

Vergleichende Analyse der Expression des Glukokortikoid-Rezeptors und der NF- kappaB Untereinheit p50 in Lymphozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Gesunden.

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Klüter, Andreas
aus Fulda

Gießen 2002

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität Gießen, Lehrstuhl für
Rheumatologie, Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim Abteilung Rheumatologie

Leiter: Professor Dr. K. L. Schmidt
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Professor Dr. G. Neeck

Gutachter: Professor Dr. J. Lohmeyer

Tag der Disputation: 26.05.2003

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	GLUKOKORTIKOIDE	1
1.1.1	<i>Geschichte der Glukokortikoide</i>	1
1.1.2	<i>Wirkungen und Nebenwirkungen der Glukokortikoide</i>	3
1.1.3	<i>Glukokortikoide bei rheumatoider Arthritis</i>	3
1.2	RHEUMATOIDE ARTHRITIS (RA)	4
1.2.1	<i>Definition der rheumatoiden Arthritis</i>	4
1.2.2	<i>Epidemiologie der rheumatoiden Arthritis</i>	5
1.2.3	<i>Ätiologie und Pathogenese der rheumatoiden Arthritis</i>	5
1.2.4	<i>Symptomatik und Stadien der rheumatoiden Arthritis</i>	6
1.2.4.1	Prodromalstadium	6
1.2.4.2	Erstes Stadium	6
1.2.4.3	Zweites Stadium	7
1.2.4.4	Drittes Stadium	7
1.2.4.5	Viertes Stadium	8
1.2.4.6	Extraartikuläre Manifestationen	8
1.2.5	<i>Diagnose der rheumatoiden Arthritis</i>	8
1.2.6	<i>Therapie der rheumatoiden Arthritis</i>	9
1.3	HORMONWIRKUNGSMECHANISMEN UND GENREGULATION	10
1.3.1	<i>Hormonelle Wirkungsmechanismen und Kernhormonrezeptoren</i>	10
1.3.2	<i>Der Glukokortikoid-Rezeptor (GR)</i>	12
1.3.3	<i>NF-κB bei RA</i>	15
2	FRAGESTELLUNG	17
3	PATIENTEN UND METHODEN	19
3.1	PATIENTEN UND KONTROLLGRUPPE	19
3.2	PRÄPARATION DER LYMPHOZYTEN	19
3.3	PRÄPARATION DES GANZZELLEXTRAKTES	19
3.4	SDS-PAGE UND WESTERN-BLOT	20
3.5	BELICHTETE FILME SCANNEN UND STATISTISCHE METHODEN	20
4	ERGEBNISSE	22
4.1	STATISTISCHE AUSWERTUNG DER GR-EXPRESSIONSDATEN	27
4.2	STATISTISCHE AUSWERTUNG DER P50-EXPRESSIONSDATEN	29

4.3	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN GR- UND p50-EXPRESSION BEI NICHT KORTISOLBEHANDELTEN RA-PATIENTEN	31
5	DISKUSSION	33
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	38
7	LITERATURVERZEICHNIS	39
8	DANKSAGUNG	50
9	LEBENS LAUF	51

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
AU	Arbitrary unit (willkürliche Einheit)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CRH	Corticotropin releasing hormone
DBD	DNA-Bindedomäne
GR	Glukokortikoidrezeptor
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HPA	Hypothalamus-Pituitary-Adrenal
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
kDA	Kilodalton
LBD	Liganden-Bindedomäne
MCP	Metakarpophalangealgelenke
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NW	Nebenwirkung
PIP	proximale Interphalangealgelenke
PMBC	peripheral mononuclear blood cells
RA	Rheumatoider Arthritis
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

1 Einleitung

1.1 Glukokortikoide

1.1.1 Geschichte der Glukokortikoide

Die Nebennieren wurden im Verlauf der Geschichte der Medizin erst relativ spät entdeckt. In den Anatomieatlanten von Andreas Vesalius (1514-1564) sind sie nicht abgebildet. Die Erstbeschreibung wird dem Anatomen Bartholomäus Eustachius (etwa 1520-1574) zugeschrieben. Die Unterscheidung zwischen Nebennierenrinde und -mark wurde in den Jahren 1862 bis 1864 von dem Würzburger Anatom Albert von Koelliker (1817-1905) beschrieben. Schon damals nahm Koelliker eine unterschiedliche Funktion beider Nebennierenanteile an. In der von Thomas Addison (1793 bis 1860) geschriebenen Monographie, welche 1855 erschien, beschrieb er das Bild der heute bekannten Nebenniereninsuffizienz. Die Funktion der Nebenniere blieb aber weiterhin unklar. Ende des 19. Jahrhunderts beschrieb der französische Physiologe Charles-Edouard Brown-Séquard (1817-1864), dass die Extirpation der Nebenniere den baldigen Tod der Tiere hervorrief.

Dem Kanadier William Osler (1879-1919) gelang es mit Glycerin Nebennierenextrakte aus Schweinen zu gewinnen und somit ein potentiell Heilmittel zu erhalten. 1897 deckte John Jakob Abel (1857-1938) die chemische Struktur des Nebennierenmarkhormons „Epinephrin“ (Adrenalin) auf, dessen Mangel lange Zeit fälschlicher Weise als Ursache für den Morbus Addison angenommen wurde. Arthus Biedel (1869-1933) gelang der Beweis, dass nur die Nebennierenrinde lebensnotwendig ist, nicht aber das Nebennierenmark. Ebenso zeigte er, dass nicht das Adrenalin, sondern ein lebenswichtiges anderes „Hormon“ in der Nebennierenrinde zu suchen ist (Kuhl, 2001).

Die ersten erfolgreichen verbesserten Nebennierenrindenextrakte kamen 1927 aus verschiedenen Labors. Insbesondere das von der Arbeitsgruppe um Frank A. Hartmann (1883-1971) an der Universität Buffalo entwickelte „Kortin“ war weitgehend frei von Adrenalin (Hartmann und Brownell, 1930). Die Applikation von „Kortin“ bei nebennierenlosen Tieren verlängerte die Lebensdauer deutlich. Das Interesse der Pharmaindustrie an einem endokrinen Wirkstoff wurde

immer größer. Unterschiedlichste Laboratorien und Einrichtungen weltweit forschten nach den verschiedenen Botenstoffen der Nebennierenrinde. Unter anderem Edward C. Kendall (1886-1972) als Leiter des biochemischen Labors der Mayo-Klinik bei Chicago, Tadeusz Reichstein (1897 bis 1996) und Kollegen in Zürich sowie Wintersteiner und Mitarbeiter an der Columbia-Universität bemühten sich um die Isolierung der Nebennierenrindenhormone (Kendall, 1950). Die Arbeitsgruppe um Reichstein konnte 1936 zeigen, dass die gesuchten Substanzen zur Gruppe der Steroide gehörten. Es wurden bis 1946 nicht weniger als 29 verschiedene Steroide aus der Nebennierenrinde isoliert (Kuhl, 2001). Die später Kortison genannte Substanz wurde gleich dreimal isoliert, u.a. „als „compound F“ von Wintersteiner, als „Substanz Fa“ durch Reichstein und als „compound E“ von der Arbeitsgruppe Kendall. Das spätere Kortison oder Hydrokortison wurde 1937/38 von Reichstein hergestellt“ (Kuhl, 2001). Dem Mediziner Hans Selye (1907-1982) gelang es, eine Unterteilung der Nebennierenrindenhormone in „Mineralokortikosteroide“ und „Glukokortikosteroide“ vorzunehmen. Des weiteren führt Selye den Begriff „Stress“ in die Medizin ein und mit diesem verbunden die „Hypophysen-Nebennieren-Achse“.

Schon in den 30er Jahren wurden Therapieversuche mit Extrakten aus der Nebennierenrinde durchgeführt. Kliniker wie der Leiter der rheumatologischen Abteilung der Mayo-Klinik Philipp Showalter Hench (1896-1965) beobachteten eine Verbesserung der arthritischen Beschwerden u.a. bei zusätzlicher Erkrankung wie Hepatitis oder bei Estrogentherapie und Schwangerschaft. Im September des Jahres 1948 zeigte sich nach einwöchiger Behandlung einer Patientin mit „compound E“ eine deutliche Besserung der arthritischen Beschwerden (Hench et al., 1949). Die besser absorbierbare acetylierte Form des „compound E“ stand ab Januar 1949 zur Verfügung. Am 13. April 1949 trat die Mayoklinik an die Öffentlichkeit. Mit Begeisterung wurde die neue „Wunderdroge“ aufgenommen. Schon im Dezember 1950 erhielten die wesentlichen Protagonisten Edward Kendall, Phillip Hench und Tadeusz Reichstein, den Nobelpreis für Medizin und Physiologie (Kuhl, 2001). Die Firma Schering entwickelte 1955 das Prednisolon mit 4fach stärkerer Wirkung als Kortisol und deutlich geringerer mineralokortikoider Wirkung. Es folgten viele weitere verwandte Präparate, wie sie heute zur Anwendung kommen.

1.1.2 Wirkungen und Nebenwirkungen der Glukokortikoide

Glukokortikoide sind potente antiphlogistisch wirksame Substanzen, die in eine Reihe von physiologischen Prozessen involviert sind (Eggert et al., 2001). Sie wirken unter anderem steigernd auf die Glukoneogenese (Nebenwirkung (NW): Steroiddiabetes), Kaliumexkretion (NW: Muskelkrämpfe, Alkalose), Natrium- und Wasserretention (NW: Ödeme, Hypertonie), Kalziumausscheidung (NW: Osteoporose) oder Appetit (NW: Gewichtszunahme). Es erfolgt eine Hemmung der Proteinbiosynthese (NW: Muskel- und Hautatrophie, Wundheilungsstörung), Fettabbau und Umverteilung (NW: Stammfettsucht, Vollmondgesicht), verminderte Kalziumresorption (NW: Osteoporose), Immunsuppression (NW: Infektionsanfälligkeit), hämatologische Veränderungen (NW: Thrombozytose, Erythrozytose bei Reduktion der Lympho- und Monozyten, Thromboseneigung, Granulozytose). Auch zeigen sich psychische Veränderungen. Kortisol kann sowohl Euphorie als auch Depression oder Psychose hervorrufen. Des weiteren erhöht eine kombinierte Gabe von Glukokortikoiden in Kombination mit Antiphlogistika die Rate der Magen- und Darmulcera. An den Augen sind Katarakt oder Glaukom mögliche Nebenwirkungen des Kortisols (aus Bitsch, Klinikleitfaden Rheumatologie).

Die wichtigste therapeutische Wirkung ist der entzündungshemmende Effekt. (Schmidt, Checkliste Rheumatologie).

1.1.3 Glukokortikoide bei rheumatoider Arthritis

Glukokortikoide werden in der Nebennierenrinde gebildet. Ihre Sekretion wird über die sogenannte Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse (Hypothalamus-Pituitary-Adrenal-axis = HPA-Achse) gesteuert. Pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin 1 (IL-1) stimulieren im Hypothalamus die Ausschüttung von „Corticotropin-Releasing-Hormon“ (CRH) durch CRH-sezernierende Neuronen, was zu einem Anstieg der ACTH-Exkretion in der Hypophyse führt. ACTH bewirkt eine Ausschüttung von Glukokortikoiden aus der Nebennierenrinde und somit einen Anstieg der Glukokortikoidkonzentration im Blut (Besedowsky et al., 1986). Diese Interaktion zwischen der neuroendokrinen Achse und dem Immunsystem

konnte neben IL-1 auch für IL-2, IL-3, IL-6, Prostaglandin F₂ und TNF- α gezeigt werden (Sternberg und Wilder, 1993). Tierexperimentell fanden sich Hinweise für eine pathogenetische Relevanz dieser Interaktion. Es ist anscheinend genetisch determiniert, in welchem Ausmaß die Achse Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenrinde aktiviert wird. Klinische Studien der HPA-Achsen Funktion bei rheumatischen Autoimmunerkrankungen zeigten einen reduzierten Kortisolanstieg während chirurgischer Stresssituation bei Patienten mit RA verglichen mit Patienten mit chronischer Osteomyelitis (Chikanza et al., 1992). Stimulationstests mit CRH bei Patienten mit RA ergaben einen deutlich höheren Anstieg der ACTH-Blutkonzentration und geringeren Anstieg der Kortisolkonzentration im Blut verglichen mit Gesunden, was eine relative Insuffizienz der Nebennierenrinde als Ursache haben könnte (Gudbjornsson et al., 1996). Die Aktivität der HPA-Achse steht mit der immunologischen Aktivität der Erkrankung in Verbindung. Es wurde bei Patienten mit rheumatoider Arthritis eine signifikante Korrelation zwischen Kortisolspiegeln und entzündlicher bzw. immunologischer Aktivität gemessen, wobei BSG, CRP, IL-6, IL-1 und TNF- α mit dem Kortisolspiegel korrelierten (Neeck et al., 1990; Boss et al., 2000). Patienten mit einer hohen Entzündungsaktivität hatten eine mehr als zweimal höhere Kortisolausschüttung über 24 Stunden als Patienten mit niedriger Aktivität. Allerdings scheint der Zusammenhang von Entzündungsaktivität und Anstieg der Kortisolausschüttung bei seropositiver RA schwächer zu sein als bei seronegativer RA (Peters et al., 1999). Es bleibt bis dato unklar wie weit oder an welchem Punkt die HPA-Achse bei Patienten mit rheumatoider Arthritis gestört ist. Man findet einen Anstieg des ACTH und Kortisols ausgelöst durch Zytokine, aber es scheint, dass dieser Anstieg inadäquat zu niedrig ist.

1.2 Rheumatoide Arthritis (RA)

1.2.1 Definition der rheumatoiden Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine Systemerkrankung des mesodermalen Bindegewebes, die hauptsächlich die Gelenke befällt. Die Kombination von Pannusbildung, Entzündung, Weichteil-, Knorpel- und Knochendestruktion kann zu bleibenden, auch schwerwiegenden Gelenkzerstörungen führen. Auch innere

Organe können mit beteiligt sein (Schmidt, Checkliste Rheumatologie).

1.2.2 Epidemiologie der rheumatoiden Arthritis

Die RA ist in Mitteleuropa mit ca. 1% Prävalenz die häufigste entzündlich rheumatische Erkrankung. Frauen erkranken 3 mal häufiger als Männer. Das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen dem 25. und 50. Lebensjahr, jedoch ist eine Erkrankung in jedem Alter möglich (Schmidt, Checkliste Rheumatologie; Hettenkofer, Rheumatologie).

