

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. M. MÜLLER- SCHILLING  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Vergleichende Untersuchung und Bewertung  
elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Nebennieren  
gesunder und arthritischer Ratten**

Inaugural- Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Humanmedizin

der

Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Katharina Krinner

2016



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. M. MÜLLER- SCHILLING  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Vergleichende Untersuchung und Bewertung  
elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Nebennieren  
gesunder und arthritischer Ratten**

Inaugural- Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Humanmedizin

der

Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Katharina Krinner

2016

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rainer H. Straub

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Joachim Grifka

Tag der mündlichen Prüfung: 1.8.2016

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis .....	1
1.1.1	Diagnostik der RA .....	1
1.1.2	Mögliche krankheitsauslösende Faktoren .....	2
1.1.3	Pathogenese der RA .....	3
1.1.4	Medikamentöse Behandlung der RA .....	5
1.2	Tiermodell der Kollagen Typ II- induzierten Arthritis .....	6
1.3	Aufbau und Funktion der neuroendokrinen Achsen .....	8
1.4	Veränderungen der Hypothalamus- Hypophysen- Nebennierenachse bei Arthritis und anderen Autoimmunerkrankungen .....	11
1.5	Mögliche adrenale Gründe für die inadäquate Produktion von Glukokortikoiden bei Arthritis .....	12
1.5.1	Cholesterinaufnahme und -speicherung in adrenokortikalen Zellen .....	12
1.5.2	Einflussfaktoren auf die Steroidogenese .....	14
1.5.3	Die Bedeutung der Mitochondrien für die Steroidogenese .....	16
1.6	Fragestellungen der Arbeit .....	19
1.6.1	Cholesterinspeicherung in adrenokortikalen Zellen .....	19
1.6.2	Adrenokortikale Mitochondrien .....	20
2	Material .....	21
2.1	Materialien .....	21
2.1.1	Verbrauchsartikel .....	21
2.1.2	Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel .....	21
2.1.3	Lösungen, Medien und Puffer .....	22
2.1.4	Kits und Assays .....	24
2.1.5	Geräte .....	24
2.2	Tiere .....	25

3	Methoden.....	26
3.1	Immunisierung der Ratten mit Kollagen Typ II.....	26
3.2	Blut- und Organentnahmen .....	26
3.2.1	Ratten .....	26
3.2.2	Mäuse .....	27
3.3	Vorbereitungen der Nebennieren für die Elektronenmikroskopie .....	27
3.4	Stimulation primärer Nebennierenzellen von DA- Ratten mit ACTH oder Isoproterenol.....	28
3.5	Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder .....	29
3.5.1	Adrenokortikale Lipidtropfen und Mitochondrien.....	29
3.5.2	Lipidtropfen im Zellpellet.....	30
3.6	Messung der mitochondrialen Aktivität adrenokortikaler Zellen.....	31
3.6.1	Kortikosteronbestimmung im Plasma.....	31
3.6.2	Messung des Sauerstoffverbrauches von Nebennierenzellen in Primärkultur .....	31
3.6.3	Messung der Cytochrom- c- Oxidase-Aktivität.....	32
3.7	Statistik.....	33
4	Ergebnisse.....	34
4.1	Ultrastrukturelle Morphologie adrenokortikaler Lipidtropfen bei DA- Ratten.....	34
4.1.1	Veränderungen adrenokortikaler Lipidtropfen im Verlauf der Arthritis.....	35
4.2	Ultrastrukturelle Morphologie adrenokortikaler Lipidtropfen bei ATGL- KO- und Wildtyp-Mäusen .....	38
4.3	Veränderungen der Lipidtropfen in primären Nebennierenzellen von DA- Ratten nach ACTH- oder Isoproterenol- Stimulation.....	40
4.4	Ultrastrukturelle Morphologie adrenokortikaler Mitochondrien bei DA- Ratten .....	42
4.4.1	Veränderungen adrenokortikaler Mitochondrien im Verlauf der Arthritis .....	43

4.5	Zusammenhänge zwischen adrenokortikalen Lipidtropfen und Mitochondrien .....	44
4.6	Messung der mitochondrialen Aktivität adrenokortikaler Zellen.....	46
4.6.1	Nebennierengewichte, Nebennierenzellzahlen und Plasmakortikosteron .....	47
4.6.2	Sauerstoffverbrauch in adrenokortikalen Zellen gesunder und immunisierter DA- Ratten.....	48
4.6.3	Cytochrom- c- Oxidase Aktivität in adrenokortikalen Mitochondrien gesunder und immunisierter DA- Ratten.....	49
5	Diskussion .....	51
5.1	Ultrastrukturelle Morphologie adrenokortikaler Lipidtropfen von DA- Ratten im Verlauf der Arthritis .....	51
5.2	Ultrastrukturelle Morphologie adrenokortikaler Mitochondrien von DA- Ratten im Verlauf der Arthritis .....	53
5.3	Zusammenhänge zwischen adrenokortikalen Lipidtropfen und Mitochondrien .....	54
5.4	Mitochondriale Aktivität adrenokortikaler Zellen gesunder oder immunisierter DA- Ratten.....	56
6	Zusammenfassung .....	59
7	Literaturverzeichnis.....	60
8	Danksagung.....	83
9	Lebenslauf .....	84
10	Eidesstattliche Erklärung .....	85
11	Zugrunde liegende Publikation .....	86

## Abkürzungsverzeichnis:

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AIA	Adjuvant- induzierte Arthritis
Anti- CCP- Antikörper	Antikörper gegen citrullinierte Peptide
APZ	antigenpräsentierende Zellen
ATGL	<i>Adipose Triglyceride Lipase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
C- Atom	Kohlenstoff- Atom
CFA	komplettes Freund Adjuvant
CIA	Kollagen Typ II- induzierte Arthritis
COX	Cytochrom- c- Oxidase
CRH	<i>Corticotropin- releasing Hormone</i>
CII	Kollagen Typ II
DA- Ratte	<i>Dark Agouti- Ratte</i>
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DMARD	<i>disease- modifying antirheumatic drug</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EM	Elektronenmikroskop
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
HPA- Achse	<i>hypothalamic- pituitary- adrenal</i> (Hypophysen- Hypothalamus- Nebennieren)- Achse



HSD	Hydroxysteroid- Dehydrogenase
HSL	Hormon- sensitive Lipase
IFA	inkomplettes Freund Adjuvant
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JIA	juvenile idiopathische Arthritis
KBD	Kashin- Beck- <i>disease</i> (Krankheit)
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
MTX	Methotrexat
MWU- Test	Mann- Whitney- U- Test
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
RA	rheumatoide Arthritis
RANK(L)	<i>Receptor Activator of NF- <math>\kappa</math>B-</i> (Ligand)
RF	Rheumafaktor
scc	<i>side chain cleavage</i> (Seitenkettenspaltung)
SCW	<i>streptococcal cell wall</i> (Streptokokkenzellwand)
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
SNS	sympathisches Nervensystem
SR- B1	<i>scavenger receptor</i> vom Typ B1
StAR	<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>
TG	Triglyzerid(e)
TNF	Tumornekrosefaktor

v.a.

vor allem

z.B.

zum Beispiel

# **1 Einleitung**

## **1.1 Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis**

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische systemische Erkrankung, die mit der Entzündung und Zerstörung von Gelenken einhergeht. Sie ist die häufigste entzündliche Arthritisform. In Industriestaaten beträgt ihre Prävalenz bis zu 1 % (157), wobei die RA bei Frauen zwei- bis dreimal häufiger vorkommt als bei Männern (52). Wird eine bestehende Erkrankung nicht behandelt, so führt sie durch fortschreitende Schäden an involvierten Gelenken zu Fehlstellungen und letztendlich zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Behinderung (55, 191). Dadurch stellt die RA einen hohen Kostenfaktor im Gesundheitswesen dar. Zusätzlich kann sie ohne adäquate Behandlung auch die Fünfjahresüberlebensrate der Betroffenen um bis zu 60% verringern, da nicht nur die Gelenke betroffen sind, sondern eine systemische Entzündung vorliegt (135, 194, 139). Typische Symptome sind geschwollene und stark schmerzhaft Gelenke, die im Laufe der Krankheit durch die bestehende Entzündung zunehmend zerstört werden. Die RA ist eine Polyarthritits, das heißt, dass mehrere Gelenke ( $\geq 6$ ) betroffen sind. Prinzipiell können alle Gelenke des Körpers erkranken, in den meisten Fällen sind jedoch Hand-, Fuß- und Kniegelenke beteiligt (159). Typischerweise bleiben hierbei an den Händen die distalen Interphalangealgelenke ausgespart. Weiterhin kann die Wirbelsäule befallen sein, wobei v.a. eine Beteiligung des Atlantoaxialgelenks in späteren Krankheitsstadien üblich ist. Schließlich gibt es die sogenannten extraartikulären Manifestationen der RA, die von Rheumaknoten bis hin zur Vaskulitis reichen (160).

### **1.1.1 Diagnostik der RA**

Die Diagnostik der RA stützt sich einerseits auf klinische Beobachtungen, andererseits auf laborchemische Marker. Um die Diagnostik zu erleichtern, existieren festgelegte Kriterien. Die Amerikanische Gesellschaft für Rheumatologie hat bestimmte Merkmale definiert, die zur Feststellung der RA erfüllt sein müssen. Dazu gehören Morgensteifigkeit in den betroffenen Gelenken für mindestens eine Stunde, Weichteilschwellungen von drei oder mehr Gelenkregionen, Schwellung von Interphalangeal-, Metakarpophalangeal- oder Handgelenken, symmetrische Gelenkschwellungen, Vorliegen von Rheumaknoten, Nachweis des Rheumafaktors

(RF) und Erosionen und/ oder periartikuläre Osteopenie an Finger- und/ oder Handgelenken auf Röntgenbildern (3). Diese Kriterien wurden 2010 überarbeitet, da sich eine fehlende Sensitivität der ursprünglichen Kriterien in frühen Krankheitsphasen zeigte. Trotzdem behalten die ursprünglichen Kriterien als Bezugspunkt für die voll ausgeprägte Krankheit ihre Wichtigkeit (2). Die überarbeitete Fassung vergibt Punkte nach den folgenden vier Kriterien: Anzahl der betroffenen Gelenke, Serologie, Entzündungsmarker und Symptombdauer (2).

Die Serologie umfasst zwei Laborparameter, den RF und die Antikörper gegen citrullinierte Peptide (Anti- CCP- Antikörper) (148). Der klassische RF ist ein Immunglobulin (Ig)M- Antikörper; jedoch finden sich auch andere Ig- Klassen. So gewinnt der IgA- Faktor an Bedeutung, da er v.a. bei der Frühmanifestation der RA sehr sensitiv ist und mit einem erosiven Krankheitsverlauf korreliert (10, 105). Im Gegensatz dazu ist der RF der Klasse IgM bei Erkrankungsbeginn seltener positiv und erst nach längerer Krankheitsdauer nachweisbar (43, 180). Die Anti- CCP- Antikörper spielen in der Frühdiagnostik der RA eine wichtige Rolle, da sie innerhalb der ersten 2 Jahre bei bis zu 81 % der Patienten positiv sind (43). Außerdem sind sie selten bei anderen Gelenkerkrankungen oder Kollagenosen nachweisbar (43).

### **1.1.2 Mögliche krankheitsauslösende Faktoren**

Die genauen Ursachen der RA sind trotz intensiver Forschung bis heute nicht bekannt. Man weiß jedoch, dass genetische Faktoren einen wichtigen Einfluss auf die Prädisposition für die RA haben (154). So gibt es einige Genloci, die zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko beitragen (21). Der wichtigste ist der *human leucocyte antigen* (HLA)- Locus, der 30 bis 50% der genetischen Prädisposition für die RA ausmacht (154, 21, 101). Innerhalb des HLA- Locus besteht die stärkste Assoziation mit den HLA- DRB1- Allelen, die für das *shared epitope* kodieren (101, 27). Das *shared epitope* ist eine definierte Aminosäuresequenz auf der DR-  $\beta$  - Kette des HLA- Klasse- II- Moleküls (62). Zudem konnten in den letzten Jahren weitere Genloci identifiziert werden, die eine Assoziation mit der RA zeigen, wie STAT4, PTPN22 und viele andere (94, 162, 163).

Jedoch ist die genetische Prädisposition keine Voraussetzung, die zwingend zum Ausbruch der Erkrankung führen muss (156). Man geht heute davon aus, dass genetische Faktoren 0 bis 25% des Risikos ausmachen, an RA zu erkranken und

dass das Restrisiko durch umweltbedingte Faktoren bestimmt wird (93, 108). Als wichtige Umweltfaktoren wurden in der Literatur viele verschiedene Aspekte beleuchtet: Bakterien wie Chlamydien (82), Viren wie das Epstein- Barr- Virus (EBV) (93, 144) und die Exposition gegenüber Siliziumoxid (68), Asbest (173) oder Rauchen (123). Jedoch war es bis heute nicht möglich, einen spezifischen Triggerfaktor zu bestimmen (67).

Zusammenfassend handelt es sich bei der RA um eine komplexe Erkrankung, deren genaue Ursache bislang unbekannt ist, die aber sowohl von genetischen als auch von Umweltfaktoren beeinflusst wird (93). Dabei geht man allgemein von einem multifaktoriellen auslösenden Geschehen aus, was erklären könnte, weshalb bisher kein spezifischer Triggerfaktor identifiziert werden konnte (67). Eine mögliche Verbindung zwischen genetischer Prädisposition und bestimmten Mikroorganismen als Triggerfaktoren stellt das erwähnte *shared epitope* dar, da es Ähnlichkeit mit viralen Proteinen besitzt. Möglicherweise ist dies ein Faktor, der dazu beiträgt, dass sich eine anfänglich gegen exogene Organismen gerichtete Immunantwort gegen körpereigene Strukturen richtet (27), wie das bei Autoimmunkrankheiten der Fall sein kann.

### **1.1.3 Pathogenese der RA**

Die RA wird zum Formenkreis der Autoimmunkrankheiten gezählt, da bei dieser Erkrankung das Auftreten von autoreaktiven T- und B- Lymphozyten und Antikörpern beobachtet werden kann (12). Am Anfang der RA- Pathogenese steht die Aktivierung dendritischer Zellen durch autologe oder exogene Antigene (158, 160). Diese dendritischen Zellen sind antigenpräsentierende Zellen (APZ), deren Aufgabe es ist, den T- Zellen Antigene zu präsentieren und diese somit zu aktivieren. Neben den dendritischen Zellen wird diese Aufgabe auch von Makrophagen und aktivierten B- Zellen übernommen (158).

Die B- Zellen tragen nicht nur durch die Antigenpräsentation zur Pathogenese der RA bei, sondern auch durch die Produktion von Antikörpern (wie Autoantikörpern) und Zytokinen (158). Diese Autoantikörper sind in der Lage, Immunkomplexe zu bilden, die ebenfalls die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen stimulieren können (158). Die Zytokine wiederum sorgen dafür, dass weitere T- Zellen, B- Zellen

und Makrophagen aktiviert werden, sodass man von einem Entzündungskreislauf sprechen kann (158, 160).

