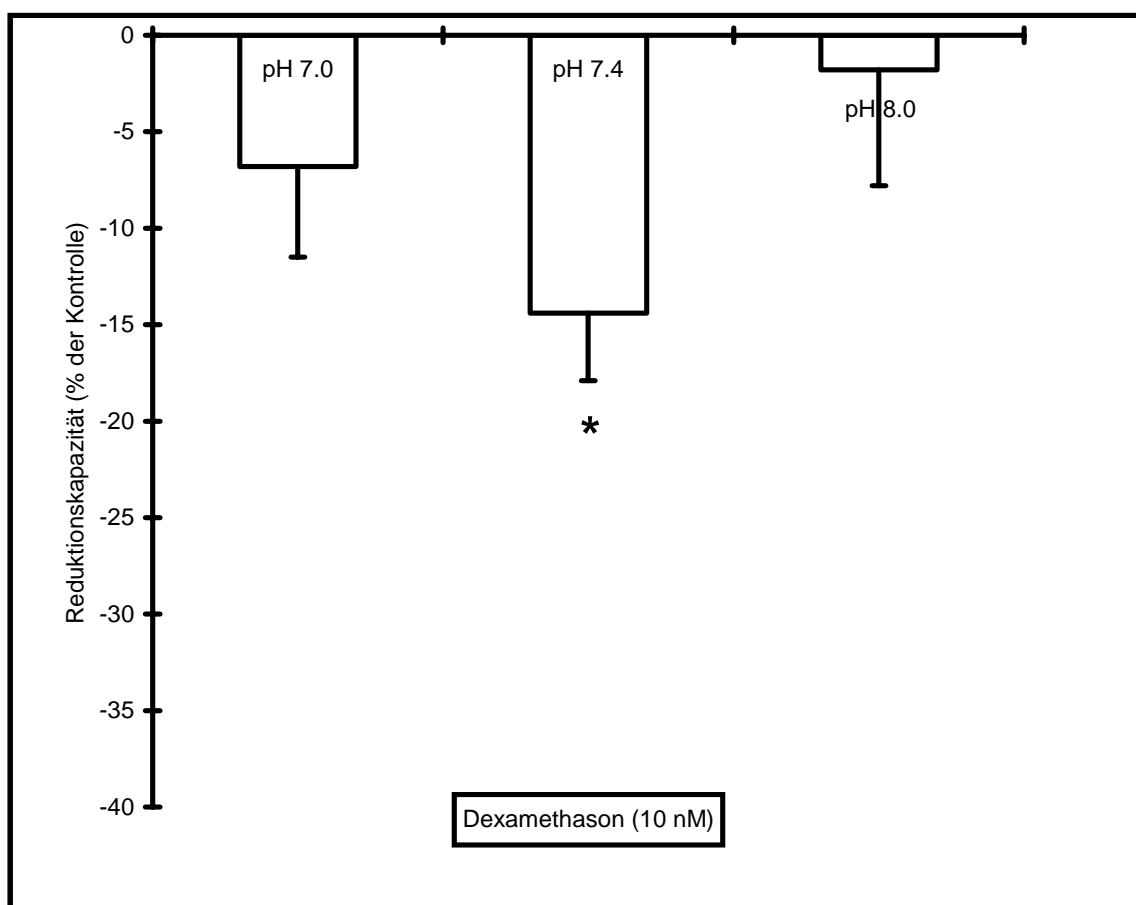


Abbildung 8a: Effekte von Dexamethason (10 nM) auf die zelluläre Reduktionskapazität hypophysärer AtT 20 Zellen bei verschiedenen pH-Werten im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle. Dexamethason wurde 0,5 h inkubiert.

Signifikante Effekte gegenüber der Kontrollgruppe wurden mit einem * markiert (t-Test für gepaarte Stichproben ungleicher Varianz mit Signifikanzniveau von 5%).

Eine signifikante Veränderung des ATP-Gehaltes konnte 10 nM Dexamethason bei allen drei pH-Werten hervorrufen. Sie betrug gegenüber der Ethanolkontrolle bei einem sauren pH von 7.0 -70% (SF 54.8, $p < 0.05$), im physiologischen Milieu -52% (SF 44.7, $p < 0.05$) und bei einem pH von 8.0 -62% (SF 41, $p < 0.05$) (Abbildung 8b).

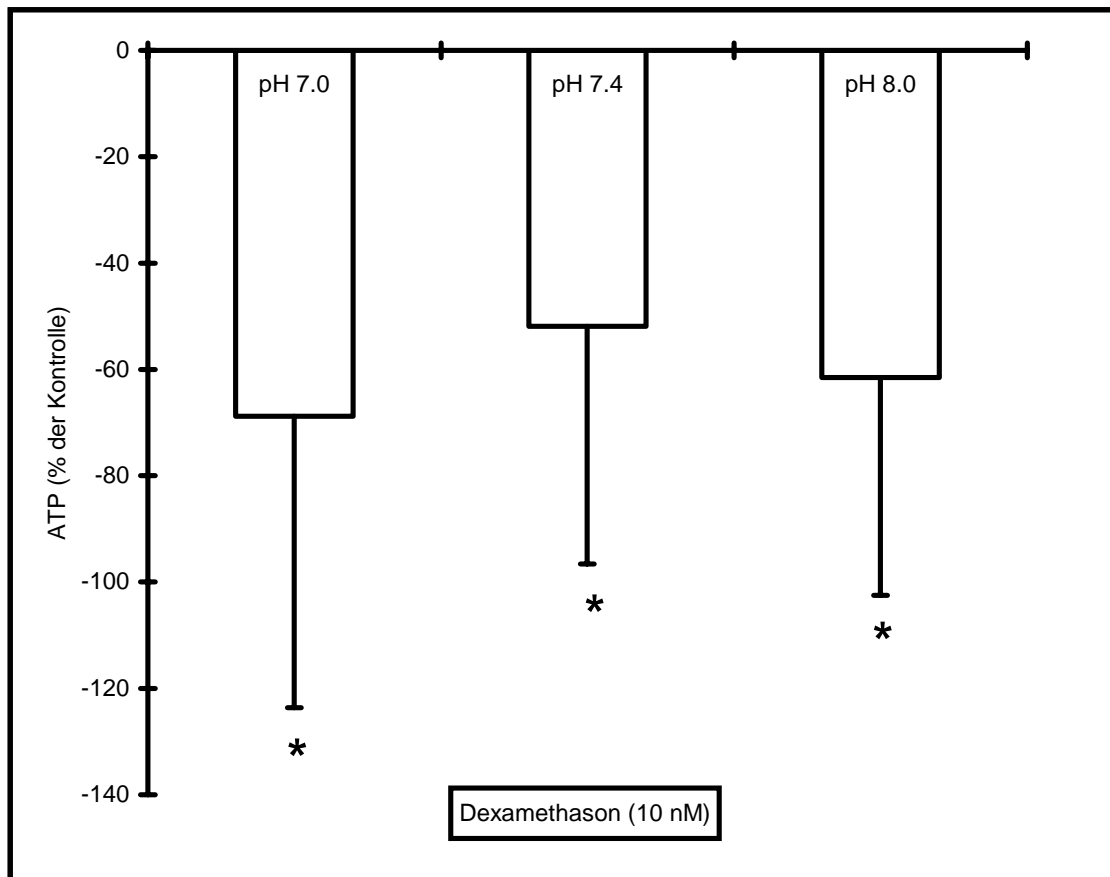


Abbildung 8b: Effekte von Dexamethason (10 nM) auf die zelluläre ATP-Konzentration hypophysärer AtT 20 Zellen bei verschiedenen pH-Werten im Vergleich zur mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle. Dexamethason wurde 0,5 h inkubiert. Signifikante Effekte gegenüber der Kontrollgruppe wurden mit einem * markiert (t-Test für gepaarte Stichproben ungleicher Varianz mit Signifikanzniveau von 5%).

3.4 Antagonisierung der Dexamethason-Effekte durch den Glukokortikoidrezeptor-Antagonisten RU38486

Bei dem Versuch Dexamethason und RU38486 wurde der Glukokortikoid-Rezeptorantagonist RU38486 in einer Konzentration von 1 μM mit Dexamethason (1 μM) zusammen für 0,5 h inkubiert.

Ohne RU38486 hatte Dexamethason eine signifikante Senkung der EZ4U-Farbstoff-Produktion bezüglich der Ethanolkontrolle um -9% (SF 3.3, $p < 0.05$) zur Folge. In Anwesenheit von RU38486 (1 μM) verstärkte sich der Dexamethason-Effekt gegenüber der Ethanol-mit-RU38486-Kontrolle auf -16% (SF 5.9, mit $p < 0.05$ signifikant). Die Verstärkung des Dexamethason-Effektes unter RU38486 im Vergleich zur Behandlung ohne RU38486 ist statistisch signifikant (Abbildung 9a).

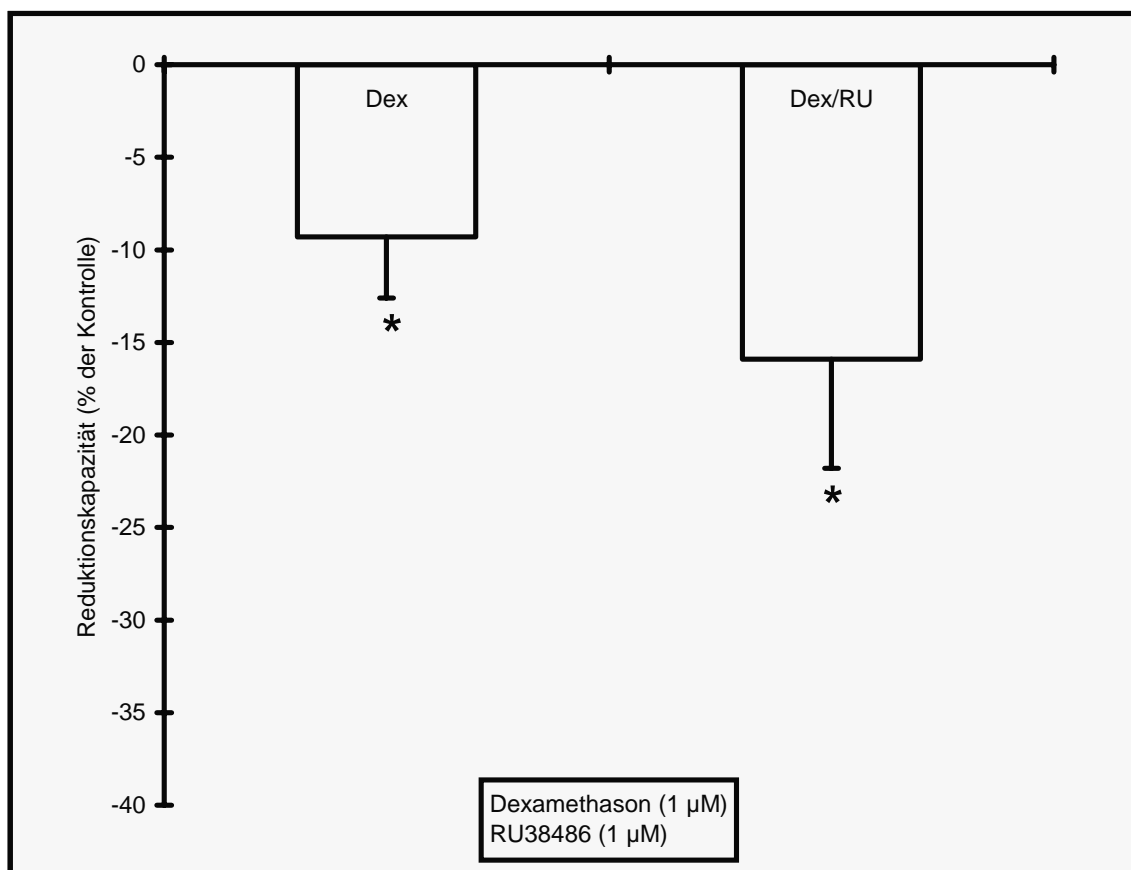


Abbildung 9a: Effekte von Dexamethason ohne und mit RU38486 auf die zelluläre Reduktionskapazität hypophysärer AtT 20 im Vergleich zur mit Lösungsmittel, bzw. mit Lösungsmittel und RU 38486 behandelten Kontrolle. Dexamethason und RU 38486 wurden gemeinsam für 0,5 h inkubiert.

Signifikante Effekte gegenüber der Kontrollgruppe wurden mit einem * markiert (t-Test für gepaarte Stichproben ungleicher Varianz mit Signifikanzniveau von 5%). Der Unterschied zwischen dem Effekt Dex und Dex mit RU38486 war ebenfalls statistisch signifikant.

Im ATP-Test lag der Effekt von Dexamethason bezüglich der Ethanolkontrolle in einer Konzentration von 1 μM bei -13% (SF 12.5). Bei gemeinsamer Applikation mit RU38486 stieg der ATP-Gehalt auf +13% (SF 5.3) gegenüber der Kontrolle mit Ethanol und RU38486. Diese Veränderung ist gegenüber dem Effekt ohne RU38486 statistisch signifikant (Abbildung 9b).