1.2.3 Ätiologie und Pathogenese der rheumatoiden Arthritis

Die Ätiologie der rheumatoiden Arthritis ist bis heute unklar. Es existieren lediglich Hypothesen. Manche Untersuchungen sprechen für eine fehlgesteuerte oder unzureichende Immunantwort des Körpers auf einen Kontakt mit einem Antigen (Bitsch, Klinikleitfaden Rheumatologie; Hettenkofer, Rheumatologie; Schmidt, Checkliste Rheumatologie) Als eventuelles Antigen sind Viren (Epstein-Barr) oder Bakterien im Gespräch. Neben der exogenen Antigen-Komponente für die Ausprägung der rheumatoiden Arthritis spielt auch die genetische Disposition eine Rolle. So findet man bei RA-Patienten gehäuft das Antigen HLA-DR4. Der gestörte Ablauf des Immunprozesses spiegelt sich humoral in der übermäßigen Bildung von Rheumafaktor (Antiglobulin) wider. Diese Immunglobuline, welche sich gegen den Fc-Teil der IgG-Antikörper richten, sind bei Patienten mit rheumatoider Arthritis unphysiologisch vermehrt (Hettenkofer, Rheumatologie; Burmester, Taschenatlas der Immunologie). Hier wird die Autoimmunität der Erkrankung besonders deutlich. Allerdings sind auch rheumatoide Arthritiden ohne Rheumafaktor bekannt, die sogenannten seronegativen rheumatoiden Arthritiden. Autoimmunreaktionen sind durch das Auftreten autoreaktiver B-Zellen und zytotoxischer T-Zellen gekennzeichnet. Eine entscheidende Bedeutung kommt den T-Lymphozyten zu, welche von Makrophagen das phagozytierte Antigen präsentiert bekommen. Im gesunden Zustand der Selbsttoleranz existieren zwar auch autoreaktive Zellklone, ihnen wird jedoch keine Unterstützung durch T-Helferzellen gewährt, so dass diese inaktiv bleiben. Momentan gibt es

unterschiedliche Ansätze, wie die pathogene Aktivierung der T-Helferzelle ermöglicht werden könnte. So kann die Expression eines Autoantigens zusammen mit einem HLA-Antigen auf Monozyten zu einer Aktivierung der T-Helferzellen führen. Bakterielle autoantigenähnliche Antigene können in Konjugation mit einem tolerierbarem Antigen T-Helferzellen aktivieren (molekulares Mimikry; Burmester, Taschenatlas der Immunologie). Die lokale Entzündungsreaktion wird durch proinflammatorische Zytokine (Interleukin 1, 2, 6 und TNF- α) von endogenen Antigenen (Immunglobulin G, Spaltprodukte, Kollagene) unterhalten. Über die Aktivierung weiterer Zelltypen (Makrophagen, B- und T-Zellen, Synovialzellen) werden Wachstumsfaktoren, Antikörper und Enzyme freigesetzt, woraus letztlich die Synovialitis und Gelenkdestruktion resultiert (Bitsch, Klinikleitfaden Rheumatologie). Den T-Lymphozyten kommt folglich dabei eine entscheidende Bedeutung zu.

1.2.4 Symptomatik und Stadien der rheumatoiden Arthritis

Die rheumatoide Arthritis wird in folgende Stadien eingeteilt:

1.2.4.1 Prodromalstadium

Das Prodromalstadium, welches Tage bis Monate dem Krankheitsbeginn vorausgehen kann und nicht immer fassbar ist, geht mit uncharakteristischen Krankheitssymptomen einher. Öfter treten flüchtige Arthralgien, Myalgien, rasche körperliche und geistige Ermüdbarkeit oder Sehnenscheidenentzündungen auf (Bitsch, Klinikleitfaden Rheumatologie; Hettenkofer, Rheumatologie; Schmidt, Checkliste Rheumatologie). Meist ist eine synovitische Gelenkschwellung das Erstsymptom (Bitsch, Klinikleitfaden Rheumatologie).

1.2.4.2 Erstes Stadium

Das erste Stadium der rheumatoiden Arthritis ist durch länger anhaltende synovitische Schwellungen v.a. symmetrisch im Bereich der Carpi, Fingergrund- und Mittelgelenke sowie durch eine Morgensteifigkeit über 30 Minuten gekennzeichnet. Es zeigt sich ein positives Gaenslen-Zeichen und ein positiver volarer Beugeschmerz der Handgelenke. Vorfußschmerzen im Bereich der

Zehengrundgelenke sind ebenfalls Frühzeichen der Erkrankung. Des Weiteren ist die Kraft in den Händen deutlich verringert (Bitsch, Klinikleitfaden Rheumatologie; Hettenkofer, Rheumatologie; Schmidt, Checkliste Rheumatologie). Es finden sich zu diesem Zeitpunkt noch keine radiologischen Veränderungen. Ein monarthritischer Beginn kommt in ca. 20% der Fälle vor (Schmidt, Checkliste Rheumatologie). Die rheumatoide Arthritis kann alle Gelenke des Menschen befallen. In schweren Fällen ist sogar ein polyartikulärer Beginn mit Fieberschüben möglich (Hettenkofer, Rheumatologie). Leitsymptome sind die synovitische Gelenkschwellung mit Morgensteifigkeit, Kraftlosigkeit und wechselnd starken Schmerzen (Bitsch, Klinikleitfaden Rheumatologie).

1.2.4.3 Zweites Stadium

Im zweiten Stadium kommt es zu radiologisch sichtbaren Veränderungen im Sinne vom Verlust der Grenzlamelle, gelenknahe Osteoporose sowie zunehmend arthritische Direktzeichen im Sinne von Knorpel- und Knochendestruktionen. Diese können sich z.B. als Erosionen oder Usuren darstellen. Zudem kommt es aufgrund der Inaktivität bei Schmerzen zunehmend zu Muskelatrophien so im Bereich der Mm. interossei der Hände. Gehäuft kommt in diesem Stadium auch die Beteiligung von Sehnenscheiden und Schleimbeuteln vor (Hettenkofer, Rheumatologie).

1.2.4.4 Drittes Stadium

Dieses Stadium ist gekennzeichnet durch die sichtbaren Veränderungen der Patienten im Sinne der klassischen Deformierungen der rheumatoiden Arthritis. Radiologisch finden sich jetzt Luxationen und Subluxationen der zerstörten Gelenke. Typische Deformitäten der Hand sind die ulnare Deviation, die Knopfloch- und Schwanenhalsdeformität sowie die 90°/90° Deformität des Daumens. Häufig entwickelt sich eine diffuse Osteoporose aufgrund der Inaktivität. Neben den Zerstörungen an den Gelenken können auch Bänderschäden auftreten. Gefürchtet ist hier eine Dislokation im Bereich des Atlas-Axis-Gelenks, welche bei einer Luxation des Dens axis zur Kompression des Rückenmarks

führen kann. In schweren Fällen einer mutilierenden rheumatoiden Arthritis können die Destruktionen an den Gelenken sehr rasch und ausgeprägt verlaufen und innerhalb kurzer Zeit zu starken Behinderungen führen (Hettenkofer, Rheumatologie).

1.2.4.5 Viertes Stadium

Das vierte Stadium ist gekennzeichnet durch fibröse oder radiologisch sichtbare knöcherne Ankylosen der einzelnen Gelenke, wodurch praktisch eine Invalidität des Patienten resultieren kann (Hettenkofer, Rheumatologie).

1.2.4.6 Extraartikuläre Manifestationen

Neben dem Befall der Gelenke kann die rheumatoide Arthritis selten auch andere Organsysteme betreffen. 2-5 % aller RA-Patienten zeigen klinisch eine extraartikuläre Manifestation im Sinne einer Vaskulitis (Rheumatoide Vaskulitis).

An der Haut finden sich Rheumaknoten, bei einer Vaskulitis eventuell auch Nekrosen. Am Nervensystem kann es zu Neuropathien, in seltenen Fällen auch zu einer Mononeuritis multiplex kommen. Die Atemwegsorgane werden manchmal im Sinne von Pleuritis oder interstitieller Lungenfibrose betroffen, und am Herzen können Peri-, Myo- und Endokarditis auftreten. An den Augen sind Episkleritis und Skleritis mögliche extraartikuläre Manifestationen. Beim Gastrointestinaltrakt sind Ulcerationen und Colitis zu erwähnen. Als wichtige Begleitphänomene sind oftmals ein Raynaud- und Sicca-Syndrom vorhanden. Bis zu 30 % aller RA-Patienten entwickeln eine Xerophthalmie bzw. Xerostomie. Allein die entzündlich rheumatische Grunderkrankung führt zur Osteoporose (Bitsch, Klinikleitfaden Rheumatologie).

1.2.5 Diagnose der rheumatoiden Arthritis

Die Diagnose der rheumatoiden Arthritis stützt sich auf die Diagnosekriterien der American Rheumatism Association (ARA), publiziert im Jahre 1988 (Arnett et al., 1988).

Es liegen folgende Kriterien zugrunde:

- 1.) Es besteht eine Morgensteifigkeit von mehr als einer Stunde für den Zeitraum von länger als 6 Wochen.
- 2.) Es findet sich eine Arthritis (Weichteilschwellung) in 3 oder mehr Gelenkregionen, die von einem Arzt beobachtet werden und seit länger als 6 Wochen besteht.
- 3.) Es besteht eine Arthritis im Bereich der Hand- und Fingergelenke (Carpi, Metacarpophalangealgelenke (MCP), proximale Interphalangealgelenke (PIP)) für länger als 6 Wochen.
- 4.) Die Arthritiden sind symmetrisch für länger als 6 Wochen.
- 5.) An der Haut finden sich subkutane Rheumaknoten an den Streckseiten der Gelenke.
- 6.) Es findet sich laborchemisch ein positiver Rheumafaktor.
- 7.) Radiologisch zeigen sich Veränderungen der Gelenke im Sinne von gelenknaher Osteoporose oder Erosionen.

Es müssen 4 der 7 Kriterien der Klassifikation erfüllt sein, um eine rheumatoide Arthritis zu diagnostizieren. Die Kriterien sichern die Verdachtsdiagnose der rheumatoiden Arthritis mit einer Sensitivität von 91-94% und einer Spezifität von 89% (Bitsch, Klinikleitfaden Rheumatologie).

1.2.6 Therapie der rheumatoiden Arthritis

Die Therapie der RA ist fast immer eine kombinierte und komplexe, d. h. sie schließt verschiedene Medikamente und Therapieverfahren ein. Die Therapie muß dynamisch sein, d. h. sich ändernden Verhältnissen anpassen (Schmidt, Checkliste Rheumatologie). Zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis werden verschiedene Präparate unter anderem nicht steroidale Antirheumatika (NSAR), Cortison und Basistherapeutika verwendet. An erster Stelle stehen nach dem klassischen Stufenschema die NSAR. Bei nicht ausreichender Therapie kommen an zweiter Stelle Glukokortikoide zum Einsatz, welche mit ihrem antiphlogistischen Effekt auch die Schmerzen deutlich lindern können, wodurch der NSAR-Verbrauch

reduziert werden kann. Da die Cortisonmonotherapie in den meisten Fällen nicht unterhalb der Cushing-Schwelle zu dauerhafter Linderung führt, wird die Glukokortikoidtherapie meist mit einer Basistherapie kombiniert. Hierdurch kann in vielen Fällen eine Reduktion der Glukokortikoiddosis auf Bereiche unterhalb der Cushing-Schwelle erzielt werden. Als gängigste Basistherapeutika seien hier Methotrexat, Leflunomid, Sulfasalazin oder Chloroquin erwähnt (Bitsch, Klinikleitfaden Rheumatologie). Eine weitere Möglichkeit der Therapie eröffnet der Einsatz biologischer Immunmodulatoren, welche die Wirkung von TNF- α hemmen können. Hier sind die zwei momentan zugelassenen Präparate Etanercept und Infliximab zu nennen, welche bereits mit sehr guter Wirkung bei rheumatoider Arthritis angewandt werden.

1.3 Hormonwirkungsmechanismen und Genregulation

1.3.1 Hormonelle Wirkungsmechanismen und Kernhormonrezeptoren

Um die spezifischen Funktionen der einzelnen Zellen im Gewebe gewährleisten zu können, ist eine Kommunikation der unterschiedlich differenzierten Zellen von großer Bedeutung. Hormone, von endokrinen Drüsen gebildet, spielen dabei eine große Rolle. Von endokriner Ebene aus können über Signalkaskaden schließlich Gene reguliert werden. Grundsätzlich lassen sich zwei Klassen von Hormonen, hydrophile und lipophile, unterteilen. Beide unterscheiden sich in Ihrer Wirkungsweise.

Zur Klasse der hydrophilen Hormone gehören Peptidhormone wie Insulin und Aminosäurederivate wie Katecholamine. Beide können aufgrund Ihrer hydrophilen Struktur die Zellmembran nicht durchdringen. Ihre Wirkung wird über Transmembranrezeptoren vermittelt. Die Hormonbindung an einen solchen Rezeptor führt zur Auslösung einer Signalkaskade im Zytoplasma. Über sogenannte 2nd Messenger wie z. B. cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat), cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) oder Calciumionen gelangt die Hormoninformation über weitere Kaskaden in den Zellkern. Im Kern wird das Hormonsignal in Form einer Modulation der Genexpression umgesetzt.

Zu den lipophilen Hormonen zählen die Steroidhormone (inklusive VitaminD3), Retinsäureabkömmlinge, Eicosanoide wie Prostaglandin und

Schilddrüsenhormone wie Thyroxin. Steroidhormone besitzen das Grundgerüst des Gonans, einen aus 4 gesättigten Ringen bestehenden Kohlenwasserstoffs. An diesem sind je nach Steroidhormon unterschiedlich lange Seitenketten am C17-Atom verknüpft. Aufgrund ihrer Lipophilie durchdringen die Steroide die Zellmembran und werden im Zytoplasma oder im Kern an spezifische Rezeptoren gebunden (O'Malley and Tsai, 1992). Diese aktivierten Rezeptoren regulieren als hormonabhängige Transkriptionsfaktoren die Aktivierung oder Hemmung ihrer Zielgene (Renkawitz, 1990; Abe et al., 1997, Akerblom und Mellon, 1991; Baniahmad et al., 1992).

Kernhormonrezeptoren kommen nur in geringer Menge in Zielzellen vor ($10^3 - 10^4$ Moleküle pro Zelle) und zeigen eine hohe Affinität ($K_D = 10^{-8} - 10^{-10}$ M) und Spezifität für ihren Liganden (Koolman und Röhn, Taschenatlas der Biochemie). Die Kernhormonrezeptoren lassen sich aufgrund von Sequenzhomologien in 6 Proteindomänen (A-F) unterteilen (Green et al., 1986). Diesen Domänen wird die Funktion der DNA-Bindung, Transaktivierung, Dimerisierung, Ligandenbindung, strukturelle Organisation und Kernlokalisierung zugeordnet. Die DNA-Bindedomäne dieser Rezeptoren besteht aus zwei Zinkfingern (Evans et al., 1988; Luisi et al., 1991). Durch eine Zink-Ion Bindung wird eine Proteinkonformation stabilisiert, die dem Rezeptor die Bindung an DNA ermöglicht. Durch Dimerbildung und Bindung an sogenannte „Hormon-Response-Elements“ (HRE's, GREs bei Glukokortikoiden) in der DNA (Berg, 1989) kann der Rezeptor regulierend in die Transkription seines Zielgens eingreifen (Yamamoto, 1985; Beato et al., 1995). Die sequenzspezifische DNA-Bindung verschiedener Rezeptoren wird durch eine Aminosäuresequenz zwischen den beiden Zink-Fingern determiniert (Berg, 1989; Klug und Schwabe, 1995). Aufgrund der Dimerisierungseigenschaften und dem HRE-Aufbau lassen sich die Kernrezeptoren in 4 Klassen aufteilen (Evans, 1988; Mangelsdorf et al., 1995).