Die erwähnten Makrophagen dienen ebenfalls nicht nur der Antigenpräsentation, sondern erfüllen weitere Aufgaben, die die Entzündung unterhalten: Zum einen sind auch sie eine wichtige Quelle für die Zytokinproduktion (Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin (IL)- 1, IL- 6), zum anderen stimulieren sie weitere Zellpopulationen, die im Laufe der RA direkt zur Gelenkdestruktion beitragen (158, 160).

Diese Destruktion der Gelenke wird zudem durch weitere komplexe Signalwege vermittelt. Die von den Immunzellen produzierten Zytokine wie TNF, IL- 6 und IL- 1 sorgen für die Migration bestimmter Zellpopulationen aus der Blutbahn in die betroffenen Gelenke –mittels Chemokine- (158) und für die Aktivierung von gewebeschädigenden Enzymen wie Matrixmetalloproteinasen (MMPs) (160). Somit wird auch lokal ein entzündliches Milieu generiert, das nach und nach durch den Abbau von Knorpel und Knochen zur irreversiblen Schädigung der betroffenen Gelenke führt.

Verschiedene Zellpopulationen und Enzyme tragen zu diesem Prozess bei: In der Synovialmembran finden sich Synoviozyten, die durch die Sekretion von MMPs in der Lage sind Knorpel und Knochen zu zerstören (158). Auch neutrophile Granulozyten spielen mithilfe von proteolytischen Enzymen und reaktiven Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle in der Gewebedestruktion (37). Die vorrangige Zellpopulation bei der Knochendestruktion sind die Osteoklasten. Sie finden sich in der Synovialmembran (149, 172) und werden durch Makrophagen stimuliert. Für diese Stimulation ist die Interaktion zwischen *Receptor Activator of NF-  $\kappa$ B* (RANK) und dem RANK- Liganden (RANKL) notwendig (172). Die Expression von RANKL wiederum wird durch proinflammatorische Zytokine wie TNF, IL- 1, IL- 6 und IL- 17 reguliert (149). Das fibröse Granulationsgewebe, das durch die erwähnten Entzündungsvorgänge gebildet wird und sich am Übergang zwischen Knorpel und Knochen findet, wird als Pannus bezeichnet (127). Ein wichtiger Faktor zur Aufrechterhaltung des Pannus ist die Neubildung von Gefäßen, da dessen Invasion in Knorpel und Knochen eine gute Blutversorgung erfordert (127). Deshalb werden in der Synovialmembran von RA- Patienten viele proangiogenetische Faktoren wie *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) exprimiert (127). Auch Fibroblasten spielen eine wesentliche Rolle für die Pannus- Bildung und die Zerstörung des Knorpels (87).

#### 1.1.4 Medikamentöse Behandlung der RA

Die medikamentöse Therapie der RA basiert auf verschiedenen Säulen: Einerseits existiert die rein symptomatische Behandlung mit nichtsteroidalen Antiphlogistika. Andererseits gibt es die so genannten DMARDs (*disease-modifying antirheumatic drugs*), wie Methotrexat (MTX), Ciclosporin, Azathioprin, Leflunomid und viele weitere. Die DMARDs werden weiter in die *small molecule* DMARDs und die neueren *biological* DMARDs (*Biologicals*) unterteilt (160). Die DMARDs modifizieren den Krankheitsverlauf grundlegend, indem sie sowohl die entzündlichen Prozesse der RA, als auch die Zerstörung der Gelenke positiv beeinflussen. Eine möglichst frühe aggressive Therapie mit DMARDs wirkt sich somit positiv auf den weiteren Verlauf aus (179, 122). Komplettremissionen treten nur bei 1 % der Behandelten auf, dennoch ist auch bei diesen eine langfristige medikamentöse Behandlung angezeigt, da ein Absetzen der Medikamente oft zum Wiederauftreten der Entzündung führt (175).

Die *small molecule* DMARDs, wie das als Goldstandard geltende MTX und auch Leflunomid, blockieren verschiedene Enzyme. Durch diese Enzyblockaden wird in Signalkaskaden eingegriffen, die die Produktion von Zytokinen und die Zellproliferation und -migration beeinflussen (111, 155). Im Gegensatz dazu greifen die *Biologicals* als monoklonale Antikörper oder lösliche Rezeptoren direkt an proinflammatorischen Zytokinen wie TNF oder Interleukinen an (160). Die anti-TNF-Therapie war in den letzten Jahren der große Durchbruch in der medikamentösen Behandlung der RA, da sie sich auch bei Patienten als wirksam erwies, die auf die bis dahin vorhandenen Medikamente nicht angesprochen hatten. Jedoch gibt es auch bei dieser Therapie Non-Responder, Komplettremissionen sind selten und schwere Nebenwirkungen dürfen nicht außer Acht gelassen werden (6, 106). Da die meisten der erwähnten DMARDs ihre volle Wirkung erst nach Wochen oder zum Teil erst nach Monaten entfalten, wird überbrückend zusätzlich mit Glukokortikoiden therapiert. Darüber hinaus wurde klar, dass Glukokortikoide in niedriger Dosierung als Dauertherapie von Vorteil sind (160).

Zusammenfassend kann man sagen, dass während der letzten 10 bis 15 Jahre das Outcome von Patienten mit RA durch neue Medikamente deutlich verbessert werden konnte. Heutzutage ist die Erkrankung bei vielen Patienten durch die Therapie gut kontrollierbar und extraartikuläre Manifestationen wie Vaskulitiden, sowie Spätfolgen wie Amyloidose sind selten geworden (160). Doch auch mit den besten Therapien ist

es momentan nicht möglich, die RA bei allen Patienten vollständig zur Ausheilung zu bringen. Zusätzlich müssen auch die Nebenwirkungen der immunsuppressiven Langzeittherapie und krankheitsassoziierte Komplikationen wie Hypertonie oder koronare Herzkrankheit bedacht werden, da auch sie zu erhöhter Morbidität und Mortalität der behandelten Patienten führen. Neben erhöhter Infektanfälligkeit existieren auch weitere unerwünschte Effekte, so begünstigen z.B. Glukokortikoide in hoher Dosierung die Entstehung einer arteriellen Hypertonie (152).

Solange die Pathophysiologie der RA noch nicht vollständig verstanden ist, wird es jedoch kaum möglich sein, Medikamente zu entwickeln, die in der Lage sind, die Erkrankung bei allen Patienten vollständig zur Ausheilung zu bringen. Aus diesem Grund ist weitere Forschung sinnvoll und nötig. Da viele Experimente zur Klärung der Krankheitsätiologie und zur Entwicklung und Erprobung neuer medikamentöser Therapien nicht an menschlichen Probanden durchgeführt werden können, wurden verschiedene Tiermodelle der Arthritis entwickelt. Auch die vorliegende Arbeit bedient sich eines dieser Modelle, welches im Folgenden näher erläutert wird.

## **1.2 Tiermodell der Kollagen Typ II- induzierten Arthritis**

Zahlreiche Tiermodelle der Arthritis sind in der Literatur beschrieben (7, 69). Diese Modelle teilen zwar bestimmte Merkmale mit der humanen RA (80), aber es finden sich auch Unterschiede (193). Auf der einen Seite gibt es die Spontanarthritiden bei transgenen Tieren (95, 98), das TNF- transgene Mausmodell (89, 104) und das HLA-B27 transgene Rattenmodell (171). Auf der anderen Seite existieren die immunologisch induzierten Arthritiden, z.B. die Streptokokkenzellwand (SCW)-induzierte Arthritis (40), die Antigen- induzierte Arthritis (7, 22), die Adjuvant-induzierte Arthritis (AIA) (130), und die Kollagen Typ II- induzierte Arthritis (CIA) (23, 73). Dabei sind die am häufigsten verwendeten Arthritismodelle die AIA bei Ratten und die CIA bei Ratten und Mäusen (69).

Die AIA bei Ratten war das erste beschriebene Tiermodell (130) und wird immer noch häufig verwendet, v.a. in der präklinischen Phase der Medikamententestung. Die klassische AIA wird bei Lewis- Ratten durch eine einzige intradermale Injektion von komplettem Freund Adjuvant (CFA) ausgelöst (7). Das AIA- Modell zeigt ein zuverlässiges und schnelles Auftreten einer fortschreitenden Entzündung in vielen



Gelenken, die zu Knochenerosionen führt (7). Klinische Zeichen dieser Polyarthritiden bei der Ratte erscheinen ungefähr 10- 14 Tage nach der Injektion des Adjuvant, halten jedoch selten länger als zwei Monate an (182). Die Pfoten der immunisierten Tiere zeigen unter dem Mikroskop eine Zellinfiltration, v.a. durch neutrophile Granulozyten, und eine Zerstörung der Gelenke. Die AIA ist eine T- Zell- abhängige Krankheit, die einige Merkmale mit der RA teilt, wie beispielsweise Verlust der Beweglichkeit im Gelenk, Schwellung der Extremitäten, Knorpelresorption und Einwanderung von Lymphozyten in betroffene Gelenke. Die Knochenresorption ist bei der AIA sehr ausgeprägt, allerdings sind Knorpelschäden von geringerem Ausmaß als bei der CIA und der RA (8). Das AIA- Modell ist abhängig von T- Zellen und Neutrophilen, B- Zellen scheinen dabei jedoch eine kleinere Rolle zu spielen (8, 197).

Die CIA wurde zuerst bei Ratten beschrieben (178) und ist ein weit verbreitetes Modell, um neue Therapieansätze bei der RA zu testen. Durch intradermale Injektion von Kollagen Typ II (CII) in inkompletem Freund Adjuvant (IFA) wird bei Ratten eine schwere Polyarthritiden hervorgerufen (178). Bei Mäusen wird die CIA auf eine andere Art verursacht: Zuerst wird CII zusammen mit CFA verabreicht, 21 Tage nach dieser ersten Immunisierung erfolgt dann eine Auffrischung mit CII und IFA (86, 44, 195). Im Allgemeinen ist die CIA durch eine deutliche Knochen- und Knorpeldestruktion charakterisiert, die mit der Ablagerung von Immunkomplexen auf Gelenkoberflächen einhergeht. Im Laufe der Immunantwort werden CII- spezifische T- und B- Zellen aktiviert, wobei die B- Zellen Antikörper gegen das Kollagen Typ II produzieren (190). Diese autoreaktiven T- und B- Zellen spielen eine große Rolle für das Fortschreiten der Erkrankung (80). Die Arthritis entwickelt sich 10- 13 Tage nach der Immunisierung, erreicht am Tag 20 ihren Höhepunkt und chronifiziert dann (7, 138). Die CIA bei Ratten zeigt viele Ähnlichkeiten zur humanen RA (80, 177). Wie beim Menschen ist auch bei den Ratten das weibliche Geschlecht anfälliger für die Erkrankung. Zudem sind die peripheren Gelenke symmetrisch betroffen und die Entzündung wird von einer Hyperplasie der Synovia sowie einer Entzündungszellinfiltration im Gelenk begleitet. Außerdem wird die Entzündung durch *Major Histocompatibility Complex* (MHC)- Gene reguliert (siehe Kapitel 1.2) und spricht auf die meisten Therapien an, die auch bei der Behandlung der RA wirksam sind (80). Im Unterschied zur menschlichen Erkrankung verläuft die CIA nicht phasenweise mit Exazerbation und Remission im Wechsel. Zudem besteht das

Entzündungszellinfiltrat bei der CIA v.a. aus polymorphkernigen Zellen, während bei der RA ein großer Anteil an monomorphkernigen Zellen beobachtet werden kann (190).

Nicht alle Rattenstämme sind in der gleichen Weise anfällig für die CIA. In der vorliegenden Arbeit wurden *Dark Agouti* (DA)- Ratten verwendet, welche sehr empfindlich gegenüber experimenteller Arthritis sind. Die unterschiedliche Anfälligkeit der Rattenstämme gegenüber der experimentellen Arthritis scheint mit Veränderungen in der Hypothalamus- Hypophysen- Nebennieren (HPA)- Achse vergesellschaftet zu sein (186, 187).

### **1.3 Aufbau und Funktion der neuroendokrinen Achsen**

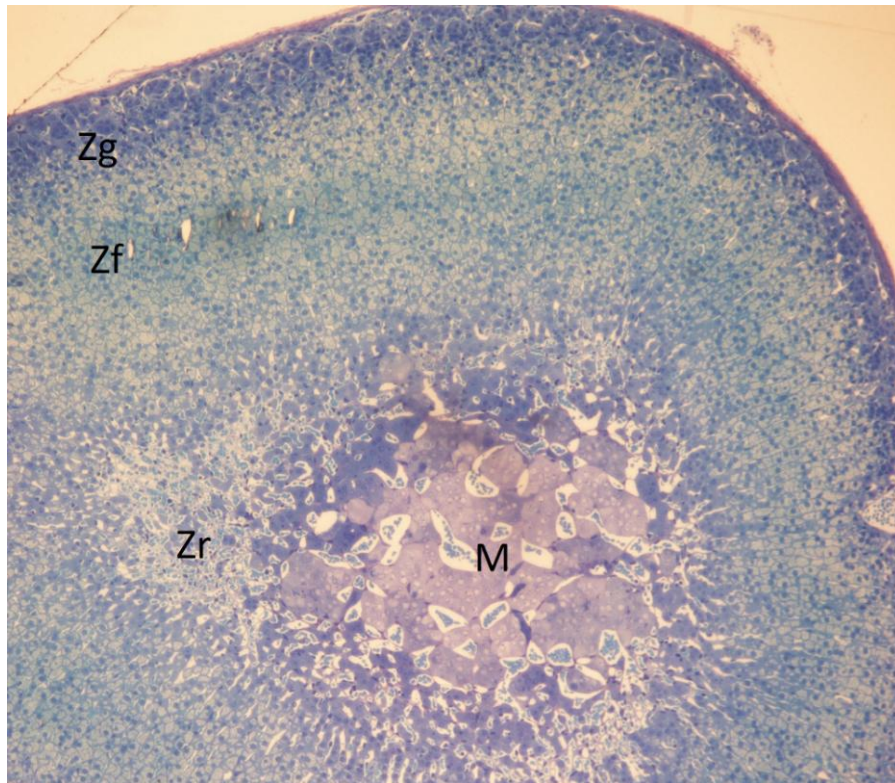
Die HPA- Achse besteht aus verschiedenen Stufen, die durch einen Regelkreis miteinander verknüpft sind. Der Hypothalamus stellt die oberste Instanz des Regelkreises dar. Aktivierte Immunzellen und im Laufe einer Immunantwort freigesetzte Zytokine (v.a. IL- 1, IL- 6 und TNF) stimulieren über die Blutzirkulation oder über Rezeptoren auf sensiblen Nervenfasern im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus die Freisetzung von *Corticotropin- releasing Hormone* (CRH) (30, 114, 115). CRH wiederum mobilisiert die Freisetzung des adrenokortikotropen Hormons (ACTH) aus dem Hypophysenvorderlappen, welches schließlich die Synthese von Steroiden in der Nebennierenrinde fördert (24). Im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus werden die Ausschüttung von CRH und ACTH durch die Kortisolkonzentration im Blut gehemmt. Durch diese negative Rückkopplung wird die Plasmakonzentration von Kortisol reguliert (150). Der Hypothalamus registriert die periphere Glukokortikoidkonzentration über eigene Hormonrezeptoren, wobei nur die Menge an freien ungebundenen Kortikoiden im Blut über die Menge an besetzten Rezeptoren im Hypothalamus entscheidet (34).

