

Philipp von Rosenstiel

Glukokortikoide und Apoptose im Gyrus dentatus der Ratte

Rezeptorspezifität und Altersabhängigkeit
Kortikosteroid-vermittelter Apoptose

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Rosenstiel, Philipp /von:

Glukokortikoide und Apoptose im Gyrus dentatus der Ratte : Rezeptorspezifität und Altersabhängigkeit Kortikosteroid-vermittelter Apoptose / Philipp von Rosenstiel. -

Berlin : Weißensee-Verl., 2002

Zugl.: München, Univ., Diss., 2001

ISBN 3-934479-68-5

Gedruckt auf holz- und säurefreiem Papier, 100 % chlorfrei gebleicht.

© Weißensee Verlag, Berlin 2002
Wilhelm-Wagenfeld-Str. 1
13086 Berlin
Tel. 0 30 / 91 20 7-100
www.weissensee-verlag.de
e-mail: mail@weissensee-verlag.de

Alle Rechte vorbehalten

Umschlag: Chili Grafik-Design, Berlin, unter Verwendung einer Abbildung des Autors

Printed in Germany

ISBN 3-934479-68-5

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	11
1. Kapitel: Hintergrund.....	13
1.1 Allgemeine Einführung.....	13
1.2 Die Kortikosteroide: Biochemie, Physiologie, Pathologie, Pharmakologie.....	14
1.2.1 Einführung: Kortikosteroide und Homöostase	14
1.2.2 Biochemie der Kortikosteroide: Struktur und Synthese.....	15
1.2.2.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen.....	15
1.2.2.2 Biosynthese und Metabolismus	16
1.2.3 Pharmakologie der Kortikosteroide	18
1.2.3.1 Die Steroidrezeptoren	18
1.2.3.2 Rezeptortypen und Bindungsverhalten	19
1.2.3.3 Verteilung und Funktion	21
1.2.4 Physiologie der Glukokortikoide: Regulation und Wirkungen	23
1.2.4.1 Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden Achse.....	23
1.2.4.2 Periphere Wirkungen	25
1.2.4.3 Zentralnervöse Wirkungen	26
1.2.4.3.1 HPA-Achsen-Regulation durch suprahypothalamische Zentren.....	28
1.2.4.3.2 Neuronale Morphologie.....	28
1.2.4.3.3 Funktionelle Wirkungen	29
1.2.5 Störungen der HPA-Achse.....	30
1.2.5.1 Überfunktion: Cushing Syndrom	30
1.2.5.2 Unterfunktion: Addison Symptomatik.....	30
1.2.5.3 Dysregulation: Neuropsychiatrische Erkrankungen	31
1.2.6 Pharmakotherapie mit Glukokortikoiden.....	32
1.3 Der Hippokampus: Entwicklung, Anatomie und Funktion	34
1.3.1 Einführung.....	34

1.3.2	Struktur des Hippokampus.....	36
1.3.2.1	Entwicklung des Hippokampus.....	36
1.3.2.1.1	Phylogenese.....	36
1.3.2.1.2	Ontogenese.....	38
1.3.2.2	Makroanatomie.....	39
1.3.2.2.1	Mensch.....	39
1.3.2.2.2	Ratte.....	40
1.3.2.3	Zytoarchitektur.....	41
1.3.2.3.1	Zelltypen, Rindenarchitektur und Verbindungen.....	41
1.3.2.3.2	Neuronale Phänotypen.....	42
1.3.2.3.2.1	Körnerzellen.....	42
1.3.2.3.2.2	Pyramidenzellen.....	43
1.3.2.3.2.3	Subiculum, Prä- und Parasubiculum und Cortex entorhinalis.....	45
1.3.2.4	Extrinsische und intrinsische Verbindungen.....	45
1.3.2.4.1	Informationsfluß.....	45
1.3.2.4.2	Intrinsische Verbindungen.....	47
1.3.2.4.3	Extrinsische Verbindungen.....	48
1.3.3	Funktionen des Hippokampus.....	52
1.3.3.1	Regulation der HPA-Achse.....	52
1.3.3.2	Konsolidierung von Gedächtnisinhalten.....	53
1.3.4	Pathologie des Hippokampus.....	56
1.3.4.1	Temporallappenepilepsien.....	56
1.3.4.2	Alzheimer'schen Krankheit.....	56
1.3.4.3	Multifokale Erkrankungen des ZNS.....	57
1.4	Zelltod: Apoptose, Nekrose und die Aufrechterhaltung des Organismus.....	57
1.4.1	Einführung.....	57
1.4.2	Nekrose.....	58
1.4.2.1	Morphologie.....	58
1.4.2.2	Auslöser.....	58
1.4.3	Apoptose.....	59
1.4.3.1	Morphologie.....	59
1.4.3.1.1	Lichtmikroskopie.....	59
1.4.3.1.2	Elektronenmikroskopie.....	60
1.4.3.2	Regulation und Ablauf.....	62
1.4.3.2.1	Auslöser.....	62
1.4.3.2.2	Intrazelluläre Reaktionen.....	62
1.4.3.2.3	Genetisches Programm.....	63
1.4.3.3	Auftreten.....	65