Klasse I:

Rezeptoren, die als ligandeninduzierte Homodimere an DNA binden (Tsai et al., 1988). Die DNA-Bindeelemente dieser Rezeptoren bestehen aus zwei, durch

einige Basenpaare getrennte, pallindromische Erkennungstellen (Tsai et al., 1988; Beato et al., 1995). Zu dieser Klasse gehören die Rezeptoren der Steroidhormone.

Klasse II:

Hormonrezeptoren, die neben Homodimeren auch Heterodimere mit dem Retinsäurerezeptor bilden können (Berrodin et al., 1992; Bugge et al., 1992). Als Erkennungssequenzen zur DNA-Bindung werden von den Klasse II-Rezeptoren meist direkte Sequenzwiederholungen erkannt. Zu den auf diese Weise wirksamen Hormonen zählen Thyroidhormone, Retinoide, Vitamin D3 und die Prostaglandine.

Klasse III:

Rezeptoren mit unbekanntem Ligand, welche hauptsächlich als Homodimere an direkte Sequenzbindungsstellen binden.

Klasse IV:

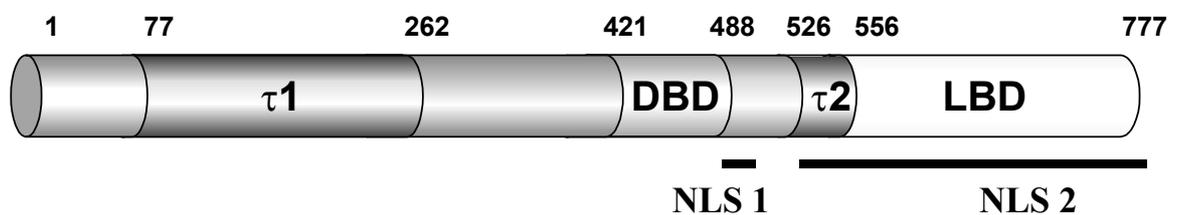
Rezeptoren mit unbekanntem Liganden, die als Monomere an die DNA binden.

1.3.2 Der Glukokortikoid-Rezeptor (GR)

Glukokortikoide wie Kortisol oder pharmazeutische Präparate wie Prednisolon entfalten ihre Wirkung durch Bindung an den Glukokortikoid-Rezeptor (GR). Der GR ist in nahezu allen Säugetiergeweben präsent und vermittelt die zelluläre Antwort auf endogen gebildete Glukokortikoide. Als hormoninduzierbarer Kernrezeptor war er 1985 der erste Transkriptionsfaktor, der isoliert und charakterisiert werden konnte (Hollenberg et al., 1985). Der GR besteht aus 777 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 94 Kilodalton (kD). Wie alle Angehörige der Superfamilie der Kernhormonrezeptoren besitzt der GR spezifische Domänen für Hormonbindung, DNA-Bindung, Dimerisierung und Transaktivierung von Zielgenen (Giguère et al., 1986, Hollenberg et al., 1987).

Die mit $\tau 1$ und $\tau 2$ bezeichneten Domänen haben autonome

Transaktivierungsfunktion, welche eine Verstärkung der Transkription bewirken kann (Hollerberg und Evans, 1988). Die DNA-Bindedomäne (DBD) besteht aus 67 Aminosäuren (Hollerberg und Evans, 1988). Das Bindemotiv ist die für die Kernrezeptoren charakteristische Zink-Finger-Struktur. Die Hormon- oder Ligandenbindedomäne (LBD) erstreckt sich über einen großen Teil des C-terminalen Endes (Rusconi und Yamamoto, 1987; Pratt et al., 1988). Weiterhin besitzt der GR zwei Kerntransportsignale im C-Terminus („Nuclear-Localisation-Signal“, NLS 1,2). Eine vereinfachte graphische Darstellung der GR-Struktur zeigt Figur 1.



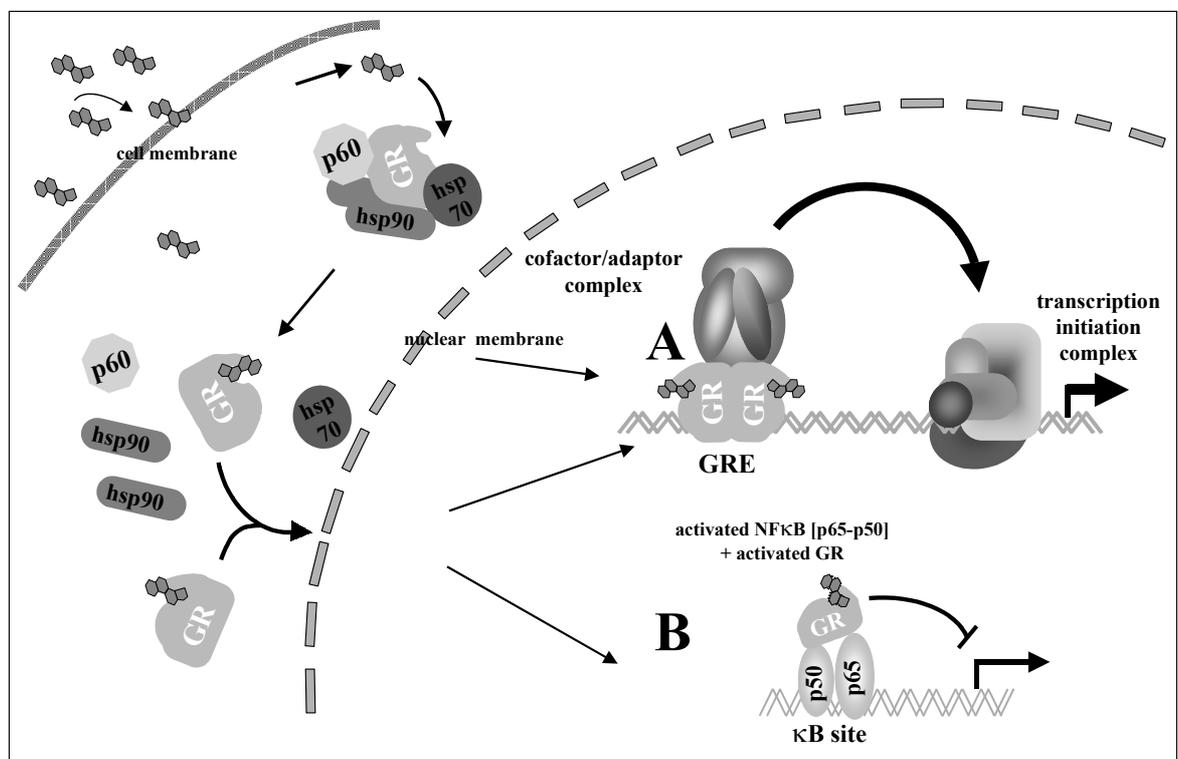
Figur 1 (Eggert et al.)

Der GR lässt sich in folgende funktionelle Domänen unterteilen:

1. DNA-Bindedomäne (DBD), wo der Rezeptor an die DNA bindet.
2. Die Liganden- oder Hormonbindedomäne (LBD), wo das Hormon an den GR bindet.
3. Die Domänen $\tau 1$ und $\tau 2$ bewirken die Transaktivierung nach DNA-Bindung.
4. Die Kerntransportsignale (nuclear-localisation-signal) NLS 1 und NLS 2.

In Abwesenheit von Glukokortikoiden liegt der GR, mit verschiedenen Hitzeschockproteinen (hsp) assoziiert, in einem inaktiven zytoplasmatischen Komplex vor. Zu einem gewissen Teil findet man ihn jedoch auch im Kern (Czar et al., 1994; Akner et al., 1995). Durch Bindung von Glukokortikoiden erfährt der GR eine Konformationsänderung mit der Folge der Dissoziation der Hitzeschockproteine vom Rezeptor (Bohen und Yamamoto, 1993; Pratt, 1993). Der GR dimerisiert nun zu einem Homodimer, welches in den Kern transloziert. Das aktive Rezeptorhormondimer kann nun an GRE's („Glucocorticoid Receptor

Response Elements“) im Promoterbereich verschiedener Gene binden. Diese DNA-Sequenzen sind meist in Pallindromen organisiert. (Beato et al., 1989; Beato, 1989). Durch Bindung an diese Sequenzen wirkt das Rezeptordimer als Transkriptionsfaktor und kann somit in die Transkription des nachfolgenden Strukturgens regulierend, aktivierend wie hemmend, eingreifen. Die Aktivierung erfolgt über die Bindung an die beschriebenen GRE's, die Repression über die Bindung sogenannter negativer Bindungsstellen (nGRE's) (Sakai et al., 1988). Mehrere benachbarte GRE's führen zu einer kooperativen Bindung von Rezeptordimeren und somit zu einer Steigerung der Transkriptionsrate (Banahmad et al., 1991). Einige bekannte GR-Interaktionsproteine sind NF-1 (Buetti und Kühnel, 1986; Cato et al., 1988), AP-1 (Beato et al., 1995) und NF- κ B (Ray und Prefontaine, 1994; Scheinmann et al., 1995). Die Interaktion v.a. von NF- κ B mit dem GR spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation inflammatorischer Prozesse. Der aktivierte GR bindet dabei an DNA-gebundenes NF- κ B und bewirkt somit eine Hemmung bzw. Transrepression der pro-inflammatorischen Geninduktion von NF- κ B. Der beschriebene Ablauf der GR-Aktivierung mit Transaktivierung und Transrepression ist in Figur 2 graphisch dargestellt.



Figur 2 (Eggert et al.)

Glukokortikoide diffundieren durch die Zellmembran, binden an den mit Hitzeschockproteinen gebundenen inaktiven GR. Es erfolgt die Abdissoziation der Hitzeschockproteine und Freilegung des GR-Kerntransportsignals. Nach Dimerisierung kann der GR an die GRE's der DNA binden und somit zu einer Transaktivierung anti-inflammatorischer Gene führen (in A dargestellt). Der GR kann im Zellkern wie in B dargestellt an NF- κ B binden und so zu einer Transrepression der pro-inflammatorischen Gene führen.

1.3.3 NF- κ B bei RA

NF-kappaB (NF- κ B) ist ein Transkriptionsfaktor, der bei Säugetieren an der Regulierung der Immunantworten beteiligt ist (Eggert et al., 2001). Es ist ein heterodimeres DNA-Bindeprotein, welches aus zwei Untereinheiten besteht, der p50- und der p65 (Rel A)-Untereinheit. NF- κ B wird durch extrazelluläre Stimuli wie das pro-inflammatorische Zytokin Interleukin 1 α (IL-1 α) oder den Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) rasch aktiviert. Die Aktivierung von NF- κ B führt zur Steigerung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 (Droogmans et al., 1992). Die Aktivierung des NF- κ B geschieht über eine phosphorylierungsabhängige Dissoziation der inhibitorischen NF- κ B Untereinheit I κ B vom p50 und Rel A-Komplex im Zytoplasma und resultiert in einer Translokation des nun aktivierten p50/Rel A Heterodimers in den Zellkern (Bäuerle und Henkel, 1994; McKay und Cidlowski, 1999). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass der GR physiologisch mit NF- κ B interagiert und dabei zu einer Inhibition der durch NF- κ B gesteuerten Transkription führt (Ray und Prefontaine, 1994; McKay und Cidlowski, 1998; siehe Figur 2) Des weiteren wurde eine direkte physische Interaktion zwischen dem GR und NF- κ B in Co-Immunpräzipitationen aufgezeigt (Ray und Prefontaine, 1994; Scheinmann et al., 1995; Caldenhoven et al., 1995). Die interagierenden Regionen wurden auf DNA-Bindedomänen (DBD) und Liganden-Bindedomänen (LBD) zugeordnet (Caldenhoven et al., 1995). Genauere Analysen ergaben, dass die Zinkfinger Domäne des GR für die Hemmung der durch NF- κ B modulierten Genexpression nötig ist (Scheinmann et al., 1995). Der molekulare Mechanismus der Inhibition, der durch NF- κ B gesteigerten Transkription durch den GR scheint

auf einer Interaktion des GR's mit der für die Transkription essentiellen RNA-Polymerase II zu beruhen (Nissen und Yamamoto, 2000).

Die proinflammatorische Wirkung des NF- κ B spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis. Asahara et al., 1995 berichteten über eine sehr hohe DNA-Bindungs-Affinität von NF- κ B in Kernextrakten, die aus Synoviamaterial von RA-Patienten gewonnen und über einen „electrophoretic mobility shift assay (EMSA) untersucht wurden. Dies war die erste Studie, die über eine gesteigerte Expression des NF- κ B bei RA berichtete. Die Promotorgene der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 wurden ebenso mit EMSA untersucht und zeigten eine Induzierbarkeit durch NF- κ B (Abe et al., 1997; Miyazawa et al., 1998). Northernblot Analysen zeigten bei tierischen Modellen von rheumatoider Arthritis, dass die durch NF- κ B aktivierten pro-inflammatorischen Zytokine und Faktoren wie IL-1, IL-6 oder TNF- α durch eine adenovirale Überexpression von I κ B blockiert werden konnten (Miagkov et al., 1998). Die adenovirale Überexpression von I κ B in synovialen Makrophagen, Fibroblasten und T-Lymphozyten bei Patienten mit rheumatoider Arthritis hatten einen ähnlichen Effekt. Es zeigte sich eine starke Reduktion der IL-6 Produktion sowie eine moderate Erniedrigung anderer pro-inflammatorischer Zytokine. Die anti-inflammatorischen Zytokine hingegen blieben unbeeinflusst (Bondeson et al., 1999).

2 Fragestellung

Glukokortikoide sind, wie bereits erwähnt, weit verbreitet bei der Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen. Sie entfalten ihre Wirksamkeit durch Bindung an den zytoplasmatischen Glukokortikoid-Rezeptor (GR) und nachfolgender Translokation in den Zellkern, was schließlich zur Modulation der Gentranskription führt (Beato, 1989; Muller und Renkawitz, 1991; Eggert et al., 2001). Der molekulare Wirkungsmechanismus von Glukokortikoiden wird entweder über die Aktivierung der Transkription glukokortikoidabhängiger Gene oder die Transrepression von Genen, welche unter anderem durch pro-inflammatorische Faktoren wie z. B. NF- κ B induziert werden, vermittelt. Die letztere der beiden Möglichkeiten scheint ein Hauptmechanismus zu sein wie der durch Glukokortikoide induzierte anti-inflammatorische Effekt zur Ausprägung kommt (Göttlicher et al., 1998; Reichhardt et al., 2000; Barnes, 1998; siehe Figur 2).