Die durch die Aktivierung der HPA- Achse freigesetzten Glukokortikoide hemmen die oben beschriebenen Entzündungsabläufe, indem sie die Aktivierung von Immunzellen und die Produktion von Zytokinen eindämmen (29). Zudem reduzieren Glukokortikoide die Akkumulation von Monozyten und Granulozyten in entzündetem Gewebe (30). Des Weiteren wird durch die Aktivierung der HPA- Achse das Androgen Dehydroepiandrosteron (DHEA) ausgeschüttet, das ebenfalls

antiinflammatorisch wirkt (166). Insofern kann die HPA- Achse in einem Sinne als gegenregulatorische Kraft zum Immunsystem verstanden werden (120).

Die paarigen Nebennieren als Effektororgan der HPA- Achse sitzen den beiden Nieren auf und bestehen aus Rinde (*Cortex*) und Mark (*Medulla*) (Abb. 1.1). Im Nebennierenmark finden sich zwischen den chromaffinen Markzellen zahlreiche Sinuskapillaren. In den Zellen des Nebennierenmarks werden Katecholamine wie Adrenalin und Noradrenalin gebildet und ins Blut abgegeben (54).

Die Nebennierenrinde ist in drei Zonen untergliedert. Von außen nach innen folgen die *Zona glomerulosa*, die *Zona fasciculata* und die *Zona reticularis* (Abb. 1.1). Die *Zona glomerulosa* steht unter dem Einfluss des Renin- Angiotensin- Aldosteron- Systems (RAAS) der Niere (150). Hier werden Mineralokortikoide wie Aldosteron gebildet, die auf den Wasser-, Natrium- und Kaliumhaushalt des Körpers wirken. Die Zellen der *Zona fasciculata* stellen v.a. Glukokortikoide her. Der wichtigste Vertreter der adrenalen Glukokortikoide beim Menschen ist das Kortisol. Kortison ist die inaktive Form von Kortisol und kann durch das Enzym 11 $\beta$ - Hydroxysteroid- Dehydrogenase (11 $\beta$ - HSD) Typ I in das aktive Kortisol umgewandelt werden (150). Bei Nagetieren ist Kortikosteron der wichtigste Vertreter der Glukokortikoide (24). Glukokortikoide werden neben Androgenen wie DHEA und Androstendion auch in der *Zona reticularis* produziert. Bei der Frau ist die *Zona reticularis* der Hauptort der Androgenproduktion im Körper. Die beiden inneren Zonen der Nebennierenrinde sind von der Stimulation durch ACTH abhängig. Die Stimulation mit ACTH führt sowohl zur Hypertrophie (Zunahme des Zellvolumens) als auch zur Hyperplasie (Zunahme der Zellzahl) in der Nebenniere (13, 39).



**Abb. 1.1:** Histologischer Schnitt der Nebenniere einer Maus (10fache Vergrößerung, Färbung mit Toluidinblau und basisch Fuchsin); Zg = *Zona glomerulosa*, Zf = *Zona fasciculata*, Zr = *Zona reticularis*, M = Mark/ *Medulla* (Dr. J. A. Schroeder, H. Siegmund, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg)

Parallel zur HPA- Achse wird im Laufe einer Immunantwort auch die Achse des sympathischen Nervensystems (SNS) aktiviert, deren oberste Instanz ebenfalls der Hypothalamus ist. Das SNS ist ein Teil des autonomen Nervensystems des Körpers (30). Die zentrale Aktivierung des SNS führt einerseits zur Aktivierung des systemischen SNS und andererseits über das Splanchnikusgebiet auch zur Aktivierung des Nebennierenmarks (57). Die Effektorhormone des SNS aus dem Nebennierenmark, die Katecholamine, können über spezifische Adrenozeptoren ebenfalls die Immunantwort des Körpers unterdrücken (109). Als  $\beta$ -adrenerge Agonisten supprimieren sie die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, die Proliferation von T- Lymphozyten und die Aktivität von zytotoxischen T- Zellen. Die immunmodulatorischen Effekte der Katecholamine sind jedoch abhängig von ihrer Dosierung und dem korrespondierenden Adrenozeptorsubtyp (184). Das SNS bewirkt seine immunmodulatorischen Effekte auch über die direkte Innervation von

zentralen Organen des Immunsystems wie Thymus, Milz (189) und Lymphknoten (48).

Das SNS und die HPA- Achse wirken jedoch nicht getrennt voneinander, sondern es gibt Hinweise, die für eine direkte Interaktion beider Systeme sprechen. Gibt man steroidproduzierende Zellen mit catecholaminproduzierenden Zellen in Kultur und vergleicht diese mit steroidproduzierenden Zellen, die alleine in Kultur sind, so produzieren Erstere zehnmal mehr Steroide (15). Straub et al. zeigten zudem den kombinierten immunsuppressiven Effekt von Kortisol und Noradrenalin bei der RA. Hier wurden zu Synoviozyten von RA- Patienten entweder nur Kortisol, nur Noradrenalin oder beide Substanzen zusammen gegeben. Die gleichzeitige Zugabe von Kortisol und Noradrenalin zu diesen Zellen ergab eine stärkere Inhibition von TNF und IL- 8 und somit einen größeren antiinflammatorischen Effekt als die Zugabe nur einer dieser beiden Substanzen (165). Sowohl die HPA- Achse als auch das SNS zeigen also für sich und in Zusammenarbeit immunmodulatorische Effekte bei entzündlichem Stress.

#### **1.4 Veränderungen der Hypothalamus- Hypophysen- Nebennierenachse bei Arthritis und anderen Autoimmunerkrankungen**

Eine erhöhte Aktivität der HPA- Achse stellt die normale Antwort des Körpers auf eine akute Entzündung dar (11, 174). Da bei der RA eine chronische Aktivierung des Immunsystems vorliegt, würde man vermuten, dass hier eine langfristige Aktivierung der HPA- Achse erfolgt (116, 11).

Studien an Patienten mit RA haben jedoch gezeigt, dass die HPA- Achse in Relation zur vorliegenden Entzündung nicht angemessen aktiviert wird (32, 33, 116). So konnten Crofford et al. und andere Gruppen zeigen, dass die Plasmakortisolwerte bei Patienten mit unbehandelter RA bezogen auf die Plasmazytokinwerte inadäquat niedrig sind (32, 167). Die fehlende langfristige Aktivierung der HPA- Achse bei Arthritis konnte von del Rey et al. auch im Tiermodell der CIA bei Ratten nachgewiesen werden und wurde von den Autoren als Entkopplung der HPA- Achse vom Immunsystem bezeichnet (42). Aber nicht nur bei der RA und der experimentellen Arthritis, sondern auch bei anderen Autoimmunerkrankungen konnten Veränderungen der HPA- Achse nachgewiesen werden. So fanden sich bei Patienten mit Polymyalgia rheumatica ebenfalls niedrige Kortisolspiegel in Relation

zur vorliegenden Entzündung und zum Plasma-ACTH (129, 164). Weiterhin zeigen auch Patienten mit primärem Sjögren- Syndrom eine Veränderung der HPA- Achse (80, 117).

Ein Funktionsverlust der HPA- Achse wurde bei vielen Autoimmunkrankheiten beschrieben; die Gründe hierfür konnten bisher jedoch nicht hinreichend geklärt werden. Einige Autoren vermuten, dass die fehlende langfristige Aktivierung der HPA- Achse bei der RA eine Anpassung des Körpers an den chronischen Entzündungsprozess darstellt (74). Andere Autoren sehen die Ursache für die fehlende Aktivierung der HPA- Achse isoliert im Hypothalamus, da die Gabe von CRH bei RA- Patienten in einer Produktion von ACTH und Kortisol resultierte (28). Wieder andere Arbeitsgruppen vermuten das grundlegende Problem des HPA- Achsen- Verlustes bei RA auf dem Niveau der Nebenniere. So konnten Hall et al. bei RA- Patienten im Vergleich zu Kontrollen zwar erhöhte ACTH- Spiegel, jedoch keine Unterschiede in den Plasma- Kortisol- Spiegeln nachweisen (66). Zudem fanden Gudbjörnsson et al. nach der Stimulation unbehandelter RA- Patienten mit CRH eine intakte ACTH- Antwort in Verbindung mit einer verminderten Kortisolantwort (63). Straub et al. konnten beobachten, dass die klinische Besserung von RA- Patienten, die eine anti- TNF- Therapie erhielten, mit einem Anstieg des Serumkortisols korrelierte, jedoch nicht mit einem Anstieg des Serum- ACTH- Levels (168). Auch beim Sjögren- Syndrom konnten Anhaltspunkte dafür gefunden werden, das grundlegende Problem innerhalb der HPA- Achse in der Nebenniere zu lokalisieren. Denn bei einem Teil der Patienten fanden sich Antikörper gegen P450c21 (Enzym der Steroidogenese, siehe Abb. 1.2) (117). Die genannten Studien deuten somit eher auf eine adrenale Insuffizienz bei chronischen Autoimmunerkrankungen wie RA hin. Im Folgenden sollen mögliche Gründe für die inadäquate Glukokortikoidproduktion bei Arthritis beleuchtet werden.

## **1.5 Mögliche adrenale Gründe für die inadäquate Produktion von Glukokortikoiden bei Arthritis**

### **1.5.1 Cholesterinaufnahme und -speicherung in adrenokortikalen Zellen**

Cholesterin, der Ausgangsstoff für die adrenale Steroidogenese, wird durch verschiedene Mechanismen in den Zellen der Nebennierenrinde bereitgestellt: (1) de

novo Synthese, (2) Aufnahme von Cholesterinestern entweder durch *low density lipoprotein* (LDL)- Rezeptoren oder durch *scavenger receptor B1* (SR- B1, *high density lipoprotein* (HDL)- assoziiert) und (3) Mobilisierung von gespeicherten Cholesterinestern (4, 64). Beim Menschen scheint die Aufnahme von Cholesterinestern über den LDL- Rezeptor eine wichtige Voraussetzung für die Steroidogenese zu sein (26). Betrachtet man jedoch LDL- Rezeptor- KO- Mäuse, so zeigt sich hier eine normale Steroidproduktion (96). Der größte Anteil des Cholesterins, das bei Mäusen für die adrenale Steroidogenese genutzt wird, wird selektiv in Form von Cholesterinestern über den SR- B1 aufgenommen. Die Cholesterinester werden in Lipidtropfen gespeichert oder durch die Hormon-sensitive Lipase (HSL) in freies Cholesterin umgewandelt, welches dann für die Steroidogenese zur Verfügung steht (96).

Die Bedeutung der HSL für die Steroidogenese zeigt sich, wenn man die Kortikosteronproduktion der Nebennierenzellen von HSL- KO- Mäusen und HSL- Wildtyp- Mäusen *in vitro* vergleicht. Hier zeigt sich eine Reduzierung des basalen Kortikosterons bei den HSL- KO- Mäusen um circa 50% (97). *In vivo* zeigte sich allerdings, dass die basalen Kortikosteronspiegel von Kontrolltieren und HSL- KO- Mäusen ähnlich hoch sind (102). Das legt die Vermutung nahe, dass die HSL nicht das wichtigste Enzym ist, das Triglyzeride (TG) im Fettgewebe von Säugetieren abbauen kann. Tatsächlich konnten Zimmerman et al. die *Adipose Triglyzeride Lipase* (ATGL) als das Enzym identifizieren, das den ersten Schritt der TG- Hydrolyse katalysiert. Die ATGL findet sich im Fettgewebe von Menschen und Mäusen und ist mit Lipidtropfen assoziiert (198). Bei ATGL- KO- Mäusen zeigt sich eine deutliche Zunahme des Fettgewebes und der TG, die nicht abgebaut werden können. Diese werden somit mehr oder weniger ausgeprägt in allen Geweben des Körpers gespeichert (65).

Ein Problem bei der Cholesterinaufnahme oder -speicherung bzw. ein Defekt der Cholesterin abbauenden Enzyme wären somit denkbare Mechanismen, die zu einer inadäquaten Glukokortikoidsekretion führen könnten.

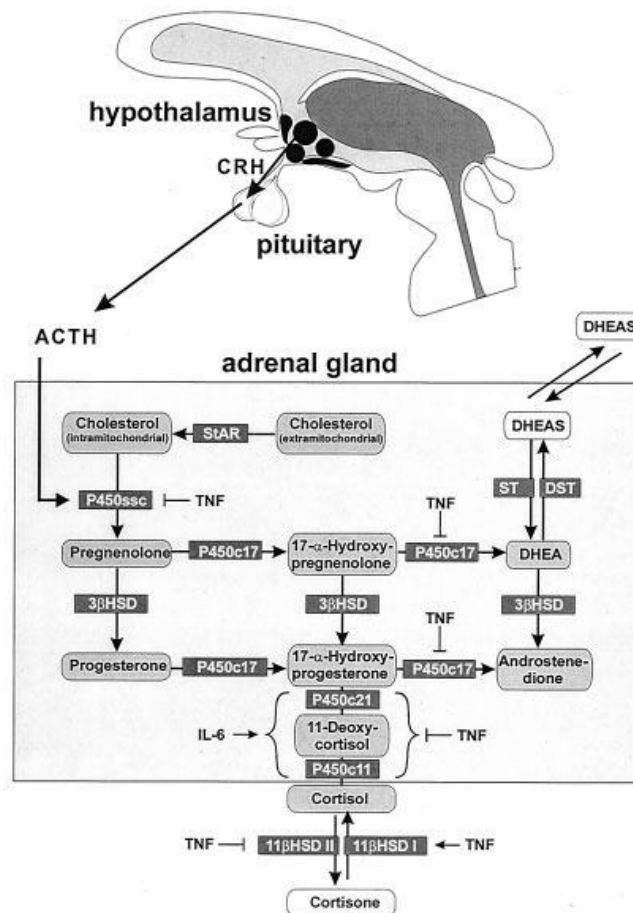
## 1.5.2 Einflussfaktoren auf die Steroidogenese

Bevor die Steroidogenese in den Zellen der Nebennierenrinde ablaufen kann, muss das Cholesterin mit Hilfe des *steroidogenic acute regulatory proteins* (StAR) in die Mitochondrien transferiert werden (Abb. 1.2). Der erste Schritt der Steroidogenese, die Umwandlung von Cholesterin in Pregnenolon, findet an der inneren Mitochondrienmembran statt und wird durch das P450 *side-chain cleavage* (scc)-Enzym katalysiert (Abb. 1.2). Pregnenolon wandert aus den Mitochondrien in das endoplasmatische Retikulum (ER), wo es durch die 3 $\beta$ -HSD und P450c17 in Hydroxyprogesteron umgewandelt wird (Abb. 1.2). P450c17 wird in den Mitochondrien gebildet, übt seine Funktion jedoch im ER aus (119). Hydroxyprogesteron wird nun durch P450c21 (Abb. 1.2) zur Kortisolvorstufe 11-Deoxykortisol oxidiert. P450c21, das auch als 21-Hydroxylase bezeichnet wird, ist ein Membranenzym des ER und befindet sich ausschließlich in der Nebennierenrinde. Der letzte Oxidationsschritt zum aktiven Kortisol wird durch das Enzym P450c11, welches an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, katalysiert (Abb. 1.2). Somit finden der erste und der letzte Schritt der Kortisolsynthese in den Mitochondrien statt (119).

