

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. R. Stahl

**Modulation der Glucocorticoidwirkung durch Vitamin B6 und
Dehydroepiandrosteron (DHEA) in menschlichen Immunzellen.**

Dissertation

zu Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Iring Ellebrecht

aus Bremen

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Inhaltsverzeichnis

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

2 Einleitung

2.1 Glucocorticoide	2
2.1.1 Regulation der Glucocorticoide in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse	2
2.1.2 Nebenwirkungen einer Glucocorticoidtherapie	3
2.1.3 Molekularer Wirkmechanismus von Glucocorticoiden	4
2.2 Cytokine	6
2.3 Leukemia inhibitory factor (LIF)	7
2.4 Vitamin B6 (Pyridoxin)	9
2.5 Dehydroepiandrosteron (DHEA)	10
2.5.1 DHEA – Mögliche Nebenwirkungen	12

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur	14
3.2 Plasmide	14
3.3 Transfektion	15
3.4 Luziferase-Assays	15
3.5 Cytokin-ELISAs	16
3.6 Statistische Auswertung	16

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von Vitamin B6 auf GR-vermittelte Transaktivierung	17
4.2 Einfluss von Vitamin B6 auf GR-vermittelte Transrepression	19
4.3 Einfluss von DHEA auf GR-vermittelte Transaktivierung	22
4.4 Einfluss von DHEA auf GR-vermittelte Transrepression bei LIF	23
4.5 Einfluss von DHEA auf GR-vermittelte Transrepression bei IL-1 β , IL-2, IL-4 und IL-6	24

5 Diskussion

6 Zusammenfassung

7 Literatur

Danksagung

Lebenslauf

Erklärung

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

In der Behandlung von autoimmunen und entzündlichen Erkrankungen sind Glucocorticoide weit verbreitet. Auf molekularer Ebene ist hierbei der Mechanismus Transaktivierung im wesentlichen für die unerwünschten Nebenwirkungen, die Transrepression dagegen für die erwünschte Immunsuppression verantwortlich. Ziel experimenteller Forschung ist es daher, Substanzen zu identifizieren, die die Glucocorticoid-vermittelte Transaktivierung hemmen und gleichzeitig die Transrepression verstärken oder unbeeinflusst lassen, um so letztlich ein günstigeres Verhältnis von Nebenwirkungen und erwünschten Wirkungen zu erzielen.

Anhand der Genexpression des proinflammatorischen Cytokins Leukemia Inhibitory Factor (LIF) auf Promotorebene sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob Vitamin B6 und/oder das vorwiegend in der Nebennierenrinde gebildeten Dehydroepiandrosteron (DHEA) diese Kriterien erfüllen.

Konkret stellten sich dabei die folgenden Fragen:

Beeinflusst Vitamin B6 die Glucocorticoidrezeptor-vermittelte Transaktivierung und/oder Transrepression, hier am Beispiel des LIF-Promotors in menschlichen Immunzellen?

Beeinflusst DHEA die Glucocorticoidrezeptor vermittelte Transaktivierung und Transrepression ebenfalls am Beispiel des LIF-Promotors in menschlichen Immunzellen?

2 Einleitung

2.1 Glucocorticoide

Glucocorticoide sind lebenswichtige Steroidhormone, die einerseits endogen im Menschen produziert, andererseits bei der Therapie vieler Krankheiten exogen ergänzt werden.

Das wichtigste endogene Glucocorticoid ist das Cortisol, welches durch diverse Stoffwechselschritte aus dem Cholesterinmolekül in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde entsteht.

Auf molekularer Ebene werden die Effekte von Glucocorticoiden durch den intrazellulär gelegenen Glucocorticoidrezeptor (GR) vermittelt.

2.1.1 Regulation der Glucocorticoide in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse

Im Ruhezustand sezerniert der Hypothalamus in einem pulsatil circadianem Rhythmus das Peptidhormon CRH (Corticotropin-Releasing-Hormon). CRH fördert zusammen mit dem ebenfalls im Hypothalamus gebildetem Vasopressin und Urocortin die Produktion und Freisetzung des Peptidhormons ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) aus dem Hypophysenvorderlappen. [22, 23]

Diese Freisetzung hat wiederum in der Nebennierenrinde einen stimulierenden Effekt auf die Cortisolproduktion. Die normale Tagesproduktion von Cortisol beträgt etwa 20 mg [68]. Das Produktionsmaximum liegt im circadianen Rhythmus zwischen 6-8 Uhr morgens, das Minimum gegen Mitternacht. In Stresszuständen werden größere Mengen an CRH und Vasopressin und somit auch an ACTH und Cortisol freigesetzt.

Dieses Achsensystem wird durch ein negatives Feedback, d.h. die hemmende Wirkung von Cortisol auf die CRH- und ACTH-Produktion, reguliert. [22]

Teile des Immunsystems wie z.B. Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Leukemia inhibitory factor (LIF) aktivieren ebenfalls die Produktion von CRH und ACTH. Das Immunsystem seinerseits wird durch Cortisol in seiner Aktivität gebremst.

2.1.2 Nebenwirkungen einer Glucocorticoidtherapie

Man unterscheidet zwischen einer reinen Substitutionstherapie bei Patienten mit Nebenniereninsuffizienz und einer Pharmakotherapie mit supraphysiologischen Glucocorticoiddosen.

Bei Patienten mit Hypocortisolismus zeigen sich besonders in Stresssituationen häufig Symptome wie Müdigkeit, Hypotonie und Hypoglykämie. Auch eine erhöhte Inzidenz von Autoimmunphänomenen wird beobachtet. Bei einer nicht adäquaten Substitution der Glucocorticoide besteht die Gefahr eines Katecholamin-refraktären Schocks. Die Therapie wird mit dem physiologischen Glucocorticoid Cortisol (= Hydrocortison), Prednisolon oder Dexamethason mit einer Dosis im physiologischen Bereich (ca. 5-7,5 mg Prednisolon-Äquivalent) durchgeführt. Diese sollte in Stresssituationen auf das 2-3fache gesteigert werden. Eine korrekt durchgeführte Substitutionstherapie ist als nebenwirkungsfrei anzusehen. [41]

Bei der Pharmakotherapie hingegen ist aufgrund der supraphysiologischen Glucocorticoiddosen stets mit Nebenwirkungen zu rechnen. [41, 71] Den immunsuppressive/antientzündliche Effekt des Glucocorticoids macht man sich bei autoimmun, nichtinfektiös-entzündlichen oder allergisch bedingten Erkrankungen zu Nutze. Demgegenüber stehen metabolische, kardiovaskuläre und zentralnervöse Nebenwirkungen, die Ausdruck einer erhöhte GR-Aktivität sind. Eine genaue Cushing-Schwellendosis ergibt sich aufgrund interindividueller Unterschiede bezüglich der Sensitivität gegenüber Glucocorticoiden nicht. Bei längeren Therapien über ca. 4 Wochen mit mehr als 5 mg Prednisolonäquivalent nimmt die Wahrscheinlichkeit ausgeprägterer, z.T. irreversibler Nebenwirkungen jedoch deutlich zu. [41]

Durch die systemische Gabe von Glucocorticoiden kommt es zu einer Inhibition der zentralen CRH- und ACTH-Freisetzung, die eine Unterdrückung der endogenen Cortisolproduktion zur Folge hat. Bei Unterschreiten der Substitutionsdosis ist die Entwicklung einer sekundären Niereninsuffizienz möglich. Zur Verhinderung dieses Pathomechanismus wird die circadiane Gabe empfohlen. Bei Absetzen des Glucocorticoids bei Ende der Therapie ist eine schrittweise Dosisreduktion sinnvoll.

Zu den metabolischen Nebenwirkungen der Glucocorticoide gehört deren diabetogene Wirkung, so dass bei disponierten Personen diabetische Stoffwechsellagen bzw. Blutzuckerentgleisungen entstehen können. Regelmäßige Blutzuckerkontrollen und gegebenenfalls der angepasste Einsatz von Antidiabetika sind sinnvoll. Des weiteren kann

man bei 30-50 % der Patienten mit längerfristiger Glucocorticoidtherapie eine Steroid-induzierte Osteoporose mit signifikanten Knochenmasseverlusten beobachten. [49] Als Therapie erscheint die Supplementierung von Calcium, die Gabe von Biphosphonaten. [2] sowie ein Ausgleich eines eventuellen Vitamin D-Mangels sinnvoll.

Kardiovaskulär ist die arterielle Hypertonie eine häufige Komplikation, die mit den gewöhnlichen Antihypertonika behandelt werden sollte. [41,71]

Die zentralnervösen Nebenwirkungen der Glucocorticoidtherapie sind nur zum Teil erforscht. Es kann beim Patienten zu euphorisierenden, aber auch zu depressiven Wirkungen, in selteneren Fällen auch zu einer Steroidpsychose kommen. Diese können in letzterem Falle den Einsatz von Neuroleptika erfordern.

Patienten unter Steroidtherapie zeigen durch die therapeutisch erwünschte Immunsuppression eine erhöhte Anfälligkeit für Infekte.

Eine regelmäßige augenärztliche Untersuchung ist aufgrund der Katarakt- und Glaukom-fördernden Wirkung von Glucocorticoiden zu empfehlen. [41]

Bei kurzfristigen Glucocorticoidtherapien unter ca. 4 Wochen können die vorwiegend auftretenden Nebenwirkungen wie Verschlechterung einer diabetischen Stoffwechsellage, arterieller Blutdruckanstieg und Induktion psychischer Veränderungen meist durch eine Pharmakotherapie beherrscht werden.

2.1.3 Molekularer Wirkmechanismus von Glucocorticoiden

Durch eine Stimulation oder Inhibition der Transkriptionsrate von Hormon-responsiven Zielgenen wirken Glucocorticoide auf zellulärer und molekularer Ebene. [15-17, 77, 78]

Die therapeutisch bedeutsame Supprimierung des Immunsystems wird durch Inhibition der dafür verantwortlichen Gene, wie z.B. dem IL-2-Gen bewirkt. [13, 60, 63 ,80]

Über den ubiquitär exprimierten Glucocorticoidrezeptor (GR) werden alle transkriptionellen Effekte der Glucocorticoide vermittelt. Dieser ist ein im Cytosol lokalisiertes 770

Aminosäuren langes und somit ca. 94000 Dalton großes Protein [36] und zeigt eine Drei-Domänen-Struktur. Diese lässt sich unterscheiden in die N-terminale lokalisierte

Transaktivierungs-Domäne, die C-terminale Hormonbindungs-Domäne und die von ihnen eingeschlossene DNA-Bindungsdomäne. Im unligierten Zustand ist der GR in fast allen

Zelltypen im Cytosol an sog. Hitzeschockproteine (*Heat Shock Proteins* = HSPs) gebunden [38,42,64,75] und dadurch inaktiviert. Die HSPs sorgen als Chaperone für die korrekte

dreidimensionale Faltung intrazellulärer Proteine. Zur Abspaltung des GR-Rezeptors vom

HSP-Komplex kommt es in einem nicht ganz aufgeklärten Prozess durch das Eindringen von Glucocorticoiden ins Cytosol, welche als lipophile Substanzen die Zellmembran ungehindert durchdringen können. Nach Bindung des spezifischen Liganden des Hormons an die C-terminale Ligandenbindungs-Domäne wird dieser Komplex in den Zellkern transloziert. Im Kern moduliert dieser Hormon-aktivierte Rezeptor die Gentranskription vorwiegend in zwei Richtungen, die Transaktivierung und die Transrepression. [15,16]

Die Transaktivierung ist besonders für die Regulation von kardiovaskulär und metabolisch relevanten Genen bedeutsam. Sie wird bewirkt durch das Binden eines Homodimer aus zwei GR-Molekülen an eine spezifische DNA-Sequenz in der Promotorregion des jeweiligen Glucocorticoid-responsiven Gens. Diese Palindrom-DNA-Sequenz-Basenfolge: „GGTACA-NNN-TGTTCT – bezeichnet man als *Glucocorticoid Response Element* (GRE). [33, 95]

Die Transrepression ist für inhibitorisch beeinflusste Gene verantwortlich, somit vorwiegend für solche mit immunologischer Wirkung, wie z.B. das IL-2-Gen. Die Promotoren dieser Gene sind Glucocorticoid-responsiv obwohl die Promotoren dieser Gene keine Bindungsstellen für GR enthalten. Die Aktivierung erfolgt hier vorwiegend über ein Homodimer aus zwei Proteinen der Jun-Protoonkogen-Familie oder einem Jun/Fos-Heterodimer. Diesen Transkriptionsfaktor bezeichnet man als *Activating Protein 1* (AP1). [7, 43, 65]

Des weiteren kann scheinbar auch der stimulierende Effekt von AP-1 auf die Transkription von hormon-aktiviertem GR antagonisiert werden, ohne dabei selbst direkt an die DNA zu binden (siehe Abb. 1). [40, 48, 69, 91]

So ist die Transaktivierung als Steigerung der Transkriptionsrate von Glucocorticoid-Zielgenen für die meisten kardiovaskulären, metabolischen und wahrscheinlich auch zentralnervösen Wirkungen verantwortlich, während der Transrepression durch Inhibierung von Gentranskription die meisten immunsuppressiven Glucocorticoideffekte zuzuschreiben sind.