In den letzten Jahren wurden mehrere Untersuchungen vorgenommen, um eine Korrelation zwischen der Expression des GR und Autoimmunkrankheiten festzustellen. Die Untersuchungen zeigten allerdings widersprüchliche Ergebnisse. In manchen Fällen war die GR-Dichte in Lymphozyten von RA-Patienten erniedrigt, auch zeigte sich ein erniedrigter GR-Spiegel in mononukleäre Zellen von Patienten mit Lupusnephritis, welche für die letzten 6 Monate keine Glukokortikoide bekommen hatten (Schlaghecke et al., 1992; Schlaghecke et al., 1994; Jiang et al., 2001). Weitere Untersuchungen zeigten eine Reduktion des GR nach Glukokortikoidgabe bei Kindern mit Autoimmunkrankheiten und Wiederanstieg ohne Glukokortikoidtherapie (Andreae et al., 2001). Eine andere Studie bestätigte die Abnahme der GR-Expression in mononukleären Zellen bei RA-Patienten nach Cortisonstoßtherapie mit Dexamethason und Erholung der GR-Expression auf Vorbehandlungswerte nach der letzten Behandlung (Wenting-Van Wilk et al., 1999). Weiterhin wurde bei mit IL-1 β vorstimulierten Synovialfibroblasten eine Erhöhung der Rezeptordichte festgestellt, wenn man diese mit Dexamethason behandelte (Hoshino et al., 1994). Eine höhere Expression des GR's in mononukleären Zellen wurde bei Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn vor Steroidgabe festgestellt. Die Expression sank auf

normale Werte nach Glukokortikoidgabe (Schottelius et al., 2000).

Weiterhin gibt es Beweise dafür, dass der pro-inflammatorische Transkriptionsfaktor NF- κ B in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis bedeutsam ist. Als aktive Form besteht dieser Faktor aus zwei Untereinheiten, der p50- und der p65-Untereinheit (Eggert et al., 2001; Göttlicher et al., 1998; Reichhardt et al., 2000) wobei der p50-Untereinheit eine Schlüsselrolle in Verbindung mit entzündlichen Gelenkentzündungen und Gelenkzerstörung zugeschrieben wird (Campbell et al., 2000). NF- κ B spielt eine entscheidende Rolle in der transkriptionellen Regulation pro-inflammatorischer Faktoren (Eggert et al., 2001; Bäuerle und Henkel, 1994; Pahl, 1999). Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen spielt p50 eine entscheidende Rolle, beispielsweise bei der experimentellen Autoimmunencephalomyelitis (Hilliard et al., 1999).

Wir entschieden uns daher die Expression des anti-inflammatorischen Transkriptionsfaktors GR und die Expression der pro-inflammatorischen NF- κ B Untereinheit p50 bei RA-Patienten, glukokortikoid und nicht glukokortikoidbehandelt, sowie bei Gesunden miteinander zu vergleichen.

Wie frühere Studien zeigen (Neeck et al., 1990; Boss et al., 2000), korreliert der Blutkortisolspiegel von unbehandelten RA-Patienten positiv mit den Entzündungsparametern wie der BSG, CRP und IL-6. Daher wurde auch eine Korrelation von der Expression des anti-inflammatorischen Transkriptionsfaktor GR und des pro-inflammatorischen Gegenspieler NF- κ B (p50) in Lymphozyten unbehandelter RA-Patienten analysiert.

Zur Bestimmung der Expression von GR und der p50 Untereinheit von NF- κ B benutzten wir den semiquantitativen Immunoblot. Dieser ermöglicht sowohl von GR als auch von p50 fast den gesamten Zellanteil zu detektieren.

3 Patienten und Methoden

3.1 Patienten und Kontrollgruppe

37 Patienten, welche die Kriterien des American Collage of Rheumatology (ACR) erfüllten (Arnett et al., 1988) und 14 gesunde Kontrollen wurden untersucht. Die Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden in zwei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe mit 16 Patienten, die vorher noch nie Glukokortikoide bekommen hatte und eine Patientengruppe mit 21 Patienten, welche über mindestens ein Jahr eine kontinuierliche Steroidtherapie von 5-15mg Prednisolon täglich erhalten hatten. Alle Gruppen waren gleichverteilt im Sinne des Geschlechts, nicht gleichverteilt bezogen auf das Alter. Allerdings fand sich keine Korrelation in Bezug auf Alter und p50-Expression ($p=0,52$) oder GR-Expression ($p=0,12$), ermittelt über Spearman rank Korrelation. Die Blutproben wurden von allen Teilnehmern zwischen 9.00 und 10.00 Uhr morgens abgenommen.

3.2 Präparation der Lymphozyten

Von jedem Teilnehmer wurden 40ml heparinisiertes Vollblut und eine Serumküvette abgenommen. Unmittelbar nach der Blutentnahme erfolgte die Lymphozytenextraktion über einen Ficoll-Histopaque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) Gradienten. Die peripheren mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells = PBMC's) wurden dreimal in PBS-Puffer gewaschen und von Ficoll befreit. Das Zellpellet bestand mikroskopisch analysiert zu ca. 90% aus mononukleären Blutzellen. Eine FACS-Analyse erbrachte einen Lymphozytenanteil von 85-88% sowie einen Monozytenanteil von 7-10%. Dies ohne Unterschied in Bezug auf die drei zu untersuchenden Gruppen.

3.3 Präparation des Ganzzellextraktes

Die so gewonnenen PBMC's wurden mit doppeltem Zellvolumen hypotonem NETN-Puffer (100 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8, 10mM Tris, 0,5% Nonidet P-40), dem die Proteaseinhibitoren Aprotinin und Leupeptin in einer Konzentration von 10µg/ml zugesetzt wurden, für 45 Minuten unter Schwenken inkubiert. Es folgten

dreimalig Frieren/Tauen in flüssigem Stickstoff bzw. 37° C und weitere Inkubation für 15 Minuten in NETN unter leichtem Schütteln. Nach einer Zentrifugation bei 14000g und 4° C für 10 Minuten wurde das gewonnene Ganzzellextrakt vorsichtig abpipetiert und die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt. Die so gewonnene Probe wurde anschließend in Teilmengen eingefroren. Alle Chemikalien, die Verwendung fanden, wurden von der Firma Sigma (München, Deutschland) geliefert.

3.4 SDS-Page und Western-Blot

Die Proteine der Ganzzellextrakte (50 und 100 µg pro Proband) sowie 12,5, 25, 50 und 100µg HeLa-Ganzzellextrakt wurden durch eine SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) aufgetrennt (Laemmli, 1970). Das so resultierende Gel wurde danach für 1,75 Stunden einem Elektrobplot unterzogen und die Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid Membran (Millipore Deutschland) transferiert. Die Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungswerten über Nacht mit PBS-T (Phosphate buffered saline, 0,1% Tween 20) und 5% Milchpuder inkubiert. Es folgte eine Antikörperinkubation für 1,5 Stunden mit einem Primärantikörper (monoklonaler anti-GR Antikörper NCL-GCR, Novocastra, Balliol, Großbritannien; polyklonaler anti-p50 Antikörper C19, Antikörper, Santa Cruz, Heidelberg Deutschland). Anschließend folgte eine Inkubation mit einem Peroxidase gekoppeltem Sekundärantikörper (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) für eine Stunde. Die Immunkomplexe wurden durch verstärkte Chemilumineszenz (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) sichtbar gemacht.

3.5 Belichtete Filme scannen und statistische Methoden

Die entwickelten Filme wurden mit einem Primax Colorado Direct Scanner (Task Bridge Version 1.1) mit einer Auflösung von 300dpi eingescannt. Die optische Dichte (od) wurde mit dem Programm Tina Version 2.07d ermittelt. Es erfolgte die Anlage einer standardisierten Messfläche um jede GR- und p50-Bande, die Bestimmung der od/mm^2 jeder Bande und die Subtraktion der od/mm^2 des Films. Die hieraus resultierende od/mm^2 für jede GR- und p50-Bande wurde mit

Standards (12.5, 25, 50, und 100µg von HeLa-Ganzzelleextrakt (HeLa-WCE)) verglichen und angepasst, so dass die Werte im linearen Bereich dieser Standardmessung lagen. Die Daten wurden mit SPSS für Windows (Version 6.1.3) weiterverarbeitet und es erfolgte die Beschreibung von Median und Rang. Die diagnostischen Gruppen wurden mittels Kruskal-Wallis verglichen. Die Korrelation zwischen Alter und Geschlecht erfolgte mittels Spearman rank Korrelation, die graphischen Darstellungen erfolgten mit box plots (Herbert und Waternaux, 1983).

4 Ergebnisse

Wir untersuchten die Expression von GR- und NF- κ B Untereinheit p50 in 3 Gruppen: Gesunde, kortisol- und nicht kortisolbehandelte Patienten mit rheumatoider Arthritis. Die Patienten sind in Tabelle 1 charakterisiert.

Tabelle 1: Patientencharakterisierung

RA-Patienten mit Glukokortikoiden behandelt

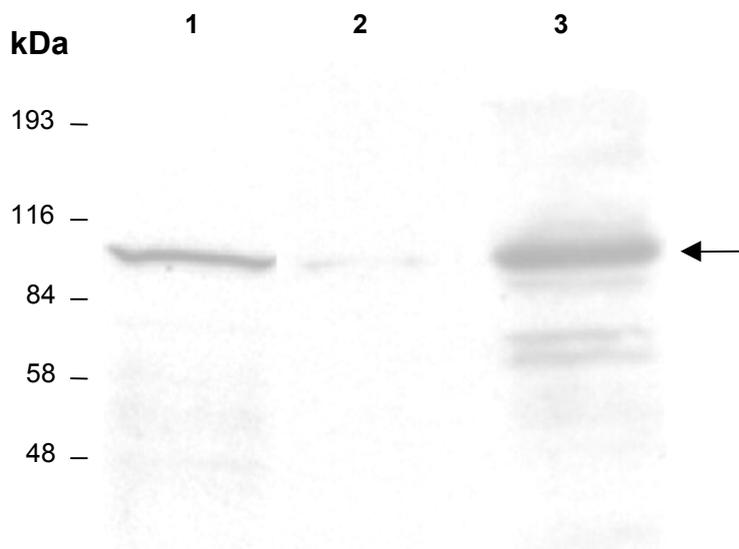
Nr.	Alter	Geschlecht	Erstdiagnose	Prednisolondosis (mg/d)	CRP [mg/dl]	BSG [1h]
1.	69	weiblich	1982	7.5	1.3	17
2.	75	männlich	1970	15	1.0	39
3.	59	weiblich	1999	12.5	3.9	30
4.	66	männlich	1992	15	3.4	19
5.	79	weiblich	1999	12.5	8.5	56
6.	63	weiblich	1993	7.5	1.8	17
7.	64	weiblich	1996	15	4.9	17
8.	58	männlich	1998	15	1.1	15
9.	59	weiblich	1990	15	5.6	45
10.	82	männlich	1996	10	2.5	13
11.	64	weiblich	1980	5	0.8	29
12.	71	männlich	1994	15	5.3	60
13.	64	weiblich	1961	12.5	1.5	23
14.	78	weiblich	1996	7.5	1.3	25
15.	69	männlich	1973	10	2.4	43
16.	58	männlich	1994	7.5	1.4	22
17.	78	weiblich	1997	7.5	0.9	20
18.	53	weiblich	1994	10	2.4	15
19.	76	weiblich	1977	15	1.5	13
20.	65	weiblich	1990	10	2.3	41
21.	50	weiblich	1998	10	1.2	12

RA-Patienten nicht mit Glukokortikoiden behandelt

Nr.	Alter	Geschlecht	Erkrankungsdauer	Prednisolondosis (mg/d)	CRP [mg/dl]	BSG [1h]
1.	71	weiblich	Oct. 2000	0	1.4	77
2.	30	weiblich	Aug. 2000	0	1.1	40
3.	60	männlich	Sep. 2000	0	5.3	51
4.	53	weiblich	Sep. 2000	0	2.7	46
5.	31	männlich	Sep. 2000	0	12.8	104
6.	56	weiblich	Dec. 2000	0	7.4	107
7.	81	weiblich	Sep. 2000	0	0.8	15
8.	75	weiblich	Dec. 2000	0	1.9	60
9.	80	weiblich	Aug. 2000	0	5.7	74
10.	71	männlich	Jun. 2000	0	3.0	5
11.	49	weiblich	Jan 2001	0	4.5	45
12.	66	männlich	Aug. 2000	0	0.6	12
13.	49	weiblich	Oct. 2000	0	1.5	34
14.	39	männlich	Jun. 2000	0	0.8	15
15.	41	männlich	Mai 2001	0	1.1	7
16.	34	weiblich	Mai 2001	0	2.9	66

Um die Expression von GR- und der NF-kappaB Untereinheit p50 zu untersuchen, wurden Lymphozyten aus 3 Gruppen von Individuen präpariert: RA-Patienten, die noch nie Glukokortikoide erhalten hatten, RA-Patienten, die mindestens das letzte Jahr mit Prednisolon therapiert worden waren und gesunde Kontrollen. Nach der Auftrennung der PBMC's mittels Ficoll-Gradienten wurde die Proteinmenge im Ganzzellextrakt photometrisch bestimmt und der GR- bzw. p50-Anteil durch Western-blot detektiert. Anschließend wurde die relative Proteinmenge densitometrisch über das Verhältnis od/mm^2 bestimmt.

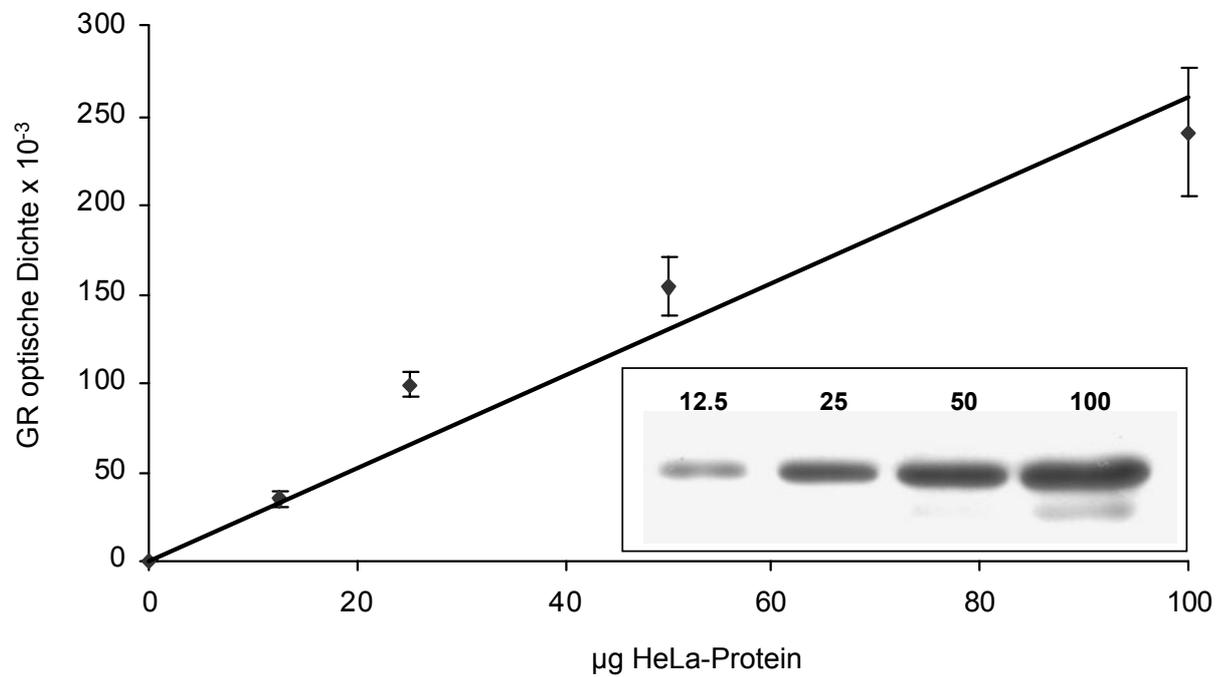
Drei repräsentative Western blots sind in Figur 3 dargestellt. Wie in Figur 3 gezeigt wird ein deutliches Signal für den GR in Ganzzellextrakt von Lymphozyten bei Gesunden darstellbar (Figure 3, Spur1). Das Signal bei unbehandelten RA-Patienten war deutlich stärker (Figur 3, Spur 3), wohingegen das Signal bei mit Glukokortikoiden behandelten RA-Patienten deutlich geringer war (Figur 3, Spur 2).