Der Unterschied im Aufbau zwischen Kortisol und Kortikosteron ist eine OH-Gruppe an Position C17. Kortikosteron entsteht über zwei Schritte aus Progesteron. Zuerst wird Progesteron durch P450c21 in 11-Deoxykortikosteron umgewandelt und anschließend vermittelt P450c11 die Umwandlung von 11-Deoxykortikosteron in Kortikosteron (150).

Eine veränderte Funktion eines dieser beschriebenen Enzyme könnte zu einer inadäquaten Steroidproduktion in der Nebennierenrinde beitragen.





**Abb. 1.2:** Die HPA- Achse mit Hypothalamus und Hypophysenvorderlappen und die einzelnen Schritte der Steroidogenese in der Nebennierenrinde des Menschen, wo sowohl Kortisol als auch Androgenvorläufer synthetisiert werden. Gleichzeitig sind die möglichen Einflüsse von TNF und IL- 6 auf verschiedene Enzyme gekennzeichnet. Ein Pfeil bedeutet, dass das Zytokin (IL- 6, TNF) den Syntheseschritt stimuliert. Ein Querbalken zeigt an, dass das Zytokin (TNF) den Enzymschritt inhibiert ( $3\beta$ - HSD =  $3\beta$ - hydroxysteroid dehydrogenase;  $11\beta$ - HSD I and II =  $11\beta$ - hydroxysteroid dehydrogenase type I and type II; ACTH = adrenocorticotropic hormone; CRH = corticotropin releasing hormone; DHEA = dehydroepiandrosterone; DHEAS = DHEA sulfate; DST = DHEA sulfotransferase; P450c11 =  $11\beta$ - hydroxylase; P450c17 =  $17\alpha$ - hydroxylase and  $17/20$ -; P450c21 =  $21\alpha$ - hydroxylase; P450ssc = side-chain cleavage enzyme; ST = DHEA sulfatase; StAR = steroidogenic acute regulatory protein (aus 168)).

Des Weiteren wurde mehrfach gezeigt, dass Zytokine wie IL-1, IL-6 oder TNF die Steroidproduktion direkt beeinflussen können (72) (Abb. 1.2). So stimuliert IL-6 die Steroidproduktion in der menschlichen Nebenniere (36, 46, 128), während TNF einen direkten inhibitorischen Einfluss auf die Genexpression verschiedener Enzyme der Steroidogenese hat (79) (Abb. 1.2). Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe zeigen außerdem, dass IL- $1\beta$  die ACTH- stimulierte Kortikosteronsekretion im Nebennierengewebe von DA- Ratten hemmt (192). Zudem können Zytokine wie TNF, IL-1 und IL-6 auf das Wachstum und die Differenzierung von adrenokortikalen

Zellen Einfluss nehmen (14). Somit sind TNF und IL-1 Faktoren, die möglicherweise zu dem bei Arthritis beobachteten Funktionsverlust der HPA-Achse beitragen.

Oben genannte Zytokine, die einen direkten Einfluss auf die Steroidogenese haben, stammen entweder aus den Nebennierenzellen selbst, oder aus Immunzellen, die die Nebenniere infiltrieren können (59, 60, 61, 83). Makrophagen wurden in allen drei Zonen der Nebennierenrinde von Menschen und Nagetieren nachgewiesen (58). Neben Makrophagen finden sich viele weitere Immunzellen wie Monozyten, dendritische Zellen und Lymphozyten in der Nebennierenrinde von Menschen und Nagetieren (14, 114). Weiterhin wurde gezeigt, dass Lymphozyten in direkten Kontakt mit Nebennierenzellen treten und diese zytokinunabhängig beeinflussen können (15), so dass Immunzellen ebenfalls als mögliche Faktoren in Frage kommen, die die Steroidogenese bei Arthritis negativ beeinflussen.

In der Literatur wurden weitere ACTH- unabhängige Faktoren, die einen Einfluss auf die Synthese von Glukokortikoiden haben, beschrieben (46, 134). So können CRH und ACTH auch außerhalb von Hypothalamus und Hypophyse von Zellen des Nebennierenmarks und von intraadrenalen Immunzellen sezerniert werden und die Steroidogenese beeinflussen (46). Auch Katecholamine, die von den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks produziert werden, können die Glukokortikoidproduktion beeinflussen (14). Bei vielen Säugetieren und beim Menschen sind die Zellen von Nebennierenmark und -rinde nicht nur in ihrer Funktion, sondern auch anatomisch verknüpft (16). So findet man chromaffine Zellen in allen Zonen der Nebennierenrinde (53, 92, 126). Bornstein et al. konnten den Einfluss der chromaffinen Zellen auf die Steroidogenese *in vitro* nachweisen: Zellen der Nebennierenrinde, die zusammen mit Zellen des Nebennierenmarks in Kultur gegeben wurden, produzierten zehnmal mehr Steroide als Zellen der Nebennierenrinde, die ohne chromaffine Zellen in Kultur waren (15).

### **1.5.3 Die Bedeutung der Mitochondrien für die Steroidogenese**

Wie in 1.5.2 beschrieben, finden der erste und der letzte Schritt der Glukokortikoidsynthese in den adrenokortikalen Mitochondrien statt. Mitochondrien sind komplexe membranumgebene Zellorganellen, die in den meisten eukaryotischen Zellen vorkommen. Sie sind von zwei hoch spezialisierten Membranen umgeben. Der Innenraum eines Mitochondrions wird als interne Matrix

und der Raum zwischen der Innenmembran und der Außenmembran als Intermembranraum bezeichnet. In die Mitochondrien- Innenmembran sind die Enzyme der Atmungskette eingebettet, die zuständig sind für die Erzeugung von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP). Die Zelle benötigt diese Energie für Stoffwechselfvorgänge, die Nebennierenrinde auch für die Steroidogenese. Die innere Membran bildet Falten, die so genannten Cristae, die in die Matrix hineinragen. Die Anzahl der Cristae variiert je nach ATP- Bedarf der Zelle (1, 181).

Die Atmungskette an der mitochondrialen Innenmembran besteht aus einer Abfolge von Redoxsystemen, die Elektronen auf Sauerstoff übertragen und den Sauerstoff zu Wasser reduzieren. Durch die ablaufenden Reaktionen kann ein Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran aufgebaut werden, der die Herstellung von ATP aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat ermöglicht. Insgesamt gehören vier Redoxsysteme zur Atmungskette (181).

Der erste Komplex ist die Nicotinamidadenindinukleotid (NADH)- Coenzym Q- Reduktase. Hier überträgt das NADH/H<sup>+</sup> Elektronen über einen Zwischenschritt an das Coenzym Q. NADH/H<sup>+</sup> ist die energiereiche Form von NAD<sup>+</sup> und fällt in der Zelle bei Reaktionen wie dem Zitratzyklus an. Durch die Übertragung der Elektronen wird das Coenzym Q reduziert. Die Energie, die bei dieser Übertragung frei wird, verschiebt Protonen vom Matrix- in den Intermembranraum des Mitochondriums (181).

Der zweite Komplex ist die Succinat- Coenzym Q- Oxidoreduktase, die auch gleichzeitig ein Enzym des Zitratzyklus ist. Dieses Enzym überträgt Elektronen von Succinat auf Coenzym Q. Die Komplexe I und II arbeiten folglich nicht in Serie, sondern erfüllen vielmehr denselben Zweck: die Übertragung von Elektronen aus reduzierten Substraten auf Coenzym Q. Die Elektronen aus dem reduzierten Coenzym Q werden nun durch den Komplex III, die sogenannte Cytochrom- c- Reduktase, auf Cytochrom c übertragen. Auch bei diesem Schritt werden Protonen in den Intermembranraum befördert (181).

Der letzte Komplex der Atmungskette ist die Cytochrom- c- Oxidase (COX). Diese überträgt schließlich die Elektronen von Cytochrom c auf Sauerstoff, wodurch Wasser entsteht. Auch bei dieser Reaktion werden Protonen in den Intermembranraum gepumpt. Durch die Übertragung der Elektronen von Komplex zu Komplex wird ein Protonengradient über der inneren mitochondrialen Membran aufgebaut. Durch diesen Gradienten kann die ATP- Synthase aus ADP und

Phosphat das ATP erzeugen. Dieser Vorgang wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet (181). Solinas et al. bringen eine verminderte oxidative Phosphorylierung in der Nebenniere von Fischer-Ratten in Zusammenhang mit einer Abnahme der Steroidhormonsynthese (161).

Neben der Energiebereitstellung für die Zelle und der Steroidogenese haben adrenale Mitochondrien eine weitere wichtige Aufgabe. Sie sind sowohl eine Quelle als auch ein Angriffspunkt freier Radikale und in der Lage, die Apoptose als reguliertes Sterben einer Zelle herbeizuführen (56, 99). Die Apoptose ist ein physiologischer Prozess, der für die Aufrechterhaltung der Homöostase im Gewebe notwendig ist, aber auch bei pathologischen Prozessen eine Rolle spielt (90).

Grundsätzlich besitzen adrenokortikale Mitochondrien die außerordentliche Fähigkeit sich morphologisch an den funktionalen Zustand der Zelle anzupassen (17). So wurde bei Ratten nach einer Hypophysektomie eine Schwellung der vesikulären Cristae in den Mitochondrien der Fasciculatazellen beobachtet, die durch Gabe von ACTH wieder verschwand (25). Des Weiteren führte die Gabe eines CRH-Antagonisten zur Abnahme von Membranen in den Mitochondrien (19), während die Gabe von CRH oder auch die Wirkung von Stress einen Anstieg des Mitochondrienvolumens und eine Zunahme der mitochondrialen Membranen bewirkten (17, 124). Auch nach enzymatischer Blockade der Steroidhormonsynthese durch Metopiron oder Amphenon B beobachteten Schwarz et al morphologische Veränderungen der Mitochondrien, die nun blasige Vorwölbungen an den Außenmembranen und wenig elektronendichten Inhalt aufwiesen und tubulär aufgebaut waren (150). Verabreicht man Ratten Aminoglutethimid, welches das Enzym P450<sub>scc</sub> (Abb. 1.2) und somit die Steroidogenese hemmt, kommt es im Inneren der Mitochondrien zu vakuolären Veränderungen und die mitochondriale Matrix wird lockerer und transparenter (85).

Mitochondrien nehmen einen bedeutenden Raum in der adrenokortikalen Zelle ein und sind, wie oben beschrieben, von großer Wichtigkeit für die Steroidogenese. Es gibt aber nur sehr wenige Studien, die sich mit mitochondrialen Veränderungen bei Arthritis beschäftigen. Eine Studie belegt, dass bei Patienten mit systemischer juveniler idiopathischer Arthritis (sJIA) im Vergleich zu gesunden Kontrollen die Expression der mitochondrialen DNA-kodierten Gene, Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1 und 2, supprimiert wird (76). Dieselbe Studie zeigt auch, dass der SLC25A4, ein Transporter an der inneren Mitochondrienmembran, dessen vermehrte

Expression mitochondriale Schäden andeutet, bei Patienten mit sJIA vermehrt exprimiert wird (76). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass bei der Kashin-Beck- Krankheit (degenerative Osteoarthritis) die Aktivität mitochondrialer Komplexe in Chondrozyten vermindert war und die Chondrozyten zudem reduzierte zelluläre ATP- Level und einen größeren Anteil an spannungslosen Mitochondrien aufwiesen (107).

Wie im letzten Kapitel dargelegt, spielen adrenokortikale Mitochondrien eine bedeutende Rolle für die Steroidogenese, da wichtige Schlüssel- Hydroxylasen in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert sind. So ist es denkbar, dass eine Dysfunktion adrenokortikaler Mitochondrien für die inadäquate Glukokortikoidproduktion bei Arthritis mit verantwortlich ist.

## **1.6 Fragestellungen der Arbeit**

### **1.6.1 Cholesterinspeicherung in adrenokortikalen Zellen**

Bei der humanen RA und der experimentellen Arthritis liegt eine im Kontext der chronischen Entzündung zu niedrige Glukokortikoidsekretion vor. Da Cholesterin der Ausgangsstoff für die Glukokortikoidsynthese ist und der Großteil des adrenalen Cholesterins in den Lipidtropfen der *Zona fasciculata* gespeichert wird, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit den Lipidtropfen in den Nebennierenzellen von Ratten. Es wurde untersucht, ob sich die Lipidtropfen im Laufe der Arthritis zahlen- und/ oder flächenmäßig verändern. Als mögliche Szenarien wurden angenommen: erstens ein Problem der Nebenniere in der Lipidaufnahme oder -speicherung und somit eine Verarmung der *Zona fasciculata* an Lipidtropfen im Verlauf der Arthritis; zweitens eine Behinderung in Abbau bzw. Weiterverarbeitung des gespeicherten Cholesterins und daraus folgend eine Akkumulation von Fett in der Nebennierenrinde; oder drittens ein völlig anderes Szenario, das die Lipidtropfen nicht zahlenmäßig beeinflusst.

Um Veränderungen hinsichtlich Anzahl und Morphologie der Lipidtropfen im Verlauf der Arthritis festzustellen, wurden diese in den adrenokortikalen Zellen der Nebennieren von DA- Ratten mit dem Elektronenmikroskop (EM) untersucht.

### **1.6.2 Adrenokortikale Mitochondrien**

Da sich diese Arbeit mit möglichen adrenalen Gründen für die inadäquate Glukokortikoidsekretion bei Arthritis beschäftigt und zentrale Schritte der Steroidogenese in den adrenokortikalen Mitochondrien ablaufen, wurden auch die Mitochondrien in den Zellen der *Zona fasciculata* von Rattennebennieren elektronenmikroskopisch untersucht. So wurde analysiert, ob sich die Anzahl oder die Morphologie der adrenokortikalen Mitochondrien im Verlauf der Kollagen Typ II-induzierten Arthritis verändern.