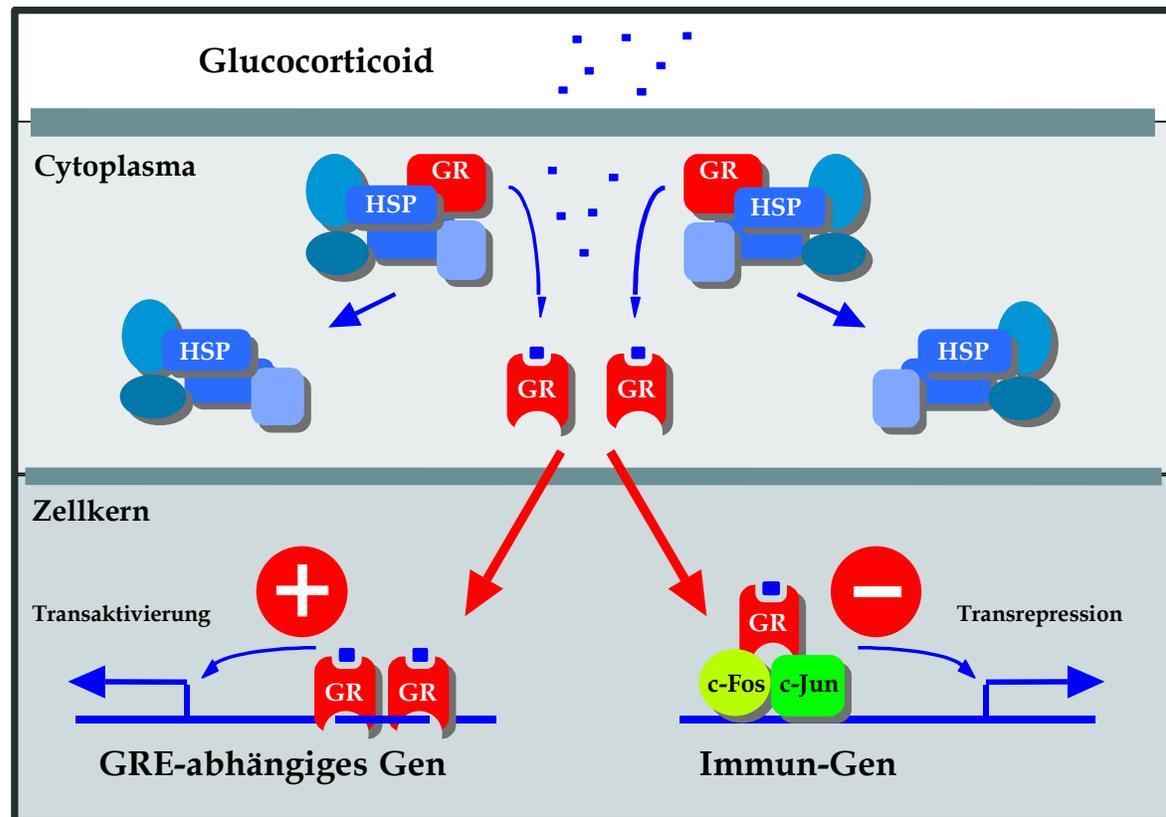


Abb. 1 – Transaktivierung und Transrepression von Glucocorticoiden

2.2 Cytokine

Die Bezeichnung Cytokine wird heute für eine Gruppe von diversen löslichen Proteinen benutzt, welche als humorale Regulatoren in nano- und picomolaren Konzentrationen wirken.

Die meisten Cytokine sind Glycoproteine, die durch die Zellen über normale sekretorische Wege sezerniert werden. Im Gegensatz zu Hormonen werden Cytokine nicht in spezifischen Drüsen, sondern meist in einer Vielzahl von unterschiedlichen Zellen und Geweben produziert. Auch haben viele Cytokine multiple Zielzellen und -gewebe. Viele Cytokine zeigen stimulierende oder inhibitorische Aktivitäten, die auch andere wirkende Faktoren verstärken oder abschwächen können. Die meisten von ihnen werden nicht in Zellen gespeichert sondern nur vorübergehend durch die Regulation der Gen-Expression produziert.

Cytokine sind auch an der Embriogenese und der Organentwicklung beteiligt; sie beeinflussen die Mitose, die Differenzierung und die Migration (z.B. durch Chemotaxis) von Zellen. Auch der neuroimmunologische, -endokrinologische und -regulatorische Prozess wird von ihnen beeinflusst. So regulieren z.B. Interleukin (IL) 1, IL-2, γ -Interferon, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) α und TNF- β das Wachstum, Überleben und die Genexpression von Neuronen und Gliazellen *in vitro*. Die biologische Aktivität von Cytokinen wird durch spezifische Membranrezeptoren übertragen, die theoretisch von fast allen Zellarten exprimiert werden können.

Als Beispiel für die Modulation der Glucocorticoidwirkung dient in dieser Arbeit u.a. das Cytokin *Leukemia inhibitory factor* (LIF).

2.3 Leukemia inhibitory factor (LIF)

Leukemia inhibitory factor (LIF) ist ein 58 kD großes und 179 Aminosäuren langes pleiotropes Cytokin mit diversen Effekten in verschiedenen Organsystemen. Im Zusammenhang mit der Fähigkeit, die Differenzierung und den Tod von murinen M1 Leukämie-Zellen zu induzieren, wurde LIF zum ersten Mal beschrieben. [54]

Die Produktion von LIF konnte in verschiedenen Zellen nachgewiesen werden: in aktivierten T-Lymphocyten-Klonen nach Antigen-Stimulation [34,58], in Fibroblasten, in endothelialen Zellen, in Chondrocyten menschlicher Gelenke, sowie in Synoviocyten [47], in welchen eine Stimulation der Induktion von anderen Cytokinen und Proteasen nachgewiesen werden konnte. [84] Die Hauptproduktion von LIF erfolgt jedoch in aktivierte T-Lymphocyten. LIF spielt eine wichtige Rolle in der Frühphase der Schwangerschaft bei der Implantation des Blastocysten im Uterus. Während des potentiellen Implantationszeitpunktes in der mittleren und späten sekretorischen Phase im Zyklus der Frau zeigt das Endometrium die höchste Produktion von LIF mRNA und -Protein.[85]

Hohe LIF-Titer zeigten sich bei diversen pathologischen Zuständen. So lassen sich erhöhte Spiegel in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Rheumatoider Arthritis finden. [47] Auch auf eine mögliche Beteiligung an der Entstehung von Osteoporose deutet die Induktion der Knochenresorption und Zunahme der Anzahl von Osteoklasten durch LIF hin. [1]

Einen weiteren Funktionsbereich scheint LIF bei der neuralen Entwicklung und bei Reparaturvorgängen an Nerven zu haben.

Es zeigt sich des weiteren eine LIF-Expression in den senilen Plaques bei Morbus Alzheimer, so dass auch hier möglicherweise LIF als Mediator einer inflammatorischen Reaktion in Frage kommt. [66]

LIF stimuliert des weiteren die Produktion von pro-inflammatorischen Cytokinen durch menschliche Monocyten im Blut [84] und ist möglicherweise bedeutend an der Pathogenese der Sepsis beteiligt. Eine Korrelation mit anderen entzündungsrelevanten Parametern ist bislang jedoch noch nicht erfolgt.

Eine reduzierte Anzahl von pluripotenten Stammzellen und beeinträchtigte Reifung des Thymus bei homozygoten LIF-knock-out-Mäusen [31] deutet auf eine wichtige Rolle dieses Cytokins bei der Hämatopoese hin. LIF wirkt hier als ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der die Blutzellvorstufen als Co-Faktor zum Wachstum anregt. [44]

LIF-Überexpression, z.B. durch Injektion von hohen Dosen LIF in Mäuse und Rhesusaffen führt zu einer Zunahme der Thrombozyten, der Megakaryocyten in der Milz, einer Splenomegalie, einer Akuten-Phase-Reaktion, überschießender Knochenneubildung und einer Dysgenese der Gonaden. [50,53,55]

LIF spielt des weiteren zusammen mit anderen Cytokinen wie IL-1, TNF- α , IL-6 und IFN- γ eine Rolle als Inhibitor der Adipogenese. So inhibiert LIF z.B. bei Tumorkachexie die Lipoproteinlipase (LPL) der Adipozyten.

Der LIF-Rezeptor (LIF-R) gehört zu der IL-6-Cytokin-Familie, der Interleukin 6, Interleukin 11, Onkostatin M, Ciliary neurotrophic factor (CNTF) und Cardiotrophin 1 (CT-1) angehören. Sie alle besitzen als Untereinheit eine gleiche, ca. 100 kD große Glycoprotein gp130-Rezeptor-Untereinheit. Neben dem membrangebundenen LIF-R existiert ein als Antagonist wirkender löslicher LIF-R, der im menschlichen Urin und Plasma nachgewiesen werden konnte. [94]

LIF wirkt in den verschiedenen Geweben über die Jak-STAT (janus kinase-signal transducer and activator of transcription)-Kaskade und wird durch negatives Feedback über SOCS (suppressor-of-cytokine-signaling proteins) autoreguliert. Im einzelnen führt bei LIF-R, wie bei allen anderen Cytokinen der IL-6-Familie in ähnlicher Weise, die Ligandenbindung am Rezeptor zu einer Konformationsänderung und zu einer Heterodimerisation des LIF-R-gp130-Komplexes. Dieses bewirkt eine Aktivierung von Jak1 und Jak2, die an die cytoplasmatischen Rezeptoruntereinheiten gp130 und LIF-R angelagert sind und führt zur Phosphorylierung der

selben und einer sich daraus ergebenden Ankoppelungsmöglichkeit für die SH-2-Domäne von STAT-Proteinen. Eine Bindung dieser Proteine verursacht eine weitere Phosphorylierung und Dimerisation von STAT-1, STAT-3 oder STAT-5a. Diese Komplexe binden, nachdem sie in den Nucleus transloziert sind, mit ihrer DNA-Bindungsdomäne an spezifische STAT-Bindungselemente in der DNA und bewirken dadurch eine Aktivierung der Transkription. Die Inhibierung der Jak-STAT-Signalkaskade kann über SOCS-1 und/oder SOCS-3 erfolgen. So reduziert eine hohe Expression von SOCS-3 die Phosphorylierung von gp130 und STAT-3; SOCS-1 dagegen inhibiert die Jak2-Aktivität. Die Genexpression von SOCS-1 und SOCS-3 ist von STAT-3 abhängig, so dass ein autoreglatives negatives Feedback besteht. [9] Es ist anzunehmen, daß für die Verstärkung der LIF-Promotor-Aktivität, ets-Transkriptionsfaktoren die an ets-Bindungsstellen am menschlichen LIF-Promotor binden, eine erhebliche Rolle spielen. [11] Ets-Proteine sind eine „Familie“ von Transkriptionsfaktoren, die an spezielle DNA-Sequenzen (GGAA/T) binden. Diese finden sich bei diversen viralen und zellulären Transkriptionsvorgängen, die u.a. für die zelluläre Proliferation, Differentiation, Transformation und Apoptose verantwortlich sein können.

2.4 Vitamin B6 (Pyridoxin)

Vitamin B6 ist ein Überbegriff der Derivative von 3-Hydroxymethyl-2-Methylpyridin wie Pyridoxin, Pyridoxamin und Pyridoxal. Sie kommen in hohen Konzentrationen in Nahrungsmitteln wie Hefe, Weizen, Mais und Leber vor. Die Resorption dieses wasserlöslichen Vitamins erfolgt im Jejunum. Eine Dosis von 100mg Vitamin B6 zeigt beim Menschen 2 Stunden nach Aufnahme die höchste Konzentration im Plasma; in Folge besteht eine Halbwertszeit von ca. 8 Stunden. [37] In den menschlichen Geweben, besonders in der Leber wird resorbiertes Pyridoxol und Pyridoxal durch eine ATP-abhängige Pyridoxkinase zu Pyridoxalphosphat (PLP) phosphoryliert. Letzteres ist die im menschlichen Körper aktive Form des Vitamin B6 und das Coenzym des Aminosäurestoffwechsels - hierbei wird eine Schiff-Base zwischen der Aldehydfunktion des Coenzym und der Aminogruppe des Aminosäure gebildet. So ist Vitamin B6 ein Cofactor in der Umwandlung von Tryptophan zu 5-Hydroxytryptamin und von Methionin zu Cystein. Es dient zum Beispiel unter anderem zur Decarboxylierung von bestimmten Aminosäuren zur Synthese von Neurotransmittern wie Serotonin, Noradrenalin, Gamma-Aminobuttersäure (GABA) und Histamin.

Der tägliche Bedarf dieses wasserlöslichen Vitamins ist weitestgehend abhängig von der Proteinaufnahme und beträgt pro 100g zugeführtem Protein 1,5 - 2mg (9 -12 μ mol). Meist leichte Vitamin B6-Mangelzustände können vermehrt bei Alkoholikern, Patienten mit chronischem Nierenversagen und Frauen mit hormoneller Kontrazeption beobachtet werden. Es kann hierbei zu einer verminderten Immunabwehr, peripherer Neuritis, Hautveränderungen, wie Schleimhautläsionen und seborrhoischer Dermatitis und Veränderungen der zerebralen Funktion, wie Depression, Ataxie, Übelkeit und Erbrechen kommen. [46]

Hohe Dosen von Vitamin B6 können als unerwünschte Wirkung neurotoxisch wirken und unter anderem zu sensiblen Neuropathien führen. [67]

Auch der Glucocorticoidrezeptor wird von Vitamin B6 beeinflusst. So zeigten sich in Zellkulturen mit einfachen Promotoren, die nur Hormon-responsive Elemente und eine TATA-Sequenz enthielten, zwar keine veränderte Glucocorticoid-induzierte Gen-Expression durch verschiedene Vitamin B6-Konzentrationen. Sobald aber dem Hormone-responsiven Element eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor „nuclear factor 1“ (NF1) hinzugefügt wurde, war unter erhöhten Vitamin B6-Spiegeln die Genexpression durch Glucocorticoide vermindert. Gegenteilige Effekte waren bei leichtem Vitamin-B6-Mangel mit einer vermehrten glucocorticoid-induzierten Genexpression zu beobachten. [4-6]

Die durch Vitamin B6 verminderte Genexpression zeigte sich auch bei anderen Steroidhormonrezeptoren, wie den Androgen-, Progesteron- und Oestrogenrezeptoren. Ein Vitamin B6-Mangel, verursacht durch den Vitamin B6-Antagonisten 4-Deoxypyridoxin, führten auch bei diesen Rezeptoren zu einer verstärkten Genexpression. [3]

2.5 Dehydroepiandrosteron (DHEA)

Dehydroepiandrosteron (DHEA) wurde 1931 von dem deutschen Chemiker A. Butenandt im menschlichen Urin entdeckt.