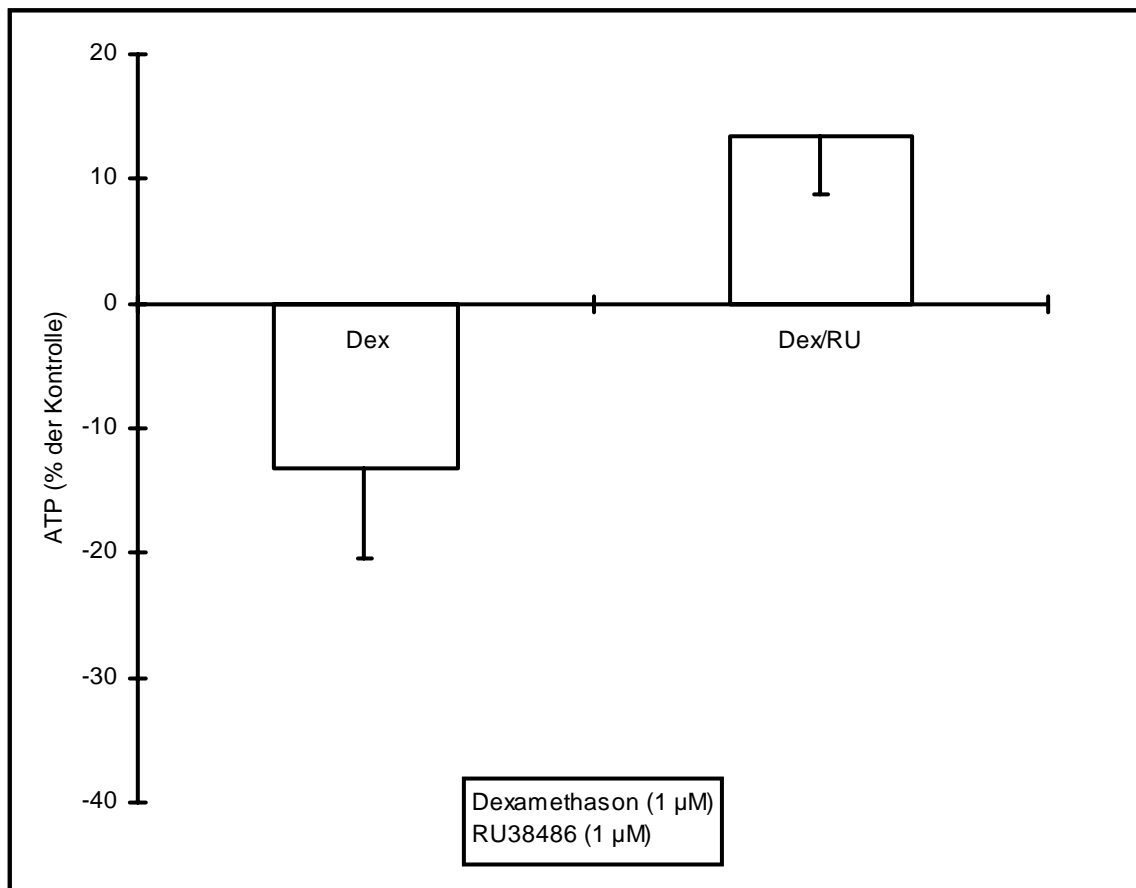


Abbildung 9b: Effekte von Dexamethason ohne und mit RU38486 auf die zelluläre ATP-Konzentration hypophysärer AtT 20 im Vergleich zur mit Lösungsmittel, bzw. mit Lösungsmittel und RU38486 behandelten Kontrolle. Dexamethason und RU38486 wurden gemeinsam für 0,5 h inkubiert. Der Unterschied zwischen dem Effekt Dex und Dex mit RU38486 war statistisch signifikant.

3.5 Dexamethason und Cycloheximid

Für den Versuch Dexamethason und Cycloheximid wurde der Hemmstoff der Proteinbiosynthese Cycloheximid in einer Konzentration von 1 μM zusammen mit dem Steroid (1 μM) 30 Min. lang inkubiert. Ohne Cycloheximid senkte Dexamethason den ATP-Gehalt gegenüber der Ethanolkontrolle signifikant um -28% (SF 11, $p < 0.05$). Zusammen mit dem Proteinsynthesehemmer betrug der Dexamethason-Effekt gegenüber der Ethanol-mit-Cycloheximid-Kontrolle nur noch statistisch signifikante -13% (SF 22.3, $p < 0.05$). Die Veränderung des Dexamethason-Effekts mit und ohne Cycloheximid ist signifikant (Abb. 10).

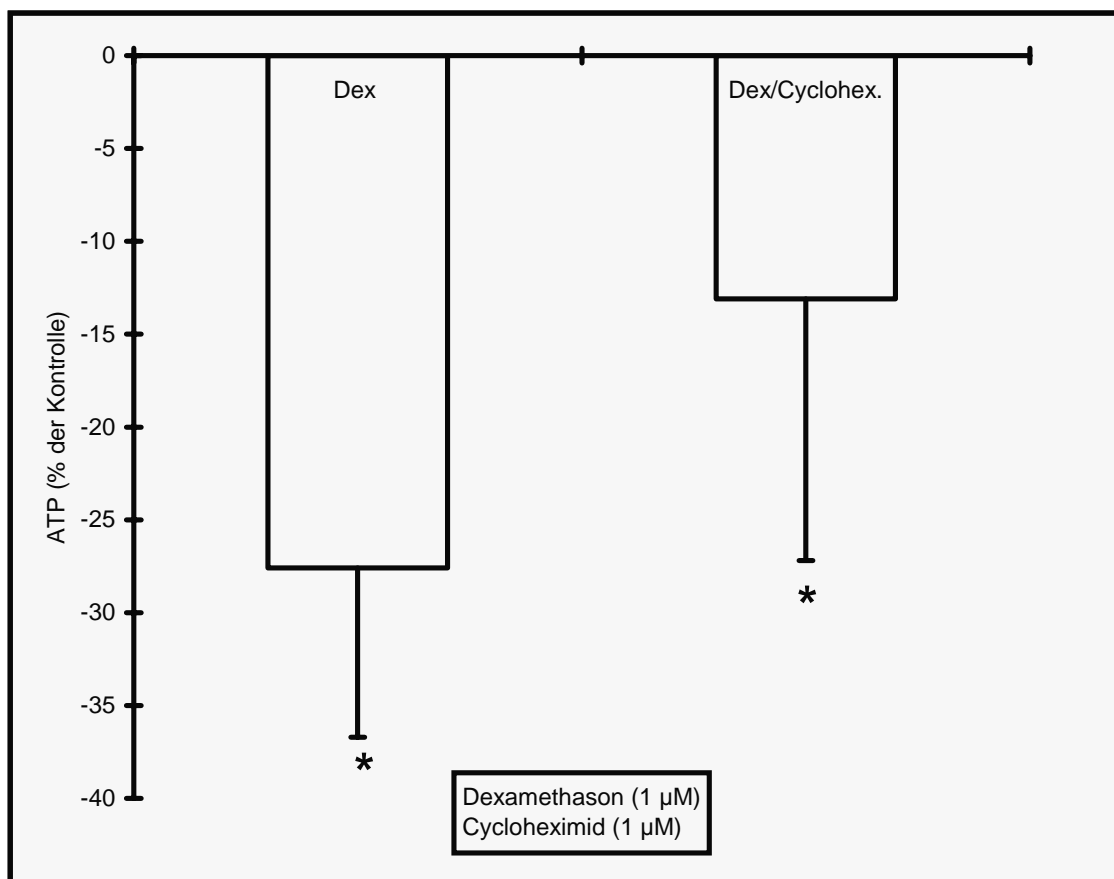


Abbildung 10: Effekte von Dexamethason ohne und mit Cycloheximid auf die zelluläre ATP-Konzentration hypophysärer AtT 20 im Vergleich zur mit Lösungsmittel, bzw. mit Lösungsmittel und Cycloheximid behandelten Kontrolle. Dexamethason und Cycloheximid wurden gemeinsam für 0,5 h inkubiert.

Signifikante Effekte gegenüber der Kontrollgruppe wurden mit einem * markiert (t-Test für gepaarte Stichproben ungleicher Varianz mit Signifikanzniveau von 5%). Der Unterschied zwischen dem Effekt Dex und Dex mit Cycloheximid war ebenfalls statistisch signifikant.

3.6 Ergebniszusammenfassung

Dexamethason stellte sich in seiner Wirkung auf die mitochondriale Reduktionskapazität und den ATP-Gehalt in AtT 20 Zellen vorwiegend als hemmende Substanz dar, die bei sehr langen (2 Tage) und sehr kurzen Inkubationszeiten (0,25 h) den stärksten supprimierenden Effekt hatte. Diese Suppression wurde bei gleichzeitiger Inkubation mit Atmungskettenhemmern deutlich reduziert.

Bei kurzer Inkubationsdauer (0,25 h) waren die mitochondriale Hemmung und die Senkung des ATP-Gehaltes vor allem in Konzentrationsbereichen vorhanden, die bezogen auf ein natürlich vorkommendes GC einem physiologischen Spiegel entsprechen. Höhere Konzentrationen, die den Konzentrationen einer hochdosierten Kortikoidtherapie entsprechen, beeinträchtigten die mitochondriale Reduktionskapazität kaum, steigerten jedoch den ATP-Gehalt.

Bei längerer Inkubationsdauer (24 h) war die Suppression der mitochondrialen Reduktionskapazität am deutlichsten in Konzentrationen ausgeprägt, die *in vivo* einer hohen therapeutischen Dosierung entsprechen. Der ATP-Gehalt wurde dahingegen vor allem von niedrigen Dexamethason- Konzentrationen gesenkt.

Eine hemmende Wirkung von Dexamethason auf die mitochondriale Reduktionskapazität bei natürlich vorkommenden GC-Konzentrationen war nur bei einem physiologischen pH-Wert von 7.4 nachweisbar. In alkalischem und saurem Milieu hatte Dexamethason nur auf den ATP-Gehalt eine supprimierende Wirkung, jedoch keinen Effekt auf die mitochondriale Reduktionskapazität.

Die durch Dexamethason (0,5 h inkubiert) hervorgerufene Hemmung der mitochondrialen Aktivität konnte durch den GC-Antagonisten RU38486 nicht aufgehoben werden. Der Proteinbiosynthesehemmer Cycloheximid konnte den hemmenden Effekt von Dexamethason auf die ATP-Konzentration vermindern, aber nicht vollständig aufheben.

4.0 Diskussion

Um die im Ergebnisteil beschriebenen Wirkmuster einzuordnen, sollen im Folgenden die festgestellten GC-Wirkungen auf neuroendokrine Zellen in Bezug auf bereits beschriebene Mechanismen diskutiert werden. Dabei soll insbesondere versucht werden, nicht-genomischen, eher schnelleren Wirkungen, langsamere, genomische Effekte gegenüberzustellen. Da die in der Literatur beschriebenen Effekte dort oft unter Aspekten einer schädigenden oder einer protektiven GC-Wirkung betrachtet werden, finden diese Aspekte ebenfalls Berücksichtigung.

Im Folgenden wird zunächst die Wertigkeit des verwendeten EZ4U-Tests diskutiert, dann werden verschiedene Aspekte der Kurzzeiteffekte, dann der Langzeiteffekte von Dexamethason behandelt. Dabei wird vor allem auf die Frage nach genomischen oder nicht-genomischen Wirkmechanismen fokussiert. Anschließend wird der Zusammenhang mit Mitochondriopathien und schließlich mögliche funktionelle Auswirkungen der Effekte auf die HHNA diskutiert.

4.1 EZ4U-Test - Parameter mitochondrialer Funktion

In dem ersten Teil dieser Arbeit wurde die Frage bearbeitet, ob der benutzte Zellvitalitätstest (EZ4U) geeignet ist, eine Hemmung der einzelnen Komplexe der Atmungskette zu erfassen. Diese Frage war im Hinblick auf die Eingrenzung eines möglichen Wirkortes von Dexamethason von Bedeutung.

Die Entwicklung des EZ4U-Tests geht auf die Entdeckung Slaters (1963) zurück, dass verschiedene Tetrazoliumsalze von Atmungskettenenzymen reduziert werden können. Mosmann entwickelte 1983 einen colorimetrischen Test, der auf dem Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid) basiert. Dieser Test erfuhr durch Denizot und Lang (1986), Tada *et al.* (1986) und Hansen *et al.* (1989) wichtige Modifikationen und wurde von der Biomedica Gruppe, Wien, zu einem verlässlichen und anwenderfreundlichen Standardverfahren (EZ4U-Test) weiterentwickelt.

Der EZ4U-Test ist wie der klassische MTT-Test nach Mosmann ein Parameter für die zelluläre Reduktionskapazität und damit letztlich für die zelluläre Vitalität. Die Bildung des Formazanfarbstoffes hängt dabei von der Aktivität der Atmungskette und damit vom zellulären Energiestoffwechsel ab. Mosmann (1983) konnte zeigen, dass mit Phorbol-Myristat-Acetat aktivierte Lymphozyten 10x mehr Farbstoff produzierten als

die nicht-aktivierten Kontrollzellen. Metabolisch inaktive Zellen wie Erythrozyten zeigten keine nennenswerte Farbstoffproduktion. Die Fähigkeit, das Tetrazoliumsalz zu reduzieren (= Reduktionskapazität) hängt also nicht nur von der Anzahl der Zellen ab und ist damit ein Parameter für Proliferation bzw. Zelltod, sondern reflektiert auch den mitochondrialen Aktivitätszustand der lebenden Zellen.

Slater berichtete bereits 1963 in einer Arbeit, dass unterschiedliche Tetrazoliumsalze von verschiedenen Enzymen der Atmungskette reduziert werden. Zur Eingrenzung des Reduktionsortes des EZ4U-Tetrazoliumsalzes wurden vor Durchführung des Tests die AtT20 Zellen mit bekannten Atmungskettenhemmern (siehe Kap. 1.1.2) behandelt. Bei der Inkubation mit den einzelnen Inhibitoren der vier Atmungsketten-Komplexe konnte in höheren Konzentrationen stets eine Senkung der mitochondrialen Reduktionskapazität im EZ4U-Test ermittelt werden. Da vor den Experimenten nicht bekannt war, ob GC mit den Inhibitoren positiv oder negativ interagieren, mussten für die Experimente Konzentrationen der Inhibitoren gewählt werden, die einerseits die Wirkungen der Substanzen nachwies, andererseits noch entsprechende Effekte der GC in beide Richtungen zuließen. In der Folge wurden Konzentrationen verwendet, die in der Nähe des Signifikanzniveaus lagen und die für Rotenon in den angewandten Konzentrationen ein statistisches Signifikanzniveau von 5% erreichten. Für die anderen Inhibitoren war für den reinen Inhibitoreffekt eine Signifikanz auf Trendniveau auf einem Niveau kleiner als 10% nachweisbar (für Kaliumcyanid $p=0.055$, für Antimycin A $p=0.08$, für Malonsäure $p=0.09$).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der EZ4U-Test Aktivitätseinschränkungen der Atmungskette im zellulären AtT20-System differenziert erfassen konnte und somit für die Untersuchungen geeignet war.

4.2 Gegenüberstellung von Kurz- und Langzeiteffekten von Dexamethason

Grundsätzlich lassen sich zelluläre Kurz- und Langzeiteffekte von Steroiden und damit auch von Dexamethason unterscheiden: Dabei werden Effekte, die innerhalb eines Zeitraumes bis zu etwa 30 Min. zu induzieren sind, als Kurzzeiteffekte bezeichnet und vermutlich über nicht-genomische Mechanismen vermittelt. Derartige Mechanismen sind derzeit erst teilweise aufgeklärt, es könnte sich hierbei um physikalische Veränderungen der Membranfluidität auf Grund der Einlagerung von Steroiden (Buttgereit *et al.*, 1993, 1994a, 1994b, Hall *et al.*, 1994, Hall, 1992), um Interaktionen mit spezifischen Rezeptoren im Bereich der Plasmamembran (Norman *et al.*, 2004)

oder um andersartige Reaktionen – zum Beispiel Effekte auf den zellulären Energiestoffwechsel auf der Ebene der Mitochondrien – handeln. Gerade letztere Wirkungen sind bisher jedoch nur ansatzweise untersucht. (Ausführliche Darstellung der bisher in der Literatur beschriebenen Wirkmechanismen siehe Kap. 1.2.3).

