

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss von Glucocorticoiden auf den neuronalen Zelltod

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Albrecht (geborene Blei)

aus Battin

Gutachter: 1. Prof. Dr. H. Hörtnagl

2. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. O. Ullrich

3. Prof. Dr. med. J. Weber

Datum der Promotion: 23.04.2007

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1.	Glucocorticoide	4
1.1.1.	Struktur, hormonale Sekretion und Regulation	4
1.1.2.	Rezeptoren und molekulare Mechanismen	5
1.1.3.	Einfluss von Glucocorticoiden auf den Zelltod	8
1.2.	Der neuronale Zelltod	9
1.3.	Mechanismen der neuroprotektiven Wirkung von Glucocorticoiden beim apoptotischem Zelltod von Neuronen	12
1.4.	<i>In vitro</i> Modelle des neuronalen Zelltodes	13
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
3.1.	Material	16
3.2.	Primäre, neuronale Zellkulturen	18
3.3.	Modelle der Zellschädigung	19
3.3.1	Ethylcholin-Aziridiniumion (AF64A)	19
3.3.2	Staurosporin	20
3.3.3.	Camptothecin	20
3.3.4.	Glutamat	20
3.3.5.	Kombinierter Sauerstoff- und Glukoseentzug (OGD)	20
3.4.	Vorbereitung der Zellkulturen, Versuchsaufbau und pharmakologische Interventionen	21
3.5	Evaluierung der Zellschädigung	22
3.5.1.	Phasenkontrastmikroskopie	22
3.5.2.	Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivitätsmessung	23
3.6.	Quantifizierung der Proteinexpression	24
3.6.1.	Ernten der Zellen und Zelllyse	24

3.6.2.	Proteinquantifizierung (BCA-Assay)	24
3.6.3	Gelelektrophorese, Western Blot und Visualisierung der Banden	25
3.6.4	Semiquantitative Analyse der Bandendichten	26
3.7.	Caspasenaktivitätsmessung	26
3.8.	Hoechst-Kernfärbung	27
3.9.	Statistik	27
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
4.1.	Dosis- und zeitabhängige neuroprotektive Wirkung von Corticosteron in der durch AF64A-induzierten Apoptose	28
4.2.	Biphasischer Effekt von Dexamethason auf die AF64A-induzierte neuronale Schädigung	30
4.3.	Einfluss von Corticosteron auf andere neuronale Modelle neuronaler Zellschädigung	31
4.4.	Rolle der Glucocorticoidrezeptoren bei der neuronalen Protektion	34
4.5.	Rolle der Eiweißsynthese bei der Corticosteron-vermittelten Neuroprotektion	35
4.6.	Involvierung des Cdk-Inhibitor p27 und des antiapoptotischen Proteins Bcl <sub>2</sub> in der Corticosteron-vermittelten Neuroprotektion	36
4.7.	Rolle der Caspasen bei der Corticosteron-vermittelten Neuroprotektion	38
4.8.	Rolle des Phosphoinositid 3-Kinase-Systems in der neuroprotektiven Wirkung von Corticosteron	39
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>41</b>
5.1.	Einfluss von Glucocorticoiden auf den apoptotischen neuronalen Zelltod	41
5.2.	Zeitabhängige neuroprotektive Wirkung von Corticosteron	42
5.3.	Corticosteron-vermittelte Neuroprotektion in Abhängigkeit von der Art des neuronalen Zelltodes	43
5.4.	Vermittlung der Neuroprotektion durch Glucocorticoidrezeptoren	44

5.5.	Abhängigkeit der Corticosteron-vermittelten Neuroprotektion von der <i>de novo</i> Proteinsynthese und antiapoptotischen Proteinen	46
5.6.	Einfluss von Corticosteron auf die Apoptose-assoziierte Zellzyklus-aktivierung	46
5.7.	Einfluss der Glucorticoide auf die Caspase-3-Aktivierung	48
5.8.	Aktivierung des PI 3-Kinase Weges	49
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Referenzen</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>66</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>67</b>

**Anhang: Lebenslauf**

**Publikationsliste**

**Danksagung**

**Eidesstattliche Erklärung**

## 8 Abbildungsverzeichnis

### Einleitung

1	Struktur von Cortison	4
2	Molekulare Mechanismen der nicht-genomischen und genomischen Steroidwirkungen	7

### Ergebnisse

3	Einfluss von Corticosteron auf die AF64A-induzierte Apoptose	28
4	Phasenkontrastaufnahmen und immunzytochemische Aufnahmen	30
5	Einfluss von Dexamethason auf die AF64A-induzierte LDH-Freisetzung	31
6	Einfluss von Corticosteron auf die Staurosporin-induzierte Apoptose	32
7	Einfluss von Corticosteron auf den Glutamat-induzierten Zelltod	33
8	Aufhebung der Corticosteron-vermittelten Neuroprotektion durch Spironolacton	34
9	Einfluss von Mifepriston auf die Corticosteron-vermittelte Neuroprotektion	35
10	Einfluss von Cycloheximid auf die Corticosteron-vermittelte Neuroprotektion	36
11	Einfluss von Corticosteron auf die Zellzyklusaktivierung unter AF64A	37
12	Einfluss von Corticosteron und AF64A auf die Expression von Bcl <sub>2</sub>	38
13	Einfluss von Corticosteron auf die Caspase-3-Aktivität	39
14	Einfluss des PI 3-Kinase-Inhibitors LY 294002 auf die Corticosteron-vermittelte Neuroprotektion	40