Figur 3

Repräsentativer anti-GR-Immunoblot eines Ganzzellextraktes aus PBMC's von Gesunden (Spur 1), glukokortikoidbehandelten RA-Patienten (Spur 2) und unbehandelten Patienten (Spur 3). Der GR ist mit einem Pfeil markiert.

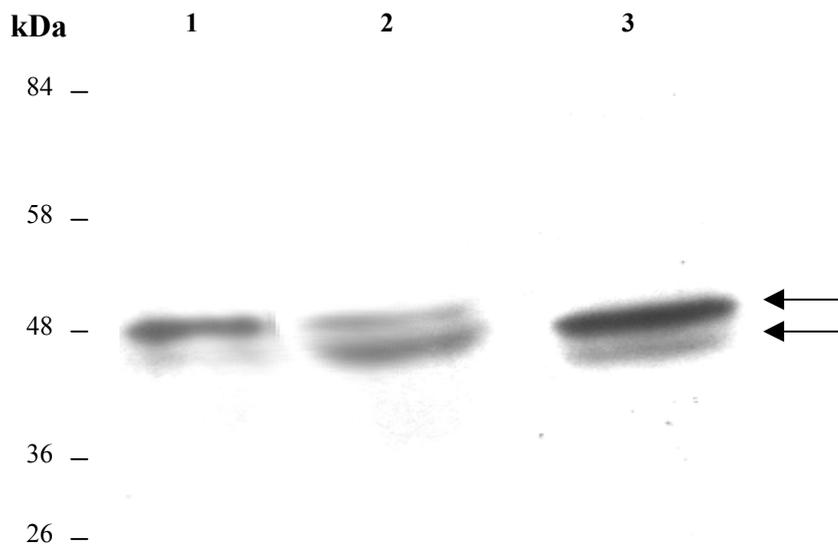
Des weiteren ist in Figur 4 eine Standardkurve für den GR in HeLa Ganzzellextrakt mit den Proteinkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100µg dargestellt.



Figur 4

Typischer Immunoblot für den GR-Antikörper mit 12,5, 25, 50 und 100µg HeLa Ganzzellextrakt. Der Kasten zeigt die Expressionssignale. Der Regressionskoeffizient $R^2=0,94$.

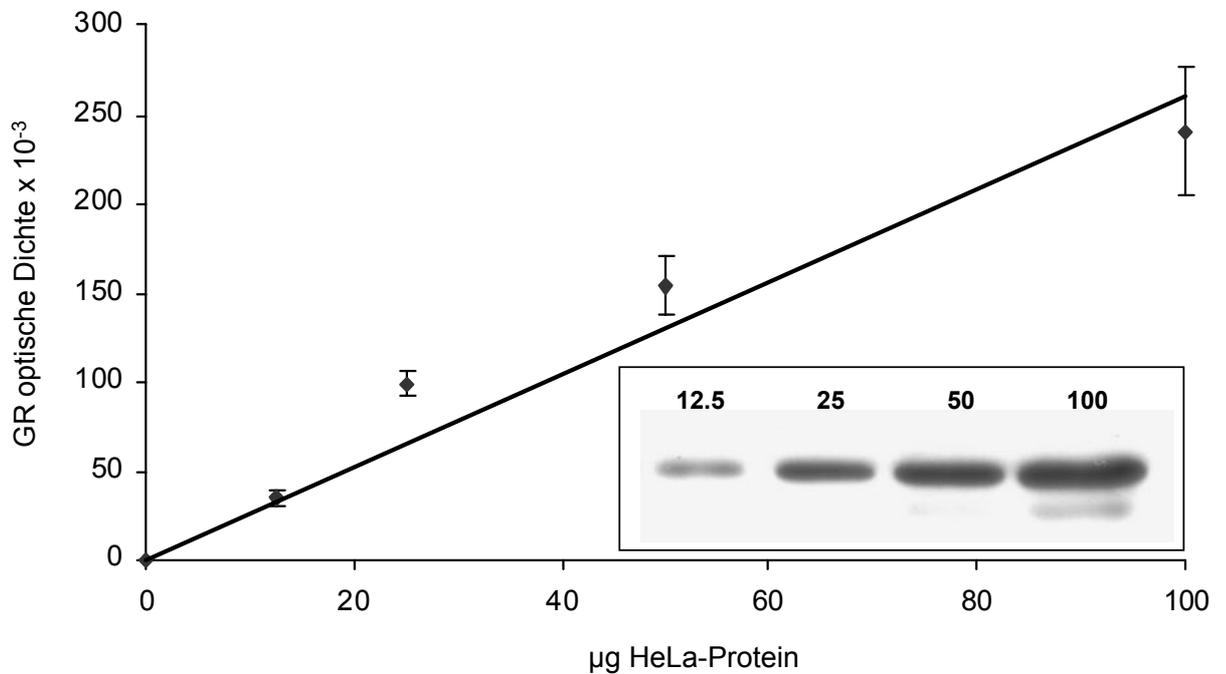
Die Untersuchung der Expression der p50 Untereinheit von NF- κ B zeigte eine Erhöhte p50-Expression bei unbehandelten RA-Patienten (Figur 5, Spur 3) im Vergleich zu der Gruppe Gesunder (Figur 5, Spur 1) und Cortison behandelter RA-Patienten (Figur 5, Spur 2). Es findet sich kein deutlicher Unterschied in der p50-Expression zwischen Gesunden und behandelten RA-Patienten.



Figur 5

Repräsentativer anti-p50-Immunoblot des Ganzzellextraktes von PBMC's von Gesunden (Spur 1), glukokortikoidbehandelten RA-Patienten (Spur 2) und unbehandelten Patienten (Spur 3). Die zwei Isoformen von p50, welche als eine Bande gerechnet wurden, sind mit Pfeilen markiert.

In Figur 6 ist eine Standardkurve für den die NF- κ B Untereinheit p50 in HeLa Ganzzellextrakt mit den Konzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 μ g dargestellt.



Figur 6

Typischer Immunoblot für den p50-Antikörper mit 12,5, 25, 50 und 100 μ g HeLa Ganzzellextrakt. Der Kasten zeigt die Expressionssignale. Der Regressionskoeffizient $R^2=0,90$.

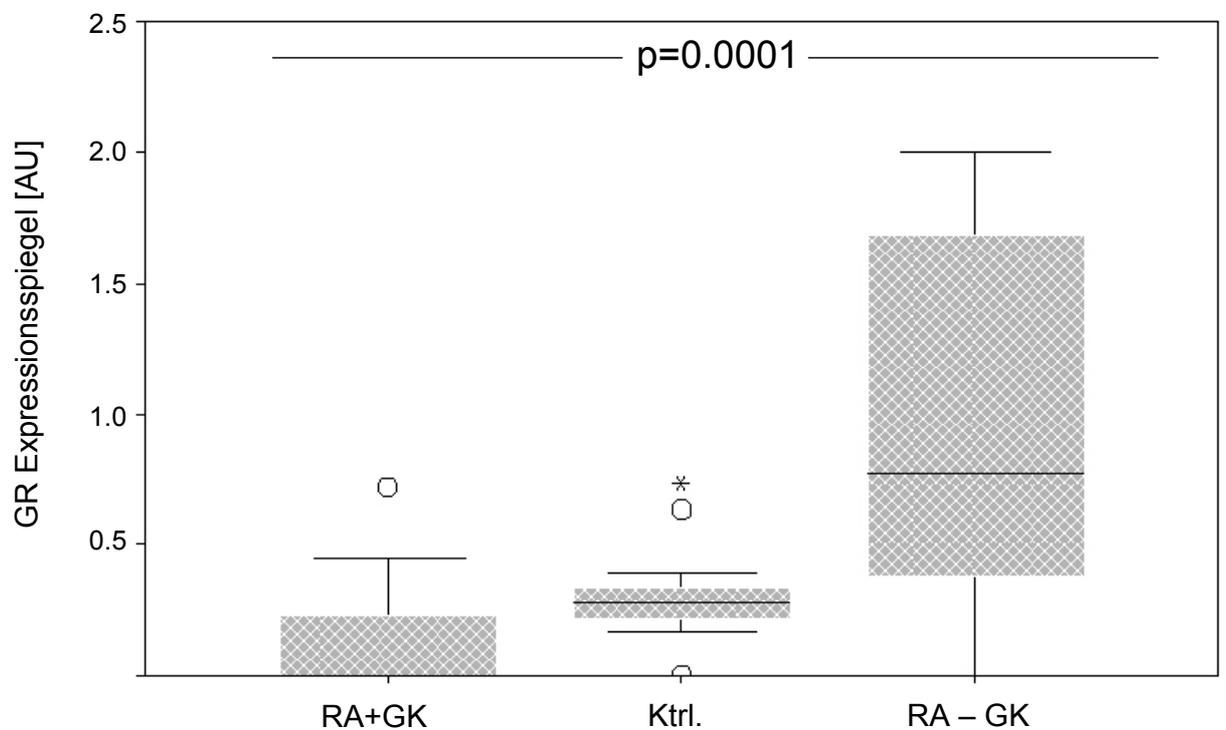
4.1 Statistische Auswertung der GR-Expressionsdaten

Die statistische Analyse ergab einen signifikanten Unterschied im Vergleich aller drei Gruppen bezüglich der GR-Expression in PBMC's ($p < 0,0001$). Da die Verteilung der Werte weit gestreut war (s. Tabelle 2), erfolgte die Darstellung mittels box plots (Figur 7).

Tabelle 2: GR-Expression in PBMC's bei 51 Individuen (ermittelt mit semiquantitativen Western blotting und berechnet in od/mm²).

No.	Gesunde Kontrollen (n=14)	RA GK-behandelt (n=21)	RA GK-unbehandelt (n=16)
1.	0.63	0.08	1.12
2.	0.22	0.00	0.46
3.	0.17	0.00	0.94
4.	0.00	0.00	1.70
5.	0.74	0.00	0.00
6.	0.30	0.00	0.00
7.	0.21	0.00	0.73
8.	0.28	0.00	0.82
9.	0.34	0.45	0.41
10.	0.39	0.42	1.89
11.	0.28	0.23	0.36
12.	0.24	0.72	1.75
13.	0.30	0.00	0.63
14.	0.20	0.00	2.00
15.		0.00	0.13
16.		0.00	1.67
17.		0.00	
18.		0.00	
19.		0.00	
20.		0.26	
21.		0.38	

Jeder Wert wurde mit einer standardisierten Menge an GR in HeLa-Ganzzellextrakt abgeglichen und normalisiert.



Figur 7

Boxplot zur graphischen Darstellung der GR-Expression in PBMC's in den 3 untersuchten Gruppen: 21 mit Glukokortikoiden vorbehandelte RA-Patienten (RA+GC), 16 nicht glukokortikoidbehandelte RA-Patienten (RA-GC) und 14 gesunde Kontrollen (Ctrl.). Der grau unterlegte Bereich repräsentiert den Bereich zwischen der 25sten und 75sten Perzentile. Die Linien außerhalb der grauen Boxen repräsentieren die 10te bis 90ste Perzentile. Die Linie innerhalb der grauen Boxen stellt den Median dar. Der Median der RA+GC-Gruppe liegt auf der Nulllinie. Ausreißer sind mit einem Kreis oder einem Sternchen gekennzeichnet.

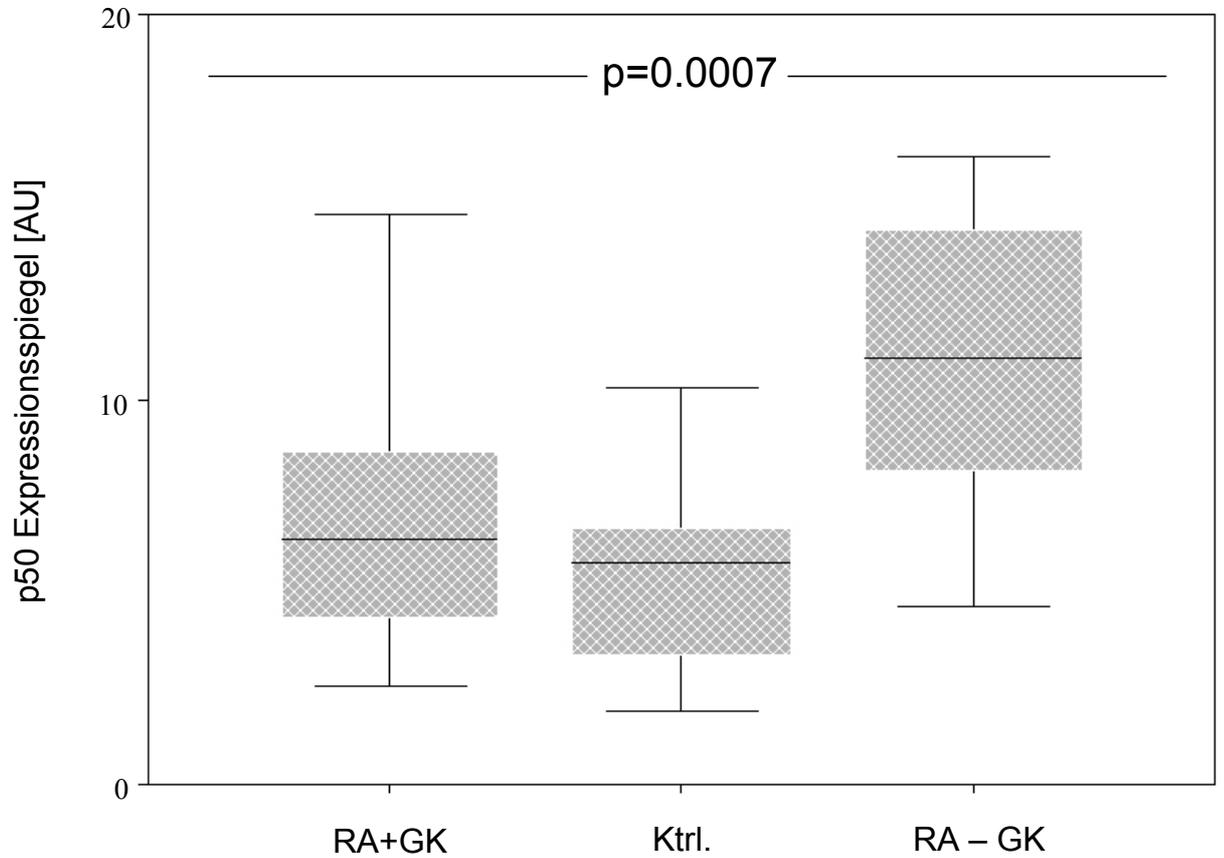
4.2 Statistische Auswertung der p50-Expressionsdaten

Bei der Expression von p50 zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression bei unbehandelten Patienten ($p < 0,0007$) im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Es ergab sich kein Unterschied in der p50-Expression bei Gesunden und glukokortikoidbehandelten RA-Patienten ($p > 0,05$). Die Resultate sind in Tabelle 3 dargestellt, der dazugehörige box plot in Figur 8.