Der klassische Wirkungsweg der Steroide, der etwa nach einem Zeitraum von 30 Min. wirksam wird, besteht in der Regulation der Aktivität einzelner Gene (Transkriptionskontrolle). Dazu wird das Steroid mit seinem spezifischen Rezeptor in den Kern transloziert, wo der Steroid-Rezeptorkomplex regulatorische Wirkungen auf eine Vielzahl von Genen ausübt. Danach kommt es dann zu einer vermehrten oder verminderten Produktion einzelner zellulärer Proteine. Derartige Prozesse dauern länger als 30 Min. und werden aufgrund der beteiligten Mechanismen als Langzeiteffekte bezeichnet. Über derartige Stoffwechselwege könnten indirekt auch zelluläre Vorgänge des Energiestoffwechsels beeinflusst werden. Im Folgenden soll exemplarisch anhand der Wirkungen von Dexamethason auf hypophysäre AtT 20-Zellen differenziert auf die Kurz- und Langzeiteffekte von Dexamethason eingegangen werden.

Es bleibt jedoch festzuhalten, dass aufgrund der Vielzahl der durch GC angestoßenen zellulären Prozesse und deren Interaktionen eine klare Abgrenzung zwischen Kurzzeiteffekten und nicht-genomischen Wirkungen einerseits, sowie Langzeiteffekten und genomischen Wirkungen andererseits nur sehr unscharf möglich ist und die Daten somit letztlich nur Schwerpunkte der Effekte wiedergeben können.

4.3 Kurzzeiteffekte von Dexamethason auf AtT 20 Zellen

4.3.1 Dosisabhängigkeit der Dexamethason-Kurzzeiteffekte

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass Dexamethason in Konzentrationen, die einem physiologischen GC-Spiegel eines natürlich vorkommenden GC entsprechen (Kaiser und Kley, 1992; Martens *et al.*, 1991, Thomas, 2000), bei einer kurzen Inkubationsdauer von 15 Min. die mitochondriale Reduktionskapazität senkt; in wesentlich höheren Konzentrationen war dieser hemmende Effekt auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel erstaunlicherweise nicht mehr klar nachweisbar. Der ATP-Gehalt wurde hier im Gegensatz zu niedrig dosiertem Dexamethason sogar gesteigert. Die Kurzzeitwirkung (0,25 h) von Dexamethason auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel von AtT 20 Zellen ist also in hohem Maße dosisabhängig.

Insgesamt wäre mit den Daten ein Hinweis erbracht, dass GC möglicherweise einen transkriptionsunabhängigen Effekt auf die Atmungskette ausüben. Ein wichtiger Aspekt ist dabei, dass alle bisher genannten Wirkungen sich in einem Zeitrahmen von 15 Min. abspielten und sich damit wahrscheinlich nicht durch einen Wirkungsmechanismus über GC-Rezeptoren und die Proteinbiosynthese erklären lassen. Derartige genomische Effekte benötigen im Allgemeinen mindestens 30 Min., um sich zu entfalten (Kaiser und Kley, 1992).

Die gemessenen, die mitochondriale Aktivität steigernden Effekte könnten den klinisch beobachteten positiven GC-Wirkungen bei Mitochondriopathien entsprechen (siehe Kapitel 1.1.4).

4.3.2 pH-Abhängigkeit der Dexamethason-Kurzzeiteffekte

Die Versuche bezüglich der Wirkung von relativ niedrigen Konzentrationen von Dexamethason (10 nM) bei verschiedenen pH-Werten erbrachten bemerkenswerte Ergebnisse: Nur bei einem physiologischen pH-Wert senkte Dexamethason die mitochondriale Reduktionskapazität, in einem sauren oder alkalischen Milieu zeigte das GC keine Wirkungen im EZ4U-Test. Die supprimierende Wirkung auf den ATP-Gehalt blieb von Veränderungen des pH-Wertes dagegen unbeeinflusst.

Möglicherweise wurde das Substrat des EZ4U-Tests durch ein verändertes pH-Milieu beeinträchtigt, die Ergebnisse würden dann nichts über den Zustand der Enzyme der Atmungskette aussagen.

Sollte es sich bei diesen Ergebnissen nicht um ein methodisches Artefakt handeln, wäre es ein interessanter Sachverhalt, dass die einem natürlichen GC-Spiegel entsprechende Dexamethason-Konzentration nach 30 Min. Inkubation nur dann die mitochondriale Aktivität bremst, wenn normale pH-Bedingungen vorliegen. In einem zu sauren Milieu, wie es bei vielen pathologischen Gewebeeränderungen vorliegt, würde das GC also seine die mitochondriale Aktivität hemmende Wirkung verlieren.

Eine wegweisende klinische Parallele zu diesem Sachverhalt ist die Tatsache, dass viele Mitochondriopathien von einer Laktatazidose begleitet werden, GC also *in vivo* unter diesen pH-Bedingungen möglicherweise ihre supprimierenden Effekte auf den Energiestoffwechsel von Muskelzellen verlieren.

4.3.3 Antagonisierbarkeit der Dexamethason-Kurzzeiteffekte durch RU38486 und Cycloheximid

In der vorliegenden Arbeit wurde die Antagonisierbarkeit des Dexamethason-Effektes nach 30 Min. Inkubation durch den GC-Rezeptorantagonisten RU38486 untersucht. Die durch Dexamethason verursachte Suppression im EZ4U-Test wurde durch RU38486 nicht aufgehoben, sondern sogar verstärkt. Die Wirkung von RU38486 besteht in der Verdrängung von Dexamethason von klassischen nukleären, oder möglicherweise auch strukturell identischen membranergen GC-Rezeptoren (Norman *et al.*, 2004). Dies beinhaltet, dass RU38486 möglicherweise auch an membranerge Rezeptoren bindet und hier Effekte antagonisiert. Eine Interaktion zwischen RU38486 und Dexamethason am zytosolischen GC-Rezeptor könnte dazu führen, dass Dexamethason durch die Rezeptorblockade vermehrt für schnelle, vom klassischen GC-Rezeptor unabhängige, die Reduktionskapazität senkende Mechanismen, verfügbar wäre.

Der ATP-Gehalt stieg unter diesen Bedingungen nach gleichzeitiger Dexamethason- und RU38486-Behandlung an. Dieses Phänomen wäre unter Umständen durch rezeptor-unabhängige Eigenschaften von RU38486 erklärbar: RU38486 zeigte bei durch oxidativen Stress (Verabreichung von β -Amyloid, Glutamat, H_2O_2) induzierten neuronalen Zelltod einen protektiven Effekt, indem es die intrazelluläre Peroxidakkumulation verhinderte (Behl *et al.*, 1997b). Diese Rolle als Radikalfänger könnte auch der mitochondrialen Integrität bei Dexamethason-Exposition zugute kommen, bei der GC die Konzentration intrazellulärer freier Radikale erhöhen. Bei dem EZ4U-Test konnte diese Wirkung vielleicht nicht umgesetzt werden, da RU38486 seine entsprechende Funktion möglicherweise erst in Bereichen ausübte, die von dem Test nicht mehr erfasst wurden.

Der Dexamethason-Effekt wurde weiterhin in Anwesenheit eines Proteinbiosynthesehemmers untersucht. Hier ergab sich eine Reduktion, jedoch keine Aufhebung des Dexamethason-Effektes. Ein klassischer Steroidrezeptor-vermittelter Effekt auf die Genexpression würde auch in eine veränderte Proteinbiosynthese münden. Die Daten deuten darauf hin, dass zumindest Teile der induzierten Veränderungen mit der Proteinsynthese in Verbindung gebracht werden können.

4.3.4 Berichte über Kurzzeiteffekte von GC auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel

In der Literatur wurde bereits von GC-Effekten auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel berichtet.

So haben Simon *et al.* (1998) bei Versuchen mit Rattennierenzellen eine Senkung der Aktivität der Cytochrom C-Oxidase (Komplex 4) unter 1 μM GC - unter anderem mit Dexamethason - gefunden. Die Inkubationszeit betrug hier 15 Min.. Diese Befunde entsprechen den Ergebnissen im EZ4U-Test dieser Arbeit. Wir konnten nach einer Inkubation von 1 μM Dexamethason über 15 Min. eine Senkung der Reduktionskapazität um -16% feststellen. Untersuchungen mit noch höheren Konzentrationen (100 μM), die unter den bei uns verwendeten Bedingungen zu keiner signifikanten Veränderungen der mitochondrialen Reduktionskapazität führten, aber eine Steigerung des ATP-Gehaltes induzierten, wurden in der Arbeit von Simon nicht durchgeführt.

Jani *et al.* (1991) haben in einer *in vivo* Studie mit Rattenleberzellen nach 2-stündiger Inkubation mit 40 mg/kg Corticosteron eine Suppression der Atmungskettenaktivität und einen reduzierten ATP-Gehalt feststellen können. Dabei wurde keine Veränderung des ADP/O-Quotienten gefunden, was gegen einen Effekt auf die oxidative Phosphorylierung spricht. Die Autoren zogen als Erklärung eine direkte Interaktion des GC mit Komponenten der Atmungsketten in Betracht.

Die Effekte nach 2-stündiger Inkubation wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Die Versuche mit 4-stündiger Inkubation von Dexamethason (100 μM) kommen dem zitierten Versuchsaufbau am nächsten. Hier zeigte sich eine Supprimierung der Reduktionskapazität um 14%, was in Einklang mit den Ergebnissen der zitierten Studie steht und die Hypothese stützt, dass es sich bei den festgestellten Effekten möglicherweise um Wirkungen auf die Atmungskette handelt.

Schuchmann *et al.* (2004) führten *in vitro* Versuche mit einer Osteoblasten-Zelllinie durch. Sie stimulierten mit Dexamethason (0,1 μM) 5 Min. oder 24 h vorbehandelte Zellen mechanisch und maßen anschließend das mitochondriale Membranpotential und den intrazellulären Calcium-Gehalt. Die Dexamethason-Kurzzeitbehandlung führte zu einer deutlich geringer ausgeprägten Membrandepolarisation nach mechanischer Stimulation gegenüber der Kontrollgruppe, die Langzeitbehandlung zeigte dagegen keinen Effekt.

Die Arbeit von Schuchmann *et al.* (2004) differiert bezüglich des Zelltyps und der untersuchten Parameter wesentlich von den Versuchen dieser Arbeit. In den mit Schuchmanns Versuchsaufbau vergleichbaren Konzentrationen von 0,01 oder 1 μM konnte in den vorliegenden Versuchen weder nach 15 Min. noch nach 24 h-Inkubationszeit ein stimulierender Effekt auf die mitochondriale Reduktionskapazität oder die ATP-Konzentration festgestellt werden.

Martens *et al.* (1991) haben nach wenigen Minuten Inkubation mit 100 μM Methylprednisolon in einer *in vitro* Studie mit Muskel-, Herz- und Leberzellen einen hemmenden Effekt auf den Komplex 1 der Atmungskette gefunden. Für eine niedrigere Konzentration von 20 μM Methylprednisolon konnte durch ihre Studien eine direkte Inhibierung des Elektronentransfers in der Atmungskette ausgeschlossen werden.

In dieser Studie zeigt das GC ein anderes Wirkprofil als in den hier durchgeführten Untersuchungen. Von großer Bedeutung ist sicher die Tatsache, dass es sich um unterschiedliche Zelltypen handelte und auch die Inkubationszeit noch kürzer gewählt wurde als in den Experimenten dieser Arbeit. In unseren Versuchen zeigte sich bei kurzzeitiger (0,25 h) Inkubation von 100 μM Dexamethason im Gegensatz zu Martens' Daten keine signifikante Suppression, weder im EZ4U-Test noch bei der ATP-Messung. Bei Martens *et al.* zeigten 20 μM Methylprednisolon keinen Effekt auf die Atmungskette. In unseren Versuchen wurde dagegen bei kurzer Inkubationszeit (0,25 h) vor allem in den noch niedrigeren Konzentrationen (1, 0,01 μM) ein supprimierender Effekt auf die mitochondriale Reduktionskapazität gefunden, Versuche mit 20 μM Dexamethason wurden allerdings nicht durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es bisher zahlreiche Hinweise aus anderen Systemen für schnelle, nicht-genomische Wirkungen von GC auf den mitochondrialen Energiehaushalt gibt. In den Arbeiten von Simon *et al.* (1998) und Jani *et al.* (1991) zeigten sich supprimierende GC-Effekte, die mit unseren Ergebnissen in Einklang stehen. Die Arbeit von Schuchmann *et al.* (2004) zeigte protektive GC-Effekte auf, während in unseren am ehesten vergleichbaren Versuchen supprimierende Effekte gefunden wurden. Bei Martens *et al.* (1991) zeigten sich hingegen supprimierende GC-Effekte, deren Dosisbeziehung sich nicht mit den von uns ermittelten Ergebnissen deckt.

Die aus der Literatur zitierten Kurzzeiteffekte sind allerdings nur sehr begrenzt mit den von uns erarbeiteten Effekten vergleichbar, weil in Hinblick auf den verwendeten

Zelltypus, die Variablen des Versuchsaufbaus und die untersuchten Parameter wesentliche Unterschiede bestehen. Damit sind auch die scheinbar diskrepanten Ergebnisse möglicherweise zu relativieren.

Insgesamt sind die zitierten Arbeiten jedoch mit unserer Hypothese vereinbar, dass Dexamethason den mitochondrialen Energiehaushalt in AtT20-Zellen auch über einen nicht-genomischen, direkten Effekt auf die Atmungskette beeinflusst.

4.3.5 Zusammenfassung - Kurzzeiteffekte als Modell nicht-genomischer Effekte von Dexamethason auf die Atmungskette

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die beobachteten Kurzzeiteffekte dieser Arbeit mit nicht-genomischen Wirkmechanismen von Dexamethason auf die Atmungskette vereinbar sind. So konnten Wirkungen auf die mitochondriale Reduktionskapazität und den zellulären ATP-Gehalt nach 15 und 30 Min. Inkubation nachgewiesen werden, die durch RU38486 und Cycloheximid nicht antagonisierbar waren. Als Wirkmechanismus ist sowohl ein unmittelbarer Effekt von Dexamethason auf Strukturen der mitochondrialen Atmungskette denkbar, als auch eine Wirkung über einen plasmamembranständigen, nicht RU38486-bindenden Rezeptor mit anschließender Aktivierung eines schnellen Transduktionsweges und Modulierung des mitochondrialen Energiestoffwechsels.

Die Ergebnisse stehen in Einklang mit den Wirkungen von GC, von denen im Zusammenhang mit Mitochondriopathien berichtet wurde.

Zudem wird auch in anderen zellbiologischen Experimenten, die in Kapitel 4.3.4 zitiert sind, von nicht-genomischen GC-Effekten berichtet, wobei der Versuchsaufbau in den entsprechenden Arbeiten jeweils nur punktuell (in Hinblick auf die untersuchte Substanz, ihre Konzentration, die Inkubationszeit, den Zelltypus, die verwendeten Methoden) unserem Versuchsaufbau entspricht. Damit sind die Ergebnisse aus den zitierten Studien mit unseren Resultaten auch nur eingeschränkt vergleichbar.