1.4.3.3.1	Physiologisch: Entwicklung, Zellmauserung, Organinvolution	65
1.4.3.3.2	Pathologisch: Tumorigenese	66
1.4.3.4	Klinische Bedeutung und therapeutische Ansätze.....	66
1.5	Fragestellung: Apoptotischer Zelltod unter dem Einfluß von Kortikosteroiden.....	67
2.	Kapitel: Experimente.....	69
2.1	Grundgedanke	69
2.2	Methoden: Darstellung von zellulärer Morphe, Zelltod und Rezeptoren	70
2.2.1	Visualisierung von Zellen: Färbung nach Nissl	70
2.2.2	Visualisierung von Apoptose: TUNEL-Färbung	70
2.2.3	Visualisierung von Rezeptoren: <i>In situ</i> Hybridisierung und Rezeptor-Autoradiographie..	71
2.2.4	Morphometrische Analyse.....	72
2.3	Neurodegeneration und Neuroprotektion nach akuter Verabreichung von Dexamethason in jungen und alten Ratten.....	73
2.3.1	Versuchstiere und Behandlung	73
2.3.2	Materialien und Methoden.....	74
2.3.2.1	Gewebeverarbeitung.....	74
2.3.2.2	<i>In situ</i> TUNEL-Färbung zum Nachweis apoptotischer Zellen	75
2.3.2.3	Radioimmunologischer Nachweis der Corticosteronspiegel	76
2.3.2.4	Auswertung	76
2.3.3	Ergebnisse	77
2.3.3.1	Auswirkung des Alters auf die Inzidenz apoptotischer Zellen im Gyrus dentatus	77
2.3.3.2	Altersentsprechende Effekte von Dexamethason	78
2.3.3.3	Altersentsprechende Effekte von Corticosteron	79
2.3.3.4	Interaktion von Corticosteron und Dexamethason	80
2.3.3.5	AltersgemäÙe Veränderungen des Serum-Corticosterons.....	81
2.3.4	Diskussion.....	82
2.4	Neurodegeneration und Neuroprotektion in adrenaletomierten Ratten	84
2.4.1	Versuchstiere und Behandlung	84
2.4.2	Materialien und Methoden.....	85
2.4.2.1	Gewebeverarbeitung.....	85
2.4.2.2	Cresylviolett-Färbung nach Nissl	86
2.4.2.3	<i>In situ</i> TUNEL-Färbung zur Darstellung apoptotischer Zellen	86
2.4.2.4	Radioimmunologischer Nachweis der Corticosteronspiegel	87
2.4.3	Ergebnisse	87

2.4.3.1	Biometrische Daten.....	87
2.4.3.2	Adrenalektomie und Zelltod im Gyrus dentatus	91
2.4.3.3	Corticosteron und ADX-vermittelter Zelltod	94
2.4.3.4	Dexamethason und ADX-vermittelter Zelltod.....	95
2.4.3.5	Interaktion von Corticosteron und Dexamethason.....	96
2.4.4	Diskussion	98
2.5	Rezeptorexpression und -bindung in jungen und alten Ratten	101
2.5.1	Versuchstiere und Behandlung	102
2.5.2	Materialien und Methoden	103
2.5.2.1	Gewebeverarbeitung.....	103
2.5.2.1.1	<i>In vivo</i> Autoradiographie.....	103
2.5.2.1.2	<i>In situ</i> Hybridisierungs-Histochemie	103
2.5.2.1.3	Auswertung	104
2.5.3	Ergebnisse.....	104
2.5.3.1	Mineralokortikoid-Rezeptor	105
2.5.3.2	Glukokortikoid-Rezeptor	106
2.5.4	Diskussion	108
3.	Kapitel: Allgemeine Diskussion.....	111
3.1	Nochmals: Die Fragestellung	111
3.2	Methodenkritik	112
3.2.1	Morphometrie	112
3.2.2	TUNEL-Färbung	113
3.2.3	<i>In situ</i> Hybridisierung spezifischer messenger RNA.....	114
3.3	Synthese: Ein Modell der Kortikosteroidwirkung auf den Gyrus dentatus	115
3.3.1	Die <i>Glucocorticoid cascade hypothesis</i> neuronaler Schädigung im Ammonshorn.....	115
3.3.2	Balance der Rezeptoraktivierung im Gyrus dentatus	117
3.3.3	Kortikosteroide und Apoptose	121
4.	Kapitel: Schlußfolgerung und Perspektive.....	125
4.1	Kernaussagen	125
4.2	Schlußfolgerung.....	126
4.3	Perspektiven.....	129