## 9 Tabellenverzeichnis

1	Verwendete Substanzen, Lösungsvehikel, Auflösung, Verdünnung und verwendete Endkonzentration für die verwendeten Substanzen	22
2	Einfluss des Applikationszeitpunktes von Corticosteron auf die AF64A-induzierten neuronalen Apoptose	29
3	Einfluss von LY 294002 auf die Corticosteron-vermittelte Neuroprotektion	40

## 10. Abkürzungsverzeichnis

ACTH	adrenokortikotropen Hormon
ADH	Vasopressin
AF64A	Ethylcholin-Aziridinium
AIF	Apoptosis inducing factor
AKT/PKB	V-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1/Proteinkinase B
AP-1	Activating protein 1
Bcl <sub>2</sub>	B-Zell-Lymphom 2
Bax	Bcl <sub>2</sub> -associated x protein
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl	Calciumchlorid
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylamino]-1-propansulfonat
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
Cdk	zellzyklusabhängigen Proteinkinasen
CKI	Zellzyklusinhibitoren
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DIV	<i>days in vitro</i> , Zellkultivierungszeit
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G <sub>1</sub>	1.Gap=Lücke im Zellzyklus
G <sub>2</sub>	2.Lücke im Zellzyklus
GABA	γ-Aminobuttersäure
GR	Glucocorticoidrezeptor
HCO <sup>3-</sup>	Hydrogencarbonat
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Hydrosulfat
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure



IAP	<i>inhibitor of apoptotic proteins</i> , hemmende Proteine der Apoptose
IGF1	<i>insulin-like growth factor-1</i> , Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1-Rezeptorweg
K <sup>+</sup>	Kalium
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
PI 3-Kinase	Phosphoinositid 3-Kinase
LDH	Laktatdehydrogenase
LY294002	Hemmer der Phosphoinositid 3-Kinase
M-Phase	Mitose-Phase
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MgCl	Magnesiumchlorid
MR	Mineralocorticoidrezeptor
MK801	Blocker des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors
N <sub>2</sub>	Stickstoff
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NBM	Neurobasales Medium
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase
OGD	<i>oxygen-glucose deprivation</i> , Sauerstoff-Glukose-Entzug
p53	Tumorsuppressorprotein
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PO <sub>2</sub>	partieller Sauerstoffdruck
Rb	Retinoblastomprotein
RU 486	Mifepriston, Glucocorticoidrezeptorantagonist
S-Phase	DNA-Synthese
SDS	<i>sodium dodecylsulfat</i> , Na-Dodecylsulfat
SGK	Serum und Glucocorticoid-induzierte Kinase

SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfat
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Zusatz von Tween 20
Tris-HCl	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, Hydrochlorid

## **Anhang**

### **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## **Publikationsliste**

- Blei K, Herwig U, Harms C, Freyer D, Katchanov J, Dirnagl U, Hörtnagl H (2002). Corticosterone attenuates apoptotic neuronal cell death in primary neuronal cultures of rat cerebral cortex. Poster 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience.
- Kapinya KJ, Harms U, Harms C, Blei K, Katchanov J, Dirnagl U, Hortnagl H (2003). Role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase in the progression of neuronal cell death in vitro and following cerebral ischaemia in vivo. J Neurochem. 2003 84:1028-39.
- Harms C, Albrecht K, Harms U, Seidel K, Hauck L, Kronenberg G, An J, Ruscher K, Meisel A, Dirnagl U, von Harsdorf R, Endres M, Hörtnagl H (2006) PI3-Akt-kinase dependent phosphorylation of p21WAF1/CIP1 as a novel mechanism of neuroprotection by glucocorticoids. J Neuroscience in revision.

## **Danksagung**

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. H. Hörtnagl für die Möglichkeit dieses Dissertationsthema zu bearbeiten, die unermüdliche und liebevolle Betreuung bei der praktischen und vor allem bei der theoretischen Arbeit, die kritische Durchsicht der Dissertation, sowie der fachlich aufschlussreichen Gespräche.

Herrn Prof. Dr. U. Dirnagl danke ich für die Möglichkeit in den Laboren des Instituts für Experimentelle Neurologie meine Experimente durchzuführen. Frau Dr. Dorette Freyer und Frau Renate Gusinda danke ich für die Unterstützung meiner praktischen Arbeit.

Herrn Dr. Christoph Harms danke ich für die Vermittlung und Einarbeitung in die verschiedenen Arbeitsmethoden, sowie die zahlreichen fachlichen Anregungen und Diskussionen und nicht zuletzt für die Durchsicht der schriftlichen Arbeit.

Frau Astrid Arnswald danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung wichtiger Experimente, Frau Hannelore Glatte danke ich für die Erstellung der Graphiken für die Präsentation meiner Arbeit bei einem internationalen Kongress.

Meiner Familie gilt ein besonderer Dank für die hervorragende Unterstützung und Begleitung auf meinem Lebensweg.

Gewidmet ist diese Arbeit meinem geliebten Michael, der in dieser Zeit mit seiner liebevollen Geduld und Hilfe ein wichtiger Rückhalt für mich war, sowie meinem Sohn Johannes.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Katharina Albrecht, versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter angefertigt und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und dass die vorliegende Dissertationsschrift noch von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Marburg, den 31.10.2006