Tabelle 3: p50-Expression in PBMC's bei 51 Individuen (ermittelt mit semiquantitativen Western blotting und berechnet in od/mm²).

Nr.	Gesunde Kontrollen (n=14)	RA GK-behandelt (n=21)	RA GK-unbehandelt (n=16)
1.	6.88	5.15	13.26
2.	3.50	2.57	8.46
3.	1.93	2.78	7.81
4.	3.32	7.20	16.31
5.	3.41	4.42	14.56
6.	6.67	4.37	10.10
7.	6.11	3.52	12.03
8.	4.33	4.08	10.16
9.	6.48	6.21	4.66
10.	5.49	6.36	13.19
11.	6.13	4.07	4.76
12.	2.85	5.17	14.28
13.	10.30	9.21	15.85
14.	10.07	12.71	15.29
15.		8.45	6.21
16.		14.82	8.44
17.		7.81	
18.		9.37	
19.		8.66	
20.		7.47	
21.		11.05	

Jeder Wert wurde mit einer standardisierten Menge an p50 in HeLa-Ganzzellextrakt abgeglichen und normalisiert.

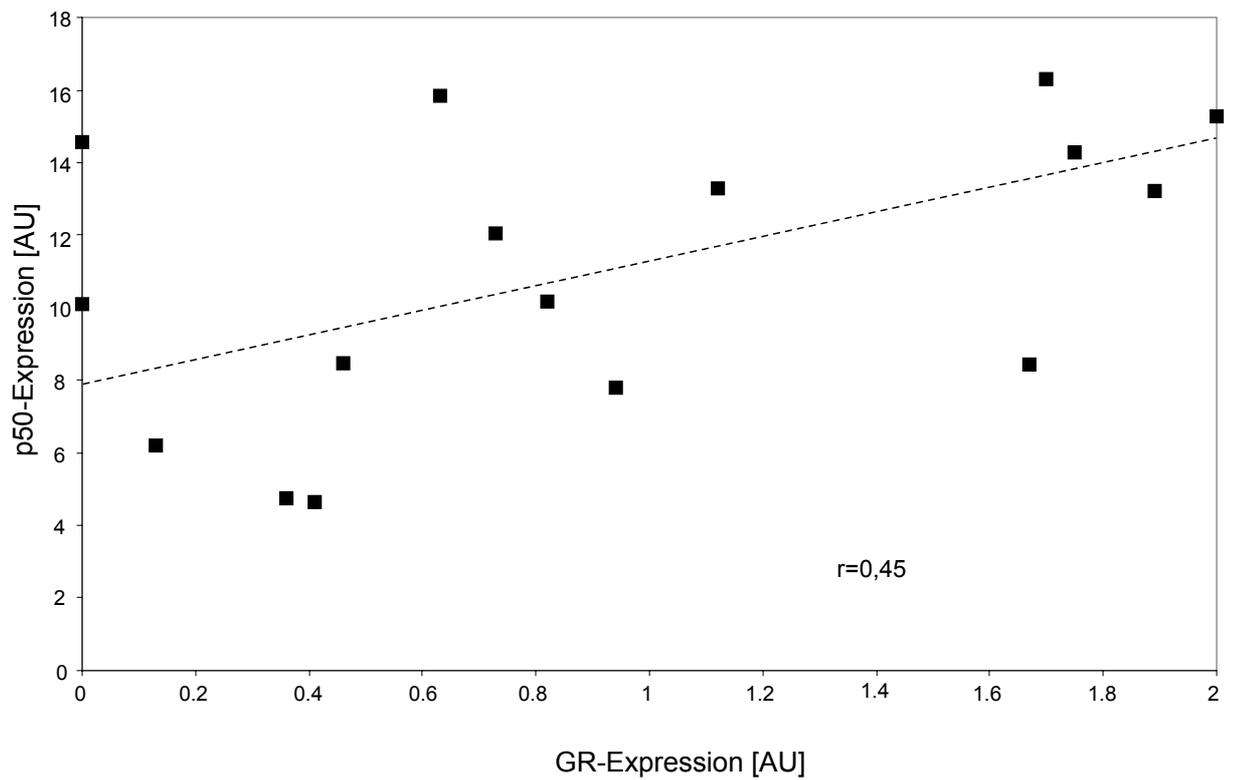


Figur 8

Boxplot zur graphischen Darstellung der p50-Expression in PBMC's in den 3 untersuchten Gruppen: 21 mit Glukokortikoiden vorbehandelte RA-Patienten (RA+GC), 16 nicht glukokortikoidbehandelte RA-Patienten (RA-GC) und 14 gesunde Kontrollen (Ctrl.). Der grau unterlegte Bereich repräsentiert den Bereich zwischen der 25sten und 75sten Perzentile. Die Linien außerhalb der grauen Boxen repräsentieren die 10te bis 90ste Perzentile. Die Linie innerhalb der grauen Boxen stellt den Median dar.

4.3 Zusammenhang zwischen GR- und p50-Expression bei nicht kortisolbehandelten RA-Patienten

Weiterhin fand sich eine positive Tendenz zwischen GR-Expression und p50-Expression bei unbehandelten RA-Patienten. Größere GR-Spiegel gehen mit größeren p50-Spiegeln einher. Dieser Zusammenhang zwischen GR- und p50-Expression ist in Figur 9 dargestellt.



Figur 9

Korrelation der Expressionsrate von GR und p50 im Ganzellextrakt von PBMC's bei RA-Patienten welche nie Glukokortikoide erhalten hatten. Der Korrelationskoeffizient ist $r=0,45$ und zeigt eine Tendenz zwischen erhöhter GR- und p50-Expression ($p<0,8$). Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Trend.

5 Diskussion

Die vorliegende Untersuchung analysiert die Expression von GR und der NF- κ B Untereinheit p50 in Lymphozyten von RA Patienten. Die Menge an GR- und p50-Protein in jedem Individuum wurde mit einem semiquantitativen Immunoblot bestimmt. Hiermit sollte es möglich sein eine möglichst große Menge von intrazellulärem GR zu erfassen.

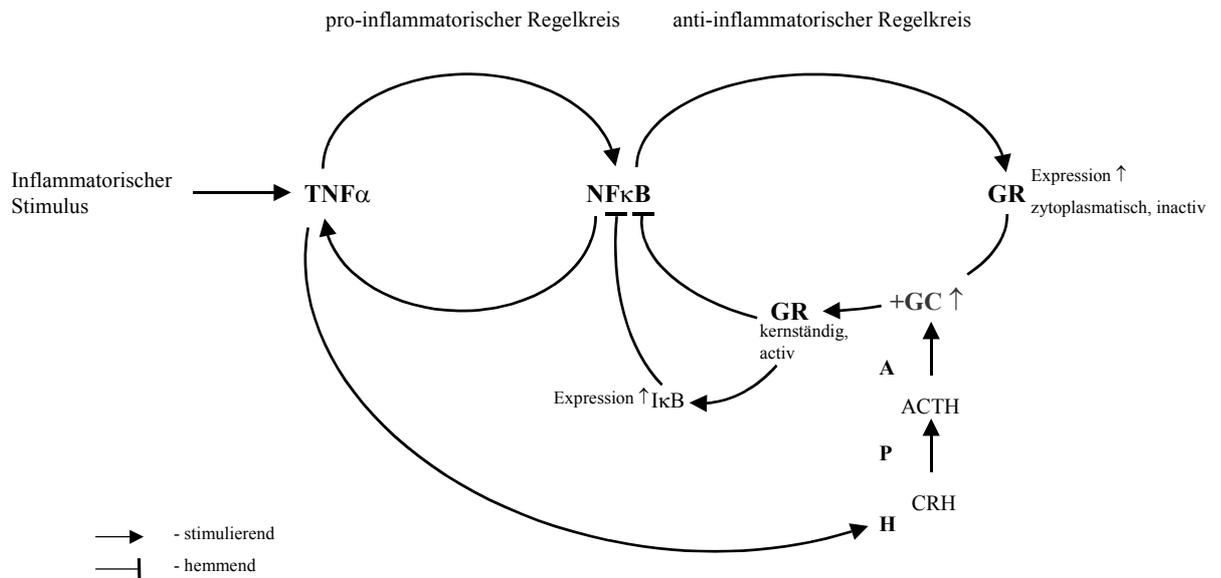
Es fand sich eine deutliche Erhöhung der GR und p50-Level bei nicht mit Glukokortikoiden behandelten Patienten mit rheumatoider Arthritis im Vergleich zu glukokortikoidbehandelten RA-Patienten und Gesunden. Ferner zeigte sich eine erhöhte GR-Expression bei Gesunden im Vergleich zu behandelten RA-Patienten. Gibt es eine Erklärung, warum man in PBMC's sowohl eine Erhöhung des anti-inflammatorischen Faktors GR und des pro-inflammatorischen Faktors NF- κ B bei unbehandelten RA-Patienten findet?

Eine Hypothese ist, dass während eines Entzündungsprozesses viele pro-inflammatorische Zytokine (z.B. IL-1, IL-2 und TNF- α) produziert werden, welche NF- κ B aktivieren können (Pahl, 1999; Osborn et al., 1989; Hazan et al., 1990, Israel, et al., 1989). Dies hat einen Regelkreis mit positivem Feedback durch NF- κ B induzierte Genaktivierung und eine weitere Erhöhung der pro-inflammatorischen Zytokine zur Folge (Pahl, 1999; Mori und Prager, 1996; Lai et al., 1995; Collart et al., 1990). Eine erhöhte NF- κ B Aktivität könnte zu einer Erhöhung der GR-Expression führen, da bekannt ist, dass NF- κ B die GR-Transkription durch eine NF- κ B Bindestelle im regulatorischen Bereich innerhalb des GR-Gens, der Promoter-Region (5'-Region), induzieren kann (Zong et al., 1990). Dies ist im Zusammenhang mit einer vorher veröffentlichten Studie, welche eine Erhöhung der GR-Expression nach TNF- α oder IL-1 Behandlung in HeLaS3 und COS1-Zellen zeigt, sehr wahrscheinlich durch NF- κ B moduliert (Webster et al, 2001).

Eine erhöhte Expression von GR führt aber noch nicht zu einer erhöhten Aktivität von GR, sondern zu einer Akkumulation von zytoplasmatischem inaktivem GR, welcher durch endo- oder exogene Hormone aktiviert werden muß. Endogenes Kortisol stellt das wichtigste Endprodukt der Hypothalamus-Hypophysen-

Nebennierenachse (HPA= hypothalamus-pituitary-adrenal) dar. Zytokine wie TNF- α oder IL-1 können die HPA-Achse auf allen drei Ebenen aktivieren und so einen Zytokin-HPA-Achsen-Regelkreis formen. Erhöhte Spiegel von TNF- α oder IL-1 führen so letzten Endes zu einer erhöhten Glukokortikoidproduktion. Glukokortikoide wiederum können den zunächst inaktiven GR aktivieren. Dies sollte letzten Endes dazu führen, einen aktivierten kernständigen GR zu erhalten, der sowohl die NF- κ B induzierte Transkription hemmen (Scheinmann et al., 1995), als auch den NF- κ B spezifischen Inhibitor I κ B aktivieren kann (Auphan et al., 1995; Scheinman und Cogswell et al., 1995). Physiologischerweise könnte dieser anti-inflammatorische Regelkreis dazu beitragen den pro-inflammatorischen Regelkreis durch Zytokine wie TNF- α und IL-1 welche den pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren, zu unterbinden und somit die entzündliche Reaktion zum Stillstand bringen. Bei der rheumatoiden Arthritis gibt es Studien, die zeigen, dass ein erhöhter Spiegel von ACTH und Kortisol, hervorgerufen durch Zytokine, vorhanden ist. Diese Erhöhung ist allerdings, wenn man sie mit Gesunden vergleicht, für das Ausmaß der Entzündung ungenügend (Masi und Chrousos, 1996, Straub et al., 2002). Hierüber könnte die positive Wirkung der exogenen Glukokortikoide erklärt werden.

Die Arbeit beschreibt eine mögliche Hypothese, die Pathogenese der rheumatoide Arthritis zu beleuchten. Durch den zwar erhöhten, aber für die Entzündung inadäquat niedrigen Kortisolspiegel, kommt der RA-Patient in einen „relativen“ Kortisolmangel, da endogen nicht ausreichend Kortisol gebildet wird um den in erhöhten Mengen vorhandenen inaktiven GR zu aktivieren. Durch exogene Zufuhr von Glukokortikoiden wird der inadäquat niedrige Kortisolspiegel angehoben, die anti-inflammatorische Wirkung über die erhöhten Konzentrationen an GR entfaltet. Wie in dieser Studie dargestellt, führt die exogene Behandlung mit Glukokortikoiden zur Reduktion der Spiegel von GR und p50, was dem Zustand bei Gesunden näher kommt. Ein vereinfachtes Modell welches die Wechselwirkungen zwischen den anti- und pro-inflammatorischen Regelkreisen erklären könnte, ist in Figur 10 beschrieben.



Figur 10

Vereinfachtes Modell über eine mögliche Interaktion zwischen pro- und anti-inflammatorischen Regelkreisen. Eine Infektion führt zu einer Erhöhung von pro-inflammatorischen Zytokinen (u. a. TNF- α , IL-1), diese können NF- κ B aktivieren. NF- κ B wiederum kann die Transkription von GR erhöhen, was in einer Erhöhung der intrazellulären Menge an GR führt. Dieser zytoplasmatisch inaktive GR kann durch exogene oder endogene Glukokortikoide (GK) aktiviert werden. Einmal aktiviert transloziert der GR in den Kern, wo er die NF- κ B Aktivität hemmt. Zudem führt eine Aktivierung des GR zu einer erhöhten I κ B-Expression, welche zusätzlich hemmend auf NF- κ B einwirkt. H= Hypothalamus, P=Pituitary (Hypophyse), A=Adrenal (Nebennierenrinde)

In Übereinkunft mit dieser Studie wurde eine Erhöhung des GR in PBMC's bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, welche zuvor nie Glukokortikoide bekommen hatten mit dem H3-Dexamethason Bindeassay nachgewiesen (Schottelius et al., 2000). Die meisten anderen Studien, welche den GR bei rheumatoider Arthritis untersucht hatten, zeigten eine Erniedrigung des GR (Schlaghecke et al., 1992; Schlaghecke et al., 1994; Jiang et al., 2001). Allerdings hatten die Patienten in diesen Studien, im Gegensatz zur hier gezeigten Untersuchung, früher schon Glukokortikoide eingenommen. Die Einnahme von Glukokortikoiden kann bis zu einem Jahr zu einer Hemmung der HPA-Achse

führen. Inwieweit dies eine Rolle spielt, bleibt abzuwarten und wird in folgenden Studien abzuklären sein.