DHEA und die im Blutplasma überwiegende Sulfatester-Form DHEA-S sind hauptsächlich von der menschlichen Nebennierenrinde (Zona reticularis) produzierte Androgene. Eine freie Umwandlung dieser beiden Formen scheint durch eine Sulfotransferase und einer Sulfatase außerhalb der Nebennieren möglich. [8] Eventuell agiert das mit einer längeren

Halbwertszeit (ca. 7-22 Stunden, im Vergleich zu DHEA mit 15-38 Minuten). ausgestattete DHEA-S als Speicherform im Plasma und sorgt so für eine Feinregulation der DHEA-Konzentration außerhalb der Nebenniere. [74] Die Stimulation zur Produktion von DHEA erfolgt neben über Proopiomelanocortin (POMC) und ACTH, möglicherweise über weitere noch nicht aufgeklärte Wege.

Für die Synthese von DHEA erfolgt eine Protein-Kinase vermittelte Umwandlung von Cholesterin in Pregnenolon in den Mitochondrien der Steroid-umwandelnden Zellen.

Im Cytosol erfolgt durch das Enzym P450c17 der Umbau in 17- α -Hydroxypregnenolon.

Infolge Abspaltung einer Seitenkette durch das Enzym C17,20-Lyase entsteht DHEA.

In der Nebenniere gebildetes DHEA wird sulfatiert und unter anderem als Testosteron-Vorläufer in den Testes verwendet. Es wird des weiteren im Skelettmuskel und Fettgewebe zu Estradiol, aber auch zu Testosteron umgebaut.

Im Leydig-Zellen-Cytosol der Testes wird DHEA durch das Enzym 17- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu Δ 5-Androstendiol und anschließend unter anderem durch einen Dehydrogenase-Isomerase-Komplex in Testosteron umgewandelt. [46]

Auch in neonatalen Rattengehirnen konnte die Bildung von DHEA und des Schlüsselenzyms P450c17 durch Neuronen und Astrozyten nachgewiesen werden, hier zeigte sich ein Antagonismus zum GABA-Rezeptor (Typ A) und als Modulator des N-methyl-D-Aspartat Rezeptors. [96,97] Gaben von DHEA zeigten eine Zunahme des Testosteron-Plasmaspiegels bei Männern und Frauen.

Die höchsten Plasmaspiegel von DHEA und DHEA-S existieren um das 25. Lebensjahr. Basale Konzentrationen im Blutplasma sind in etwa 500 ng/dL DHEA und 200000 ng/dL DHEAS. Ab ca. dem 40. Lebensjahr finden sich rasch sinkende Konzentrationen dieser Hormone. Die Plasmakonzentration von 70-jährigen entsprechen nur noch 5-10 % von Jugendlichen. [18]. Dieses steht im Gegensatz zu vielen anderen Nebennierenrindenhormonen, die nicht derart deutliche Veränderungen abhängig vom Lebensalter zeigen.

Ein ähnlicher Abfall der Plasmakonzentrationen mit zunehmendem Alter findet sich beim Insulin-like growth factor-I (IGF-I) welches im Körper anabole Funktionen wahrnimmt. Eine DHEA-Substitution führt auf bisher nicht aufgeklärte Weise zu einem Anstieg von IGF-1 im Blutplasma. [57]

Einige Studien erweisen die Korrelation von sinkenden DHEA-Serumspiegeln und eine Zunahme von typischen Alterserkrankungen wie erhöhter Carcinominzidenz, Artherosklerose, Osteoporose, verminderte Immunabwehr, sowie erhöhter Mortalität,

Schlaflosigkeit und eine Verminderung des Wohlbefindens. Eine Gabe von DHEA in Doppel-Blind-Studien zeigte eine Zunahme des Wohlbefindens. [82]

Auf eine mögliche Verbesserung von Depressionen weisen einige Untersuchungen hin. So zeigte sich in einer Doppel-Blind-Studie nach 6-monatiger Gabe von 50mg DHEA ein durchschnittlich deutlich verbessertes psychisches und physisches Befinden bei Männern und Frauen. [57]

Auch bei Patienten mit der Autoimmunerkrankung Systemischer Lupus Erythematodes (SLE) verbesserte eine DHEA-Gabe von 200mg pro Tag das Krankheitsbild im Gegensatz zur Placebo-Gruppe. [82]

Auf immunologischer Ebene zeigt sich eine negative Korrelation von DHEA-S und Interleukin-6, letzteres hat eine wichtige Schlüsselrolle in der Immunabwehr und ist bei vielen chronischen Erkrankungen reduziert. [76] Dementsprechend steigen auch mit höherem Alter und sinkenden DHEA-S Konzentrationen der IL-6 Plasmaspiegel durchschnittlich an. [93] DHEA-Gabe bei Mäusen zeigte eine Zunahme der Immunabwehr und durch Stimulation von Osteoklasten und Lymphoidzellen eine Verzögerung einer Osteoporose.

Auch bei älteren Männern, denen über 20 Wochen hohe Dosen von DHEA (50mg pro Tag) gegeben wurden, ließ sich eine Verbesserung des Immunsystems nachweisen. [45] Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei postmenopausalen Frauen in einer Doppel-Blind-Studie. [21] In einigen Studien zeigt sich bei DHEA Gabe eine Reduzierung der Körperfettmasse [27,59] ohne Einfluss auf das Gesamtgewicht [86], in anderen konnte keine Änderung der Fettmasse gefunden werden. [79,88]

Niedrige DHEA-Serumspiegel führen somit möglicherweise zu einer verstärkten Lipogenese und Gluconeogenese und damit zu einer Erhöhung des Risikos für Diabetes mellitus und Herzkrankheiten.

Im Gegensatz zur Annahme in früheren Studien besteht wahrscheinlich kein Zusammenhang zwischen niedrigen Serumspiegeln diese Hormons und Demenzerkrankungen wie z.B. Morbus Alzheimer. [87]

2.5.1 DHEA – Mögliche Nebenwirkungen

So ist DHEA als „Anti-Aging“-Lifestyle-Medikament in den letzten Jahren in die Schlagzeilen gelangt. Nebenwirkungen bei Gabe von DHEA über kurze Zeiträume

(1600mg/Tag über 28 Tage) scheinen eher gering: es zeigten sich leichte Veränderungen im Blutzuckermetabolismus, Akne, leichte Zunahme des Haarwachstums an Armen und Beinen. [81] Auch bei geringeren Dosen von 50-200 mg pro Tag kam es zu Akne (50% der Patienten), vermehrtem Wachstum des Gesichtshaars (18%) und vermehrter Schweißbildung (8%). [83]

Über mögliche Langzeitnebenwirkungen existieren im Moment nur relativ wenig Daten. In Tierversuchen fanden sich bei Forellen und Ratten erhöhte Inzidenzen von Lebertumoren [56,62]. Bei Männern besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen hohen DHEA-Plasmaspiegeln und dem Auftreten von Prostatacarcinomen. [51]

Im Gegensatz zu jungen Frauen, bei denen Mammatumore auch oft mit niedrigen DHEA-Plasmaspiegeln einhergehen, zeigt sich bei postmenopausalen Frauen eine signifikante Verbindung zwischen hohen DHEA-Spiegeln und dem Brustkrebsrisiko. [30,35]

So stellen sich letztendlich folgende Fragen:

Interferiert Vitamin B6 mit einer Glucocorticoidrezeptor-vermittelten Transaktivierung und/oder Transrepression hier am Beispiel des LIF-Promotors ?

Und interferiert DHEA mit einer Glucocorticoidrezeptor vermittelter Transaktivierung und Transrepression am Beispiel des LIF-Promotors ?

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Es wurden sowohl Zelllinien als auch normale menschliche Lymphocyten verwendet.

Menschliche Jurkat T-Lymphomzellen (ATCC, Rockville, MD) bei denen es sich um eine Zelllinie eines T-Zell-Leukämie-Patienten handelt, wurden als Modell für menschliche Lymphocyten verwendet und in RPMI1640-Medium (Invitrogen, Karlsruhe), welches mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin, Streptomycin und L-Glutamin versetzt wurde. Diese in Suspension wachsenden Zellen besitzen keinen endogenen, funktionsfähigen GR. Ebenso wurden HeLa-Zellen (ATCC, Rockville, MD) kultiviert. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie aus einem Adenocarcinom des Cervix uteri. Die Transfektionsexperimente wurden in Vitamin B6-freiem RPMI 1640 durchgeführt.

Die Isolation normaler menschlicher Leukocyten erfolgte aus heparinisiertem, peripherenvenösem Blut gesunder Spender. Die Erythrocyten wurden durch Dichtegradienten-Zentrifugation in Ficoll-Isopaque abgetrennt. Die Leukocyten wurden in RPMI1640-Medium kultiviert, welches mit 10 % FKS, den oben genannten Antibiotika und L-Glutamin supplementiert wurde. Bei den Transfektionsexperimenten wurde zusätzlich 1 µg/ml Phytohämagglutinin (PHA) zugefügt. Dieses entspricht einem Fünftel der zur Aktivierung der Lymphocyten notwendigen PHA-Konzentration und verbessert deren nachfolgende Transfektion. Nach 20-stündiger Kultivierung wurde die Lymphocyten angereicherte Fraktion der nichtadhärenten Zellen abgetrennt und zur Transfektion verwendet.

3.2 Plasmide

pGL3-IL-2-Luciferase wurde wie in der Literatur beschrieben [13,14] hergestellt. Es beinhaltet ein 595 bp Fragment des menschlichen IL-2 Gens (-548/+47), an welchem IL-2 Gentranskription und die Suppression dieser Transkription möglich ist. [60,63,80] Der IL-2 Promoter besitzt Bildungsstellen für AP-1, NF-κB, NF-AT (*nuclear factor* von aktivierten T-Zellen) und *ets*-Transkriptionsfaktoren, aber keine GREs. [60,63,80] pGL3-LIF-Luciferase wurde wie in der Literatur beschrieben [10] hergestellt. Es beinhaltet ein 666 bp Fragment (-629/+37) der 5'-Region des menschlichen LIF Gens mit Bindungsstellen für AP-1, NF-κB, NF-AT und *ets* Transkriptionsfaktoren. [11] pGL3-MMP9-Luciferase enthält die

Promotorregion (570bp) des humanen Matrix-Metalloproteinase 9-Gens (MMP9), welches zwei AP-1 Bindungsstellen beinhaltet. pGL3-GRE-tk81-Luciferase beinhaltet die GRE-Sequenz des humanen Tyrosin Aminotransferase-Promotors, verbunden mit einem kleinen Herpes Simplex Virus Typ 1 Thymidin-Kinase (tk) Promotor. [13,14] PRShGRalpha beinhaltet die vollständige codierende Region des humanen GRalpha mit dem Promotor [36] des aktiven Rous-Sarkom-Virus; dieses Plasmid wurde von Dr. R. Evans (Salk Institute, La Jolla, CA) zur Verfügung gestellt.

3.3 Transfektion

Jurkat-Zellen und normale menschliche Lymphocyten wurden durch Elektroporation transfiziert (250 V, 950 μ F). Jurkat-Zellen wurden mit 10 μ g Reportervektor und 5 μ g Expressionsvektor pRShGRalpha pro 8×10^6 Zellen in einem Volumen von 400 μ l elektroporiert. pRShGRalpha wurde bei der Transfektion hinzugefügt, da diese Zellen keinen funktionierenden GR besitzen. Die höchste Transfektionseffizienz für normale Lymphocyten wurde durch Elektroporation von 50 μ g Reportervektor pro 5×10^6 Zellen in einem Volumen von 250 μ l erzielt. Nach der Transfektion wurden die Zellen in 12-Well-Platten in einer Dichte von 500000 Zellen/Well kultiviert. Nach 12 Stunden wurden die Zellen mit Phorbolster (TPA, $0,5 \times 10^{-7}$ M, Sigma, Deisenhofen) und Ionomycin (1 μ g/ml, Sigma) stimuliert. Dieses entspricht einer Simulation der Lymphocytenaktivierung durch Makrophagen-vermittelte Antigenpräsentation. Diesen stimulierten Lymphocyten wurden außerdem die angegebenen Konzentrationen von Dexamethason, Dehydroepiandrosteron (DHEA), Pyridoxin oder Pyridoxal-5-Phosphat hinzugefügt. HeLa-Zellen wurden wie in der Literatur beschrieben durch Lipofektion [12] bzw. auch wie oben angegeben durch Elektroporation transfiziert. Die Ergebnisse dieser Experimente unterschieden sich nicht signifikant von denen, die mit Vitamin B6-freiem Serum durchgeführt wurden, was darauf hindeutet, dass die Restemengen von Vitamin B6 in normalem RPMI keinen Effekt auf die GR-Funktion haben.