## 2 Material

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Verbrauchsartikel

Artikel	Firma
Einmalskalpelle Nr. 20	Feather (Japan)
Eppendorf- Cups	Sigma- Aldrich (Deisenhofen)
Falconröhrchen 15/50 ml	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Küvetten	Brand GmbH (Wertheim)
Microlance Nadeln	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Ohrmarken und Zange (73855)	Hauptner (Solingen)
OxoDish OD24 (24- Wellplatten)	PreSens GmbH Regensburg
Petrischalen 60x15	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Pipetten (Glas; 5/10/25/50 ml)	Corning Incorporated (Corning, USA)
Plastikspritzen (2/5/10 ml)	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Präparationsbesteck	Aesculap (Tuttlingen)
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf AG (Hamburg)
Sterilfilter, <i>Cell Strainer</i>	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)

#### 2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel

Artikel	Firma
ACTH	Novartis Pharma GmbH, Nuremberg
basisches Fuchsin	Merck (Darmstadt)
Bleizitrat (Ultrastain Stain II)	LEICA (Wien)
DNase I	Sigma- Aldrich (Deisenhofen)

<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Sigma- Aldrich (Deisenhofen)
EDTA	Sigma- Aldrich (Deisenhofen)
Epoxid Kunstharz EmBed 812	Science Services Munich, Germany
Ethanol 96%	Merck (Darmstadt)
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN Systems, Aidenbach, Deutschland
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS)	Sigma- Aldrich (Deisenhofen)
Hyaluronidase I-S	Sigma- Aldrich (Deisenhofen)
Inkomplettes Freund- Adjuvans (IFA)	Sigma- Aldrich (Deisenhofen)
Isoproterenol	Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kollagen Typ II (CII) (bovin, 2 mg/ml in 0,5M Essigsäure)	Chondrex (Seattle, WA, USA)
Kollagenase I	Sigma- Aldrich (Deisenhofen)
NaCl- Lösung, steril (0,9%)	Braun (Melsungen)
Osmiumtetroxid	Science Services (München)
Toluidinblau	Merck (Darmstadt)
Trasylol	Bayer Corp. AG (Leverkusen)
Trypanblau	Sigma- Aldrich (Deisenhofen)
Uranylacetat	Science Services (München)

### **2.1.3 Lösungen, Medien und Puffer**

#### **PBS**

5 PBS- Tabletten	Sigma- Aldrich (Deisenhofen)
1l H <sub>2</sub> O bidest	



### **PBS und Triton (0,3%)**

3 ml Triton X-100

Sigma- Aldrich (Deisenhofen)

1l H<sub>2</sub>O bidest

### **10x BSA**

5g bovines Serumalbumin (BSA)

Sigma- Aldrich (Deisenhofen)

ad 50 ml PBS und Triton (0,3%)

### **Verdaulösung**

HBSS

3 mg/ml BSA

2,6 mg/ml Kollagenase I

Sigma- Aldrich (Deisenhofen)

0,15 mg/ml DNase

Sigma- Aldrich (Deisenhofen)

0,15 mg/ml Hyaluronidase

Sigma- Aldrich (Deisenhofen)

### **Karnofskifixativ**

2,5% Glutaraldehyd

Science Services (München)

2% Paraformaldehyd

Science Services (München)

Natriumcacodylat

Science Services (München)

## 2.1.4 Kits und Assays

Artikel	Firma
<i>Corticosterone rat/mouse ELISA Kit</i>	demeditec (Kiel)
<i>Mitochondria Activity Assay Kit</i>	amsbio (Oxon, UK)
<i>Mitochondria Isolation Kit</i>	amsbio (Oxon, UK)

## 2.1.5 Geräte

Artikel	Firma
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
Dekapitationsapparatur	Werkstatt der Uni Regensburg
Feinwaage (Modell CP64, 1 mg genau)	Sartorius AG (Göttingen)
Feinwaage (Analytic AC 210 S)	Waegetechnik Dümberger (Köfering)
Gewebeprozessor	LYNX, Leica, Vienna, Austria
Homogenisator (IKA Ultra- Turrax)	Medita (Hof)
Lichtmikroskop	Leica, Wetzlar, Germany
Photometer	IMPLEN (München)
Pipetten 10/100/200/1000 µl	Eppendorf AG (Hamburg)
Plattenlesegerät (ELISA- Reader, Emax)	Molecular Devices (Ismaning)
<i>Sensor dish reader</i>	PreSens GmbH Regensburg
Sterilbank (Lamina Flow Einheit)	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
Tiefkühlzentrifuge (Megafuge 1.0 R)	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
Tischschüttler (Certomat)	B. Braun (Melsungen)

Transmissionselektronenmikroskop LEO912AB	Carl Zeiss, Oberkochen, Germany
Waage (1g genau)	Sartorius AG (Göttingen)
Wasserbad (JULABO SW-20C)	JULABO Labortechnik GmbH (Sellbach)
<i>Ultracut S</i>	Leica, Vienna, Austria

## 2.2 Tiere

Die weiblichen DA- Ratten wurden von der Firma Harlan Laboratories GmbH (Venray, Holland) erworben. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen gehalten. Die Versuche wurden nach den gültigen Vorschriften für die Handhabung von Tieren durchgeführt (Regierung der Oberpfalz AZ 54-2532.1-06/09).

Die ATGL- KO- Mäuse wurden ursprünglich von Rudolf Zechner erworben (Institut für Molekularbiologie, Universität Graz, Österreich) und die C57BL/6J- Wildtyp- Mäuse wurden bei der Firma Janvier (Le Genest St. Isle, France) gekauft.

Haemmerle et al. ersetzten bei der ATGL- KO- Maus das erste Exon des ATGL- Gens, einschließlich des Startcodons für die Translation und der gemeinsamen Aminosäuresequenz der Lipasen (GX SXG, G steht für Glycin, S für Serin, und X ist eine beliebige Aminosäure), durch eine Neomycin Expressionskassette (65). ATGL(-/-)- Mäuse zeigen eine Lipidspeicherung in nahezu allen Geweben des Körpers, die über das physiologische Maß hinausgeht. Dabei ist das Ausmaß des Fettzuwachses je nach Organ bzw. Gewebe unterschiedlich. Verglichen mit den ATGL- Wildtyp- Mäusen zeigen die ATGL(-/-)- Mäuse einen zweifachen Anstieg der Gesamtkörperfettmasse. Zudem findet sich bei den ATGL(-/-)- Mäusen eine drastische Reduktion der Isoproterenol ( $\beta$ - adrenerger Agonist)- stimulierten Lipolyse (65).

## **3 Methoden**

### **3.1 Immunisierung der Ratten mit Kollagen Typ II**

Die Immunisierung der Ratten wurde von Christine Wolff durchgeführt. Um bei den DA- Ratten eine experimentelle Arthritis hervorzurufen, wurden sie mit einer 1:1 Mischung aus 300 µg bovinem CII und IFA immunisiert. 0,3 ml dieser Emulsion wurden intradermal ca. 1 cm unterhalb der Schwanzbasis injiziert. Den Kontrolltieren wurde 0,9% NaCl verabreicht.

Jede Extremität (Vorder- und Hinterpfoten) wurde mit Hilfe eines Arthritisscores bewertet. Für jede entzündete Region (Zehen, Mittelfuß und Knöchel) wurde ein Punkt vergeben. Ein zusätzlicher Punkt wurde für das Hinken einer Extremität vergeben. So konnte pro Tier eine maximale Punktzahl von  $4 \times 4 = 16$  Punkten vergeben werden.

### **3.2 Blut- und Organentnahmen**

#### **3.2.1 Ratten**

Die Blut- und Organentnahmen bei den Ratten wurden in Zusammenarbeit mit Christine Wolff durchgeführt. Die DA- Ratten wurden durch Dekapitierung getötet und anschließend wurde ihnen Rumpfblood entnommen. Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen gesammelt, die außerdem 10 µl Trasylol enthielten, das die Enzymaktivität hemmt. Bis zur Zentrifugation (10 min, 3000 U/min, 4°C) wurde das Blut auf Eis aufbewahrt. Nach der Zentrifugation wurde das Plasma abpipettiert und bei -80°C gelagert. Die Nebennieren wurden sehr vorsichtig ausgebaut, umgebendes Fett wurde entfernt und die rechte und linke Nebenniere einzeln gewogen.

### **3.2.2 Mäuse**

Die Blut- und Organentnahmen bei den Mäusen wurden von Christine Wolff durchgeführt. Die ATGL- KO- und die C57BL/6J- Wildtyp- Mäuse wurden durch CO<sub>2</sub>-Begasung getötet. Im Anschluss daran wurden ihnen die Nebennieren für weitere Untersuchungen entnommen.

### **3.3 Vorbereitungen der Nebennieren für die Elektronenmikroskopie**

Die Ratten wurden wie unter 3.2.1 beschrieben an verschiedenen Tagen nach der Immunisierung (0, 1, 5, 14, 28, 41, 55) getötet, wobei ihnen anschließend die Nebennieren entnommen wurden. Auch eine ATGL- KO- Maus und eine ATGL- Wildtyp- Maus wurde wie unter 3.2.2 beschrieben getötet, im Anschluss wurden ihnen die Nebennieren entnommen. Die Organe wurden nach der Entnahme für mindestens einen Tag mit Karnofskifixativ fixiert. Das Karnofskifixativ wurde freundlicherweise vom Institut für Pathologie zur Verfügung gestellt. Die weiteren Vorbereitungen der Nebennieren für die Elektronenmikroskopie wurden von Heiko Siegmund (Institut für Pathologie Regensburg) durchgeführt. Die Nebennieren wurden geviertelt und dann mit Osmiumtetroxid (OsO<sub>4</sub>) postfixiert. Anschließend wurden die Organe mit Hilfe einer abgestuften Ethanolreihe dehydriert und mit Epoxid- Kunstharz (Epon) in einem automatisierten Gewebeprozessor infiltriert. Im nächsten Schritt wurden die Proben zwei Tage lang bei 60°C polymerisiert. Aus den Eponblöcken wurden doppelt gefärbte (mit Toluidinblau und basischem Fuchsin) Anschnitte (0,8 µm) hergestellt. Diese Anschnitte wurden mit dem Lichtmikroskop auf die relevanten Strukturen (*Zona fasciculata*) hin untersucht. Die nicht relevanten Strukturen wurden mit einer Rasierklinge entfernt, während vom restlichen Eponblock Ultradünnschnitte angefertigt wurden (80 nm). Diese Ultradünnschnitte wurden mit wässrigem Uranylacetat und Bleizitrat doppelt kontrastiert und schließlich mit dem energiegefilterten Transmissionselektronenmikroskop LEO912AB untersucht. Zu jedem Tötungszeitpunkt (Tag 1, 5, 14, 28, 40, 55), abgesehen vom Tag 0, wurden EM- Bilder zweier immunisierter Tiere und zweier Kontrolltiere angefertigt. Am Tag 0 wurden Bilder zweier Kontrolltiere angefertigt. Pro Tier wurden 48 Bilder in einer 3150- fachen Vergrößerung aufgenommen, so dass pro Zeitpunkt und Gruppe 96 Bilder entstanden.

Von der *Zona fasciculata* der Nebenniere je einer ATGL- KO- und einer ATGL-Wildtyp- Maus wurden 48 Bilder (Vergrößerung 3150- fach) angefertigt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden lediglich Bilder der linken Nebenniere angefertigt, nachdem getestet worden war, dass kein Unterschied zwischen der rechten und linken Nebenniere bestand.

### **3.4 Stimulation primärer Nebennierenzellen von DA- Ratten mit ACTH oder Isoproterenol**

Die Stimulation der Nebennierenzellen wurde in Zusammenarbeit mit Christine Wolff durchgeführt. Zwanzig DA- Ratten wurden durch Dekapitierung getötet, ihnen wurden beide Nebennieren entfernt und in kleine Stücke geschnitten, anschließend wurden die Nebennierenzellen folgendermaßen isoliert: Die Nebennierenstücke wurden für 60 min bei 37°C auf einem Schüttler in einer Verdauungslösung (HBSS, 2,6 mg/ml Kollagenase I, 3 mg/ml BSA, 0,15 mg/ml DNase, 0,15 mg/ml Hyaluronidase) inkubiert. Alle Überstände wurden abpipettiert und die Zellsuspension wurde durch einen 70 µm *cell strainer* gegeben, zentrifugiert (4°C, 10 min bei 1000 U/min) und zweimal mit HBSS (10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) gewaschen. Die Nebennierenzellen wurden auf eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$ /ml in DMEM (10% FCS and 1% Penicillin/ Streptomycin) justiert. Danach wurden die Zellen bei 37° C (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) entweder für 2 h mit oder ohne ACTH ( $10^{-10}$  M) oder für 13 h mit oder ohne Isoproterenol ( $10^{-6}$  M) inkubiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets für einen Tag in Karnofskifixativ fixiert. Die Zellpellets wurden mit Osmiumtetroxid postfixiert, mit Hilfe einer abgestuften Ethanolreihe dehydriert und mit Epon in einem automatisierten Gewebeprozessor infiltriert. Danach wurden die Proben für zwei Tage bei 60°C polymerisiert. Aus den Eponblöcken wurden ultradünne Anschnitte angefertigt (80 nm). Diese ultradünnen Anschnitte der verschiedenen Zellpellets wurden mit wässrigem Uranylacetat und Bleizitrat doppelt kontrastiert und schließlich mit dem energiegefilterten Transmissionselektronenmikroskop LEO912AB untersucht. Für jede Gruppe (Isoproterenol, ACTH und Kontrolle) wurden 48 EM- Bilder (Vergrößerung: 3150- fach) angefertigt.