4.4 Langzeiteffekte von Dexamethason auf AtT 20 Zellen

4.4.1 Dexamethason hat eine supprimierende Langzeitwirkung auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel

Bei langer Inkubationsdauer (47 h, 24 h) hatte Dexamethason auf die mitochondriale Reduktionskapazität einen supprimierenden Effekt, der bei steigender Dexamethason-Konzentration an Ausprägung zunahm. Der ATP-Gehalt wurde dagegen nur in niedrigen Konzentrationen signifikant gesenkt, in höheren Dexamethason-Konzentrationen blieb der ATP-Gehalt überraschenderweise praktisch unbeeinflusst. Möglicherweise wurde eine eher erwartete supprimierte ATP-Bildung durch zelluläre Regulationsvorgänge wieder ausgeglichen. Eine weitere, sensiblere Methode zur Aufdeckung einer mitochondrialen Dysfunktion wäre vermutlich die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials oder des P/O-Quotienten gewesen. Der P/O-Quotient gibt die Anzahl der ATP-Moleküle an, die pro Sauerstoff-Atom synthetisiert werden. Er wird bestimmt durch die Pumpleistung der Atmungskette insgesamt und die Anzahl der rückfließenden Protonen, die zur Bildung von 1 Molekül ATP gebraucht werden. Damit ist der P/O-Quotient ein Maß für die Effizienz, mit der die Phosphorylierung und Sauerstoffverbrauch aneinander gekoppelt sind und kann eine mitochondriale Dysfunktion mit supprimierter ATP-Bildung sensibler aufdecken, als die Bestimmung der ATP-Konzentration, die durch Regulationsvorgänge noch konstant gehalten werden kann (Duchen, 2004; Merlo-Pich *et al.*, 2003; Marcinek *et al.*, 2004; Karlson *et al.*, 1994).

4.4.2 Berichte über supprimierende GC-Langzeiteffekte

Behl *et al.* (1997a) beobachteten bei hippocampalen Neuronen unter oxidativen Stressoren eine weitere Beeinträchtigung der Zellvitalität durch Corticosteron und Dexamethason (24 h). Diese gesteigerte Stresssensitivität konnte durch RU38486 antagonisiert werden, was für einen über den klassischen GC-Rezeptor-vermittelten Effekt spricht. Die Autoren gaben aber selber zu bedenken, dass ein so einschneidender Effekt, wie sie ihn beobachtet hatten, auch an einen Energieentleerungsprozess denken lässt (Sapolsky, 1990a; Lawrence und Sapolsky, 1994; Masters *et al.*, 1989; Horner *et al.*, 1990).

Eine nähere Spezifizierung eines über GC-Rezeptoren vermittelten genomischen GC-Effektes erfolgte durch Garvey (Garvey *et al.*, 1989). Er zeigte in Adipozyten-Primärkulturen eine durch GC beeinträchtigte Expression von Glucosetransportergenen. Dieser Mechanismus wurde auch mit dem supprimierenden Effekt von GC auf den ATP-Gehalt hippocampaler Neuronen unter Aglykämie in Zusammenhang gebracht, der von Lawrence und Sapolsky (1994) beobachtet wurde.

Es konnten also bereits in anderen Studien Hinweise auf Effekte von GC auf den zellulären Energiestoffwechsel erbracht werden, die jedoch von den Autoren vorwiegend als Steroidrezeptor-vermittelt eingeordnet wurden. In diesem Sinne könnten auch die supprimierenden Dexamethason-Langzeiteffekte auf die mitochondriale Reduktionskapazität und auf die ATP-Konzentration, die in dieser Arbeit gemessen wurden, gedeutet werden. Eine nähere Beschreibung und Diskussion des Dexamethason-Langzeiteffektes durch zusätzliche Inkubation der Zellen mit Atmungskettenhemmern erfolgt in den nächsten Kapiteln.

4.4.3 Der supprimierende Dexamethason-Langzeiteffekt wird durch Atmungskettenhemmer vermindert

Ein Ergebnis dieser Arbeit ist die Beobachtung, dass Dexamethason, wenn es zusammen mit einem Atmungskettenhemmer inkubiert wird, einen signifikant (bei Rotenon fast signifikant mit einem $p=0.07$) geringeren hemmenden Effekt auf die mitochondriale Reduktionskapazität hat als nach alleiniger Verabreichung. Der Grund für dieses Ergebnis könnte sein, dass die Effekte der Atmungskettenhemmer und des Dexamethasons (oder eines bisher nicht beschriebenen "second-messengers") über die gleichen oder sehr ähnliche Wirkungsmechanismen vermittelt werden.

4.4.4 Berichte über Effekte von Atmungskettenhemmern auf die Wirkung von GC

Stefanelli *et al.* (1997) haben die Apoptoseinduktion durch Dexamethason in Thymozyten untersucht und fanden, dass der schädigende Dexamethason-Effekt durch Atmungskettenentkoppler und ATP-Synthesehemmer verzögert oder blockiert wurde. Das Ausbleiben der Dexamethason-Wirkung wurde auf eine Entleerung der ATP-Speicher zurückgeführt.

Gemäß der hier formulierten Hypothese, dass GC einen nicht-genomischen, unmittelbaren Effekt auf die Atmungskette ausüben könnten, liegt der Verdacht nahe,

dass der ATP-Verlust auch durch Dexamethason selbst hervorgerufen worden sein könnte. In meinen Versuchen mit Atmungskettenhemmern und Dexamethason wurde kein ATP-Gehalt bestimmt. In nachfolgenden Experimenten wurde jedoch der Effekt von Dexamethason auf den ATP-Gehalt in gleicher Konzentration (100 μM) und bei gleicher Inkubationszeit (24 h) getestet. Hier ergab sich kein nachweisbarer Effekt auf den ATP-Gehalt (aber möglicherweise auf die ATP-Bildung, siehe Kap. 4.4.1). Der ATP-Verlust in dem von Stefanelli geschilderten Fall ist demzufolge eher nicht durch eine direkte Dexamethason-Wirkung hervorgerufen worden, sondern nur durch den Atmungskettenentkoppler bzw. ATP-Synthesehemmer bedingt. Dies wurde auch von Stefanelli selbst postuliert. Möglicherweise sind auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten verminderte ATP-Spiegel durch Atmungsketteninhibitoren eine Ursache für die abgeschwächte Dexamethason-Wirkung. Ein Mangel an energiereichen Substraten würde eine genomische Dexamethason-Wirkung nach 24 h Inkubation eventuell so beeinträchtigen können, dass eine verminderte Reduktionskapazität resultiert, wie sie in den Versuchen mit Dexamethason und Atmungskettenhemmern beobachtet wurde. Aus diesem Grunde ist für diesen Effekt als Mechanismus eine klassische genomische Steroidrezeptorwirkung denkbar.

In Kontrast zu diesem Erklärungsansatz steht die Arbeit von Tonomura *et al.* (2003): hier wurde die Apoptose-Induktion von Dexamethason auf Thymozyten untersucht. Nach 10 - 16 h Dexamethason-Exposition konnten mitochondrial vermittelte Ereignisse nachgewiesen werden, die bekanntermaßen mit einem Zelltod vergesellschaftet sind: der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, Cytochrom-C-Ausfluss ins Cytoplasma und eine Caspase-3-Aktivierung (Teil einer Proteasen-Aktivierungskaskade auf der Apoptose-Endstrecke) (Green und Reed, 1998; Susin *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1997). Außerdem konnte eine gesteigerte Synthese von Wasserstoffperoxid festgestellt und dabei als Produktionsort die Atmungskette identifiziert werden. Bei zusätzlicher Behandlung der Dexamethason-exponierten Zellen mit Atmungskettenhemmern (Rotenon und Antimycin A) konnte der intrazelluläre Wasserstoffperoxidgehalt und die Apoptoserate signifikant gesenkt werden.

Diese Ergebnisse, welche einen nicht-genomischen Dexamethason-Effekt auf die Atmungskette nahe legen, scheinen die anfangs erwähnte Hypothese zu bestätigen, dass die durch Atmungskettenhemmer beeinträchtigte Dexamethason-Wirkung in den

Experimenten dieser Arbeit auf das Konkurrieren um die gleichen Wirkmechanismen oder Bindungsstellen von Dexamethason (oder eines bisher nicht beschriebenen "second-messengers") an der Atmungskette zurückführen sein könnte.

Eine mit den Ergebnissen von Stefanelli *et al.* (1997) und Tonomura *et al.* (2003) schwer vereinbare Studie legten Pastorino *et al.* (1995) vor. Sie fanden bei der Wirkung von Atmungsketteninhibitoren auf Hepatozyten einen protektiven Effekt durch 1 μ M Dexamethason nach einer Vorinkubation von 6 - 18 h. Der durch die Atmungskettenhemmer hervorgerufene zelluläre ATP-Verlust und der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials blieben unbeeinflusst. Weiter wurde berichtet, dass unter einem Atmungskettenhemmer (Cyanid) die Arachidonsäurefreisetzung, d.h. letztendlich die Degradation von Plasmamembranphospholipiden durch Dexamethason, verhindert wurde. Der GC-Effekt war durch RU38486 und Cycloheximid antagonisierbar. Deshalb und weil bei kurzfristiger, simultaner Dexamethasongabe kein protektiver Effekt zu verzeichnen war, gingen die Autoren von einer genomischen Wirkung des GC aus. In der gleichen Arbeit zeigte Dexamethason allein verabreicht nach 2, 4 oder 6 h keinen Effekt. Dies wurde in einem Zellvitalitätstest gemessen, bei dem der Gehalt an Laktatdehydrogenase bestimmt wurde.

Diese Beobachtungen können mit den Ergebnissen unserer Arbeit kaum vereinbart werden. Es zeigten sich in unseren Versuchen jedenfalls keine protektiven Dexamethasoneffekte bei durch Atmungskettenhemmern geschädigten Zellen.

Allerdings lassen schon die unterschiedlich gewählten Konzentrationen und Inkubationszeiten nur sehr begrenzt Vergleiche zu. Darüber hinaus bestehen im mitochondrialen Energiestoffwechsel zwischen Hepatozyten und HVL-Zellen wie AtT 20 bezüglich der Reaktionen auf GC vermutlich große Unterschiede.

4.4.5 Berichte über Langzeiteffekte von GC auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel

Zunächst wird in zwei Arbeiten von GC-Langzeiteffekten auf den ATP-Gehalt berichtet:

Svec (1985) fand in Versuchen mit AtT 20 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Dexamethason (0,01 μ M) eine Steigerung des ATP-Gehaltes und eine Senkung der Anzahl der GC-Rezeptoren. Der Autor untersuchte des Weiteren die GC-

Rezeptorbindungskapazität und den ATP-Gehalt nach Behandlung mit verschiedenen Noxen und stellte dabei fest, dass der intrazelluläre ATP-Gehalt nicht mit der GC-Rezeptorkapazität korrelierte. In unserer Arbeit fand sich dagegen bei gleicher Dexamethason-Konzentration, aber 24 h Inkubation eine Suppression des ATP-Gehaltes. Unsere Befunde decken sich eher mit der Arbeit von Jani *et al.* (1991). Hier wurden Ratten 40 mg/kg Körpergewicht Corticosteron injiziert. Nach 3 Tagen wurde in den Leberzellmitochondrien ein verminderter ATP-Gehalt festgestellt, wobei der ADP/O-Quotient erniedrigt war, was für einen Effekt auf die oxidative Phosphorylierung spricht.

Im Weiteren konnten andere Arbeitsgruppen glukokortikoiderge Effekte auf mitochondriale Membranen zeigen:

Motoyama *et al.* (2003) konnten protektive Effekte von Methylprednisolon (2h Vorbehandlung) auf die mitochondriale Funktion von *in vivo* Rattenlebermitochondrien nach hypoxischer Schädigung nachweisen. Hierbei konnte ein Schutz gegen die Depolarisation mitochondrialer Membranen aufgezeigt werden. Effekte auf die Bildung von Wasserstoffperoxid und damit Hinweise für eine Funktion des GC als Radikalfänger zeigten sich nicht.

In einem ähnlichen Ansatz wurden auch sinusoidale Epithelzellen der Leber untersucht. Hier fanden sich keinerlei Effekte von Methylprednisolon auf mitochondriale Funktionsparameter.

Andere Arbeitsgruppen fanden dagegen supprimierende Effekte auf das mitochondriale Membranpotential.

Roussel *et al.* (2003) konnten bei Ratten nach 5-tägiger Dexamethason-Injektion in Lebermitochondrien ein gesteigertes Protonenleck nachweisen. Auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel von Muskelzellen zeigte Dexamethason jedoch keinen Effekt.

Tonomura *et al.* (2003) zeigten in Versuchen mit Mäuse-Thymozyten, dass es ca. 10-16 h nach Dexamethason-Injektion zu einem intrazellulären Anstieg von Wasserstoffperoxid sowie einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und einem Cytochrom c-Ausstrom ins Cytoplasma kam.

Untersuchungen zur Integrität der mitochondrialen Membranen wurden im Rahmen unserer Arbeit nicht durchgeführt.

Die folgenden Autoren berichten von anderweitigen Langzeiteffekten von GC auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel:

Renner *et al.* (2002) konnten in lymphozytären Zellen eine Reduktion von Atmungskettenenzymaktivität durch Dexamethason darstellen.

Bailly-Maitre *et al.* (2002) untersuchten den Langzeiteffekt von Dexamethason (1-9 Tage Inkubation, Konzentrationen zwischen 0,01 und 50 μM) auf Primärkulturen humaner und Rattenhepatozyten in Hinblick auf Apoptosemaker und die Zellvitalität. Dexamethason zeigte vor allem in hohen Konzentrationen und nach langer Inkubation signifikante protektive Effekte. Die spontane Apoptose wurde verzögert, wobei die Expression antiapoptotischer Proteine gesteigert und proapoptotischer Proteine gesenkt wurde. Gleichzeitig konnte eine Modulation Mitochondrien-abhängiger Stoffwechselwege aufgezeigt werden (Inhibierung des Cytochrom C-Ausstromes, Hemmung des Caspase-Stoffwechsels).

Bei langfristiger Inkubation (47 h, 24 h) konnten in unserer Arbeit, im Gegensatz zu Svec (1985), Motoyama *et al.* (2003) und Bailly-Maitre *et al.* (2002), aber in Einklang mit den anderen Autoren, supprimierende Effekte auf die mitochondriale Reduktionskapazität und teilweise auf den ATP-Gehalt gefunden werden. Ein induzierender Effekt auf AtT20 Zellen bezüglich des ATP-Gehaltes konnte von uns nur in einer Dexamethason-Konzentration von 100 μM und nur bei einer sehr kurzen Inkubationszeit von 15 Min. festgestellt werden.