3.4 Luziferase-Assays

Nach weiteren 8 Stunden wurden die transfizierten und wie unter 2.3 angegebenen behandelten Zellen aus den Wells in Eppendorf-Röhrchen transferiert, bei 4000/U für 10 min zentrifugiert, zweimal mit *Phosphate Buffered Saline* (PBS) gewaschen und mit einem

Reporter-Lysispuffer (Promega, Madison, Wisconsin, USA) lysiert. Die Luziferase-Aktivität im Zelllysate wurde in einem Luminometer (Lumat LB 9501, Berthold, Wildbad) bestimmt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal in Triplikaten durchgeführt.

3.5 Cytokin-ELISAs

Zur Untersuchung der Glucocorticoid-modulierten Expression der Cytokine LIF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-18 auf Proteinebene wurden nichttransfizierte menschliche Lymphocyten wie unter 2.1 beschrieben kultiviert und wie oben angegeben stimuliert; die Messung der LIF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 und IL-18-Proteinkonzentration im Zellkulturmedium wurde mit einem jeweiligen spezifischen kommerziellen ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) entsprechend den Angaben der Hersteller (R & D Systems, Wiesbaden) durchgeführt.

3.6 Statistische Auswertung

Sämtliche Experimente wurden mindestens dreimal in Triplikaten durchgeführt. Alle Resultate wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von Vitamin B6 auf GR-vermittelte Transaktivierung

HeLa-Zellen die mit pGL3-GRE-tk81-Luziferase transfiziert wurden, zeigten bei Stimulation mit Dexamethason bei zunehmender Konzentration (10^{-10} M, 10^{-8} M, 10^{-6} M) eine vermehrte Induktion der Reporter-gen-Aktivität (bei Stimulation von Dexamethason 10^{-6} M das 29,7-fache $\pm 16,9$). Die Zugabe von 10^{-3} M Vitamin B6 (Pyridoxin) führte zu einer 58,0 %igen Inhibition dieses Effektes. Dieser Effekt zeigt sich in ähnlicher Form bei Zugabe von 10^{-5} M Pyridoxal-5-Phosphat, der im menschlichen Körper aktiven Form von Vitamin B6 (siehe Abb. 2 - „Transaktivierung HeLa-Zellen“).

Diese Transaktivierung zeigte sich bei anderen Zelltypen nicht. So ergab sich bei Jurkat-Zellen, die mit pRShGRalpha und pGL3-GRE-tk81-Luziferase Reporter Plasmid cotransfiziert und mit Dexamethason in verschiedenen Konzentrationen stimuliert wurden, eine dosisabhängige Erhöhung der Reporter-gen-Aktivität bis zum 43,4-fachen bei 10^{-6} M Dexamethason. Dieses Reporter-gen-Stimulation wurde bei den Jurkat-Zellen nicht durch 10^{-6} M Pyridoxin oder 10^{-6} M Pyridoxal-5-Phosphat inhibiert (siehe Abb. 3 - „Transaktivierung Jurkat-Zellen“).

Auch bei mit TPA und Ionomycin vorbehandelten und mit pGL3-GRE-tk81-Luziferase Reporter Plasmid transfizierten normalen menschlichen Lymphozyten, denen Dexamethason in verschiedenen Konzentrationen hinzu gegeben wurde, zeigte sich eine Induzierung der Reporter-gen-Aktivität, abhängig von der Dexamethason-Dosis bis zum 6,0-fachen bei 10^{-6} M, aber keine signifikante Inhibierung der Aktivität unter Zugabe von 10^{-6} M Pyridoxin oder 10^{-6} M Pyridoxal-5-Phosphat (siehe Abb. 4 - „Transaktivierung humane Lymphozyten“).

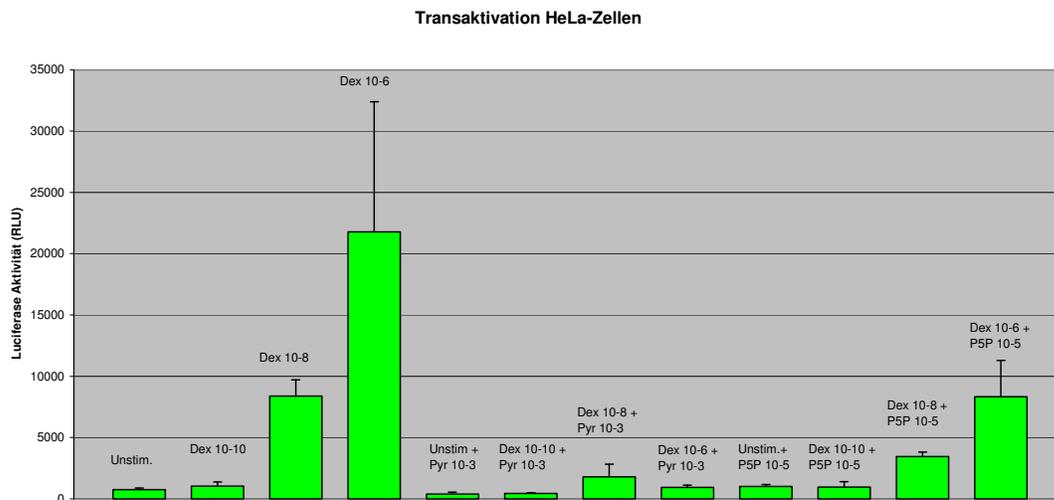


Abb. 2 – Transaktivierung HeLa-Zellen

Legende: Unstim.= Unstimuliert; Dex = Dexamethason 10^{-10} M, 10^{-8} M, 10^{-6} M;
 Pyr = Pyridoxin 10^{-3} M, P5P = Pyridoxal-5-Phosphat 10^{-5} M

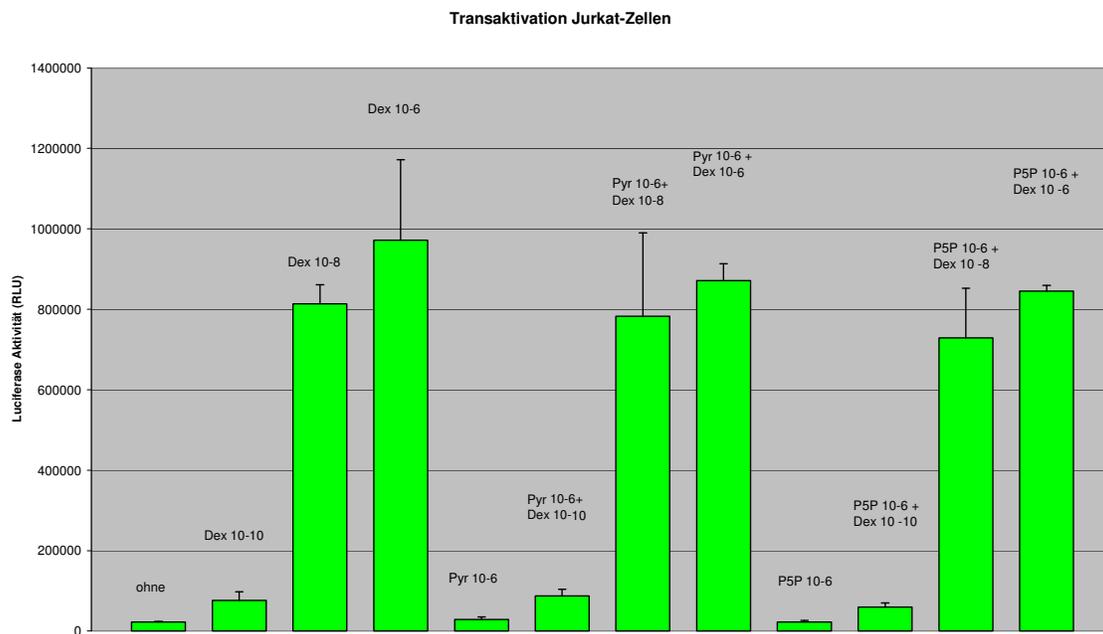


Abb. 3 - Transaktivierung Jurkat-Zellen

Legende: ohne= Unstimuliert; Dex = Dexamethason 10^{-10} M, 10^{-8} M, 10^{-6} M;
 Pyr = Pyridoxin 10^{-6} M, P5P = Pyridoxal-5-Phosphat 10^{-6} M

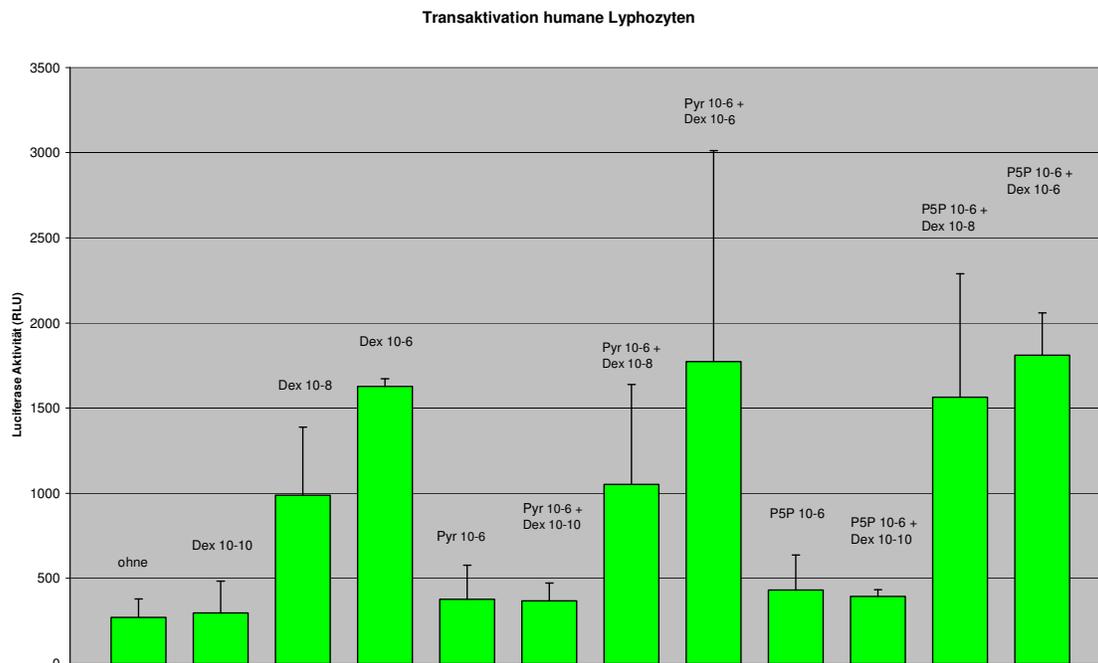


Abb. 4 – Transaktivierung humane Lymphozyten

Legende: ohne= Unstimuliert; Dex = Dexamethason 10^{-10} M, 10^{-8} M, 10^{-6} M;

Pyr = Pyridoxin 10^{-6} M, P5P = Pyridoxal-5-Phosphat 10^{-6} M

3.3. Einfluss von Vitamin B6 auf GR-vermittelte Transrepression

HeLa-Zellen, die mit einem AP-1 abhängigen pGL3-MMP9-Luziferase-Konstrukt (Matrix metalloproteinase 9) transfiziert wurden, zeigte sich eine TPA-stimulierte Reportergen-Aktivität, die um $54,3 \pm 22,1$ % durch 10^{-6} M und 10^{-8} M Dexamethason inhibiert wurde. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Werte bei Zugabe von 10^{-3} M Pyridoxin und 10^{-5} M Pyridoxal-5-Phosphat (siehe Abb. 5 - „Transrepression HeLa-Zellen / MMP9“).

4.2 Einfluss von Vitamin B6 auf GR-vermittelte Transrepression

Bei Jurkat-Zellen, die mit pRShGRalpha transfiziert und mit Dexamethason in verschiedenen Konzentrationen (10^{-8} M, 10^{-6} M) behandelt wurden, zeigte sich eine Dexamethason-Dosis-abhängige Reduktion der Werte von Leukemia inhibitory factor (LIF) um bis zu 51,7 % im ELISA. Das Ergebnis unterschied sich nicht signifikant bei Zugabe von 10^{-3} M Pyridoxin oder 10^{-5} M Pyridoxal-5-Phosphat (siehe Abb. 6 - „Transrepression Jurkat-Zellen / LIF“).

Bei mit TPA und Ionomycin vorbehandelten normalen menschlichen Lymphozyten, denen Dexamethason in verschiedenen Konzentrationen (10^{-8} M, 10^{-6} M) hinzu gegeben wurde, zeigten sich bei Dexamethason-Konzentrations-abhängige Reduktion der Werte im LIF-ELISA um bis zu 78,8 %. Diese wurden durch Zugabe von 10^{-3} M Pyridoxin um weitere 12,4 % reduziert. Versuche mit Konzentrationen von 10^{-6} M Pyridoxin zeigten diesen Effekt nicht. So scheint sich ein immunsuppressiver Effekt eher bei höheren Konzentrationen von Pyridoxin einzustellen (siehe Abb.7 - „Transrepression humane Lymphozyten / LIF“).