### **3.5 Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder**

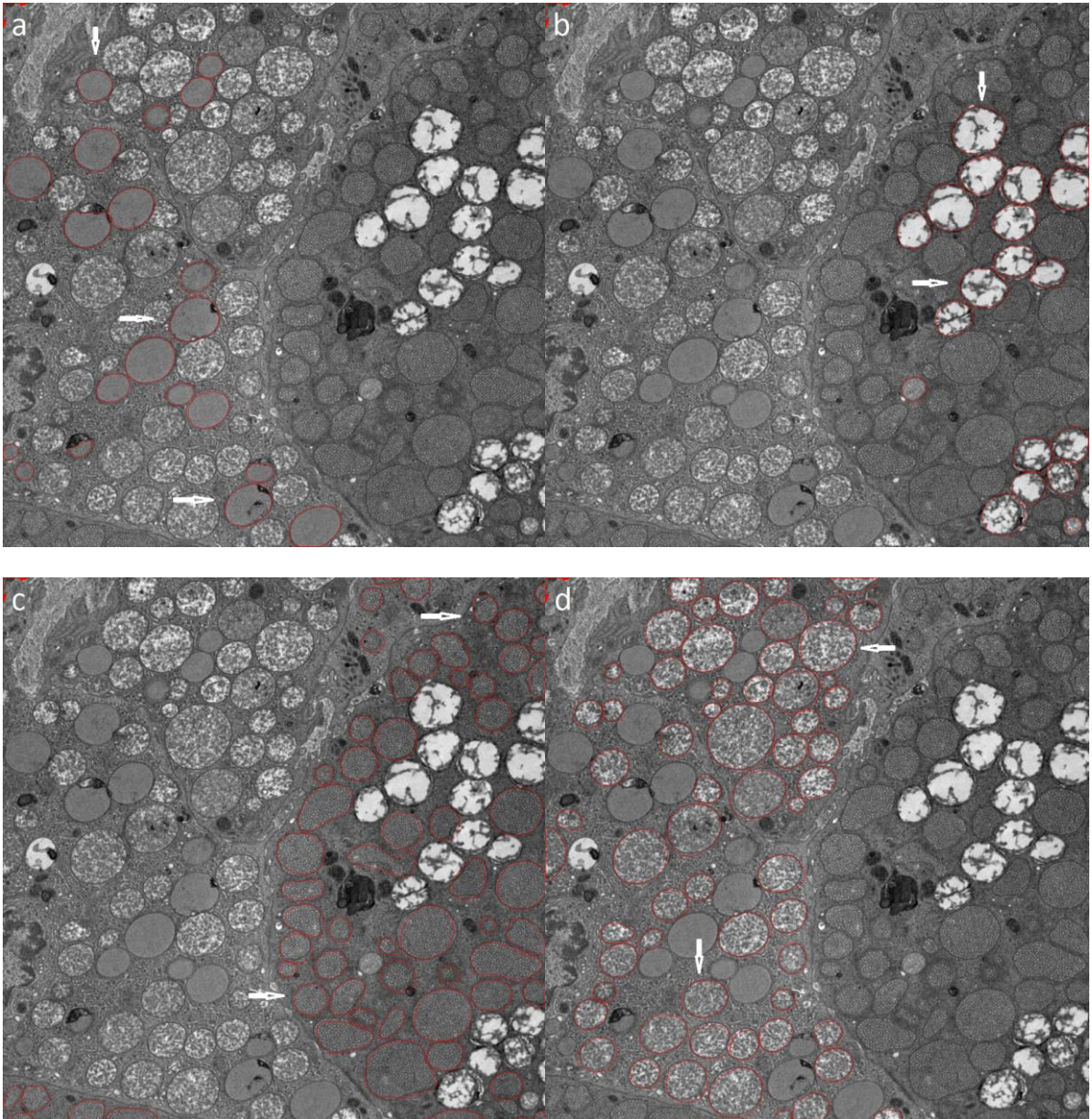
Zur Auswertung der von der Pathologie erstellten EM- Bilder wurde die Software ITEM verwendet (Olympus, Münster).

#### **3.5.1 Adrenokortikale Lipidtropfen und Mitochondrien**

Da es nahezu unmöglich ist, mit einem EM- Bild immer exakt eine Zelle abzubilden, erfolgte die Auswertung der Lipidtropfen und Mitochondrien nicht pro Zelle, sondern je intakter Zellfläche eines Bildes. Dafür wurde auf jedem Bild die intakte Zellfläche markiert und durch das Programm die Fläche berechnet. Anschließend wurden in dieser intakten Fläche erst die Lipidtropfen und dann die Mitochondrien umrahmt und deren Anzahl und Fläche bezogen auf die intakte Gesamtfläche berechnet. Die Zahl bzw. Fläche der Lipidtropfen und der Mitochondrien wurden am Ende einheitlich je  $\mu\text{m}^2$  dargestellt.

Bei der Auswertung fielen zwei verschiedene Formen der Lipidtropfen auf: a) einheitlich graue Lipidtropfen (Abb. 3.1a) und b) Lipidtropfen mit verschiedenen großen Aufhellungen (Abb. 3.1b). Dementsprechend wurden diese Lipidtropfen als homogen oder inhomogen bezeichnet und jede Unterform für sich ausgewertet (Abb. 3.1a und b).

Auch bei der Auswertung der Mitochondrien fielen morphologisch verschiedene Typen auf. Es fanden sich dunkle Mitochondrien mit vielen regelmäßigen Cristae (Abb. 3.1c) und helle, geschwollen wirkende Mitochondrien mit unregelmäßigen Cristae (Abb. 3.1d). Im Folgenden wurden die dunklen Mitochondrien als intakt und die hellen Mitochondrien als nicht intakt bezeichnet sowie beide Mitochondrientypen für sich ausgewertet.



**Abbildung 3.1 a, b, c und d:** Einrahmung der (a) homogenen und (b) inhomogenen Lipidtropfen und der (c) intakten und (d) nicht- intakten Mitochondrien in der intakten Zellfläche, *Zona fasciculata* einer DA- Ratte in 3150facher Vergrößerung.

### 3.5.2 Lipidtropfen im Zellpellet

Die Auswertung der Lipidtropfen im Zellpellet erfolgte auf die gleiche Art und Weise wie die Auswertung im Nebennierengewebe. Die Anzahl der Lipidtropfen wurde einheitlich je  $\mu\text{m}^2$  dargestellt.



### **3.6 Messung der mitochondrialen Aktivität adrenokortikaler Zellen**

Die Messung der mitochondrialen Aktivität adrenokortikaler Zellen wurde in Zusammenarbeit mit Christine Wolff durchgeführt. Insgesamt wurden 23 Kontrolltiere und 22 immunisierte Tiere (Tag 1) verwendet. Die DA- Ratten wurden wie unter 3.2.1 beschrieben getötet, die Nebennieren entnommen und gewogen. Das Kortikosteron im Plasma wurde bei allen Tieren bestimmt (3.6.1). Die aus den linken Nebennieren isolierten Zellen wurden zur Messung des Sauerstoffverbrauches verwendet. Die aus den rechten Nebennieren isolierten Zellen wurden zur weiteren Isolierung der Mitochondrien und anschließenden Messung der mitochondrialen COX- Aktivität genutzt. Aus zeitlichen Gründen wurde hier nur der Tag 1 nach Immunisierung untersucht.

#### **3.6.1 Kortikosteronbestimmung im Plasma**

Für die Kortikosteronbestimmung wurde ein Kortikosteron- ELISA der Firma demeditec (Referenznummer DEV9922) verwendet. Dieser ELISA basiert auf dem Prinzip des Wettbewerbs um freie Bindungsstellen. Eine unbekannte Menge von Kortikosteron in der Probe und eine bekannte Menge von Kortikosteron, die an Meerrettichperoxidase gebunden ist, konkurrieren um Bindungsstellen an den *Wells* der Platte, die mit Kortikosteron- Antiserum bedeckt sind. Nach dem Waschen und Hinzugeben von *Substrate Solution* ist die Kortikosteron- Konzentration dann umgekehrt proportional zur gemessenen optischen Dichte. Der ELISA wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### **3.6.2 Messung des Sauerstoffverbrauches von Nebennierenzellen in Primärkultur**

Die Messung des Sauerstoffverbrauches von Nebennierenzellen wurde in Zusammenarbeit mit Christine Wolff durchgeführt. Für dieses Experiment wurden die linken Nebennieren von 23 Kontrolltieren und 22 immunisierten Tieren (Tag 1) verwendet. Die Nebennieren wurden wie unter 3.2.1 beschrieben entnommen und die Nebennierenzellen wie unter 3.4 beschrieben isoliert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und  $2,5 \times 10^6$  Zellen in ein *Well* einer 24- *Well*- Platte für die Sauerstoffverbrauchsmessung gefüllt. Das letzte *Well* diente als Kontrolle und wurde

nur mit Medium befüllt. Die Platte wurde in den Brutschrank in das vorgesehene Gehäuse eingesetzt, gemessen wurde der Sauerstoffverbrauch mit dem *Sensor dish reader* der Firma PreSens. Das Gerät misst den vierten Schritt der Atmungskette, im Verlauf dessen Sauerstoff zu Wasser wird. Unter der Platte befindet sich ein Sensor, der noninvasiv einen lumineszenten Farbstoff detektiert, welcher proportional zum gelösten Sauerstoff im Medium ist.

### **3.6.3 Messung der Cytochrom- c- Oxidase-Aktivität**

Die Messung der Cytochrom- c- Oxidase- Aktivität wurde in Zusammenarbeit mit Christine Wolff durchgeführt. Für dieses Experiment wurden die rechten Nebennieren von 23 Kontrolltieren und 22 immunisierten Tieren (Tag 1) verwendet. Die Nebennieren wurden wie unter 3.2.1 beschrieben entnommen und die Nebennierenzellen wie unter 3.4 beschrieben isoliert.

Für die Isolierung der Mitochondrien wurde ein Kit der Firma amsbio verwendet. Zum Sammeln der Nebennierenzellen wurden diese bei 600 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Danach wurden sie mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen und noch einmal bei 600 g und 4°C für 5 min zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde nun in 1 ml *Mitochondria Isolation Buffer* gelöst und im vorgekühlten Zerkleinerer auf Eis gegeben und zerkleinert. Das Homogenat wurde in einen 2 ml Eppendorf Cup gegeben und bei 600 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und bei 12.000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 50 µl *Mitochondria Storage Buffer* gelöst und bis zur darauffolgenden Messung der COX- Aktivität auf Eis gelagert.

Auch für die Messung der COX- Aktivität wurde ein Kit der Firma amsbio verwendet. Wie bereits beschrieben ist die COX ein Enzym, das spezifisch für die Atmungskette innerhalb der Mitochondrien ist. Die Aktivität dieses Enzyms gibt somit Auskunft über die mitochondriale Aktivität. Durch die COX wird das reduzierte Cytochrom c oxidiert. Das reduzierte Cytochrom c hat (im Gegensatz zum oxidierten Cytochrom c) sein Absorptionsmaximum bei 550 nm. Je weniger Absorption nun bei 550 nm gemessen wird, desto aktiver ist die COX, da durch sie das reduzierte Cytochrom c abnimmt. Dieser Test basiert folglich auf einer Abnahme der Absorption bei 550 nm über einen gewissen Zeitraum. Alle Messungen und Berechnungen wurden exakt nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

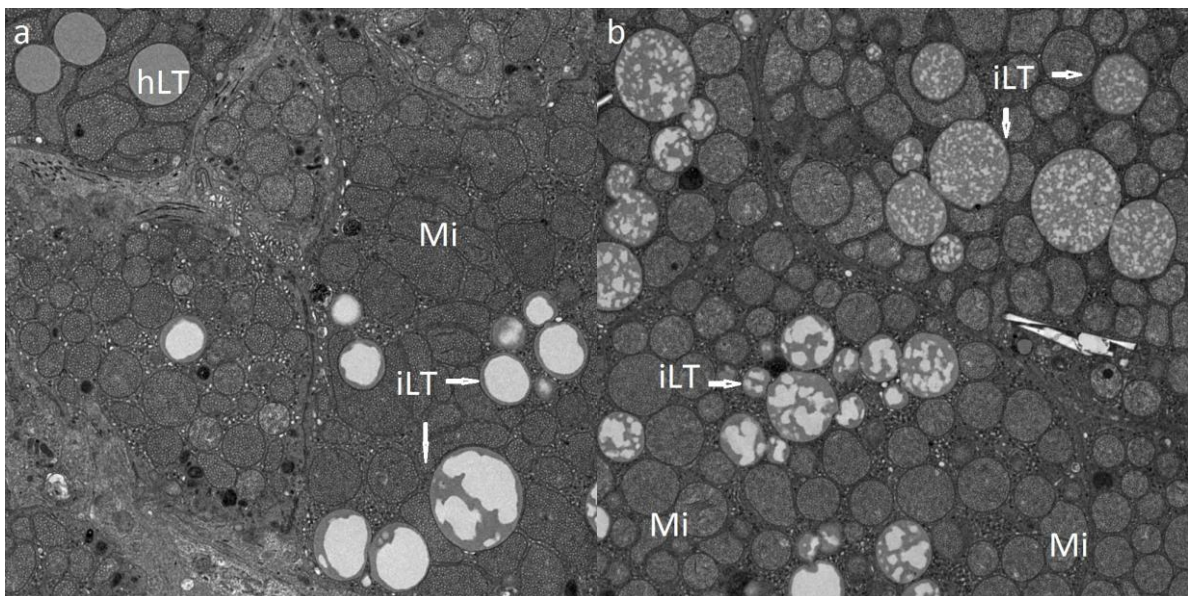
### 3.7 Statistik

Für die statistische Analyse und zum Erstellen der Graphen wurden die Programme Excel 2010 und Sigma Plot 12.5 verwendet. Zum Vergleich von je zwei Gruppen (Gruppen- Medianwerte) wurde der nichtparametrische Mann- Whitney- U- Test (MWU- Test) verwendet. Korrelationen wurden mit der Spearman Rangkorrelationsanalyse berechnet. Die Daten wurden entweder als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM), als *Box- Plots* mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile oder als *Vertical Bar Charts* mit *Simple Error Bars* dargestellt. Das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0.05$ .

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ultrastrukturelle Morphologie adrenokortikaler Lipidtropfen bei DA- Ratten

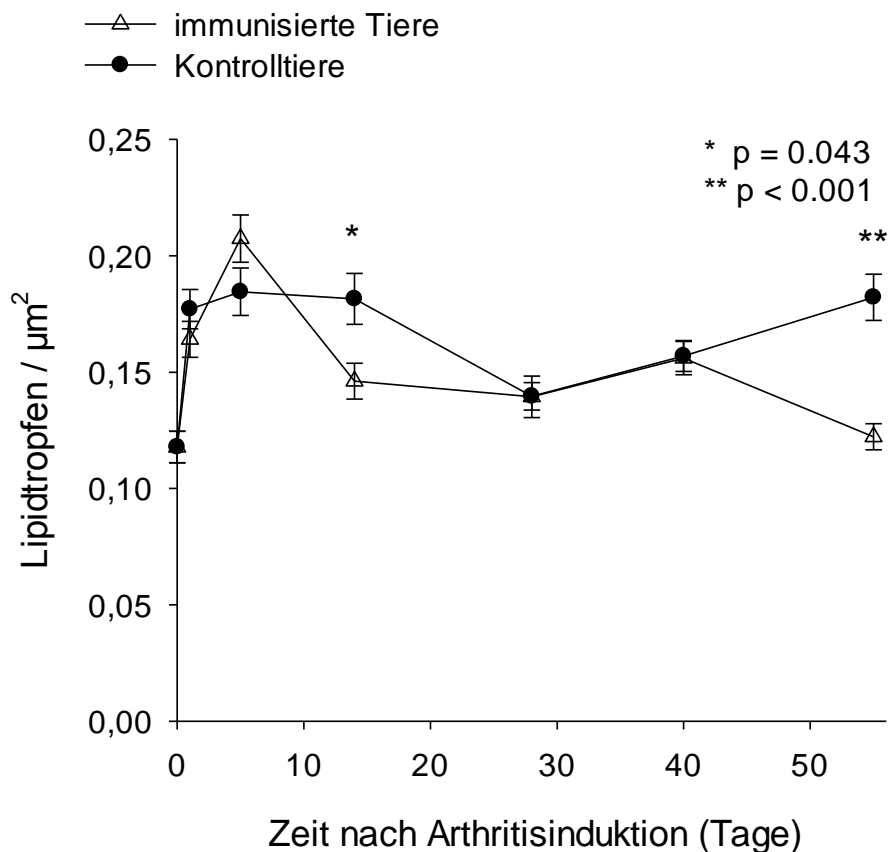
Die Lipidtropfen in der *Zona fasciculata* der Nebenniere fungieren als Cholesterinspeicher und Cholesterin ist der Ausgangsstoff für die Steroidogenese. Da ein Problem der Lipidspeicherung bei der experimentellen Arthritis vermutet wird, wurden Anzahl und Fläche der Lipidtropfen im Verlauf der Arthritis untersucht. Dabei fiel auf, dass die Lipidtropfen in der *Zona fasciculata* keine einheitliche Morphologie besitzen, sondern dass sie sich in zwei verschiedene Typen unterteilen lassen. Es existiert eine Art von Tropfen, welche im EM- Bild homogen grau erscheint (Abb. 4.1a) und eine andere Art mit weißen Aufhellungen (Abb. 4.1a und b). Die einheitlich grauen Lipidtropfen werden im Weiteren als homogene Lipidtropfen, diejenigen mit den weißen Aufhellungen als inhomogene Lipidtropfen bezeichnet. Die weißen Aufhellungen innerhalb der inhomogenen Lipidtropfen waren von unterschiedlicher Anzahl und Größe (Abb. 4.1a und b). Ließ ein Lipidtropfen eine noch so kleine Aufhellung erkennen, wurde er als inhomogen klassifiziert.