Es konnten in dieser Arbeit zwar auch nach langzeitiger Dexamethason-Inkubation Effekte auf den mitochondrialen Energiehaushalt nachgewiesen werden, eingehendere Untersuchungen zur Charakterisierung dieser Effekte, z.B. bezüglich der Antagonisierbarkeit durch GC-Rezeptorantagonisten, wurden hier jedoch nicht durchgeführt. Langzeiteffekte von GC, die über eine genomische Wirkungen auf die mitochondriale Atmungskette vermittelt werden, scheinen vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse möglich, wurden im Rahmen dieser Arbeit aber nicht weiter untersucht.

4.4.6 Zusammenfassung – Werden Langzeiteffekte von Dexamethason über Wirkungen auf die Proteinbiosynthese vermittelt ?

Das Effektprofil nach Langzeitinkubation von Dexamethason, insbesondere in Hinblick auf den modulierenden Effekt von Atmungskettenhemmern, spricht derzeit nicht klar für einen Mechanismus, der über klassische GC-Rezeptoren und schließlich die Proteinbiosynthese oder andererseits über nicht-genomische Effekte auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel vermittelt wird. So wäre weiterhin eine unmittelbare Bindung des GC an Komponenten der Atmungskette denkbar oder ein Effekt über plasmamembranständige Rezeptoren und die Aktivierung eines schnellen “second-messengers“ mit zusätzlicher Modulation der Atmungskettenaktivität auch unter Bedingungen der Langzeitinkubation möglich.

In Anbetracht der aktuellen Datenlage sind mit Bezug auf die Langzeitinkubation beide Effektormechanismen denkbar. In den zitierten Studien wurden GC-Langzeiteffekte auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel teilweise als genomisch, teilweise als nicht-genomisch eingeordnet. Eine genauere Klassifizierung der in dieser Arbeit festgestellten Langzeiteffekte ist nicht möglich.

4.5 Weitere Aspekte der Dexamethason-Wirkungen

4.5.1 Glutamat - Ein Mediator für Dexamethason-Effekte in AtT 20 Zellen?

Die Wirkung von GC im Zusammenhang mit der durch Glutamat vermittelten Neurotoxizität hat zunehmend Beachtung gefunden. Die in den hier durchgeführten Untersuchungen verwendeten Hypophysenvorderlappenzellen AtT 20 besitzen verschiedene Glutamatrezeptoren (Bhat *et al.*, 1995; Kiyama *et al.*, 1993). Glutamat ist in entsprechenden Konzentrationen im Zellmedium vorhanden, so dass derartige Effekte in den hier verwendetem Modell möglich sind.

Glutamat ist eine exzitatorische Aminosäure, die über spezifische Rezeptoren - wichtigster Vertreter ist der NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat-)Rezeptor - einen intrazellulären Calcium-Anstieg induziert. Calcium löst eine Kaskade von zellulären Reaktionen aus, die u.a. dazu führen, dass die Atmungsaktivität der Mitochondrien sinkt (Sun und Gilboe, 1994) und vermehrt freie Radikale produziert werden.

Die Tatsache, dass GC-Wirkungen mit Glutamat-vermittelter Neurodegeneration in Zusammenhang gebracht wurde, basiert auf Experimenten, in denen eine Reduktion

GC-induzierter Schädigung durch Glutamatantagonisten gezeigt werden konnte (Watanabe *et al.*, 1992a, 1992b; Armanini *et al.*, 1990).

Es bleibt noch ungeklärt, ob GC die Glutamatfreisetzung steigern (Moghaddam *et al.*, 1994), die Glutamataufnahme senken (Virgin *et al.*, 1991), oder ob über eine Senkung der Glucoseutilisation in der Nervenzelle Transportmoleküle für exzitatorische Aminosäuren in ihrer Funktion beeinträchtigt werden, und es dadurch zu einer extrazellulären Anreicherung von Glutamat kommt (Reagan und McEwen, 1997).

Die in dieser Arbeit gefundenen Effekte nach kurzer Inkubationszeit könnten über einen Wirkmechanismus wie den der Glutamatoxizität vermittelt worden sein. Die mitochondrialen Veränderungen wie das verminderte Reduktionsvermögen und ein niedrigerer ATP-Gehalt wären mit den durch erhöhtes Calcium induzierten Beeinträchtigungen vereinbar. Auch Glutamat verursacht eine Minderung der Atmungsaktivität.

In Zusammenhang mit Glutamat wurden von verschiedenen Autoren auch protektive Effekte von Glukokortikoiden beschrieben. Es handelt sich dabei sowohl um *in vivo* (Barks *et al.*, 1991; Liu und McAdoo, 1993) als auch um *in vitro* (Flavin, 1996; Klegeris *et al.*, 1997; Piani und Fontana, 1994) Experimente, die gemeinsam haben, dass die Zellen einer Noxe ausgesetzt waren.

Diese gegensinnigen Effekte von GC, die in der Literatur bezüglich der Glutamatoxizität beschrieben wurden, sind für diese Arbeit insofern interessant, als für kurze Inkubationszeiten konzentrationsabhängig ebenfalls gegensinnige Effekte gefunden wurden.

Es bleibt somit lediglich festzustellen, dass an einem Teil der in dieser Arbeit gefundenen Effekte möglicherweise Glutamatwirkungen beteiligt waren.

4.5.2 Unspezifische Effekte auf zelluläre Membranen - Kein Modell für Dexamethason-Effekte auf AtT 20 Zellen

Zahlreiche Arbeiten berichten von unspezifischen Membranveränderungen, die vermutlich durch Einlagerung der Steroide in Zell- und Organellenmembranen zu erklären sind und mit Änderungen der physikochemischen Eigenschaften (Buttgereit *et al.*, 1993, 1994a, 1994b; Hall *et al.*, 1994; Hall, 1992), des lokalen Ionentransportes (Bangham *et al.*, 1965; Cronstein *et al.*, 1992; Sessa und Weissmann, 1968) und der Membranlipide (Hall, 1992) einhergehen. Diese Wirkungen manifestieren sich nach wenigen Minuten und halten nur für einen kurzen Zeitraum an.

Die hier nach kurzer Inkubationszeit festgestellte Dexamethason-Suppression der mitochondrialen Reduktionskapazität, die nicht durch RU38486 und Cycloheximid antagonisierbar war, scheint zunächst durch einen Membraneffekt erklärbar. Vor allem bei Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften würde man jedoch eine Dosis-Wirkungs-Beziehung vermuten, bei der mit einer höheren Dosis auch ein größerer zellulärer Effekt verbunden ist. Bei einer Inkubationszeit von 15 Min. wurde hier jedoch ein umgekehrtes Verhältnis gefunden, was das Konzept einer direkten Membranwirkung eher unwahrscheinlich macht.

Als weitere Wirkmechanismen von GC wurden ebenfalls Effekte auf den Glucosetransport postuliert. GC scheinen unter Ischämie-ähnlichen Bedingungen (Glucose-, Sauerstoffmangel) den Glucosetransport in die Zellen zu hemmen. Daraufhin sank der ATP-Gehalt und die Zellvitalität (Tombaugh und Sapolsky, 1992). Sinkende ATP-Spiegel unter GC bei Aglykämie oder Cyanid-Applikation wurden auch mit einem eingeschränkten Glucosetransport in Zusammenhang gebracht (Lawrence und Sapolsky, 1994). Ein in Betracht gezogener Mechanismus besteht aus der Invagination der Transporter beinhaltenden Membranoberflächen (Horner *et al.*, 1987). Beide Berichte beziehen sich auf eindeutig funktionell beeinträchtigte Zellen. Bei nicht vorgeschädigten Zellen konnten diese Beobachtungen nicht gemacht werden. Dies steht im Gegensatz zu den hier erarbeiteten Ergebnissen. Damit dürften die beschriebenen Mechanismen kein Erklärungsmodell für die in dieser Arbeit festgestellten Effekte darstellen.

4.5.3 Die Glutathionperoxidase - Kein Modell für Dexamethason-Effekte auf AtT 20 Zellen

Ein weiterer beschriebener GC-Wirkmechanismus ist die Reduktion des Gehaltes an Glutathionperoxidase im Rattenhippocampus (McIntosh *et al.*, 1995). Die Glutathionperoxidase stellt ein eher neuroprotektiv wirkendes Enzym dar, welches u. a. den Abbau von zellschädigenden Lipidperoxydradikalen katalysiert. Eine Hemmung der Glutathionperoxidase könnte mit der aktivitätsbeeinträchtigenden Wirkung von Dexamethason auf die Mitochondrien von AtT 20 Zellen in Zusammenhang stehen. Schwer vereinbar mit diesem Konzept ist jedoch das Phänomen der abgeschwächten Suppression nach einer Dexamethason-Inkubation über 24 h unter Atmungskettenhemmern. Warum sollte ein letztendlich gesteigerter Gehalt an freien Radikalen die Funktion der Atmungskette weniger hemmen, wenn noch ein Hemmer

der Atmungskette anwesend ist? Auch das Muster der teilweise stimulierenden, teilweise supprimierenden Effekte bei kurzer Dexamethason-Inkubation in dieser Arbeit lassen sich durch das Konzept einer Glutathionperoxidasehemmung nicht erklären.

4.6 GC und Mitochondriopathien

Wie im Kapitel 1.1.4 bereits dargestellt, wurden GC vereinzelt erfolgreich zur Behandlung von Mitochondriopathien eingesetzt.

Die in dieser Arbeit gezeigten Kurzzeiteffekte von Dexamethason, die in hohen Konzentrationen die mitochondriale Aktivität steigerten, könnten den klinisch beobachteten kurativen GC-Wirkungen bei Mitochondriopathien entsprechen.

Andererseits wurde von zwei Patienten berichtet (Mitsui *et al.*, 2002), die nach langfristiger Corticosteroidtherapie klinische, histochemische und biochemische Befunde einer Mitochondriopathie, und zwar einer CPEO, zeigten.

Wenn diese Beobachtungen auch im Widerspruch zu einander zu stehen scheinen, so weisen sie doch beide in die gleiche Richtung. Ein nicht-genomischer Effekt von GC auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel mag unter unterschiedlichen Umständen sehr verschieden charakterisiert sein, ist offenbar aber grundsätzlich vorhanden. Wie in den Kapiteln 4.3.4 und 4.4.5 ausführlich dargestellt, gibt es zu dieser Hypothese zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten, die abhängig von den Versuchsvariablen (untersuchter Zelltyp, GC, Inkubationszeit, GC-Konzentration, um nur einige Parameter zu nennen) bezüglich des Effektes von GC auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel auch zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen kamen.

4.7 Effekte auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Dexamethason Kurzzeiteffekte auf AtT 20 Hypophysenvorderlappenzellen ausübt, die nicht hinlänglich über einen genomischen GC-Rezeptormechanismus erklärt werden können. Sie sind teilweise vereinbar mit der Annahme, dass GC über Glutamat-assoziierte Mechanismen wirken.

Die Daten dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass Dexamethason einen Effekt auf die Atmungskettenaktivität hat, der möglicherweise durch eine direkte Bindung an Strukturen der mitochondrialen Atmungskette oder auch durch eine Bindung an mögliche membranständige, bisher nicht näher identifizierte Rezeptoren, die über einen

schnellen "second-messenger" die Funktion der Atmungskettenenzyme modulieren, vermittelt wird.

Eine funktionelle Beeinflussung von Hypophysenvorderlappenzellen durch GC spielt in Hinblick auf ihre regulatorischen Funktionen der HHNA-Aktivität eine bedeutende Rolle.

Es zeigten sich nach kurzzeitiger Applikation von physiologischen Spiegeln entsprechenden Konzentrationen und bei langzeitiger Applikation in allen untersuchten Konzentrationen hemmende Wirkungen auf Atmungskettenparameter.

Ein Aspekt der supprimierenden GC-Wirkung ist die Überlegung, dass die in eher niedrigen Konzentrationen gemessenen, schnell einsetzenden - möglicherweise auch die Effekte nach längerer Inkubationszeit - mitochondrialen Aktivitätsminderungen nicht unbedingt als irreversibel angesehen werden müssen. Der Sinn eines Stresshormons könnte auch sein, Zellfunktionen nur vorübergehend zu dämpfen, ohne einen zellulären Schaden hervorzurufen.

Plausibler ist jedoch die Annahme, dass die im EZ4U-Test erfasste mitochondriale Aktivitätsminderung einer funktionellen Beeinträchtigung entspricht, die über ein Energiedefizit, welches möglicherweise als veränderter ATP-Gehalt in dieser Arbeit gemessen wurde, im weiteren Verlauf zu einer erniedrigten Transkriptionsleistung führt. Diese könnte z.B. durch eine verminderte Expression von GC-Rezeptoren eine Beeinträchtigung der negativen Rückkopplung zur Folge haben. Letztendlich könnte dieser Mechanismus zu einem erhöhten GC-Basalspiegel führen, der auch neuronale und neuroendokrine Zellen schädigen könnte. Der Verlust von GC-Rezeptoren exprimierenden Neuronen durch GC-Exposition und ein konsekutiv erhöhter Basalwert von GC im Hippocampus wurde bereits von Smith (1996) beschrieben.

Die stimulierenden Effekte von Dexamethason auf den mitochondrialen Energiehaushalt der Hypophysenzellen in hoher Konzentration und nach kurzer Inkubation könnten in der HHNA eine bei akuter Aktivierung des Stresssystems sinnvolle Bahnung sein.

Die Hypothese, dass dagegen chronische Stressereignisse mit einer erhöhten Cortisolexposition die HHNA stören, und diese Dysregulation wiederum zu einem langfristig erhöhten Cortisol-Spiegel führt, der andere weitreichende ungünstige Veränderungen auslöst, ist mit vielen klinischen Beobachtungen bei neuropsychiatrischen Störungen ebenfalls gut vereinbar.

Depressionen werden häufig durch belastende Lebensereignisse ausgelöst (Berger *et al.*, 1999) und bei der Hälfte aller Depressiven können eine gestörte HHNA-Aktivität und erhöhte Cortisol-Spiegel nachgewiesen werden (Holsboer, 1983; Arana *et al.*, 1985).

Auch in Hinblick auf altersbezogene mentale Defizite sind ähnliche Mechanismen erkennbar: so konnte einerseits eine Assoziation zwischen einer Dysregulation der HHNA, erhöhten Cortisol-Spiegeln und einer Verschlechterung kognitiver Leistungen bei Älteren aufgezeigt werden (Lupien *et al.*, 1994). Andererseits gilt der Zusammenhang zwischen Stress, erhöhten Cortisol-Spiegeln und Gedächtnisverlust als unbestritten (Sauro *et al.*, 2003). Möglicherweise ist auch hier ein erhöhter Cortisol-Spiegel sowohl eine Ursache als auch eine Folge der komplexen neuroendokrinen Störungen.

5.0 Zusammenfassung und Ausblick

Glukokortikoide (GC) sind Hormone mit vielfältigen Wirkungen auf den menschlichen Organismus. Die Summe ihrer Einzeleffekte bewirkt eine Adaptation und verhindert gleichzeitig eine Überreaktion auf Stress. Ihre Regulation erfolgt über den Rückkopplungsmechanismus der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHNA).

Zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten zeigen, dass die Wirkungen von GC äußerst variabel, ja teilweise gegensätzlich sind. Ihre Effekte hängen von zahlreichen Faktoren ab. Inkubationszeit, Konzentration und Zelltyp sind nur einige der vielen Variablen, die auf ihre Wirkungen Einfluss haben. Ein großer Teil der glukokortikoidergen Wirkungen wird über intrazelluläre Rezeptoren und die Proteinbiosynthese vermittelt. Es wurden jedoch auch andere Wirkmechanismen beschrieben. Dabei sind Effekte, die mit der Atmungskette in Zusammenhang gebracht wurden, aufgrund der zentralen Rolle des Energiestoffwechsels für sämtliche zellulären Funktionen einschließlich des zellulären Überlebens von erheblicher Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde daher insbesondere auf Kurzeffekte des Glukokortikoids Dexamethason auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel fokussiert: Dabei wurden adrenokortikotrophe Hypophysenvorderlappenzellen der Maus (AtT 20) verwendet, mit denen nach Behandlung eine Bestimmung der Reduktionskapazität mittels eines mitochondrialen Funktionstestes (EZ4U), sowie ATP- und Proteinbestimmungen durchgeführt wurden.

In diesen Experimenten zeigten sich bei kurzen Inkubationszeiten (15 und 30 Minuten) und Konzentrationen von 1 μM und 10 nM, was im Bereich physiologischer GC-Spiegel liegt, starke supprimierende Effekte auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel. Diese konnten durch einen Glukokortikoidrezeptor-Antagonisten nicht aufgehoben werden. In hohen Konzentrationen (100 μM) zeigte Dexamethason dagegen stimulierende Kurzeffekte auf den zellulären ATP-Gehalt. Bei langfristiger Inkubation (24 h) wirkte Dexamethason auf die mitochondrialen Parameter in allen untersuchten Konzentrationen (10 nM bis 100 μM) im Wesentlichen supprimierend.

Insgesamt wurde die Rolle von Zellen des Hypophysenvorderlappens (HVL) im Hinblick auf Kurzzeiteffekte von GC bisher wenig untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit an hypophysären AtT 20-Zellen legen transkriptionsunabhängige Atmungsketteneffekte nahe und bestätigen das komplexe Profil glukokortikoiderger Wirkungen.

Die festgestellten kurzfristigen stimulierenden Effekte bei höheren Dosierungen stehen möglicherweise für Wirkungen der GC, die den mitochondrialen Energiehaushalt der Hypophysenzellen für die Stressaktivierung vorbereiten.

Protektive GC-Effekte zeigen sich auch klinisch bei der Behandlung von Mitochondriopathien. Möglicherweise konnte in dieser Arbeit ein *in vitro*-Korrelat dieser Effekte dargestellt werden.

Es zeigten sich in dieser Arbeit nach kurzzeitiger Applikation von GC in physiologischen Spiegeln entsprechenden Konzentrationen und bei langzeitiger Applikation in allen untersuchten Konzentrationen supprimierende Wirkungen auf Atmungskettenparameter. Eine Aktivitätsminderung der Atmungskette regulatorisch wirkender Hypophysenvorderlappenzellen durch GC könnte entweder zu einer physiologischen, vorübergehenden Suppression des zellulären Stoffwechsels führen oder einen Zellschaden hervorrufen, der zu einer weitreichenden Dysfunktion der HHNA führen könnte. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen Hypercortisolismus und Störungen der HHNA hätte eine weitreichende klinische Bedeutung und wird als Modell für neuropsychiatrische Störungen intensiv diskutiert.

Die in dieser Arbeit zitierten Studien, die sich mit potentiellen Atmungsketteneffekten von GC beschäftigen, zeigen derzeit noch kein eindeutiges Wirkprofil dieser Hormone. Es sollten nun Studien folgen, die die Reaktion von HVL-Zellen auf kurzzeitige GC-Exposition *in vivo* prüfen und damit eine Verbindung zu protektiven GC-Effekten bei Patienten mit Mitochondriopathien schaffen. Des Weiteren wären Versuche mit durch Mitochondriopathien betroffenen Zellen sinnvoll, um die klinisch beobachteten Wirkungen von GC auf erkrankte Patienten auch auf zellulärer Ebene näher zu klassifizieren.

6.0 Literaturverzeichnis

Anderson, S., Bankier, A.T., Borel, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J. *et al.*, (1981)

Sequence and organization of the human mitochondrial genome.
Nature 290, 457-465.

Arana, G.W., Baldessarini, R.J., Ornstein, M., (1985)

The dexamethasone suppression test for diagnosis and prognosis in psychiatry.
Arch Gen Psychiatry 42, 1193-1204.

Armanini, M.P., Hutchins, C., Stein, B.A., Sapolsky, R.M., (1990)

Glucocorticoid endangerment of hippocampal neurons is NMDA-receptor dependent.
Brain Res. 532, 7-12.

Attardi, G. und Schatz, G., (1988)

Biogenesis of mitochondria.
Annu. Rev. Cell. Biol. 4, 289-333.

Axelrod, J., Reisine, T.D., (1984)

Stress hormones: their interaction and regulation.
Science 224, 452-459.

Bailly-Maitre, B., de Sousa, G., Zucchini, N., Gugenheim, J., Boulukos, K.E., Rahmani, R., (2002)

Spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes: molecular mechanisms and regulation by dexamethasone.
Cell Death Differ. 9, 945-955.

Bangham, A.D., Standish, J.M., Weissmann, G., (1965)

The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. *J. Molec. Biol.* 13, 253-259.

Barks, J.D.E., Post, M., Tuor, U.I., (1991)

Dexamethasone prevents hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat.
Pediatr. Res. 29, 558-563.

Barnes, P.J., Adcock, I., (1993)

Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms.
Trends Pharmacol. Sci. 14, 436-441.

Bartholome, B., Spies, C.M., Gaber, T., Schuchmann, S., Berki, T., Kunkel, D., Bienert, M., Radbruch, A., Burmester, G.R., Lauster, R., Scheffold, A., Buttgerit, F., (2004)

Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis.

FASEB J. 18 (1), 70-80.

Behl, C., Lezoualc'h, F., Trapp, T., Widmann, M., Skutella, T., Holsboer, F., (1997a)

Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons in vitro.

Endocrinology 138, 101-106.

Behl, C., Trapp, T., Skutella, T., Holsboer, F., (1997b)
Protection against oxidative stress-induced neuronal cell death-A novel role for RU486.
Eur. J. Neurosci. 9, 912-920.

Berger, M., *et al.*, (1999)
Psychiatrie und Psychotherapie.
Urban und Schwarzenberg

Bhat, G.K., Mahesh, V.B., Chu, Z.W., Chorich, L.P., Zamorano, P.L., Brann, D.W.,
(1995)
Localisation of the N-methyl-D-aspartate R1 receptor subunit in specific anterior
pituitary hormone cell types of the female rat.
Neuroendocrinology 62, 178-186.

Blass, J.P., Avigan, J., Uhlenhof, B.W.A., (1970)
Defect in pyruvate decarboxylase in a child with an intermittent movement disorder.
J. Clin. Invest. 49, 423-432.

Boonyaratanakornkit, V., Edwards, D.P., (2004)
Receptor mechanisms of rapid extranuclear signalling initiated by steroid hormones.
Essays Biochem. 40, 105-20.

Boumpas, D.T., Chrousos, G.P., Wilder, R.L., Cupps, T.R., Balow, J.E., (1993)
Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases. Basic and clinical correlates.
Ann. intern. Med. 119, 1198-1205.

Bremner, J.D., Randall, P., Scott, T.M., Bronen, R.A., Seibyl, J.P., Southwick, S.M.,
Delaney, R.C., McCarthy, G., Charney, D.S., Innis, R.B., (1995)
MRI-based measurement of hippocampal volume of patients with combat-related
posttraumatic stress disorder.
Am. J. Psychiatry 152, 973-981.

Brewster, M.E., Loftsson, T., 2002
The use of chemically modified cyclodextrins in the development of formulations for
chemical delivery systems.
Pharmazie 57 (2), 94-101.

Browning, J.L., Ward, M.P., Wallner, B.P., Pepinsky R.B., (1990)
Studies on the structural properties of lipocortin-1 and the regulation of its synthesis by
steroids. Prog. Clin. Biol. Res. 349, 27-45.

Buttgereit, F., Brand, M.D., Müller, M., (1993)
Effects of methylprednisolone on the energy metabolism of quiescent and Con A-
stimulated thymocytes of the rat.
Biosci. Rep. 13, 41-52.

Buttgereit, F., Müller, M., Wolbart, K., Thiele, B., Hiepe, F., (1994a)
The influence of methylprednisolone on energy metabolism of Ehrlich ascites tumour
cells. Biosci. Rep. 14, 283-290.

- Buttgereit, F., Grant, A., Müller, M., Brand, M.D., (1994b)
The effects of methylprednisolone on oxidative phosphorylation in Con A-stimulated thymocytes. Top-down elasticity analysis and control analysis.
Europ. J. Biochem. 223, 513-519.
- Buttgereit, F., Brink, I., Thiele, B., Hiepe, F., Burmester, G.R., Hall, E., (1995)
Effects of methylprednisolone and 21-aminosteroids on mitogen-induced IL-6 and TNF- α production in human peripheral blood mononuclear cells.
J. pharmacol. Exp. Ther. 275, 850-853.
- Buttgereit, F., Dimmeler S., Neugebauer, E., Burmester, G.-R., (1996)
Wirkungsmechanismen der hochdosierten Glucocorticoidtherapie.
Dtsch. med. Wschr. 121, 248-252.
- Buttgereit, F., Scheffold, A., (2002)
Rapid glucocorticoid effects on immune cells.
Steroids 67 (6), 529-34.
- Chambliss, K.L., Yuhanna, I.S., Anderson, R.G., Mendelsohn, M.E., Shaul, P.W., (2002)
ER β has nongenomic action in caveolae.
Mol. Endocrinol. 16, 938-946.
- Charmandari, E., Kino, T., Souvatzoglou, E., Chrousos, G.P., (2003)
Pediatric stress : hormonal mediators and human development.
Horm. Res. 59 (4), 161-179.
- Chaudhuri, A., Behan, P.O., (2004)
Fatigue in neurological disorders.
Lancet 363 (9413), 978-988.
- Coburn-Litvak, P.S., Tata, D.A., Gorby, H.E., McCloskey, D.P., Richardson Anderson, B.J., (2004)
Chronic corticosterone affects brain weight, and mitochondrial, but not glial volume fraction in hippocampal area CA3.
Neuroscience 124 (2), 429-438.
- Cronstein, B.N., Kimmel, S.C., Levin, R.I., Martiniuk, F., Weissmann, F.G., (1992)
A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 89, 9991-9995.
- Croxtall, J.D., Flower, R.J., (1992)
Lipocortin 1 mediates dexamethasone-induced growth arrest of the A549 lung adenocarcinoma cell line.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 3571-3575.
- Croxtall, J.D., van Hal, P.T., Choudhury, Q., Gilroy, D.W., Flower, R.J., (2002)
Different glucocorticoids vary in their genomic and non-genomic mechanism of action in A549 cells.
Br. J. Pharmacol. 135, 511-519.
- Daufeldt, S., Lanz, R., Allera, A., (2003)

Membrane-initiated steroid signaling (MISS): genomic steroid action starts at the plasma membrane.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 85 (1), 9-23.

de Kloet, E.R., Reul, J.M.H.M., de Ronde, F.S.W., Bloemers, M., Ratka, A., (1986)
Function and plasticity of brain corticosteroid receptor systems: action of neuropeptides.

J. Steroid Biochem. 25, 723.

Demonakos, C., Tsawdaroglou, N.C., Djordjevic-Markovic, R., Papalopoulou, M., Galanopolous, V., Papadogeorkagi, S., Sekeris, C.E., (1993)

Import of the glucocorticoid receptor into rat liver mitochondria in vivo and in vitro.

J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 46, 401-413.

de Munk, A., Guyre, P.A., Holbrock, N.J., (1984)

Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. Endocr. Rev. 5, 25.

Denizot, F., Lang, R., (1986)

Rapid colorimetric assay for cell growth and survival.

Journal of Immunological Methods 89, 271-277.

Diorio, D., Viau, V., Meaney, M.J., (1993)

The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress.

J. Neurosci., 13: 3839-3847.

Djouadi, F., Bastin, J., Gilbert, T., Rotig, A., Rusin, P. Merlet-Benichou, C., (1994)

Mitochondrial biogenesis and development of respiratory chain enzymes in kidney cells: Role of glucocorticoids.

Am. J. Phys. 267, C245-C254.

Djouadi, F., Bastin, J., Kelly, D.P., Merlet-Benichou, C, (1996)

Transcriptional regulation by glucocorticoids of mitochondrial oxidative enzyme genes in the developing rat kidney.

Biochem. J. 315, 555-562.

Drevets, W.C., Price, J.L., Simpson, J.R., Todd, R.D., Reich, T., Bannier, M., Raichle, M.E., (1997)

Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders.

Nature 386, 824-827.

Duchen, M.R., (2004)

Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology.

Mol. Aspects Med. 25, 365-451.

Egger, J., Wilson, J., (1983)

Mitochondrial inheritance in a mitochondrially mediated disease.

N. Engl. J. Med. 309, 142-145.

Engel, A.G., Siekert, R.G., (1972)

Lipid storage myopathy responsive to prednisone.

Arch. Neurol. 27, 174-181.

Engel, W.K., Cunningham, G.G., (1963)

Rapid examination of muscle tissue: an improved trichrome stain method for fresh-frozen biopsy sections.

Neurology 13, 919-923.

Erickson, K., Drevets, W., Schulkin, J., (2003)

Glucocorticoid regulation of diverse cognitive functions in normal and pathological emotional states.

Neurosci Biobehav Rev. 27(3), 233-246.

Evans, S.J., Murray, T.F., Moore, F.L., (2000)

Partial purification and biochemical characterization of a membrane glucocorticoid receptor from an amphibian brain.

J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 72, 209-221.

Farach-Carson, M.C., Davis, P.L., (2003)

Steroid hormone interactions with target cells: cross talk between membrane and nuclear pathways.

JPET 307, 839-845.

Feldman, S., Conforti, N., (1985)

Modifications of adrenocortical responses following frontal cortex stimulation in rats with hypothalamic deafferentations and medial forebrain bundle lesions.

Neuroscience 15, 1045-1047.

Feldman, S., Weidenfeld, J., (1999)

Glucocorticoid receptor antagonists in the hippocampus modify the negative feedback following neural stimuli.

Brain Res. 821, 33-37.

Flavin, M.P., (1996)

Influence of dexamethasone on neurotoxicity caused by oxygen and glucose deprivation in vitro. Exp. Neurol. 139, 34-38.

Flower, R.J., (1989)

Glucocorticoids and the inhibition of phospholipase A2.