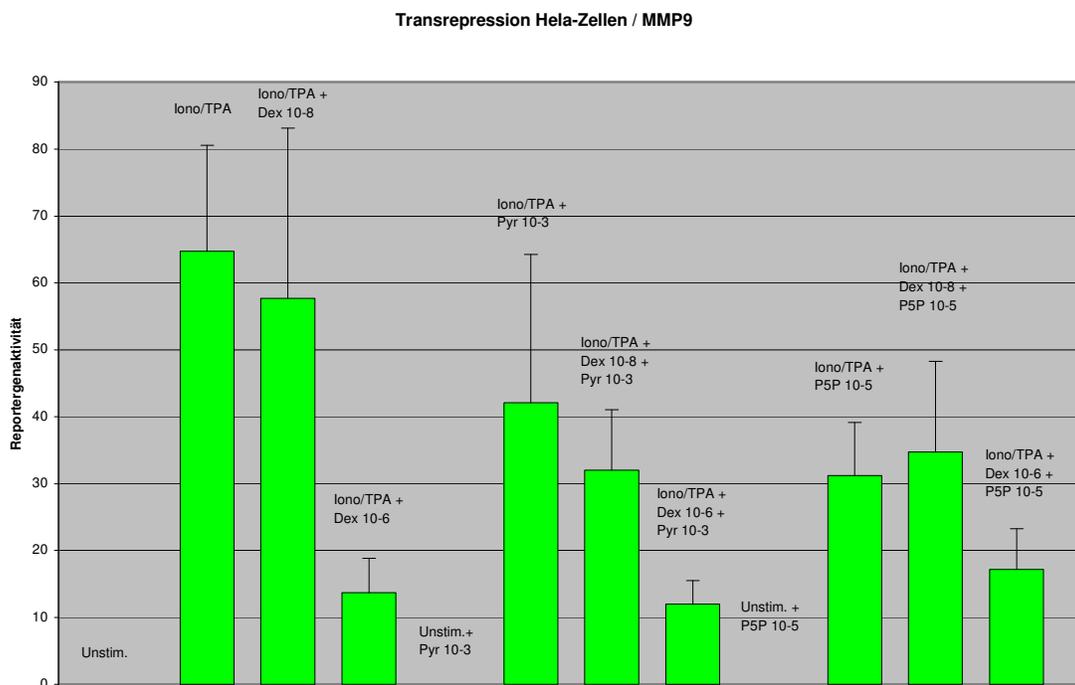


Abb. 5 – Transrepression HeLa-Zellen/MMP9-Promotor

Legende: TPA = Phorbol Ester 0.5×10^{-7} M; Iono = Ionomycin 1 $\mu\text{g/ml}$;

Unstim.= Unstimuliert; Dex = Dexamethason 10^{-8} M, 10^{-6} M; Pyr = Pyridoxin 10^{-3} M, P5P = Pyridoxal-5-Phosphat 10^{-5} M

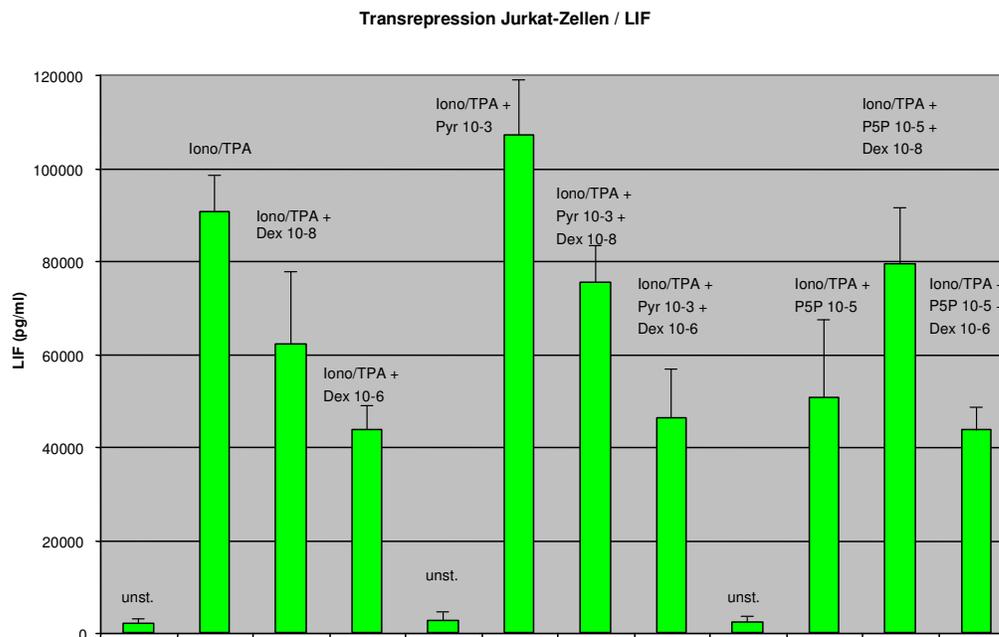


Abb. 6 – Transrepression Jurkat-Zellen / LIF

Legende: TPA = Phorbol Ester 0.5×10^{-7} M; Iono = Ionomycin $1 \mu\text{g/ml}$;

Unstim.= Unstimuliert; Dex = Dexamethason 10^{-8} M, 10^{-6} M; Pyr = Pyridoxin 10^{-3} M,

P5P = Pyridoxal-5-Phosphat 10^{-5} M

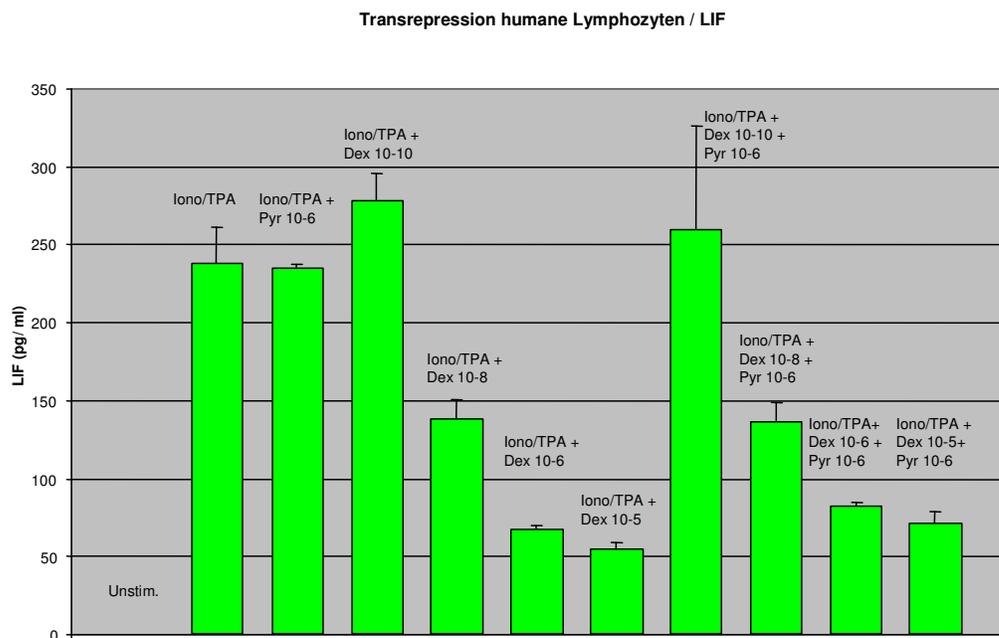


Abb. 7 – Transrepression Lymphozyten / LIF

Legende: TPA = Phorbol Ester 0.5×10^{-7} M; Iono = Ionomycin $1 \mu\text{g/ml}$; Unstim.=

Unstimuliert; Dex = Dexamethason 10^{-10} M, 10^{-8} M, 10^{-6} M; Pyr = Pyridoxin 10^{-6}

4.3 Einfluss von DHEA auf GR-vermittelte Transaktivierung

Humane Lymphozyten, die mit TPA und Ionomycin vorbehandelt wurden und mit pGL3-GRE-tk81-Luziferase Reporter Plasmid transfiziert wurden, zeigten unter Zugabe verschiedener Dexamethason-Konzentrationen (10^{-10} M, 10^{-8} M, 10^{-6} M) keine signifikanten Unterschiede in der Reporter-Gen-Aktivität mit und ohne Dehydroepiandrosteron (DHEA, 10^{-6} M). Eine Dexamethason-Dosis abhängige Verstärkung der Reporter-Gen-Aktivität bis zum 3,6-fachen war indes zu beobachten (siehe Abb. 8 - „Transaktivierung humane Lymphozyten“).

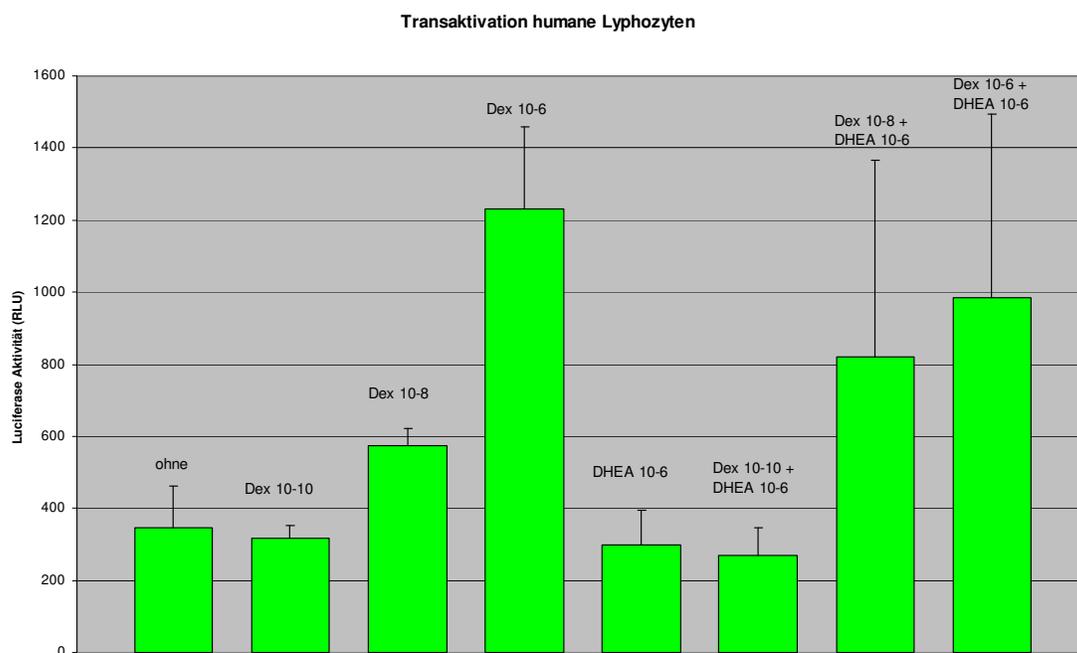


Abb. 8 - Transaktivierung humane Lymphozyten

Legende: Ohne= Unstimuliert; Dex = Dexamethason 10^{-10} M, 10^{-8} M, 10^{-6} M;
DHEA = Dehydroepiandrosteron 10^{-6} M

4.4 Einfluss von DHEA auf GR-vermittelte Transrepression bei LIF

Bei der Stimulierung von normalen menschlichen Lymphozyten mit TPA und Ionomycin und unter Zugabe von Dexamethason in unterschiedlicher Konzentration (10^{-10} M, 10^{-8} M, 10^{-6} M) und mit ohne DHEA (10^{-6} M) zeigten sich divergente Effekte. So ergab sich bei einigen Versuchen neben der Dexamethason-Dosis abhängigen Inhibition der LIF-Produktion im ELISA eine erhebliche Reduktion dieses Cytokins um das bis zu 95,8 % unter Anwesenheit von 10^{-6} M DHEA (siehe Abb. 9 - „Transrepression humane Lymphozyten / LIF“). In anderen Experimenten blieb diese signifikante LIF-Inhibierung unter 10^{-6} M DHEA aus (siehe Abb. 10 - „Transrepression humane Lymphozyten / LIF“).