**Abb. 4.1:** Zellen der *Zona fasciculata* einer DA-Ratte in 3150-facher Vergrößerung mit homogenen (a) und inhomogenen (a und b) Lipidtropfen. (hLT = homogene Lipidtropfen; iLT = inhomogene Lipidtropfen; Mi= Mitochondrien).

### 4.1.1 Veränderungen adrenokortikaler Lipidtropfen im Verlauf der Arthritis

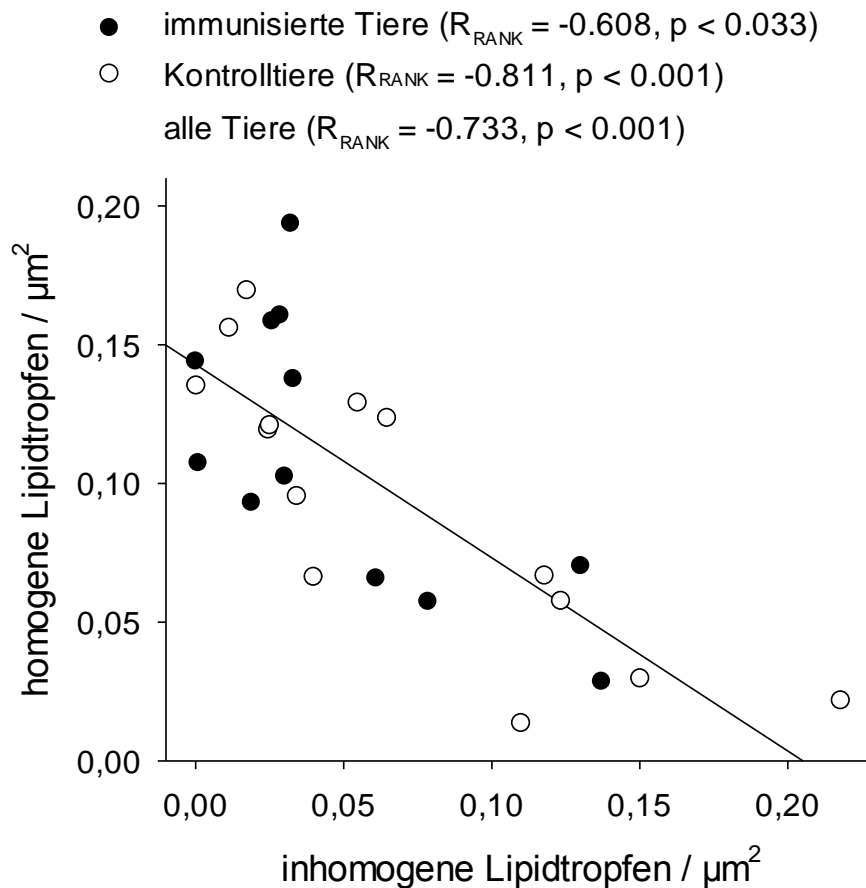
Zu jedem Tötungszeitpunkt (Tag 1, 5, 14, 28, 40, 55), abgesehen vom Tag 0, wurden die EM- Bilder zweier immunisierter und zweier Kontrolltiere ausgewertet. Am Tag 0 wurden Bilder zweier Kontrolltiere ausgewertet. Da pro Tier 48 Bilder vorliegen, ergeben sich pro Zeitpunkt und Gruppe 96 Bilder. Betrachtet man die Anzahl aller Lipidtropfen (homogene und inhomogene) im Verlauf der Arthritis, zeigen sich am Tag 14 und 55 signifikante Unterschiede. Zu beiden Zeitpunkten weisen die Kontrolltiere eine größere Anzahl an Lipidtropfen auf als die immunisierten Tiere (Abb. 4.2).



**Abbildung 4.2:** Anzahl aller Lipidtropfen in der *Zona fasciculata* im Verlauf der Arthritis. Im Vergleich zu den immunisierten Tieren war die Zahl der Lipidtropfen an den Tagen 14 und 55 bei den Kontrolltieren signifikant höher. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 96 Bildern je Zeitpunkt und Gruppe (MWU- Test).

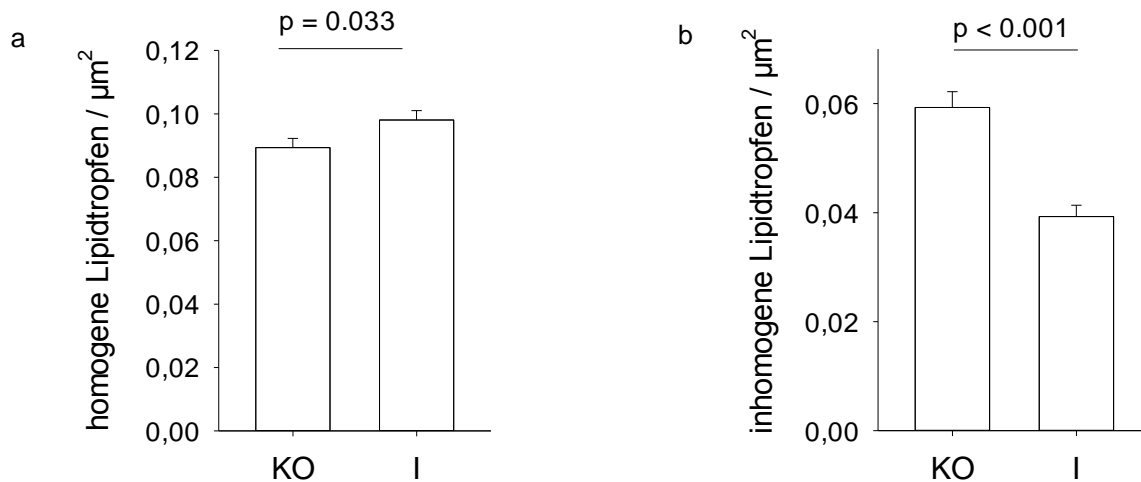


zeigen eine negative Korrelation zwischen den homogenen und inhomogenen Lipidtropfen (Abb. 4.4).



**Abb. 4.4:** Negative Korrelation der homogenen und inhomogenen Lipidtropfen sowohl bei immunisierten Tieren ( $n=12$ ) als auch bei Kontrolltieren ( $n=14$ ). Die Regressionslinie aller Tiere und die Spearman Korrelationskoeffizienten aller Tiere, der immunisierten Tiere und der Kontrolltiere sind dargestellt.

Betrachtet man nun die Gesamtzahl der homogenen bzw. der inhomogenen Lipidtropfen bei Kontrolltieren und immunisierten Tieren, verfügen die Kontrolltiere über signifikant mehr inhomogene Lipidtropfen (Abb. 4.5a) und über signifikant weniger homogene Lipidtropfen (Abb. 4.5b) als die immunisierten Tiere.



**Abb. 4.5:** (a) homogene und (b) inhomogene Lipidtropfen bei Kontrolltieren und immunisierten Tieren. Die Kontrolltiere (KO) verfügen über signifikant mehr inhomogene Lipidtropfen (b) und über signifikant weniger homogene Lipidtropfen (a) als die immunisierten Tiere (I). Werte sind dargestellt als *Vertical Bar Charts* mit *Simple Error Bars* (Mittelwerte  $\pm$  SEM).

Somit lässt sich feststellen, dass eine negative Korrelation zwischen den homogenen und inhomogenen Lipidtropfen adrenokortikaler Zellen besteht. Außerdem verfügen die Kontrolltiere über mehr inhomogene, aber weniger homogene Lipidtropfen als die immunisierten Tiere.

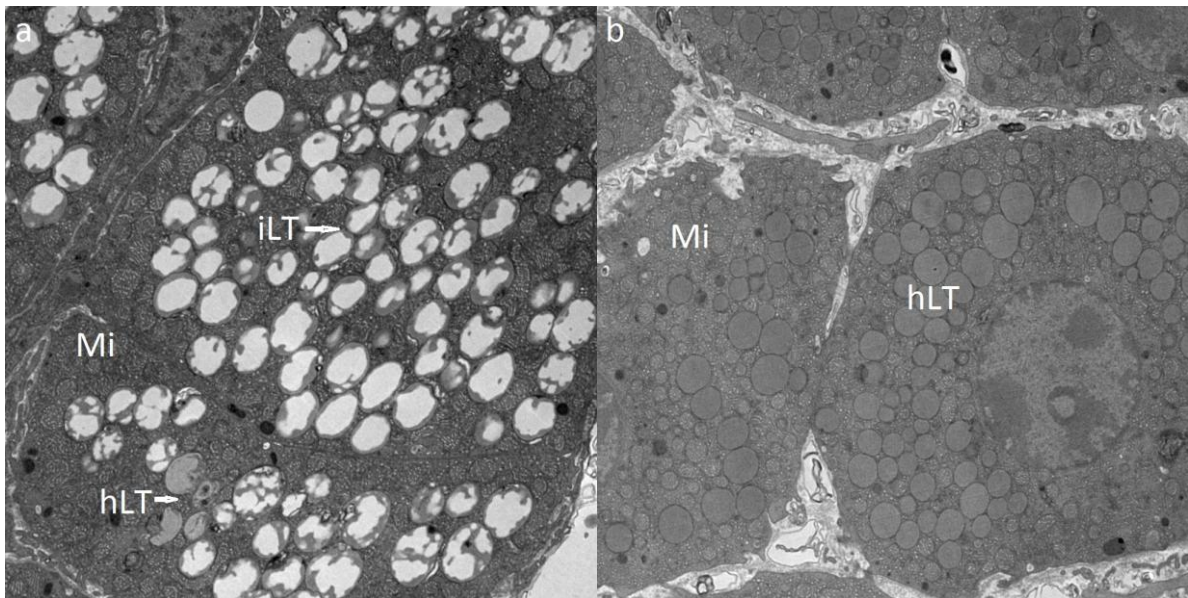
Damit stellt sich die Frage, was das homogene bzw. inhomogene Aussehen der Lipidtropfen im Einzelnen bedeutet. Diese Frage soll im anschließenden Kapitel beantwortet werden.

## 4.2 Ultrastrukturelle Morphologie adrenokortikaler Lipidtropfen bei ATGL- KO- und Wildtyp-Mäusen

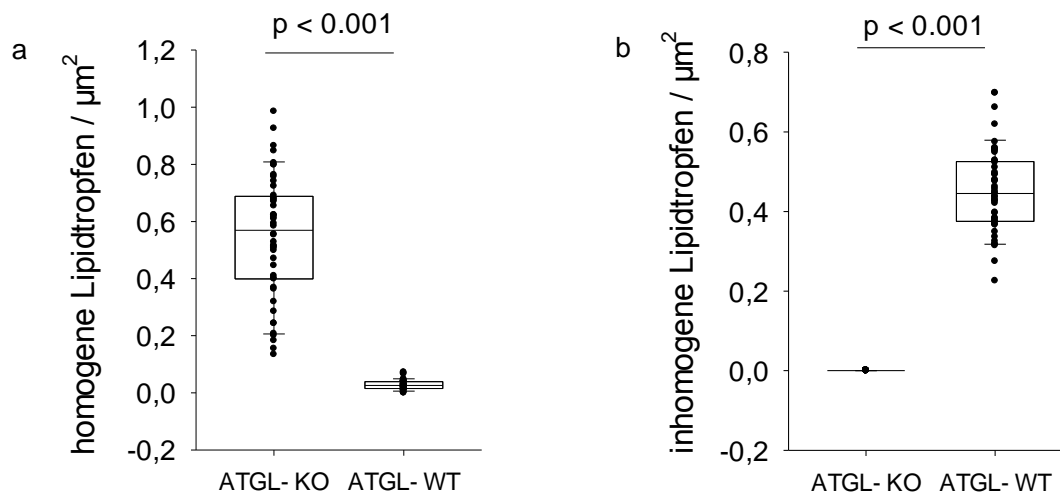
Um die beiden vorhandenen Typen der Lipidtropfen näher zu charakterisieren, wurden ATGL- KO- Mäuse verwendet. Bei diesen Mäusen ist das Enzym ATGL blockiert, das neben der HSL das wichtigste lipolytische Enzym im Körper und somit auch in der Nebenniere ist (siehe Kapitel 1.5.1). Die fehlende Aktivität dieses Enzyms führt zur massiven Reduktion der Lipolyse im Körper. Schon im histologischen Schnitt weist die ATGL- KO- Maus im Gegensatz zum C57BL/6J-Wildtyp eine massive Einlagerung von Lipidtropfen auf.



Um der Frage nachzugehen, welche Bedeutung die homogenen und die inhomogenen Lipidtropfen haben, wurden von der *Zona fasciculata* einer ATGL-Wildtyp- Maus und einer ATGL- KO- Maus je 48 EM- Bilder angefertigt. Auf diesen Bildern wurde untersucht, welcher Typ der Lipidtropfen bei welchem Maustyp vorliegt. Schon beim ersten Betrachten der EM- Bilder fiel auf, dass die ATGL- KO- Maus nur homogene Lipidtropfen besitzt (Abb. 4.6b), während bei der C57BL/6J- Wildtyp- Maus beide Formen der Lipidtropfen vorliegen (Abb. 4.6a). Dies wurde auch bei genauer Auszählung der adrenokortikalen homogenen und inhomogenen Lipidtropfen bei beiden Mausgruppen bestätigt (Abb. 4.7).