In: Schleimer, R.P., Claman, H.N., Oronsky, A.. Anti-inflammatory steroid action.

Academic Press. San Diego.

Garvey, W., Hueckssteadt, T., Monzon, R., Marshall, S., (1989)

Dexamethasone regulates the glucose transport system in primary cultured adipocytes: different mechanisms of insulin resistance after acute and chronic exposure.

Endocrinology 124, 2063-2073.

Gold, P.W., Goodwin, F.K., Chrousos, G.P., (1988)

Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress. 1+2.

N Engl J Med 319, 348-353 + 413-420.

- Goulding, N.J., Godolphin, J.L., Sharland, P.R., Peers, S.H., Sampson, M., Maddison, P.F., Flower, R.J., (1990)
Anti-inflammatory lipocortin 1 production by peripheral blood leucocytes in response to hydrocortisone.
Lancet 335 (8703), 1416-1418.
- Green, D.R., Reed, J.C., (1998)
Mitochondria and apoptosis.
Science 281, 1309.
- Gurvits, T.V., Shenton, M.E., Hokama, H., Ohta, H., Lasko, N.B., Gilbertson, M.W., Orr, S.P., Kikinis, R., Jolesz, F.A., McCarley, R.W., Pitman, R.K., (1996)
Magnetic resonance imaging study of hippocampal volume in chronic, combat-related posttraumatic stress disorder.
Biol. Psychiatry 40, 1091-1099.
- Hall, E.D., (1992)
The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone.
J. Neurosurg. 76, 13-22.
- Hall, E.D., McCall, J.M., Means, E.D., (1994)
Therapeutic potential of the lazaroids (21-amino steroids) in acute central nervous system trauma, ischemia and subarachnoid hemorrhage.
Advanc. Pharmacol. 28, 221-268.
- Han, J.Z., Lin, W., Chen, Y.Z., (2005)
Inhibition of ATP-induced calcium influx in HT4 cells by glucocorticoids: involvement of protein kinase A.
Acta Pharmacol. Sin. 26 (2), 199-204.
- Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K., (1989)
Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill.
J. Immunol. Methods 119, 203-210.
- He, Z., Wang, Z.Y., Li, J., Zhu, Q., Lamb, C., Ronald, P., Chory, J., (2000)
Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1.
Science 288, 2360-2363.
- Hirata, F., (1989)
Lipocortins as a second messenger.
In: Schleimer, R.P., Claman, H.N., Oronsky, A., *Anti-inflammatory steroid action.* Academic Press. San Diego.
- Holliday, P.L., Martens, M.E., Lee, C.-P., Gilroy, J., (1984)
Mitochondrial myopathy with an abnormality of ATP Synthesis.
Neurology 34, (Suppl. 1), 163.
- Holsboer, F., (1983)
The dexamethasone suppression test in depressed patients: clinical and biochemical aspects.
J Steroid Biochem. 19, 251-257.

- Horner, H., Munck, A., Lienhard, G., (1987)
Dexamethasone causes translocation of glucose transporter from the plasma membrane to an intracellular in human fibroblasts.
J. Biol. Chem. 262, 17696-17700.
- Horner, H.C., Packan, D.R., Sapolsky, R.M., (1990)
Glucocorticoids inhibit glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia.
Neuroendocrinology 52, 57-64.
- Hsu, C.-C., Chuang, Y.-H., Tsai, J.-L., Jong, H.-J., Shen, Y.-Y., Huang, H.-L., Chen, H.-L., Lee, H.-C., Pang, C.-Y., Wei, Y.-H., Chen, S.-S., (1995)
CPEO and carnitine deficiency overlapping in MELAS syndrome.
Acta Neurol. Scand. 92, 252-255.
- Huhtakangas, J.A., Olivera, C.J., Bishop, J.E., Zanello, L.P., Norman, A.W., (2004)
The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D3 in vivo and in vitro.
Mol. Endocrinol. 18 (11), 2660-71.
- Hurko, O., Johns, D.R., Rutledge, S.L., Stine, O.C., Peterson, P.L., Miller, N.R., *et al.*, (1990)
Heteroplasmy in chronic external opthalmoplegia: clinical and molecular observations.
Pediatr. Res. 28, 542-548.
- Jani, M.S., Telang, S.D., Katyare, S.S., (1991)
Effect of corticosterone treatment on energy metabolism in rat liver mitochondria.
J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 38, 587-591.
- Kadowaki, T., Kitagawa, Y., (1988)
Enhanced transcription of mitochondrial genes after growth stimulation and glucocorticoid treatment of Reuber hepatoma H35 cells.
FEBS Lett. 233, 51-86.
- Kaiser, H., Kley, K., (1992)
Cortisontherapie.
Thieme Verlag, Stuttgart, 9. Auflage.
- Karlson, P., Doenecke, D., Koolmann, J., (1994)
Biochemie für Naturwissenschaftler und Mediziner.
Thieme Verlag, Stuttgart, 14. Auflage.
- Kiyama, H., Sato, K., Tohyama, M., (1993)
Characteristic localisation of non-NMDA type glutamate receptor subunits in the rat pituitary gland.
Brain Res. Mol. Brain Res. 19, 262-268.
- Kjellström, B.T., Risberg, B., (1985)
High dose corticosteroids and cell-cell interactions.
Acta chir. Scand. 256, Suppl., 37-47.
- Klegeris, A., Walker, D.G., McGeer, P.L., (1997)

Regulation of glutamate in cultures of human monocytic THP-1 and astrocytoma U-373 MG cells.
Neuroimmunol. 78, 152-161.

Kley, H., (1985)
Physiologie, Pathophysiologie, Klinik, Diagnostik und internistische Therapie.
In: Kümmerle, F., Lenner V., Hrsg. Erkrankungen der Nebennieren.
Thieme Verlag, Stuttgart

Koufali, M.-M., (2002)
Localization of the glucocorticoid receptor in mitochondria of glioma C3 cells.
MSc Thesis, University of Athens.

Krausz, C., Bonaccorsi, L., Luconi, M., Fuzzi, B., Criscuoli, L., Pellegrini, S., Forti, G., Baldi, E., (1995)
Intracellular calcium increase and acrosome reaction in response to progesterone in human spermatozoa are correlated with in vitro fertilization.
Human reprod. 10, 120-124.

Lawrence, M.S., Sapolsky, R.M., (1994)
Glucocorticoids accelerate ATP loss following metabolic insults in cultured hippocampal neurons.
Brain Res. 646, 303-306.

Li, J., Chory, J., (1997)
A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction.
Cell 90, 929-938.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X., (1997)
Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.
Cell 91, 479.

Limbourg, F.P., Huang, Z., Plumier, J.C., Simoncini, T., Fujioka, M., Tuckermann, J. Schutz, G., Moskowitz, M.A., Liao, J.K., (2002)
Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids.
J. Clin. Invest. 110, 1729-1738.

Limbourg, F.P., Liao, J.K., (2003)
Nontranscriptional actions of the glucocorticoid receptor.
J. Mol. Med. 81, 168-174.

Liu, D., McAdoo, D.M., (1993)
Methylprednisolone reduces excitatory amino acid release following experimental spinal cord injury.
Brain Res. 609, 293-297.

Liu, L., Wang, Y.X., Zhou, J., Long, F., Sun, H.W., Liu, Y., Chen, Y.Z., Jiang, C.L., (2005)

- Rapid non-genomic inhibitory effects of glucocorticoids on human neutrophil degranulation.
Inflamm. Res. 54 (1), 37-41.
- Löffler, G., Petrides, P., (1997)
Biochemie und Pathobiochemie.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 5. Auflage.
- Long, F., Wang, Y.X., Liu, L., Zhou, J., Cui, R.Y., Jiang, C.L., (2005)
Rapid nongenomic inhibitory effects of glucocorticoids on phagocytosis and superoxide anion production by macrophages.
Steroids 70 (1), 55-61.
- Luconi, M., Francavilla, F., Porazzi, I., Macerola, B., Forti, G., Baldi, E., (2004)
Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens.
Steroids 69 (8-9), 553-9.
- Luft, R., Ikkos, D., Palmieri, G., Ernster, L., Afzelius, B., (1962)
A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study.
J. Clin. Invest. 41, 1174-1804.
- Lundblad, J.R., Roberts, J.L., (1988)
Regulation of proopiomelanocortin gene expression in pituitary.
Endocr. Rev. 9, 135-158.
- Lupien, S., Lecours, A.R., Lussier, I., Schwartz, G., Nair, N.P.V., Meaney, M.J., (1994)
Basal cortisol levels and cognitive deficits in human aging.
J. Neurosci. 14, 2893-2903.
- Magarinos, A.M., Somoza, G., De Nicola, A.F., (1987)
Glucocorticoid negative feedback and glucocorticoid receptors after hippocampectomy in rats. Horm. Metab. Res. 19, 105-109.
- Marcinek, D.J., (2004)
Mitochondrial dysfunction measured in vivo.
Acta Physiol. Scand. 182, 343-352.
- Martens, M.E., Peterson, P.L., Lee, C.P., (1991)
In vitro effects of glucocorticoid on mitochondrial energy metabolism.
Biochim. Biophys. Acta 1058, 152-160.
- Masson, M., Loftsson, T., Masson, G., Stefansson, E., (1999)
Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and in vitro testing.
J. Control. Release 59 (1), 107-18.
- Masters, J.N., Finch C.E., Sapolsky, R.M., (1989)
Glucocorticoid endangerment of hippocampal neurons does not involve deoxyribonucleic acid cleavage.

Endocrinology 124, 3083-3088.

McEwen, B.S., de Kloet, E.R., Rostene, W., (1986)
Adrenal receptors and actions in the nervous system.
Physiol. Rev. 66, 1121.

McIntosh, L.J., Hong, K.E., Sapolsky, R.M., (1995)
High glucocorticoid levels decrease some antioxidant enzyme activities in the adult rat brain. Soc. Neurosci. Abstr. 21, 2129.

Meizel, S., Turner, K.O., Nuccitelli, R., (1997)
Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction.
Dev. Biol. 182, 67-75.

Merlo-Pich, M., Deleonardi, G., Biondi, A., Lenaz, G., (2004)
Methods to detect mitochondrial function.
Exp. Geront. 39, 277-281.

Mitsui, T., Umaki, Y., Nagasawa, M., Akaike, M., Aki, K., Azuma, H., Ozaki, S., Odomi, M., Matsumoto, T., (2002)
Mitochondrial damage in patients with long-term corticosteroid therapy: development of oculoskeletal symptoms similar to mitochondrial disease.
Acta Neuropathol. 104 (3), 260-266.

Mizoguchi, K., Ishige, A., Aburada, M., Tabira, T., (2003)
Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus.
Neuroscience 119 (3), 887-897.

Moghaddam, B., Bolinao, M.L., Stein-Behrens, B., Sapolsky, R.M., (1994)
Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate.
Brain Res. 655, 251-254.

Moore, F.L., Orchinik, M., (1994)
Membrane receptors for corticosterone. A mechanism for rapid behavioral responses in an amphibian.
Horm. And Behav. 28, 512-519.

Moore, F.L., Orchinik, M., Lowry, C., (1995)
Functional studies of corticosterone receptors and neuronal membranes.
Receptor 5(1), 21-8.

Mosmann, T., (1983)
Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.
J. Immunol. Methods 65, 55-63.

Motoyama, S., Saito, S., Minamiya, Y., Saito, R., Nakamura, M., Okuyama, M., Imano, H., Ogawa, J., (2003)
Methylprednisolone inhibits low-flow hypoxia-induced mitochondrial dysfunction in isolated perfused rat liver.

Crit. Care Med.31 (5), 1468-1474.

Norman, A.W., Mizwicki, M.T., Norman, D.P.G., (2004)
Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model.

Nat. Rev. Drug Discov. 3 (1), 27-41.

Norman, A.W., Olivera, C.J., Barreto Silva, F.R., Bishop, J.E., (2002)
A specific binding protein/receptor for $1\alpha,25$ -dihydroxy D3 is present in an intestinal caveolae membrane fraction.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 298, 414-419.

Orchinik, M., Murray, T.F., Moore, F.L., (1991)

A corticosteroid receptor in neuronal membranes.

Science 252, 1848-1851.

Pastorino, J.G., Wilhelm, T.J., Glascott, P.A., Kocsis, J.J., Farber, J.L., (1995)

Dexamethasone induces resistance to the lethal consequences of electron transport inhibition in cultured hepatocytes.

Arch. Biochem. Biophys. 318, 175-181.

Peterson, P.L., Martens, M., Lee, C.-P., Wolfe, D., Hatfield, J., Gilroy, J., (1986a)

MELAS: A disorder of mitochondrial metabolism.

Neurology 36 (Suppl. 1), 94.

Peterson, P.L., Martens, M., Lee, C.-P., (1986b)

The treatment of mitochondrial disease.

Neurology 36 (Suppl. 1), 95.

Peterson, P.L., (1995)

The treatment of mitochondrial myopathies and encephalomyopathies.

Biochim. Biophys. Acta 1271, 275-280.

Piani, D., Fontana, A., (1994)

Involvement of the cystine transporter system Xc⁻ in the macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons.

J. Immunol. 152, 3578-3585.

Powell, C.E., Watson, C.S., Gametchu, B., (1999)

Immunoaffinity isolation of native membrane glucocorticoid receptor from S49⁺⁺ lymphoma cells: biochemical characterization and interaction with Hsp 70 and Hsp 90.

Endocrine 10, 271-280.

Przyrembel, H., (1987)

Therapy of mitochondrial disorders.

J. Inher. Metab. Dis. 10, 129-146.

Psarra, A.-M., Bochaton-Piallat, M.-L., Gabbiani, G., Sekeris, C.E., Tsakopoulos, M., (2002)

Mitochondrial localization of glucocorticoid receptor in glial (Müller) cells in the salamander retina.

Glia, 41 (1), 38-49.