5. Kapitel: Anhang	131
5.1 Protokolle	131
5.1.1 Cresylviolett-Färbung nach Nissl.....	131
5.1.1.1 Lösungen	131
5.1.1.1.1 Phosphatpuffer 100 mM, pH 7,3 (PBS)	131
5.1.1.1.2 Paraformaldehydlösung 4% (PFA)	131
5.1.1.1.3 Cresylviolettlösung 0,5%.....	131
5.1.1.2 Protokoll.....	131
5.1.2 TUNEL-Färbung (Gavrieli, Sherman, und Ben-Sassan, 1992).....	132
5.1.2.1 Lösungen	132
5.1.2.1.1 PBS 100 mM, pH 7,3	132
5.1.2.1.2 Reaktionslösung	132
5.1.2.1.3 Tris HCl 50 mM.....	132
5.1.2.1.4 Extravidin Peroxidase Lösung.....	132
5.1.2.2 Protokoll.....	133
5.1.3 <i>In situ</i> Hybridisierungs Histochemie (Whitfield, Brady et al., 1990b).....	134
5.1.3.1 Lösungen	134
5.1.3.1.1 PBS 10 x	134
5.1.3.1.2 SSC 20 x.....	134
5.1.3.1.3 PFA 4% in PBS	134
5.1.3.1.4 Ethanol	134
5.1.3.1.5 NaCl 5 M	134
5.1.3.1.6 EDTA 0,5 M pH 8,0	134
5.1.3.1.7 Tris-HCl 1 M pH 7,5	134
5.1.3.1.8 STE-Puffer	135
5.1.3.1.9 ssDNA 10 mg/ml	135
5.1.3.1.10 Hefe tRNA 50 mg/ml in DEPC-H ₂ O	135
5.1.3.1.11 Dextransulfat 50% in DEPC-ddH ₂ O	135
5.1.3.1.12 Dithiothreitol 5M (DTT; Sigma, Deisenhofen)	135
5.1.3.1.13 Triethanolamin-HCl pH 8,0.....	135
5.1.3.1.14 Hefe-RNA (Sigma, Deisenhofen).....	135
5.1.3.1.15 Hybridisierungs-Puffer (für 200 ml)	135
5.1.3.1.16 SDS 10% in DEPC-Wasser	136
5.1.3.1.17 Na-Thiosulfat 10%.....	136
5.1.3.1.18 RNase-Puffer	136
5.1.3.1.19 RNase Aufbewahrungslösung (10 mg/ml)	136
5.1.3.2 Protokoll.....	136
5.1.3.2.1 Markieren der Riboproben (SP6 Transkription)	136

5.1.3.2.2 Gewebefixierung	137
5.1.3.2.3 Acetylierung.....	137
5.1.3.2.4 Dehydrierung, Entfettung und Belichtung.....	137
5.2 Bibliographie	138
5.3 Abbildungsverzeichnis.....	154
5.4 Tabellenverzeichnis.....	155
5.5 Index.....	156
Zusammenfassung	159
Lebenslauf.....	163
Danksagung	165

1. KAPITEL: HINTERGRUND

1.1 Allgemeine Einführung

Der Patient H.M., der 1953 bei einem heroischen Versuch kanadischer Neurochirurgen, seiner therapierefraktären Epilepsie Herr zu werden, den größten Teil seiner beiden Temporallappen verlor, konnte von sich behaupten, wahrlich für den Augenblick zu leben: die großzügige Entfernung beider Temporallappen hatte ihn der Möglichkeit beraubt, Erlebtes, Gehörtes, Gesehenes, wie auch immer Wahrgenommenes zu einer bleibenden Erinnerung, zu einem Teil seiner Selbst zu machen (Milner, Corkin et al., 1968; Scoville und Milner, 1957)¹.

Eine umfangreiche Literatur deutet darauf hin, daß wir uns, weniger drastisch, weniger unmittelbar, weniger vollständig, im Laufe eines Lebens, das durch psychische und physische Belastungen und das Verstreichen von Zeit geprägt ist, einer chemischen Form dessen unterziehen, was bei Patient H.M. das Skalpell vollbracht hat: Kortikosteroide, eine Gruppe von Hormonen, die entscheidend daran beteiligt sind, wie wir mit dem, was das Dasein uns bietet, umgehen, können dem Hippokampus unter gegebenen Voraussetzungen so zusetzen, daß Zellen zugrunde gehen. Fehlen diese Hormone allerdings, leidet der Hippokampus (wie der Rest des Organismus) noch eindeutiger.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Einführung in die Thematik zu geben und Fragen der Rezeptorspezifität der degenerativen, aber auch der trophischen Effekte der Adrenokortikoide zu beantworten.

¹ H.M. selbst sagt von seinem Erleben: "Every day is alone in itself, whatever enjoyment I've had, and whatever sorrow I've had."