TNF- α Inhibitoren haben sich in der Therapie der rheumatoide Arthritis bereits etabliert und werden weltweit mit großem Erfolg angewandt. Diese Arbeit zeigt eine Erhöhung der NF- κ B Untereinheit p50 bei Patienten mit nicht glukokortikoidbehandelter rheumatoider Arthritis. In nicht entzündungsbedingt stimulierten Zellen liegt NF- κ B im Zytoplasma mit seinem Inhibitor I κ B komplexiert gebunden vor. Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt durch signalinduzierte Phosphorylierung der inhibitorischen Untereinheit I κ B durch spezielle I κ B-Kinasen (IKK). Nach Phosphorylierung dissoziiert der Inhibitor I κ B vom NF- κ B-Komplex. NF- κ B kann in den Kern translozieren und dort über die Regulation der entsprechenden Zielgene seine pro-inflammatorische Wirkung entfalten. So wurde aufgezeigt, dass Makrophagen aus entzündlichem Synovialgewebe, welche durch adenoviralem Transfer mit I κ B transfiziert wurden, zu einer Reduktion der TNF- α Konzentration in der Gelenkzellkultur führten (Foxwell et al., 1998). NF- κ B ist wie TNF- α sicherlich ein effektives Ziel bei der Therapie der rheumatoiden Arthritis. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich unter Glukokortikoidbehandlung der Expressionspiegel von p50 bei RA-Patienten dem von Gesunden nähert, was einen regulatorischen Effekt der exogenen Glukokortikoide bezogen auf die Menge und die Aktivität von NF- κ B, wie er auch in anderen Publikationen beschrieben (Auphan et al., 1995; Scheinman und Cogswell et al., 1995), wahrscheinlich erscheinen lässt. Andere in vitro Untersuchungen zeigen, dass Kortisol keinen inhibitorischen Effekt auf NF- κ B bzw. aktivierenden Effekt auf I κ B zu haben scheint, um den proinflammatorischen Effekt von NF- κ B vor der Translokation in den Kern zu verhindern. Die Behandlung von Synoviazellen mit Dexamethason zeigte in vitro keine Erhöhung von I κ B und identische Mengen an NF- κ B im Nucleus (Han et al., 2001). Um hier Klarheit zu bekommen, sind sicherlich noch weitere Studien abzuwarten.

Es ist zu hoffen, dass in den nächsten Jahren weitere Medikamente entwickelt werden können, welche wie I κ B-Agonisten, NF- κ B-Antagonisten oder IKK-Antagonisten eingesetzt werden können.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei unbehandelten Patienten mit rheumatoider Arthritis eine Erhöhung der GR-Expression und p50-Expression vorliegt. Bei Patienten mit Glukokortikoidgabe sind diese Spiegel signifikant niedriger. Unter der Gabe von Prednisolon scheint es zu einer „Downregulation“ sowohl des GR und des p50 in physiologische Bereiche zu kommen.

Die Gabe von Glukokortikoiden führt bei Patienten mit RA zu einer deutlichen Reduktion des GR in unphysiologisch niedrige Bereiche. Die klinische Erfahrung zeigt, dass nach dem Beginn einer chronischen Kortisoltherapie bei Patienten mit rheumatoider Arthritis die Glukokortikoiddosis oftmals nicht ohne erneute arthritische Beschwerden vollständig ausgeschlichen werden kann bzw. teilweise die Gabe mehr und mehr gesteigert werden muss, um den gleichen entzündungshemmenden Effekt zu erhalten. Dies könnte ein Zeichen für eine mögliche Gewöhnung an das Glukokortikoidpräparat sein, wie wir es von anderen Medikamenten wie Morphin oder Nitropräparaten kennen. Es sind noch weitere Studien nötig, um gerade bei den unbehandelten RA-Patienten den Verlauf des GR nachzuvollziehen. Es ist zu vermuten, dass diese sich nach chronischer Glukokortikoidtherapie ähnlich verhalten wie in dieser Studie die steroidbehandelten RA-Patienten.

Obwohl die rheumatoide Arthritis eine weit verbreitete und sicherlich „alte“ Erkrankung ist, stehen wir erst am Anfang einer Reihe von Therapiemöglichkeiten, die sich auftun werden, um leidgeplagten Patienten mit rheumatoider Arthritis optimaler zu helfen als wir das momentan können.

6 Zusammenfassung

Zielstellung: Es wurden die Expression des antiinflammatorisch wirkenden Transkriptionsfaktors Glukokortikoid-Rezeptor (GR) und der Untereinheit p50 des proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- κ B in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) untersucht.

Methode: Es wurden unbehandelte und mit Glukokortikoiden vorbehandelte RA-Patienten sowie gesunde Probanden verglichen. Die Expressionsanalyse von GR und der NF- κ B Untereinheit p50 in peripheren PMBC's, welche zuvor durch Gradientenzentrifugation isoliert wurden, wurde mittels semiquantitativem Immunoblotting durchgeführt.

Resultate: Die GR- und NF- κ B-Expression in PBMC's waren im Vergleich zu Gesunden gegenüber RA-Patienten, welche noch nie Glukokortikoide eingenommen hatten, signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu war die GR-Konzentration bei RA-Patienten, welche mit Glukokortikoiden therapiert worden waren, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erniedrigt. Zudem zeigte sich eine Korrelation zwischen GR- und NF- κ B- (p50) Expression bei den unbehandelten RA-Patienten.

Schlussfolgerung: In der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis kommt es zu einer erhöhten Expression des GR in PBMC's. Dies wird begleitet von einer ebenfalls erhöhten Expression von NF- κ B (p50). Die Verabreichung von Glukokortikoiden führt zu einer Reduktion der GR- und p50-Expression in Lymphozyten, die p50 Expression ist dabei nicht mehr von jener von Gesunden zu unterscheiden.

Schlagwörter:

GLUKOKORTIKOID REZEPTOR ; RHEUMATOIDE ARTHRITIS ; NF- κ B ;
LYMPHOZYTEN

7 Literaturverzeichnis

- Abe et al., 1997 M. Abe, Y. Tanaka, K. Saito, F. Shirakawa, Y. Koyama, S. Goto, S. Eto: Regulation of interleukon (IL)-1 beta gene transcription induced by IL-1beta in rheumatoid synovial fibroblast-like cells, E11, transformed with simian virus 40 large T antigen. *J. Rheumatology*. 1997, 24, S.420-429,
- Ackerblom und Mellon, 1991 I.E. Ackerblom, P.L. Mellon: Repression of gene expression by steroid and thyroid hormones. In: *Nuclear Hormone Receptors*. M.G. Parker ed. (San Diego: Academic Press, Inc.). 1991, S.175-196,
- Akner et al., 1995 G. Akner, A.C. Wilkström, J.A. Gustafsson: Subcellular distribution of the glucocorticoid receptor and evidence for its association with microtubules. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1995, 52, S.1-16,
- Andreae et al., 2001 J. Andreae, R. Tripmacher, R. Weltrich, W. Rohde, R. Keitzer, U. Wahn, K. Paul, F. Buttgereit: Effect of glucocorticoid therapy on glucocorticoid receptors in children with autoimmune diseases. *Pediatr. Res.* 2001, 49, S.130-135,
- Arnett et al., 1988 F. C. Arnett, S.M. Edworthy, D.A. Bloch, D.J. McShane, J.F. Fries, N.S. Cooper, L.A. Healey, S.R. Kaplan, M.H. Liang, H.S. Luthra, et al.: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988, 31, S.315-324,
- Asahara et al., 1995 H. Asahara, M. Asanuma, N. Ogawa, S. Nishibayashi, H. Inoue: High DNA-binding activity of transcription factor NF-kappaB in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995, 37, S.827-832,
- Auphan et al., 1995 N. Auphan, J.A. DiDonato, C. Rosette, A. Helmberg, M. Karin: Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I-kappa B synthesis.. *Science*. 1995, 270, S.286-290,
- Baniahmad et al., 1991 Baniahmad C., Steiner C., Köhne A.C., Renkawitz R.: Co-operative binding of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain is one of at least two mechanisms for synergism. *J. Mol. Biol.* 1991, 222, S.155-165,

- Baniahmad et al., 1992 A. Baniahmad, A.C. Köhne, R. Renkawitz: A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor. *EMBO*. 1992, 11, S.1015-1023,
- Barnes, 1998 P.J. Barnes: Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin. Sci. (Colch)*. 1998, 94, S.557-572,
- Bäuerle und Henkel, 1994 P.A. Bäuerle, T. Henkel: Function and activation of NF-kappaB in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*. 1994, 12, S.141-179,
- Beato et al., 1989 M. Beato, G. Chalepakis, M. Schauer, E.P. Slater: DNA regulatory elements for steroid hormones. *J. Steroid Biochem.*. 1989, 32, S.737-747,
- Beato et al., 1995 M. Beato, P. Herrlich, G. Schütz: Steroid hormone receptors: Many actors in search of plot. *Cell*. 1995, 83, S.851-857,
- Beato, 1989 M. Beato: Gene regulation by steroid hormones. *Cell*. 1989, 56, S.335-344,
- Berg, 1989 J.M. Berg: DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell*. 1989, 57, S.1065-1068,
- Berrodin et al., 1992 T.J. Berrodin, M.S. Marks, K. Ozato, E. Linney, E. and M.A. Lazar: Heterodimerization among thyroid hormone receptor, retinoic acid receptor, retinoic X receptor, chicken ovalbumin upstream transcription factor and an endogenous liver protein. *Mol. Endocrinol.*. 1992, 6, S.1468-1478,
- Besedowsky et al., 1986 H. Besedowsky, A. del Ray, E. Sorkin, C.A. Dinarello: Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science*. 1986, 233, S.652-657,
- Bitsch Thomas Bitsch: *Klinikleitfaden Rheumatologie*. 2. Auflage Gustav Fischer, 1997 S. 212-258, S.484-490,
- Bohen und Yamamoto, 1993 H.W. Bohen, K.R. Yamamoto: Isolation of Hsp90 mutants by screening for decreased steroid receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993, 90, S.11424-28,
- Bondeson et al., 1999 J. Bondeson, B. Foxwell, F. Brennan, M. Feldmann:

- Defining therapeutic targets by using adenovirus: blocking NF- κ B inhibits both inflammatory and destructive mechanisms in rheumatoid synovium but spares anti-inflammatory mediators. *Proc. Natl. Acad. Sci.*. 1999, *96*, S.5668-5673,
- Boss et al., 2000 B. Boss, G. Neeck: Correlation of IL-6 with the classical humoral disease activity parameters ESR and CRP and with serum cortisol, reflecting the activity of the HPA-axis in active rheumatoid arthritis. *Z. Rheumatol.*. 2000, *59 (Suppl. 2)*, S.61-62,
- Buetti und Kühnel Buetti E., Kühnel B. : Distinct sequence elements involved in the glucocorticoid regulation of the mouse mammary tumor virus promotor identified by linker scanning mutagenesis.. *J. Mol. Biol.*. 1986, *190*, S.379-389,
- Bugge et al., 1992 T.H. Bugge, J. Pohl, O. Lonnoy, O. and H.G. Stunnenberg: RXR alpha, a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors. *EMBO J.*. 1992, *11*, S.1409-1418,
- Burmester G.-R. Burmester, A. Pezzutto: Taschenatlas der Immunologie. 1. Auflage Thieme, 1998 S. 154-160,
- Caldenhoven et al., 1995 E. Caldenhoven, J. Liden, S. Wissink, A. Van der Stolpe, J. Raaijmakers, L. Koenderman, S. Okret, J.A. Gustafsson, P.T. Van der Saag: Negativ cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.*. 1995, *9*, S.401-412,
- Campbell et al., 2000 I.K. Campbell, S. Gerondakis, K. O'Donnel, I.P. Wicks: Distinct roles for the NF-kappa B1 (p50) and c-Rel transcription factors in inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest.*. 2000, *105*, S.1799-1806,
- Cato et al., 1988 Cato A.C., Heitlinger E., Ponta H., Klein-Hitpass L., Ryffel G.U., Bailly A., Rauch C., Milgrom E.: Estrogen and progesterone receptor-binding sites on the chicken vitellogenin II gene: Synergims of steroid hormone action. *Mol. Cell. Biol.*. 1988, *8*, S.5323-5330,
- Chikanza et al., 1992 I.C. Chikanza, P. Petrou, G. Kingsley, G. Chrousos, G.S. Panayi: Defective hypothalamic response to immune and inflammatory

- stimuly in patients with rheumaoid arthrtitis. *Arthritis Rheumatology*. 1992, 35, S.1281-1288,
- Collart et al., 1990 M.A. Collart, P. Bäuerle, P. Vassali,: Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa-B like motifs and of constitutive and inductible form of NF-kappa B. *Mol. Cell. Biol.*. 1990, 10, S.1498-1506,
- Czar et al., 1994 M.J. Czar, J.K. Owens-Grillo, A.W. Yem, K.L. Leach, M.R. Jr. Deibel, M.J. Welsh, W.B. Pratt : The hsp 56 immunophilin component of untransformed steroid receptor complexes is localized both to micotubules in the cytoplisma and to the same nonrandom regions within the nucleus as the steroid receptor. *Mol. Endocrinol.*. 1994, 8, S.1731-1741,
- Droogmans et al., 1992 L. Droogmans, I. Cludts, Y. Cleuter, R. Kettmann, A. Burny: Nucleotide sequence of the bovine inerleukin-6 gene promoter. *DNA Seq.*. 1992, 3, S.115-117,
- Eggert et al., 2001 Eggert et al.: Molecular mechanisms of glucocorticoid action in rheumatic autoimmune diseases. *Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2001, 77, S.185-191,
- Evans and Hollerberg, 1988 R.M. Evans, S.M. Hollerberg: Zinc fingers: Gilt by association. *Cell*. 1988, 52, S.1-3,
- Evans, 1988 R.M. Evans: The steroid and thyroid hormone superfamily. *Science* . 1988, 240, S.889-895,
- Foxwell et al., 1998 B. Foxwell, K. Browne, J. Bondeson, C. Clarke, R. de Martin, F. Brennan, M. Feldmann: Efficient adenoviral infection with IkappaB alpha reveals that macrophage tumor necrosis factor alpha production in rheumatoid arthritis is NF-kappaB dependent.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998, 95(14), S. 8211-8215,
- Giguère et al., 1986 V. Giguère, S.M. Hollenberg, M.G. Rosenfeld, R.M. Evans: Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*. 1986, 46, S.645-652,
- Göttlicher et al., 1998 M. Göttlicher, S. Heck, P. Herrlich: Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J. Mol. Med.*