- Qiu, J., Lou, L.G., Huang, X.Y., Lou, S.J., Pei, G., Chen, Y.Z., (1998)
Nongenomic mechanisms of glucocorticoid inhibition of nicotine-induced calcium influx in PC12 cells: involvement of protein kinase C.
Endocrinology 139 (12), 5103-5108.
- Rachamin, N., Latter, H., Malinin, N., Asher, C., Wald, H., Garty, H., (1995)
Dexamethasone enhances expression of mitochondrial oxidative phosphorylation genes in rat distal colon.
Am. J. Physiol. 269, C1305-C1310.
- Reagan, L.P., McEwen, B.S., (1997)
Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus.
Journal of Chem. Neuroanat. 13, 149-167.
- Reisine, T., Affolter, H.-U., 1987
Hormon receptor regulated proopiomelanocortin gene expression.
Biochem. Pharmacol. 36, 191-195.
- Renner, K., Kofler, R., Gnaiger, E., (2002)
Mitochondrial function in glucocorticoid triggered T-ALLce with transgenic bcl-2 expression. *Mol. Biol. Rep.* 29 (1-2), 97-101.
- Robyn, D., Wolffe, A.P., Wahli, W., (2000)
Nuclear hormone receptor coregulators in action: Diversity for shared tasks.
Mol. Endocrinol. 14, 329-347.
- Rohdewald, P., Möllmann, H., Barth, J., Rehder, J., Derendorf, H., (1986)
Pharmacokinetics of dexamethasone and its phosphate ester.
Biopharmaceutics and Drug Disposition 7.
- Roussel, D., Dumas, J.F., Augeraud, A., Douay, O., Foussard, F., Malthiery Simard, G., Ritz, P., (2003)
Dexamethason treatment specifically increases the basal proton conductance of rat liver mitochondria.
FEBS Lett 541 (1-3), 75-79.
- Sapolsky, R.M., Krey, L.C., McEwen, B.S., (1985)
Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. *J. Neurosci.* 5, 1222-1227.
- Sapolsky, R.M., (1990a)
Glucocorticoids, hippocampal damage and the glutamatergic synapse.
Prog. Brain Res. 86, 13-23.
- Sapolsky, R.M., Uno, H., Rebert, C.S., Finch, C.E., (1990b)
Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates.
J. Neurosci. 10, 2897-2902.
- Sauro, M.D., Jorgensen, R.S., Teal Pedlow, C., (2003)
Stress, glucocorticoids, and memory: a meta-analytic review.
Stress 6(4), 235-245.

- Scheller, K., Seibel, P., Sekeris, C.E., (2003)
Glucocorticoid und thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells.
Int. Rev. Cyt. 222, 1-61.
- Schuchmann, S., Wiontzek, M., Burmester, R.R., Buttgereit, F., (2004)
Modulation of intracellular calcium signaling and mitochondrial function in cultured osteoblastic cells by dexamethasone and celecoxib during mechanical stimulation.
Clin. Exp. Rheumatol., 22 (2), 184-196.
- Sengers, R.C.A., Stadhouders, A.M., Trijbles, J.M.F., (1984)
Mitochondrial myopathies: clinical, morphological and biochemical aspects.
Eur. J. Pediatr. 141, 192-207.
- Sessa, G., Weissmann, G., (1968)
Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes.
J. Lipid Res. 9, 310-318.
- Sheline, Y.I., Wang, P.W., Gado, M.H., Csernansky, J.G., Vannier, M.W., (1996)
Hippocampal atrophy in recurrent major depression.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3908-3913.
- Shoffner, J.M., Wallace, D.C., (1994)
Oxidative phosphorylation diseases and mitochondrial DNA mutations: Diagnosis and treatment. *Annu. Rev. Nutr.* 14, 535-568.
- Simon, N., Jolliet, P., Morin, C., Zini, R., Urien, S., Tillement, J.-P., (1998)
Glucocorticoids decrease cytochrome c oxidase activity of isolated rat kidney mitochondria.
FEBS Letters 435, 25-28.
- Slater, T.F., Sawyer, B., Sträuli, U., (1963)
Studies on succinate-tetrazolium reductase systems.
Biochim. et Biophys. acta, 77, 383-393.
- Smith, M., (1996)
Hippocampal vulnerability to stress and aging: possible role of neurotrophic factors.
Behav. Brain Res. 78, 25-36.
- Song, R.X., McPherson, R.A., Adam, L., Bao, Y., Shupnik, M., Kumar, R., Santen, R.J., (2002)
Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ER α -Shc association and Shc pathway activation.
Mol. Endocrinol. 16, 116-127.
- Sperl, W., (1997)
Diagnose und Therapie von Mitochondriopathien.
Wien. Klin. Wochenschr. 109(3), 93-99.
- Sperl, W., Mayr, H., Skladal, D., (2003/2004)
Mitochondriopathien.
Pädiat. Prax. 64, 425-435.

- Starkman, M.N., Gebarski, S.S., Berent, S., Schteingart, D.E., (1992)
Hippocampal formation volume, memory dysfunction , and cortisol levels in patients with Cushing's Syndrome.
Biol. Psychiatry 32, 756-765.
- Stefanelli, C., Bonavita, F., Stanic, I., Farruggia, G., Falcieri, E., Robuffo, I., Pignatti, C., Muscari, C., Rossoni, C., Guarnieri, C., Caldarera, C.M., (1997)
ATP depletion inhibits glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis.
Biochem. J. 322, 909-917.
- Sun, D., Gilboe, D.D., (1994)
Ischemia-induced changes in cerebral mitochondrial free fatty acids, phospholipids, and respiration in the rat.
J. Neurochem. 62, 1921-1928.
- Susin, S.A., Zamzami, N., Kroemer, G., (1998)
Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more.
Biochim. Biophys. Acta 1366, 151.
- Svec, F., (1985)
Relationship between intact cell ATP levels and glucocorticoid receptor-binding capacity in the AtT-20 cell.
Biochim. Biophys. Acta 847, 147-154.
- Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., Tsukamoto, K., (1986)
An improved colorimetric assay for interleukin 2.
J. Immunol. Methods 93, 157-165.
- Thomas, L., (2000)
Labor und Diagnose.
TH Books, Frankfurt, 5. Auflage.
- Tombaugh, G.C., Sapolsky, R.M., (1992)
Corticosterone accelerates hypoxia- and cyanide-induced ATP loss in cultured hippocampal astrocytes.
Brain Res. 588, 154-158.
- Tonomura, N., McLaughlin, K., Grimm, L., Goldsby, R.A., Osborne, B.A., (2003)
Glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes: requirement of proteasome-dependent mitochondrial activity.
J. Immunol. 170, 2469-78.
- Torchia, J., Glass, C., Rosenfeld, M.G., (1998)
Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses.
Curr. Opin. Cell Biol. 10, 373-383.
- Uekama, K., Otagiri, M, Uemura, Y., Fujinaga, T., Arimori, K., Matsuo, N., Tasaki, K., Sugii, A., (1983)
Improvement of oral bioavailability of prednisolone by beta-cyclodextrin complexation in humans.
J. Pharmacobiodyn. 6 (2), 124-7.

- Vedder, H., (1990)
Serum-free culture of AtT 20 pituitary cells: a system for neuroendocrine studies under defined conditions.
In Vitro Cell. Dev. Biol. 26, 1068-1072.
- Virgin, C.E., Ha, T.P.-T., Packan, D.R., Tombaugh, G.C., Yang, S.H., Horner, H.C., Sapolsky, R.M., (1991)
Glucocorticoids inhibit glucose transport and glutamate uptake in hippocampal astrocytes: Implications for glucocorticoid neurotoxicity.
J. Neurochem. 57, 1422-1428.
- Wallace, D.C., Zheng, X., Lott, M.T., Shoffner, J.M., Hodge, J.A., Kelley, R.I., *et al.*, (1988)
Familial mitochondrial encephalomyopathy, (MERFF): Genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease.
Cell 55, 601-610.
- Wallace, D.C., (1992)
Diseases of the mitochondrial DNA.
Ann. Rev. Biochem. 61, 1175-1212.
- Wallace, D.C., (1995)
Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging.
Am. J. Hum. Genet. 57, 201-223.
- Watanabe, Y., Gould, E., Cameron, H.A., Daniels, D.C., McEwen, B.S., (1992a)
Phenytoin prevents stress- and corticosterone-induced atrophy of CA3 pyramidal neurons. *Hippocampus* 2, 431-436.
- Watanabe, Y., Gould, E., McEwen, B.S., (1992b)
Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons.
Brain Res. 341, 345.
- Weitzmann, E.D., Fukushima, D., Nogueira, C., Roffwarg, H., Gallagher, T.F., Hellman, L., (1971)
Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects.
J Clin Endocr Metab. 33, 14.
- Wijk, van, P.A., Neck, van, J.W., Rijnberk, A., Croughs, R.J., Mol, J.A., 1995
Proliferation of the murine corticotropic tumour cell line AtT20 is affected by hypophysiotrophic hormones, growth factors and glucocorticoids.
Mol. Cell. Endocrinol. 111 (1), 13-9.
- Willems, J.L., Monnens, L.A.H., Trijbels, J.M.F., Veerkamp, J.H., Meyer, A.E.F.H., van Dam, K., van Haelst, U., (1977)
Leigh's encephalomyelopathy in a patient with cytochrome c oxidase deficiency in muscle tissue. *Pediatrics* 60, 850-857.
- Williams, T.J., Yarwood, H., (1990)
Effect of glucocorticoids on microvascular permeability.
Amer. Rev. resp. Dis. 141, 39-43.

Wolffe, A.P., Guschin, D., (2000)

Chromatin features and targets that regulate transcription.

J. Struct. Biol. 129, 102-122.

Wong, M.L., Kling, M.A., Munson, P.J., Listwak, S. *et al.*, (2000)

Pronounced and sustained central hypernoradrenergic function in major depression with melancholic features: Relation to hypercortisolism and corticotropin-releasing hormone.

Proc Natl Acad Sci 97, 325-330.

Yukawa, H., Shen, J., Harada, N., Cho-Tamaoka, H., Yamashita, T., (2005)

Acute effects of glucocorticoids on ATP-induced Ca²⁺ mobilization and nitric oxide production in cochlear spiral ganglion neurons.

Neuroscience 130 (2), 485-96.

Zhu, Y., Rice, C.D., Pang, Y., Pace, M., Thomas, P. (2003)

Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes.

Proc. Natl Acad. Sci. USA 100, 2231-2236.

7.0 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ACTH	= Adrenocorticotrophes Hormon
AmA	= AntimycinA
ATP	= Adenosintriphosphat
CPEO-Syndrom	= Chronisch progressive externe Ophthalmoplegie-Syndrom
CRH	= "Corticotropin-Releasing-Hormone"
Dex	= Dexamethason
DMEM	= "Dulbecco´s Modified Eagles Medium"
DNS	= Desoxyribonukleinsäure
EDTA	= Ethylendiamin-Tetraazetat
EGFR	= Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
e-NOS	= Endotheliale Stickstoffoxyd Synthase
FADH	= Flavin-Adenin-Dinnucleotid+H ₂ .
GC	= Glucocorticoid
HHNA	= Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HVL	= Hypophysenvorderlappen
KCN	= Kaliumcyanid
MAP	= Mitogen aktivierte Proteinkinase
MELAS-Syndrom	= Myopathie-Enzephalopathie-Laktatazidose-Stroke-like-Episoden-Syndrom
MEM	= "Minimal Essential Medium"
MERRF-Syndrom	= "Myoklonus-Epilepsy-Ragged-Red-Fibre-Syndrome"
MP	= Methylprednisolon
MS	= Malonsäure
MTT	= (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid)
NADH	= Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid+H ₂ .
NMDA	= N-methyl-D-Aspartat
NNR	= Nebennierenrinde
PBS	= "Phosphate-Buffered Saline"
PKA	= Proteinkinase A
PKC	= Proteinkinase C

RNS	= Ribonukleinsäure
Rot	= Rotenon
SF	= Standardfehler
Trisma	= Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
ZNS	= Zentrales Nervensystem

7.2 Verzeichnis der Reagenzien und anderer Materialien

Reagenzien:

Amphotericin B:	Gibco/BRL, Paisley, Schottland
Antimycin A:	Merck, Darmstadt, Deutschland
ATP Biolumineszenz Test Kit CLS II:	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Cycloheximid:	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dexamethason:	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dexamethason (wasserlöslich):	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DMEM/Hepes ("Dulbecco's Modified Eagle's Medium" mit 25 mM Hepes):	Gibco/BRL, Paisley, Schottland
EDTA (NA ₂ -Ethylendiamin-Tetraacetat-2H ₂ O):	Merck, Darmstadt, Deutschland
EZ4U-Test:	Biomedica-Gruppe, Wien, Österreich
Fetales Kälberserum:	Seromed, Berlin, Deutschland
Kaliumcyanid:	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Malonsäure:	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
MEM Earle's Medium (Minimal Essential Medium):	Seromed, Berlin, Deutschland
Methylprednisolon:	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Natrium Pyruvat:	Gibco/BRL, Paisley, Schottland
Penicillin Natrium:	Gibco/BRL, Paisley, Schottland
Proteintest (Bio-Rad DC Protein Test):	BioRad, München, Deutschland
Rotenon:	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
RU38486:	Roussel Uclaf, Romainville, Frankreich
β-Cyclodextrin:	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Streptomycinsulfat:	Gibco/BRL, Paisley, Schottland
Trisma-Puffer (Tris-hydroxymethyl-aminomethan):	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X100:	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau:	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Verbrauchsmaterial:

Kulturflaschen (250 ml):	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Einmalpipetten mit Wattestopfen:	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen:	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Kunststoffröhrchen:	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Mikrotiterplatten (24-Vertiefungen):	Nunc, Roskilde, Dänemark
Mikrotiterplatten (96-Vertiefungen):	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Mikrotiterplatte (weiß, 95-Vertiefungen):	Packard, Böblingen, Deutschland

Geräte:

Inkubatoren:	Heraeus, Hanau, Deutschland Labortect, Göttingen, Deutschland
Pipetten:	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Elektrische Pipettierhilfen (“Pipetboy“):	Integra Biosciences, Wallisellen, Schweiz
Photometer (“MRX“):	Dynatech Laboratories, Nürtingen, Deutschland
Luminenszenzzähler (“TopCount“):	Packard, Böblingen, Deutschland

Software:

MikroWin:	Mikrotek, Overath, Deutschland
QuattroPro:	Borland, Langen, Deutschland

7.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold; Aumüller; Basler; Baum; Berger; Bertalanffy; Bien; Daut; Engelhart-Cabillic;
Fruhstorfer; Fuhrmann; Ganz; Gemsa; Geus; Golenhofen; Gotzen; Görg, Christian;
Gressner; Griss; Grzeschik; Happle; Hartmann; Hebebrandt; Hielscher; Hofmann;
Joseph; Kaiser; Kern; Kleine; Klenk; Klose; Koolman; Krause; Krieg; Kroll; Kuhn;
Kummer; Lang; Lange; Lemberg; Lennartz; Maisch; Mennel; Moll; Moosdorf;
Neubauer; Oertel; Peter; Petermann; Pfab; Reckzeh; Remschmidt; Rothmund; Röhm;
Schachtschabel; Schepelmann; Schüffel; Schulz; Seifart; Seitz; Seyberth; Slenczka;
Sommer; Spalke; Spieker; Steiniger; Vedder; Voigt; Weihe; Werner; Westermann; von
Wichert; Wolf, Martin; Zugmaier.

7.4 Danksagung

Ich bedanke mich bei Professor Dr. J.-C. Krieg und PD Dr. H. Vedder für die Überlassung des Themas und die konstante Bereitschaft zur Unterstützung, bei Sabine Fischer, Cornelia Würz, Norman Anthes und Annette Tittmar für die kollegiale Zusammenarbeit und Hilfe. Einen besonderen Dank an meinen lieben Ehemann Alexander Rösler für die moralische Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.