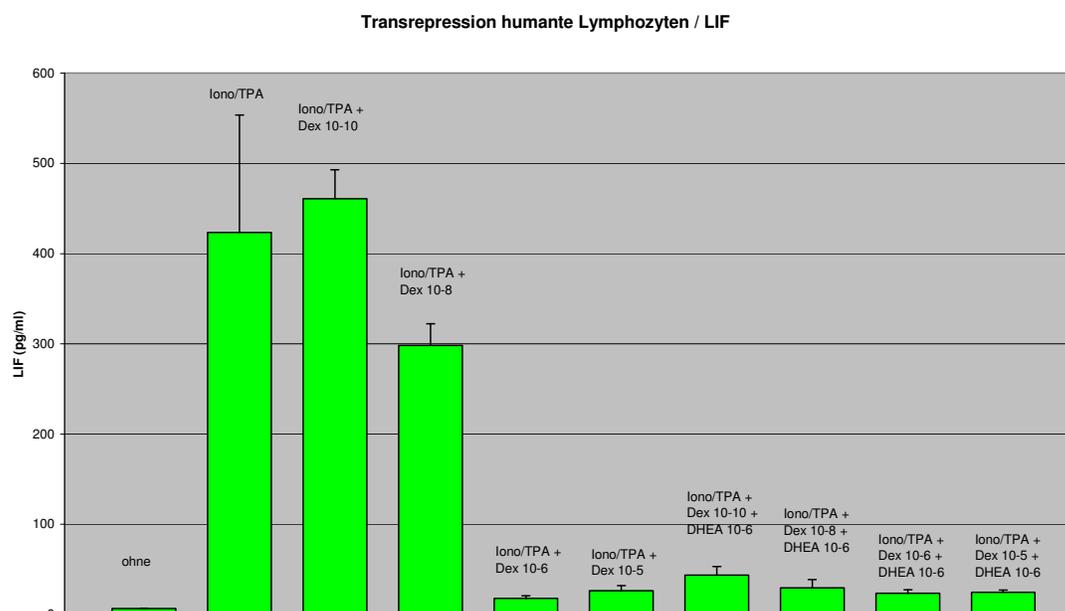


Abb. 9 – Transrepression humane Lymphozyten / LIF

Legende: TPA = Phorbol Ester 0.5×10^{-7} M; Iono = Ionomycin 1 $\mu\text{g/ml}$;

Ohne = Unstimuliert; Dex = Dexamethason 10^{-10} M, 10^{-8} M, 10^{-6} M; DHEA = Dehydroepiandrosteron 10^{-6} M

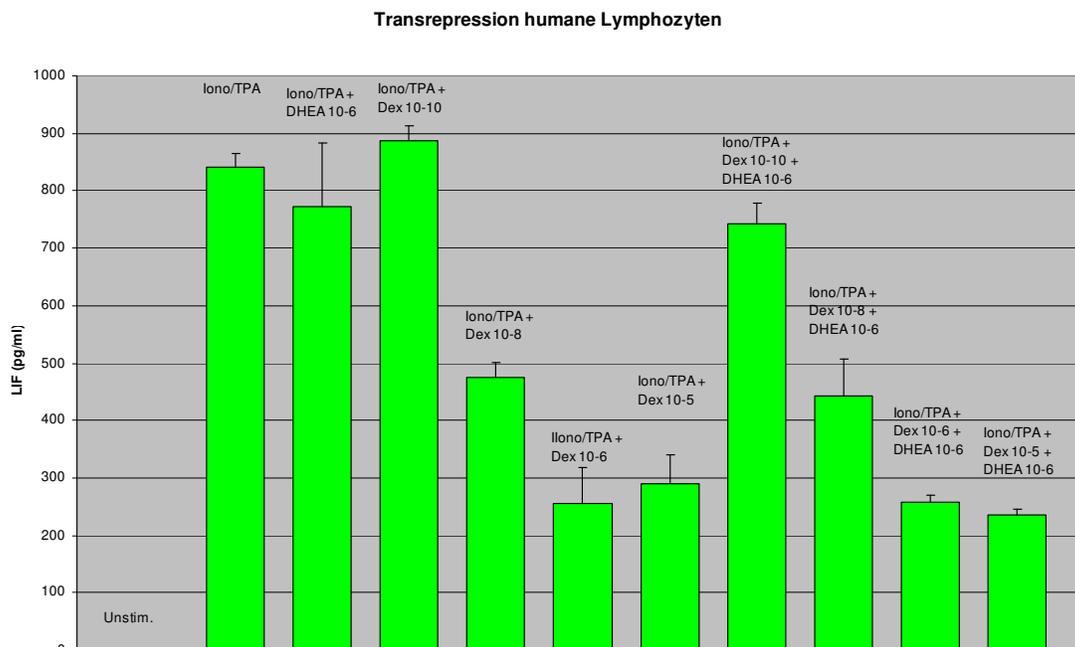


Abb. 10 – Transrepression Humane Lymphozyten / LIF

Legende: TPA = Phorbol Ester 0.5×10^{-7} M; Iono = Ionomycin $1 \mu\text{g/ml}$;
 Unstim. = Unstimuliert; Dex = Dexamethason 10^{-10} M, 10^{-8} M, 10^{-6} M; DHEA =
 Dehydroepiandrosteron 10^{-6} M

4.5 Einfluss von DHEA auf GR-vermittelte Transrepression bei IL-1 β , IL-2, IL-4 und IL-6

Bei Untersuchung des Einflusses von DHEA auf die GR-vermittelte Transrepression bei weiteren Cytokinen zeigte sich bei Interleukin-2 (IL-2) keine signifikante Beeinflussung. So zeigte sich zum Teil neben der Dexamethason-Dosis (10^{-6} M) abhängigen Inhibition der IL-2-Produktion (um bis zu 45,6 %) bei humanen Lymphozyten (mit TPA und Ionomycin stimuliert) ohne signifikante Inhibierung der IL-2 Produktion bei Zugabe von DHEA 10^{-6} M. Andere Cytokine wie Interleukin-1 β , Interleukin-4 und Interleukin-6 zeigten ebenfalls keine signifikanten DHEA (10^{-6} M) abhängigen Veränderungen ihrer Konzentration bei mit TPA und Ionomycin stimulierten normalen menschlichen Lymphozyten in ELISAs, wohl aber eine Dexamethason-Dosis (10^{-6} M) abhängigen Inhibition (siehe Abb.11 - Transrepression Interleukine).

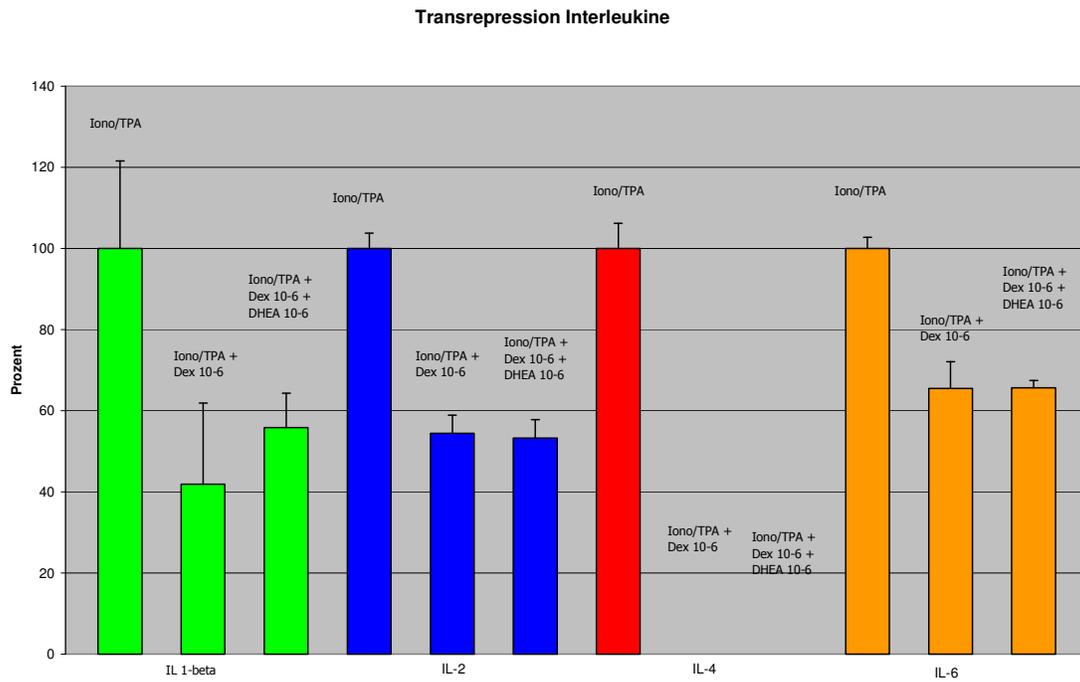


Abb. 11 – Transrepression Interleukine

Legende: TPA = Phorbol Ester 0.5×10^{-7} M; Iono = Ionomycin 1 $\mu\text{g/ml}$;

Ohne = Unstimuliert; Dex = Dexamethason 10^{-6} M; DHEA = Dehydroepiandrosteron 10^{-6} M.

IL = Interleukin

5 Diskussion

Glucocorticoide sind aufgrund ihrer immunsuppressiven Wirkung in der Behandlung von autoimmun- und entzündlichen Krankheiten weit verbreitet. Ein wünschenswertes Ziel ist, die Nebenwirkungen einer Langzeit-Glucocorticoidtherapie zu reduzieren. Dieses könnte durch die Entwicklung neuer „dissozierender“ Glucocorticoide (GC) erreicht werden, die eine Transrepression der Immungene bewirken jedoch die Transaktivierung, welche für die meisten Nebenwirkungen der GC-Therapie verantwortlich ist, unbeeinflusst lassen. [60] Diese erwünschte selektive Wirkung könnte möglicherweise auch durch Kombination konventioneller GC mit weiteren Substanzen, die selektiv mit der Funktion des Glucocorticoid-Rezeptors (GR) interferieren, erreicht werden.

Es wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen von Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Vitamin B6 auf den GR untersucht. Hierzu wurde die Wirkung der Substanzen auf die Transaktivierung und Transrepression des GR, letzteres am Beispiel des Cytokins *Leukemia inhibitory factor*, bzw. der Interleukine (IL) 1 β , 2, 4, und 6 untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, daß Vitamin B6 selektiv die GR-vermittelte Transaktivierung in Nicht-Immunzellen (hier HeLa-Zellen) inhibiert, während die Transrepression in diesen Zellen nicht beeinflusst wird. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass in Immunzellen (hier humane Lymphozyten) Vitamin B6 schwach die Transaktivierung inhibiert, jedoch keine Wirkung auf die Transrepression hat. Es ist daher anzunehmen, daß Vitamin B6 die GR-Funktion auf eine promoter- und zellspezifische Weise modulieren kann.

Weiter zeigten die Ergebnisse, daß DHEA die GR-vermittelte Transaktivierung nicht beeinflusst. Die GR-vermittelte Transrepression zeigte divergente Ergebnisse, bei einigen Experimenten zeigten sich eine signifikante Inhibition der LIF-Produktion durch DHEA, bei anderen Experimenten gleicher Art zeigte sich dieses nicht. Die Ursachen hierfür bleiben zur Zeit unklar.

Die GR-vermittelte Transrepression der IL 1 β , 2, 4, und 6 zeigt sich durch DHEA nicht beeinflusst.

Eine Inhibition der GR-Funktion durch Pyridoxal-5-Phosphat, der biologisch aktiven Form des Vitamin B6 ist seit langem bekannt (Cidlowski et al.). Die GC-induzierte Genexpression zeigt bei Vorhandensein von einfachen Promotern, des Hormon Response Elements sowie einer TATA-Sequenz, keine Veränderungen durch unterschiedliche Vitamin B6-Konzentrationen. Erst unter einem zusätzlichen Transkriptionsfaktor (NF1) ist eine

Reduktion dieser Genexpression unter Vitamin B6 zu verzeichnen (Allgood et al.) Diese Beeinflussung der Genexpression durch Vitamin B6 zeigt sich auch bei Androgen-, Progesteron- und Oestrogenrezeptoren (Allgood et al.). Zuvor durchgeführte Experimente erwiesen, dass die Veränderung der Vitamin B6-Konzentration in kultivierten Zellen oder Geweben die Spiegel der GC-induzierten Tyrosin-Aminotransferase und die enzymatische Reaktion der Alkalischen Phosphatase im selben Sinne veränderte, d.h. erhöhte Pyridoxal-5-Phosphat-Konzentrationen führten zu niedriger Aktivität der Substanzen. Auch wenn der Mechanismus der Glucocorticoid-vermittelten Immunsuppression bis heute nicht vollständig verstanden wurde, zeigte sich dass dieser weniger von einer direkten Bindung des GR an spezifische DNA-Sequenzen, als vielmehr auch von der Interaktion des GR mit anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF-kB abhängig ist. Diese zeigte sich bisher in Nicht-Immunkzellen, wie z.B. HeLa S3-Zellen, E8.2-Zelllinie (murine Fibroblasten) und der humanen Brustkrebszelllinie T47D. [3]

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Pyridoxal-5-Phosphat die GR-vermittelte Transaktivierung in HeLa-Zellen, also Nicht-Immunkzellen inhibiert, während die Transaktivierung in Immunkzellen (humane menschliche Lymphozyten) durch Pyridoxal-5-Phosphat nicht beeinflusst wurde. Hierbei war es unerheblich, ob bei den Experimenten diese, im Körper aktive Form des Vitamin B6 oder Pyridoxal verwendet wurde.

Zur Zeit ist unklar, über welchen Mechanismus die GR-Funktion selektiv beeinflusst wird.

Einige Veröffentlichungen zeigten Daten, welche darauf hindeuten, daß Vitamin B6 die Bindung des GR an die DNA durch direkte Interaktion mit dem Rezeptor beeinflusst.

[3,20,24,29] Da Pyridoxal-5-Phosphat in seiner klassischen Rolle als Cofaktor durch spezifische Wirkung an bestimmten Aminosäuren wirkt, wäre eine ähnliche Wirkung am GR durch eine einfache Interaktion mit spezifischen Aminosäuren, z.B. Lysin möglich. [3] Dieses wäre eine Erklärung, warum Vitamin B6 die Transaktivierung, nicht aber die Transrepression inhibieren kann, da letztere nicht von der Bindung an DNA abhängig ist. Dieses Modell erklärt jedoch nicht die in dieser Arbeit gezeigte Zelltyp-spezifische Weise, mit der Vitamin B6 die GR-vermittelte Transaktivierung beeinflusst.

Es ist eher anzunehmen, daß Vitamin B6 selektiv mit verschiedenen Coaktivatoren interagiert, welche für die GR-vermittelte Transaktivierung benötigt werden. Weitere Untersuchungen könnten die Wechselwirkungen verschiedener bekannter GR-Coaktivatoren wie z.B. *steroid receptor coactivator-1* (SRC-1) und CBP/P300 mit Vitamin B6 klären.

[25,39] Zellspezifische Expression dieser Coaktivatoren könnte für die zellspezifische Wirkung von Vitamin B6 verantwortlich sein.