- 1998, 76, S.480-489,
- Green et al., 1986 S. Green, P. Chambon: A superfamily of potential oncogenic hormone receptors. *Nature*. 1986, 324, S.615-617,
- Gudbjornsson et al., 1996 B. Gudbjornsson, B. Skogseid, K. Oberg, L. Wide, R. Hallgren: Intact adrenocorticotrophic hormone secretion but impaired cortisol response in patients with active rheumatoid arthritis . Effect of glucocorticoids, *J. of Rheumatology*. 1996, 23, S.596-602,
- Han et al., 2001 C.W. Han, J.H. Choi, J.M. Kim, W.Y. Kim, K.Y. Lee, G.T. Oh: Glucocorticoid-mediated repression of inflammatory cytokine production in fibroblast-like rheumatoid synoviocytes is independent of nuclear factor-kappaB activation induced by tumor necrosis factor alpha. *Rheumatology (Oxford)*. 2001, 40(3), S.267-273,
- Hartmann und Brownell, 1930 F. A. Hartmann und K.A. Brownell: The hormone of the adrenal cortex. *Science*. 1930, S.72,
- Hazan et al., 1990 U. Hazan, D. Thomas, J. Alcamì, F. Bachelrie, N. Israel, H. Yssel et al. : Stimulation of a human T-cell clone with anti-CD3 or tumor necrosis factor induces NF-kappa B translocation but not human immunodeficiency virus 1 enhancer-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.*. 1990, 87, S.7861-7865,
- Hench et al., 1949 S. Hench, : The effect of a hormon of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: Compound E) and Pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Proc. Staff. Meet. Mayo. Clin.* 1949, 24, S.181-197,
- Herbert und Waternaux, 1983 J.R. Herbert, C. Waternaux: Graphical displays of growth data. *Am. J. Clin. Nutr.*. 1983, 38, S.145-147
- Hettenkofer Hans-Jürgen Hettenkofer: *Rheumatologie*. 3. Auflage Thieme, 1998 S. 51-72,
- Hilliard et al., 1999 B. Hilliard, E.B. Smoilova, T.S. Lui, A. Rostami, Y. Chen: Experimental autoimmune encephalomyelitis in NF-kappa B-deficient mice: roles of NF-kappa B in the activation and differentiation of autoreactive T-cells. *J. Immunol.*. 1999, 163, S.2937-2943,

- Hollenberg et al., 1985 S.M. Hollenberg, C. Weinberger, E.S. Ong, G. Cerelli, A.E. Oro, R. Lebo, E.B. Thompson, M.G. Rosenfeld, R.M. Evans: Primary structure and expression of a functional human glucocorticoidreceptor cDNA. *Nature*. 1985, *318*, S.635-641,
- Hollenberg et al., 1987 S.M. Hollenberg, V. Giguère, P. Segui, R.M. Evans: Colocalisation of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor.. *Cell*. 1987, *49*, S.39-46,
- Hollerberg und Evans, 1988 S.M. Hollerberg, R.M. Evans: Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*. 1988, *55*, S.899-906,
- Hoshino et al., 1994 J. Hoshino, B. Beckmann, J.Huser, H. Kröger: Interleukin 1 beta enhances the response of rabbit synovial fibroblasts in vitro to dexamethason injury: implications for the role of increased nuclear hypersensitive sites and the number of dexamethasone receptors. *J. Rheumatol.* 1994, *21*, S.616-622,
- Israel, et al., 1989 A. Isreal, O. Le Bail, D. Hatat, J. Piette, M. Kieran, F. Logeat, P. Kourilsky : TNF stimulates expression of mouse MHC class I genes by inducing an NF-kappa B-like enhancer binding activity which displaces constitutive factors. *EMBO J.* 1989, *8*, S.3793-3800,
- Jiang et al., 2001 T. Jiang, S. Liu, M. Tan, F. Huang, Y. Sun, X. Dong et al.: The phase-shift mutation in the glucocorticoid receptor gene: potential etiologic significance of neuroendocrine mechanisms in lupus nephritis. *Clin. Chim. Acta* . 2001, *313*, S.113-117,
- Kendall, 1950 E.C. Kendall: The development of cortison as a therapeutic agent. Nobel lecture. 11. December 1950,
- Klug und Schwabe, 1995 A. Klug, J.W.R. Schwabe: Zinc fingers. *FASEB J.* 1995, *9*, S.597-604,
- Koolman J. Koolman, K.H. Röhm: Taschenatlas der Biochemie. 1. Auflage Thieme, 1994 S.330-350,
- Kuhl, 2001 F. Kuhl: Cortison, die Wunderdroge gegen Rheuma. *Pharmazeutische-Zeitung*. 2001, *10*,

- Laemmli, 1970 U.K. Laemmli: Cleavage structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*. 1970, 227, S.680-685,
- Lai et al., 1995 J.H. Lai, G. Horvath, J. Subleski, J. Bruder, P. Ghosh, T.H. Tan: RelA is a potent transcriptional activator of the CD28 response element within the interleukin 2 promoter. *Mol. Cell. Biol.* 1995, 15, S.4260-4271,
- Luisi et al., 1991 B.F. Luisi, W.X. Xu, Z. Otwinowski, L.P. Freedman, K.R. Yamamoto, P.B. Sigler: Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*. 1991, 352, S.497-505,
- Mangelsdorf et al., 1995 D.J. Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schütz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, P. und R.M. Evans: The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell*. 1995, 83, S.835-839,
- Masi und Chrousos, 1996 A.T. Masi, G.P. Chrousos: Hypothalamic-pituitary-adrenal-glucocorticoid axis function in rheumatoid arthritis.. *J. Rheumatol.* 1996, 23, S.577-581,
- McKay und Cidlowski, 1998 L.I. McKay, J.A. Cidlowski: Cross-talk between nuclear factor kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol. Endocrinol.* 1998, 12, S.45-56,
- McKay und Cidlowski, 1999 L.I. McKay, J.A. Cidlowski: Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr. Rev.* . 1999, 20, S.435-459,
- Miagkov et al., 1998 A.V. Miagkov, D.V. Kovalenko, C.E. Brown, J.R. Didsbury, J.P. Cogswell, S.A. Stimpson, A.S. Baldwin, S.S. Marakov: NF- κ B activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998, 95, S. 138859-138864,
- Miyazawa et al., 1998 K. Miyazawa, A. Mori, K. Yamamoto, H. Okudaira: Transcriptional roles of CCAAT/enhancer binding protein-beta, nuclear factor-kappaB, and C-promoter binding factor 1 in interleukin (IL)-1beta-induced IL-6 synthesis by human rheumatoid fibroblast-like synoviocytes . *J. Biol. Chem.* 1998, 273, S. 7620-7627,

- Mori und Prager, 1996 N. Mori, D. Prager: Transactivation of the interleukin-1alpha promotor by human T-cell leukemia virus type I and II Tax proteins. *Blood*. 1996, 87, S.3410-3417,
- Muller und Renkawitz, 1991 M. Muller, Renkawitz R.: The glucocorticoid receptor. *Biochim. Biophys. Acta*. 1991, 1088, S.171-182,
- Neeck et al., 1990 G. Neeck, K. Federlin, V. Graef, D. Rusch, K.L. Schmidt: Adrenal secretion of cortisol in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatology*. 1990, 17, S.24-29,
- Nissen und Yamamoto, 2000 R.M. Nissen, K.R. Yamamoto: The glucocorticoid receptor inhibits NF-kappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* 2000, 14, S.2314-2329,
- O'Malley and Tsai, 1992 B.W. O'Malley, M.J. Tsai: Molecular pathways of steroid receptor action. *Biol. Reproduct.* 1992, 46, S.163-167,
- Osborn et al., 1989 L. Osborn, S. Kunkel, G.J. Nabel: Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of nuclear factor kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989, 86, S.2336-2340,
- Pahl, 1999 H.L. Pahl: Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999, 18, S.6863-6866,
- Peter et al., 1999 J.H. Peter, B. Boss, G. Neeck: Investigations of neopterin soluble interleukin-2 receptor and cortisol in rheumatoid arthritis. *Z. Rheumatol.* 1999, 58, S.315,
- Pratt et al., 1988 W.B. Pratt, D.J. Jolly, D.V. Pratt, S.M. Hollenberg, V. Giguère, F.M. Cadepond, G. Schweizer-Groyer, M.-G. Catelli, R.M. Evans, E.-E. Baulieu : A region in the steroid binding domain determines formation of the non-binding 9S glucocorticoid receptor complex. *J. Biol. Chem.* 1988, 263, S.267-273,
- Pratt, 1993 W.B. Pratt: The role of heat shock proteins in regulating the function, folding and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, S.21455-58,

- Ray und Prefontaine, 1994 A. Ray, K. Prefontaine: Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* . 1994, *91*, S.752-756,
- Reichhardt et al., 2000 H.M. Reichhardt, J.P. Tuckermann, A. Bauer, G. Schütz : Molecular genetic dissection of glucocorticoid receptor function in vivo. *Z. Rheumatol.*. 2000, *59 Suppl 2*, S.1-5,
- Reichstein, 1936 T. Reichstein: Über Bestandteile der Nebennierenrinde VI. *Helv. Chim. Acta.*. 1936, *19*, S.1107-1126,
- Renkawitz, 1990 R. Renkawitz: Transcriptional repression in eucaryotes. *Trends in Genetics.* 1990, *6*, S.192-197,
- Rusconi und Yamamoto, 1987 S. Rusconi, K.R. Yamamoto: Functional dissection of the hormone and DNA binding activities of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.*. 1987, *6*, S.1309-1315,
- Sakai et al., 1988 D.D. Sakai, S. Helms, J. Carlsted-Duke, J.A. Gustafsson, F.M. Rottmann, K.R. Yamamoto: Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes Dev.*. 1988, *2*, S.1144-1154,
- Scheinman et al., 1995 R.I. Scheinman, A. Gualberto, C.M. Jewell, J.A. Cidlowsky, A.S. Jr. Baldwin: Characterisation of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol. Cell. Biol.*. 1995, *15*, S.943-953,
- Scheinman und Cogswell et al., 1995 R.I. Scheinman, P.C. Cogswell, A.K. Lofquist, AS Jr. Baldwin: Role of transcriptional activation of I-kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids.. *Science.* 1995, *270*, S.283-286,
- Scheinmann et al., 1995 R. Scheinmann, A. Gualberto, C.M. Jewell, J.A. Cidlowski, A.S. Baldwin: Characerization of mechanisms involed in transrepression of NF- κ B by activated glucocorticoid receptors. *Mol. Cell. Biol.*. 1995, *15*, S.943-953,
- Schlaghecke et al., 1992 R. Schlaghecke, E. Kornely, J. Wollenhaupt, C. Specker:

- Glucocorticoid receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1992, 35, S.740-744,
- Schlaghecke et al., 1994 R. Schlaghecke, D. Beuscher, E. Kornely, C. Specker: Effects of glucocorticoids in rheumatoid arthritis. Diminished glucocorticoid receptors do not result in glucocorticoid resistance. *Arthritis Rheum.* 1994, 37, S.1127-1131,
- Schmidt, K. L.: Checkliste Rheumatologie. 2. Auflage Thieme, 2000 S. 101-118, S. 464-468, 3-13-763002-9,
- Schottelius et al., 2000 A. Schottelius, S. Wedel, R. Weltrich, W. Rohde, F. Buttgereit, S. Schreiber et al.: Higher expression of glucocorticoid receptor in peripheral mononuclear cells in inflammatory bowel disease.. *Am. J. Gastroenterol.* 2000, 95, S.1994-1999,
- Sternberg und Wilder, 1993 E.M. Sternberg, R.L. Wilder: Corticosteroids. In D.J. McCarthy, E.J. Koopman (Eds.): *Arthritis and allied conditions* (Lea & Febiger: Philadelphia 1993). S.665,
- Strähle et al., 1988 U. Stähle, W. Schmid, G. Schütz: Synergistic action of the glucocorticoid receptor with transcription factors. *EMBO J.* 1988, 7, S.3389-3395,
- Straub et al., 2002 R.H. Straub, L. Paimela, R. Peltomaa, J. Schölmerich, M. Leirisalo-Repo: Inadequate low serum levels of steroid hormones in relation to interleukin-6 and tumor necrosis factor in untreated patients with early rheumatoid arthritis and reactive arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002, 46, S.654-662,
- Tsai et al., 1988 S.Y. Tsai, J. Carlstadt-Duke, N.L. Weigel, K. Dahlmann, J.A. Gustafsson, M.J. Tsai, B.W. O'Malley: Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. *Cell.* 1988, 55, S.361-369,
- Webster et al, 2001 J.C. Webster, R.H. Oekley, C.M. Jewell, J.A. Cidlowski: Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: A mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci.. 2001, 98, S.6865-6870,
- Wenting-Van Wilk et al., 1999 M.J. Wenting-Van Wilk, M.A. Blankenstein, F.P. Lafeber, J.W. Bijlsma: Relation of plasma dexamethason to clinical response. Clin. Exp. Rheumatol.. 1999, 17, S.305-312,
- Wieland et al., 1991 S. Wieland, U. Dobbeling, S. Rusconi: Interference and synergism of glucocorticoid receptor and octamer factors. EMBO J.. 1991, 10, S.2513-2521,
- Yamamoto, 1985 K.R. Yamamoto: Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. Ann. Rev. Genet.. 1985, 19, S.209-252,
- Zong et al., 1990 J. Zong, J. Ashraf, E.B. Thompson: The promotor and first untranslated exon of the human glucocorticoid receptor gene er GC rich but lack consensus glucocorticoid receptor element sites. . Mol. Cell. Biol.. 1990, 10, S.5580-5585,

Danksagung

Ich möchte mich bei meiner Frau Nicole bedanken, die mich durch mein ganzes Studium begleitet hat und in schweren wie in guten Zeiten immer für mich da war und sein wird. Des Weiteren gebührt Dank meinen Eltern, Geschwistern und meiner Oma, welche mich sowohl durch meine Schulzeit begleitet, als auch mein Studium der Humanmedizin ermöglicht haben.

Ein Dank vor allem an Herrn Professor Neeck, der mir die Arbeit an dem Thema ermöglicht hat und für mich stets ein guter Mentor war sowohl bei der Doktorarbeit als auch gerade bei der klinischen Arbeit. Auch Dr. Eggert aus der Biologie möchte ich für seine Unterstützung danken. Es war eine gute Erfahrung für mich, auch einmal Labortätigkeiten auszuführen und fachübergreifend eine Doktorarbeit zu gestalten. Diesbezüglich auch Dankeschön an Dr. Schulz und H. Dotzlaw für die Geduld mit mir.

Den mitwirkenden Patienten sowie Gesunden herzlichen Dank für den Mut sich von mir Blut abnehmen zu lassen. Ohne Euch hätte ich meine Arbeit nicht durchführen können.

8 Lebenslauf

persönliche Daten

Name: Klüter: Andreas
Geburtsdatum: 21.8.1973
Geburtsort: Fulda
Familienstand: verheiratet
Nationalität: deutsch
Konfession: katholisch

Ausbildung:

1979-1984	Eingangs- und Grundschule Fulda-Lehnerz
1984-1993	Winfriedschule, Gymnasium des Landkreises Fulda Abschluß: Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife
1993-1994	Zivildienst im den Städtischen Klinikum Fulda
WS1994/95-SS1999	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig- Universität Gießen, nach dem SS 1999 2. Staatsexamen.
10/1999-9/2000	Praktisches Jahr: Innere Medizin und Chirurgie im Kreiskrankenhaus Bad Homburg. Wahlfach Rheumatologie in der Kerckhoff-Klinik Abteilung Rheumatologie, Bad Nauheim. Abschluß 3. Staatsexamen im Oktober 2000
1/2001-6/2002	Arzt im Praktikum in der Kerckhoff-Klinik Abteilung Rheumatologie, Bad Nauheim
seit 8/2002	Assistenzarzt im Klinikum Südstadt Rostock Abteilung Innere Medizin