Potentielle Anwendungsmöglichkeiten der Ergebnisse der Arbeit könnten sich zum Beispiel bei der Langzeit-Glucocorticoidtherapie, z.B. bei Autoimmunerkrankungen ergeben. Diese können bekanntermaßen unerwünschte Wirkungen wie u.a. arterielle Hypertonie, Diabetes, Gewichtszunahme und Osteoporose haben. Eine additive Gabe von Vitamin B6 könnte diese Nebenwirkungen reduzieren, ohne auf die immunsuppressive Wirkung der GC Einfluss zu nehmen, da Vitamin B6 in den Untersuchungen nur die Transaktivierung in Nicht-Immunzellen (nicht erwünschte GC-Effekte) und nicht in den Immunzellen (erwünschte GC-Effekte) inhibiert. Des Weiteren zeigte sich kein Einfluss von Pyridoxal-5-Phosphat auf die Transrepression mit der erwünschten Immunsuppression einer GC-Therapie. Allerdings war die Dosis von Vitamin B6 bei den hier gezeigten Versuchen (10⁻³ M) mehrere tausend Mal höher als die normale Serumkonzentration (ca. 0,25x10⁻⁶ M). Zur Zeit ist noch unklar, ob solche hohen Konzentrationen von Vitamin B6 zur Inhibition der GC-Aktivität in vivo notwendig sind. Bei hohen Dosen von Vitamin B6 sind als unerwünschte Wirkungen neurotoxische Effekte möglich. Ergebnisse von Patienten, die täglich über 2-14 Monate 2-6 g Vitamin B6 oral aufnahmen, zeigten das Auftreten von sensiblen Neuropathien, welche nach Absetzen des Vitamins nach Monaten reversibel waren. [26]

Das Steroidhormon DHEA und seine im Blut vorwiegend zu findende sulfatierte Form DHEAS haben in Bezug auf GC und das Immunsystem noch nicht vollständig geklärte Effekte.

Es ist eine glucocorticoid-antagonistische Wirkung beschrieben, d.h. eine anabole Wirkung auf Knochen und Muskel, eine Reduktion des Körperfettes und eine antidiabetogene Wirkung. Dieses könnte eine der physiologischen Funktionen von DHEA sein. In Experimenten bei Frauen mit nicht insulin-abhängigem Diabetes mellitus zeigten sich der unter Gabe des GC Dexamethason erhöhte Glucose-Toleranztest Insulin-Level unter gemeinsamer Gabe von Dexamethason und DHEA als Ausdruck einer verbesserten Insulin-Sensitivität reduziert. [19] Bei Ratten zeigte sich die Gewichtszunahme unter erhöhten GC-Spiegeln im Blut unter Gabe von DHEA gemindert. [90] Ebenso ergab die Gabe von DHEA bei Ratten einen präventiven Effekt auf die Hypertension durch GC. [73]

In den Ergebnissen ließ sich unter verschiedenen DHEA-Konzentrationen kein Unterschied in der GR-vermittelten Transaktivierung durch Dexamethason in humanen Lymphozyten

verzeichnen. Es zeigt sich also, daß die antagonistische Wirkung nicht auf einem direkten Antagonismus am GR beruht.

Es wäre somit als alternativer Mechanismus eine Wirkung über die Metabolisierung von DHEA zu Östrogenen oder Androgenen denkbar.

In einigen Experimenten zeigte sich bei Bestimmung des Cytokins LIF eine Zunahme der GR vermittelte Transrepression in humanen Lymphozyten unter steigender DHEA Konzentration. Es bleibt unklar, warum nur einige Lymphozyten-Populationen mit einer GR-vermittelten Transrepression reagierten. Eine solche durch DHEA verstärkte Transrepression wäre für den klinischen Alltag wünschenswert, da hierdurch die gewünschte Immunsuppression durch geringere GC-Gaben herbeigeführt werden könnte. Einige der typischen unerwünschten Langzeitwirkungen von GC wie Osteoporose könnten durch DHEA zumindest verringert werden. Eine derartige additive Therapie mit DHEA könnte auch durch einen eventuellen DHEA-Mangel eine verstärkte katabole Wirkung der GC reduzieren. So zeigt sich durch negative Rückkopplung bei externer Gabe von GC eine ACTH Suppression. Dieser Mangel an ACTH könnte somit zu einer reduzierten DHEA-Produktion in der Nebennierenrinde und hierdurch als vermindertem anabolen Faktor zu einer Verstärkung der katabolen Wirkung von GC führen.

Eine spezifische DHEA-Bindung konnte in unterschiedlichen Geweben von verschiedenen Spezies gezeigt werden, z.B. in T-Zellen von Mäusen [52], glatten Muskelzellen in Gefäßen bei Kaninchen [32] oder humanen T-Lymphoiden Zelllinien [61]. Es wäre also auch die direkte Interaktion mit einem möglichen spezifischen DHEA-Rezeptor denkbar, welcher allerdings noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Ungeklärt sind bisher die unerwünschten Langzeitwirkungen von DHEA. In Tierexperimenten zeigte sich bei Ratten und Forellen eine erhöhte Inzidenz von Lebertumoren [56,62]; bei Männern besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen hohen Blut-DHEA-Spiegeln und vermehrtem Auftreten von hormonabhängigen Tumoren, wie z.B. dem Prostatacarcinomen. [51] Von einer Gabe von DHEA als „Anti-aging“-Medikament muss deswegen zum jetzigen Zeitpunkt abgeraten werden.

6 Zusammenfassung

Glucocorticoide sind ein bedeutsamer Bestandteil der Homöostase physiologischer Vorgänge und werden medikamentös zur Therapie autoimmuner Prozesse und zur Immunsuppression eingesetzt. Eine längerfristige höherdosierte Glucocorticoidtherapie geht oft mit bedeutsamen Nebenwirkungen wie Osteoporose, diabetischen Stoffwechsellagen und arterielle Hypertonie einher.

Glucocorticoide wirken auf molekularer Ebene durch Bindung an den Glucocorticoidrezeptor (GR). Die durch den GR bedingte Genregulation teilt sich in die Transaktivierung und Transrepression. Eine Induktion der Genexpression durch direkte Bindung des GR an Glucocorticoid-responsive Elemente (GRE) bedingt eine Transaktivierung. Diese scheint für die Nebenwirkungen einer Glucocorticoidtherapie verantwortlich zu sein. Die Transrepression ist gekennzeichnet durch Interaktion des GR mit weiteren Transkriptionsfaktoren. Sie ist für die erwünschte Immunsuppression verantwortlich.

So wäre der selektive Einfluss von Medikamenten auf den GR und somit eine Reduktion von eventuellen Nebenwirkungen einer Glucocorticoid-Therapie wünschenswert.

So wurden in den Experimenten der Einfluss von Vitamin B6 und Dehydroepiandrosteron (DHEA) auf den GR in verschiedenen Zelllinien untersucht. Hierbei wurde quantitativ die Produktion des Cytokins *Leukemia inhibitory factor* (LIF) bestimmt.

Es zeigte sich bei Nicht-Immunzellen am Beispiel von HeLa-Zellen, dass Vitamin B6 selektiv die GR-vermittelte Transaktivierung hemmt. Bei Immunzellen - hier am Beispiel von humanen Lymphozyten - war dieser Effekt nur schwach nachweisbar.

DHEA zeigte bei beiden Zelllinien keinen Einfluss auf die GR-vermittelte Transaktivierung. Die GR-vermittelte Transrepression zeigte unter DHEA keine eindeutigen Ergebnisse. So wurden in einigen Experimenten eine signifikante Reduktion der Produktion von LIF beobachtet, während sich diese in anderen nicht zeigte. Die Ursache hierfür bleibt unklar.

Es besteht aufgrund der Ergebnisse die Vermutung, dass Vitamin B6 die GR-Funktion auf zell- und promoterspezifische Weise beeinflussen kann.

Weitere Experimente könnten zu einer spezifischen Modulation der GR-vermittelten Transaktivierung und somit zu einer Reduktion der klinischen Nebenwirkungen von Glucocorticoiden führen.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Abe, E, Tanaka, H, Ishimi, Y, Miyaura, C, Hayashi, T, Nagasawa, H, Tomida, M, Yamaguchi, Y, Hozumi, M, Suda, T. Differentiation inducing factor purified from conditioned medium of mitogen-treated spleen cell cultures stimulates bone resorption. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986; 83:5958-5962
- [2] Adachi JD, Bensen WG, Brown J, et al. Intermittent etidronate therapy to prevent corticosteroid-induced osteoporosis. N Eng J Med 1997; 382:382-387
- [3] Allgood VE, Cidlowski JA, Vitamin B6 modulates transcriptional activation by multiple members of the steroid hormone receptor superfamily. J. Biol. Chem. 1992; 267(6): 3819-24
- [4] Allgood VE, Oakley RH, Cidlowski JA. Modulation by vitamin B6 of glucocorticoid receptor-mediated gene expression requires transcription factors in addition to the glucocorticoid receptor. J Biol Chem 1993; Oct 5;268(28):20870-6
- [5] Allgood VE, Powell-Oliver FE, Cidlowski JA. Vitamin B6 influences glucocorticoid receptor dependent gene expression. J Biol Chem 1990; 265:12424-12433
- [6] Allgood VE, Powell-Oliver FE, Cidlowski JA. The influence of vitamin B6 on the structure and function of the glucocorticoid receptor. Ann N Y Acad Sci 1990; 585:452-465
- [7] Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. Biochim Biophys Acta 1991; 1072:129-157
- [8] Arlt W, Justl H-G, Callies F, Reincke M, Hübler D, Oettel M, Ernst M, Schulte HM, Allolio B. Oral dehydroepiandrosterone for adrenal androgen replacement: pharmacokinetics and peripheral conversion to androgens and estrogens in young healthy females after dexamethasone suppression. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1998; 83:1928-1934

- [9] Auernhammer CJ, Melmed S. Leukemia-Inhibitory Factor—Neuroimmune Modulator of Endocrine Function, *Endocrine Reviews* 2000; 21(3): 313–345
- [10] Bamberger AM, Erdmann I, Bamberger CM, Jenatschke S, Schulte HM. Transcriptional regulation of the human leukemia inhibitory factor gene: modulation by glucocorticoids and estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 127:71-79
- [11] Bamberger AM, Jenatschke S, Schulte HM, Ellebrecht I, Beil FU, Bamberger CM. Regulation of the human leukemia inhibitory factor (LIF) gene by ets transcription factors. *Neuroimmunomodulation*. 2004; 11(1):10-9
- [12] Bamberger CM, Bamberger AM, Wald M, Chrousos GP, Schulte HM. Inhibition of mineralocorticoid activity by the β -isoform of the human glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; 60:43-50
- [13] Bamberger CM, Else T, Bamberger AM, et al. Regulation of the human interleukin-2 gene by the alpha and beta isoforms of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 136:23-28
- [14] Bamberger CM, Else T, Bamberger AM, Beil FU, Schulte HM. Dissociative glucocorticoid activity of medroxyprogesterone acetate in normal human lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:4055-4061
- [15] Bamberger CM, Schulte HM. Wirkungsmechanismus der Glucocorticoide. *Internist (Berl.)* 1997; 38:366-370
- [16] Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev* 1996; 17:245-261
- [17] Beato M, Sanchez-Pacheco A. Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* 1996; 17:587-609

- [18] Bélanger A, Candas B, Dupont A, et al. Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 79:1086–1090
- [19] Buffington CK, Pourmotabbed G, Kitabchi AE. Case report: amelioration of insulin resistance in diabetes with dehydroepiandrosterone. *Am J Med Sci.* 1993 Nov; 306(5):320-4
- [20] Cake MH, DiSorbo DM, Litwack G. Effect of pyridoxal phosphate on the DNA binding site of activated hepatic glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 1978; 253:4886-91
- [21] Casson PR, Andersen RN, Herrod HG, et al. Oral dehydroepiandrosterone in physiologic doses modulates immune function in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169:1536–9
- [22] Chrousos GP, The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation, *N Eng J Med* 1995; 332:1351-1362
- [23] Chrousos GP, Gold PW, The concepts of stress and stress system disorders, *JAMA* 1992; 267:1244-1252
- [24] Cidlowski JA, Thanassi JW. Extraction of nuclear glucocorticoid-receptor complexes with pyridoxal phosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 82:1140-6
- [25] Collingwood TN, Urnov FD & Wolffe AP. Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol* 1999; 23:255-275
- [26] Compton, MM, Cidlowski, JA. *Endocrinol.* 1986; Rev. 7:140-148
- [27] Diamond P, Cusan L, Gomez JL, et al. Metabolic effects of 12-month percutaneous dehydroepiandrosterone replacement therapy in postmenopausal women. *J Endocrinol* 1996; 150:43–50
- [28] DiSorbo, DM, Litwack, G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981; 99:1203-1208

- [29] Dolan KP, Diaz-Gil JJ, Litwack G. Interaction of pyridoxal 5'-phosphate with the liver glucocorticoid receptor-DNA complex. *Arch Biochem Biophys* 1980; 201:476-85
- [30] Dorgan JF, Longcope C, Stephenson HE, et al. Relation of prediagnostic serum estrogen and androgen levels to breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996; 5:533-9
- [31] Escary JL, Perreau J, Duménil D, Ezine S, Brûlet P. Leukemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature* 1993; 363:361-364
- [32] Furutama D, Fukui R, Amakawa M, Ohsawa N. Inhibition of migration and proliferation of vascular smooth muscle cells by dehydroepiandrosterone sulfate. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Feb 27; 1406(1):107-14
- [33] Glass CK. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 1994; 15:391-407
- [34] Godard, A, Gascan, H, Naulet, J, Peyrat, MA., Jacques, Y, Soullillou, JP, Moreau, JF. Biochemical characterization and purification of HILDA, a human lymphokine active on eosinophils and bone marrow cells. *Blood* 1988; 71:1618-1623
- [35] Gordon GB, Bush TL, Helzlsouer KJ, et al. Relationship of serum levels of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate to the risk of developing postmenopausal breast cancer. *Cancer Res* 1990; 50:3859-62
- [36] Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 1985; 318:635-641
- [37] Holman P. *J of Australian College of Nutritional & Environmental Medicine* 1995; Vol 14, No 1:5-16

[38] Hutchinson KA, Dittmar KD, Pratt WB. All of the factors required for assembly of the glucocorticoid receptor into a functional heterocomplex with heat shock protein 90 are preassociated in a self-sufficient protein folding structure, a „foldosome“. J Biol Chem 1994; 269:27894-27899

[39] Jenkins BD, Pullen CB & Darimont BD. Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. Trends Endocrinol Metab 2001; 12:122-126

[40] Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, et al. Antitumor promotion and antiinflammation: down modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. Cell 1990; 62:1189-1204

[41] Kaiser H. Praxis der Cortisontherapie. München, Urban und Schwarzenberg, 1995

[42] Kanelakis KC, Morishima Y, Dittmar KD, et al. Differential effects of the hsp70-binding protein BAG-1 on glucocorticoid receptor folding by the hsp90-based chaperone machinery. J Biol Chem 1999; 274:34134-34140

[43] Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. J Biol Chem 1995; 270:16483-16486

[44] Keller JR, Gooya JM, Ruscetti FW. Direct synergistic effects of leukemia inhibitory factor on hematopoietic progenitor cell growth: comparison with other hematopoietins that use the gp130 receptor subunit. Blood 1996; 88:863– 869

[45] Khorram O, Vu L, Yen SS. Activation of immune function by dehydroepiandrosterone (DHEA) in age-advanced men. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 1997; 52:M1–7

[46] Löffler G, Petrides PE. Biochemie und Pathobiochemie. 1997 Springer Verlag.
5. Auflage

[47] Lotz, M., Moats, T. and Villiger, PM. Leukemia inhibitory factor is expressed in cartilage and synovium. Potential contributions to the pathogenesis of arthritis. *J. Clin. Invest.* 1992; 90:888-896

[48] Lucibello FC, Slater EP, Jooss KU, Beato M, Müller R. Mutual transrepression of Fos and the glucocorticoid receptor: involvement of a functional domain in Fos which is absent in FosB. *EMBO J* 1990; 9:2827-2834

[49] Lukert BP, Raisz LG, Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management. *Ann Int Med* 1990; 112:352-364

[50] Mayer P, Geissler K, Ward M, Metcalf D. Recombinant human leukemia inhibitory factor induces acute phase proteins and raises the blood platelet counts in nonhuman primates. *Blood* 1993 Jun 15;81(12):3226-33

[51] McNeil C. Potential drug DHEA hits snags on way to clinic. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:681-3

[52] Meikle AW, Dorchuck RW, Araneo BA, Stringham JD, Evans TG, Spruance SL, Daynes RA. The presence of a dehydroepiandrosterone-specific receptor binding complex in murine T cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992 May; 42(3-4):293-304

[53] Metcalf D, Gearing DP. Fatal syndrome in mice engrafted with cells producing high levels of leukemia inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989 Aug;86(15):5948-52

[54] Metcalf, D., Hilton, D.J. and Nicola, N.A. Clonal analysis of the actions of the murine leukemia inhibitory factor on leukemic and normal murine hemopoetic cells. *Leukemia* 1988; 2:216-21

[55] Metcalf D, Nicola NA, Gearing DP Effects of injected leukemia inhibitory factor on hematopoietic and other tissues in mice. *Blood* 1990 Jul 1;76(1):50-6

- [56] Metzger C, Mayer D, Hoffmann H, et al. Sequential appearance and ultrastructure of amphiphilic cell foci, adenomas, and carcinomas in the liver of male and female rats treated with dehydroepiandrosterone. *Toxicol Pathol* 1995;23:591–605
- [57] Morales AJ, Nolan JJ, Nelson JC, Yen SSC. Effects of replacement dose of DHEA in men and women of advancing age. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:1360-67
- [58] Moreau, JF, Bonneville, M, Godard, A, Gascan, H, Gruart, V, Moore, M.A. and Soulillou, JP. Characterization of a factor produced by human T cell clones exhibition eosinophil-activating and burst-promoting activities. *J. Immunol.* 1987; 138:3844-3849
- [59] Nestler JE, Barlasini CO, Clore JN, et al. Dehydroepiandrosterone reduces serum low density lipoprotein levels and body fat but does not alter insulin sensitivity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 66:57–61
- [60] Northrop JP, Crabtree GR, Mattila PS. Negative regulation of interleukin 2 transcription by the glucocorticoid receptor *J Exp Med* 1992; 175:1235-1245
- [61] Okabe T, Haji M, Takayanagi R, Adachi M, Imasaki K, Kurimoto F, Watanabe T, Nawata H. Up-regulation of high-affinity dehydroepiandrosterone binding activity by dehydroepiandrosterone in activated human T lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995 Oct; 80(10):2993-6
- [62] Orner GA, Mathews C, Hendricks JD, et al. Dehydroepiandrosterone is a complete hepatocarcinogen and potent tumor promoter in the absence of peroxisome proliferation in rainbow trout. *Carcinogenesis* 1995;16:2893–8
- [63] Paliogianni F, Raptis A, Ahuja SS, Najjar SM Boumpas DT. Negative transcriptional regulation of human interleukin 2 (IL-2) gene by glucocorticoid through interference with nuclear transcription factors AP-1 and NF-AT. *J Clin Invest* 1993; 91:1481-1489
- [64] Pratt WB, Dittmar KD. Studies with purified chaperones advance the understanding of the mechanism of glucocorticoid receptor-hsp90 heterocomplex assembly. *Trends Endocrinol Metab* 1998; 9:244-252

[65] Ransone LJ, Verma IM. Nuclear proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6:539-557

[66] Rensink AA, Gellekink H, Otte-Holler I, Ten Donkelaar HJ, De Waal RM, Verbeek MM, Kremer, B. Expression of the cytokine leukemia inhibitory factor and pro-apoptotic insulin-like growth factor binding protein-3 in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002 Nov;104(5):525-33

[67] Reynolds RD, Natta, CL. Depressed plasma pyridoxal phosphate concentrations in adult asthmatics. *Am. J. Clin. Nut.*, 1985; 211: 684-8

[68] Schöfl, C, von zur Mühlen, A. Vermeidung unerwünschter Wirkungen einer Glukokortikoidtherapie, *Internist* 1997; 38:371-380

[69] Schüle R, Rangarajan P, Kliwer S, et al. Functional antagonism between oncoprotein c-jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 1990; 62:1217-1226

[70] Schulte HM, Corticotropin-Releasing Faktor : Experimentelle und klinische Untersuchungen. Stuttgart – New York: Georg Thieme-Verlag, 1989

[71] Schulte HM, Bamberger CM, Mönig H, Allolio B. Prävention und Therapie der Nebenwirkungen einer systemischen Therapie mit Glucocorticoiden. In: Schulte HM, Benker G, Allolio B (Hrg). Therapie mit Glucocorticoiden – Molekularbiologische, pharmakologische und klinische Aspekte. Stuttgart, New York: Schattauer, 1993:257-262

[72] Schulte HM, Chrousos GP, Oldfield EH et al. Corticotropin releasing factor: pharmacokinetics in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58:192-196

[73] Shafagoj Y, Opoku J, Quereshi D, Regelson W, Kalimi M. Dehydroepiandrosterone prevents dexamethasone-induced hypertension in rats. *Am J Physiol* 1992; 263:E210-3

[74] Shealy CN. A review of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Integrative Physiological and Behavioral Science* 1995; 30:308–313

- [75] Smith DF, Toft DO. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 1993; 7:4-11
- [76] Straub R et al. Serum DHEA and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2012-17
- [77] Truss M, Beato M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 1993; 14:459-479
- [78] Tsai M-J, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann Rev Biochem* 1994; 63:451-486
- [79] Usiskin KS, Butterworth S, Clore JN, et al. Lack of effect of dehydroepiandrosterone in obese men. *Int J Obes* 1990; 14:457-63
- [80] Vacca A, Felli MP, Farina AR, et al. Glucocorticoid receptor mediated suppression of the interleukin 2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements. *J Exp Med* 1992; 175:637-646
- [81] Van Vollenhoven RF, et al. *Arthritis Rheum* 1994; 37:1305-1310
- [82] Van Vollenhoven RF, Engleman EG, McGuire JL. Dehydroepiandrosterone in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1995; 38:1826-31
- [83] Van Vollenhoven RF, Morabito LM, Engleman EG, McGuire JL. Treatment of systemic lupus erythematosus with dehydroepiandrosterone: 50 patients treated up to 12 months. *J Rheumatol* 1998; 25:285-9
- [84] Villiger, PM, Geng, Y, Lotz, M. Induction of cytokine expression by Leukemia inhibitory factor. *J. Clin. Invest.* 1993; 91:1575-1581

- [85] Vogiagis D, Salamonsen LA. The role of leukaemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy, *Journal of Endocrinology* 1999; 160:181–190
- [86] Vogiatzi MG, Boeck MA, Vlachopapadopoulou E, et al. Dehydroepiandrosterone in morbidly obese adolescents: effects on weight, body composition, lipids, and insulin resistance. *Metabolism* 1996; 45:11
- [87] Watson RR, Huls A, Araghnikuam M, Chung S. Dehydroepiandrosterone and diseases of aging. *Drugs Aging* 1996 Oct; 9(4):274-91
- [88] Welle S, Jozefowicz R, Statt M. Failure of DHEA to influence energy and protein metabolism in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:1259
- [89] Wolf OT, Neumann O, Hellhammer DH, et al. Effects of a two-week physiological dehydroepiandrosterone substitution on cognitive performance and well-being in healthy elderly women and men. *J Clin Endocrinol. Metab* 1997; 82:2263–7
- [90] Wright BE, Porter JR, Browne ES, Svec F. Antiglucocorticoid action of dehydroepiandrosterone in young obese Zucker rats. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1992 Aug; 16(8):579-83
- [91] Yang-Yen H-F, Chambard JC, Sun YL, et al. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 1990; 62:1205-1215
- [92] Yen SSC, Morales AJ, Khorram O. Replacement of DHEA in aging men and women. *Ann NY Acad Sci* 1995; 774:128–42
- [93] Zhang Z, Watson R. DHEA in Immune modulation and aging. *Health Promotion and Aging*, R. Watson, ed. Harwood Acad. Pub. 1999; 113-23

[94] Zhang JG, Zhang Y, Owczarek CM, Ward LD, Moritz RL, Simpson RJ, Yasukawa K, Nicola NA. Identification and characterization of two distinct truncated forms of gp130 and a soluble form of leukemia inhibitory factor receptor α -chain in normal human urine and plasma. *J Biol Chem* 1998; 273:10798 –10805

[95] Zilliacus J, Wright APH, Carlstedt-Duke J, Gustafsson J-A. Structural determinants of DNA-binding specificity by steroid receptors. *Mol Endocrinol* 1995; 9:389-4

[96] Zwain, IH, Yen, SSC. *Endocrinology* 1999; 140:880–887

[97] Zwain, IH, Yen, SSC. *Endocrinology* 1999; 140:3843–3852

Danksagung

Professor Dr. Christoph M. Bamberger danke ich für die praktische und theoretische Unterstützung, sowie für die Überlassung des Themas.

Mein Dank gilt ebenfalls Doris Pankoke und Bianca Kelp für die freundliche Zuarbeit im Labor.

Für die finanzielle Förderung danke ich dem Graduiertenkolleg 336 „Molekulare Endokrinologie – Molekularer Stoffwechsel“, insbesondere Prof. Dr. H. J. Seitz.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Iring Ellebrecht
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Geboren:	04.10.1973 in Bremen
Familienstand:	ledig
Anschrift:	Frickestr. 64, 20251 Hamburg
Telefon:	040-46773637
Email:	iringellebrecht@gmx.de

Ausbildung

1980 - 1993	Grundschule, Orientierungsstufe, Gymnasium und Sekundarstufe II in Bremen, Abschluss Abitur (Durchschnittsnote: 1,9)
1994 - 1996	Studium der Geographie an der Universität Hamburg
04/1996	Beginn des Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
03/1998	Physikum (Noten: schriftl. 2, mündl. 3)
03/1999	Erstes Staatsexamen (Note 2)
seit 07/1999	Doktorarbeit, Thema „Modulation der Glucocorticoidwirkung durch Vitamin B6 und DHEA in menschlichen Immunzellen“ bei Prof. Dr. C. M. Bamberger, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
05/2000 - 03/2001	Doktorandenstipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs 336 („Molekulare Endokrinologie – Molekularer Stoffwechsel“) der Universität Hamburg
09/2001	Zweites Staatsexamen (Noten: schriftl. 2, mündl. 2)
10/2001 - 09/2002	Praktisches Jahr: 16 Wochen Radiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf; 8 Wochen Unfallchirurgie im Inselspital Bern/Schweiz; 8 Wochen Allgemein Chirurgie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf; 16 Wochen Innere Medizin im Israelitischen Krankenhaus Hamburg
10/2002	Drittes Staatsexamen (Note 2), Gesamtnote gut (2,0)
04/2003 - 09/2004	Arzt im Praktikum in der Inneren Medizin im Evang. Amalie Sieveking-Krankenhaus (Chefärztin: Prof. Dr. Koop) in Hamburg

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