**Abb. 4.6:** Repräsentative EM- Bilder der Zona fasciculata einer C57BL/6J- Wildtyp- Maus (a) und einer ATGL- KO- Maus (b) in 3150-facher Vergrößerung. Zu erkennen sind homogene und inhomogene Lipidtropfen bei der Wildtyp-Maus (a) und zahlreiche homogene Lipidtropfen bei der ATGL-KO-Maus (b). (iLT = inhomogene Lipidtropfen, hLT = homogene Lipidtropfen, Mi = Mitochondrien).



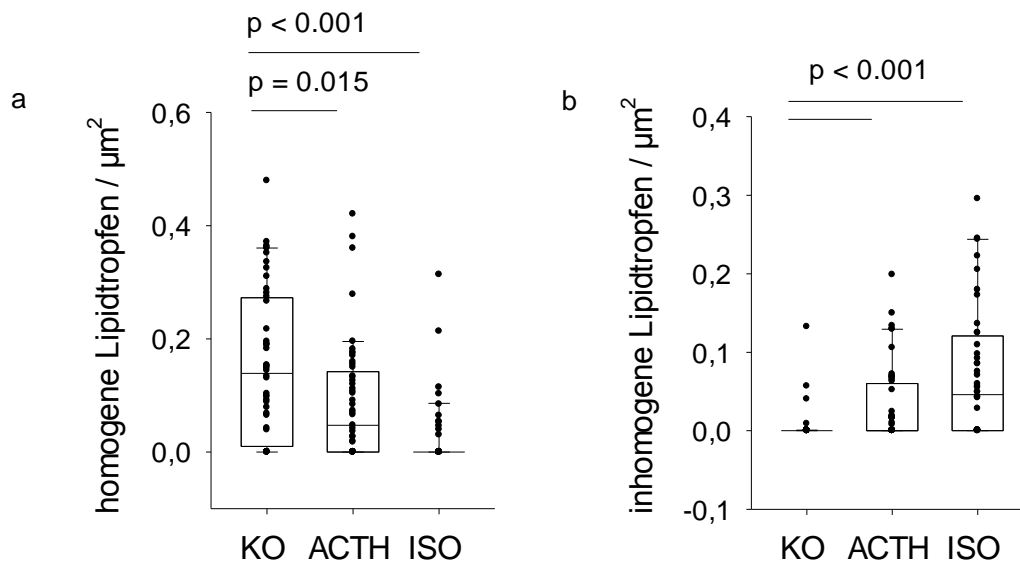
**Abb. 4.7:** Anzahl der (a) homogenen und (b) inhomogenen Lipidtropfen bei der ATGL- KO- Maus und der Wildtyp- Maus. Die ATGL- KO- Maus verfügt über keinerlei inhomogene Lipidtropfen. Insgesamt wurden je 48 Bilder ausgewertet, Box- Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile, (MWU- Test).

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die homogenen Lipidtropfen eine Art Speicherform sind und die inhomogenen Lipidtropfen eine aktive Form darstellen, in der Cholesterin- Abbau stattfindet.

#### 4.3 Veränderungen der Lipidtropfen in primären Nebennierenzellen von DA- Ratten nach ACTH- oder Isoproterenol-Stimulation

Zur weiteren Charakterisierung der Lipidtropfen in der *Zona fasciculata* wurden Zellen aus den Nebennieren von 20 DA- Ratten isoliert und entweder gar nicht (unstimulierte Kontrolle) oder für zwei Stunden mit ACTH ( $10^{-10}$  M), und für 13 Stunden mit Isoproterenol ( $10^{-6}$  M), einem  $\beta$  - adrenergen Agonisten, stimuliert. In der Pathologie wurden daraufhin mit dem EM 48 Bilder der Zellpellets jeder Gruppe angefertigt, die dann auf das Vorkommen von homogenen und inhomogenen Lipidtropfen hin ausgewertet wurden. Die verwendeten Hormone ACTH und Isoproterenol regen die Nebenniere zur Lipolyse und zur Ausschüttung von Glukokortikoiden an. Geht man von der Annahme aus, dass die inhomogenen Lipidtropfen jene sind, die gerade abgebaut werden, so müssten diese durch die

Stimulation mit ACTH oder Isoproterenol zahlenmäßig zunehmen. Tatsächlich nahm die Anzahl inhomogener Lipidtropfen in den adrenokortikalen Zellen sowohl durch die zweistündige ACTH- Stimulation, als auch durch die dreizehnstündige Stimulation mit Isoproterenol signifikant zu (Abb. 4.8b). Die Anzahl homogener Lipidtropfen dagegen nahm durch die Stimulation mit Isoproterenol oder ACTH im Vergleich zu den Kontrollen signifikant ab (Abb. 4.8a).



**Abb. 4.8:** Der Einfluss von ACTH und Isoproterenol auf die Anzahl der (a) homogenen und (b) inhomogenen Lipidtropfen in adrenokortikalen Zellen von DA- Ratten. Die Zellen wurden entweder nicht (KO = Kontrolle) oder mit ACTH ( $10^{-10}$  M) oder Isoproterenol (ISO,  $10^{-6}$  M) stimuliert. Durch die Stimulation nahmen die inhomogenen Lipidtropfen zahlenmäßig zu und die homogenen ab. 48 Bilder pro Gruppe, Box- Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile, (MWU- Test).

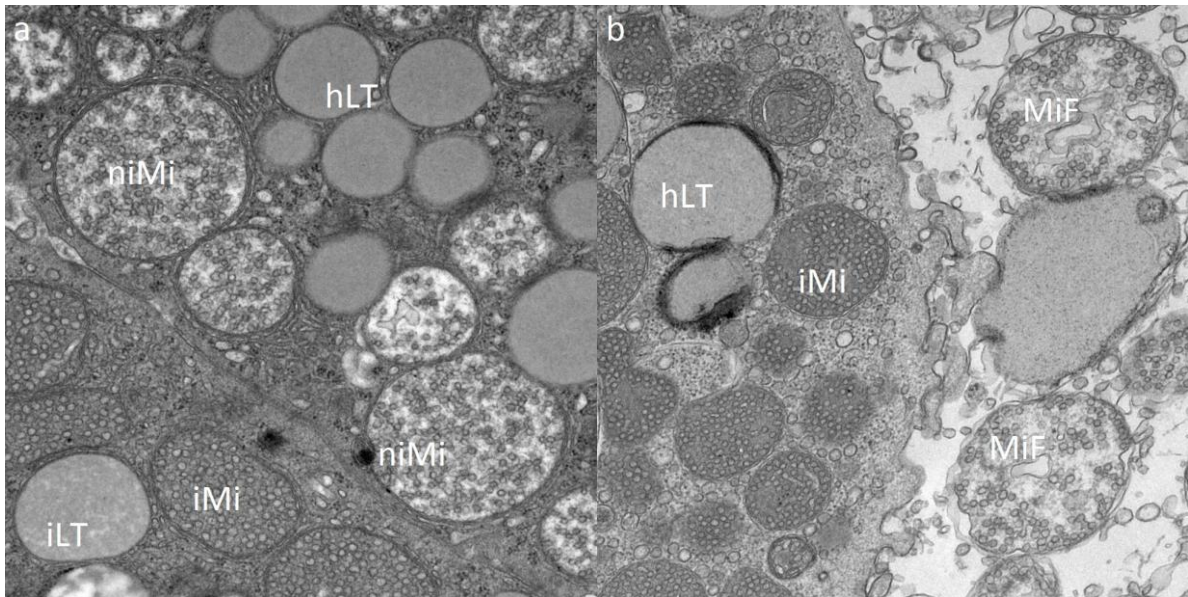
Somit lässt sich feststellen, dass die homogenen Lipidtropfen tatsächlich die Speicherform darstellen, während die inhomogenen Lipidtropfen die sind, die gerade abgebaut werden. Dazu passt auch die negative Korrelation der beiden Typen von Lipidtropfen (Abb. 4.4). In den adrenokortikalen Zellen der Kontrolltiere findet man mehr Lipidtropfen, die gerade abgebaut werden als in den adrenokortikalen Zellen der immunisierten Tiere. Die *Fasciculata*-Zellen der immunisierten Tiere haben mehr Speicherlipide als die Nebennierenzellen der Kontrolltiere.

#### **4.4 Ultrastrukturelle Morphologie adrenokortikaler Mitochondrien bei DA- Ratten**

Die Mitochondrien sind die Kraftwerke jeder Zelle. In den *Fasciculata*- Zellen der Nebenniere finden sich in diesen Organellen zudem wichtige Enzyme der Glukokortikoidsynthese. Auch die Mitochondrien wurden in der vorliegenden Arbeit einer morphologischen Untersuchung unterzogen. Anhand der EM- Bilder wurde ausgewertet, ob sich die Morphologie und die Anzahl der Mitochondrien im Laufe der Arthritis verändern.

Die Ergebnisse zeigen, dass in den Zellen der *Zona fasciculata* zwei verschiedene Mitochondrien- Typen vorhanden waren. Zum einen findet man dunkle Mitochondrien mit klar zu erkennenden Cristae, die im Folgenden als intakte Mitochondrien bezeichnet werden (Abb. 4.9a). Daneben findet man aufgehellte Mitochondrien, die hydroptisch geschwollen wirken und weniger bzw. verschwommene Cristae aufweisen (Abb. 4.9a). Letztere werden im Folgenden als nicht- intakte Mitochondrien bezeichnet, da sich in diesen Mitochondrien Wassereinlagerungen befinden, die durch eine durchlässige Mitochondrienmembran entstanden sind. Betrachtet man untergegangene Zellen mit Mitochondrienfragmenten, zeigen diese eine ähnliche Morphologie wie die nicht- intakten Mitochondrien (Abb. 4.9b).

Die nicht- intakten Mitochondrien ähneln in der 3150- fachen Vergrößerung morphologisch den inhomogenen Lipidtropfen. Den Unterschied erkennt man jedoch in der 10000- fachen Vergrößerung eindeutig daran, dass die Mitochondrien Cristae besitzen, die den Lipidtropfen fehlen (Abb.4.9a).

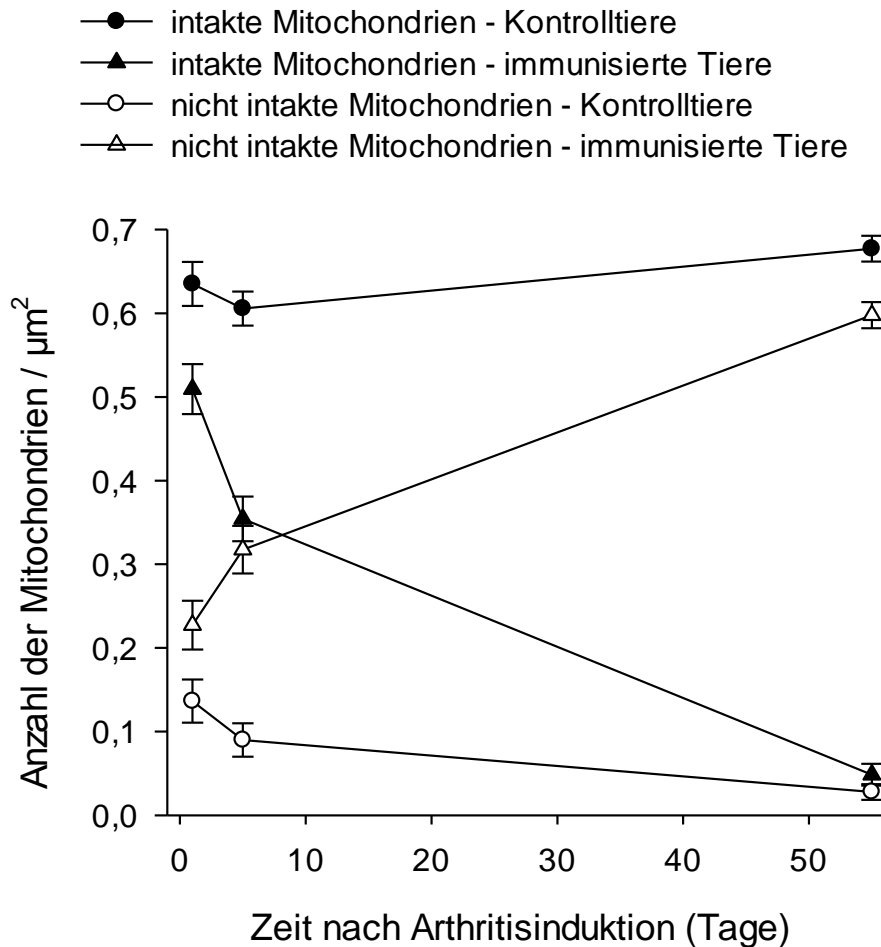


**Abb. 4.9:** (a) *Zona fasciculata* einer DA- Ratte in 10000- facher Vergrößerung. Im Gegensatz zu den inhomogenen Lipidtropfen besitzen die nicht- intakten Mitochondrien deutlich erkennbare Cristae. (b) Einzelne Nebennierenzelle einer DA- Ratte (links) und Zellfragmente einer untergegangenen Zelle (rechts), 10000- fache Vergrößerung. Innerhalb der intakten Zelle findet man Lipidtropfen und intakte Mitochondrien. Daneben erkennt man Rückstände einer untergegangenen Zelle, wie Mitochondrienfragmente, die den nicht- intakten Mitochondrien in der Nebennierenrinde ähneln. (hLT = homogene Lipidtropfen; iLT = inhomogene Lipidtropfen; iMi = intakte Mitochondrien; niMi = nicht- intakte Mitochondrien; MiF = mitochondriale Fragmente)

#### 4.4.1 Veränderungen adrenokortikaler Mitochondrien im Verlauf der Arthritis

Die Anzahl intakter und nicht- intakter Mitochondrien in den *Fasciculata*- Zellen der Nebennieren wurde an den Tagen 0, 1, 5, 14, 28, 40 und 55 ausgewertet. Zu jedem Tötungszeitpunkt, abgesehen vom Tag 0, wurden die EM- Bilder zweier immunisierter und zweier Kontrolltiere ausgewertet. Da pro Tier 48 Bilder vorlagen, ergaben sich pro Zeitpunkt und Gruppe 96 Bilder.

Die Anzahl intakter Mitochondrien in den adrenokortikalen Zellen der Kontrolltiere war an den Tagen 1, 5 und 55 signifikant höher im Vergleich zu den immunisierten Tieren (Abb. 4.10). Im Gegensatz dazu war die Anzahl nicht- intakter Mitochondrien in den adrenokortikalen Zellen der Kontrolltiere an denselben Tagen signifikant niedriger im Vergleich zu den immunisierten Tieren (Abb. 4.10). An den Tagen, die nicht in der Abbildung dargestellt sind, fanden sich weder bei den intakten, noch bei den nicht- intakten Mitochondrien signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen und den immunisierten Tieren.

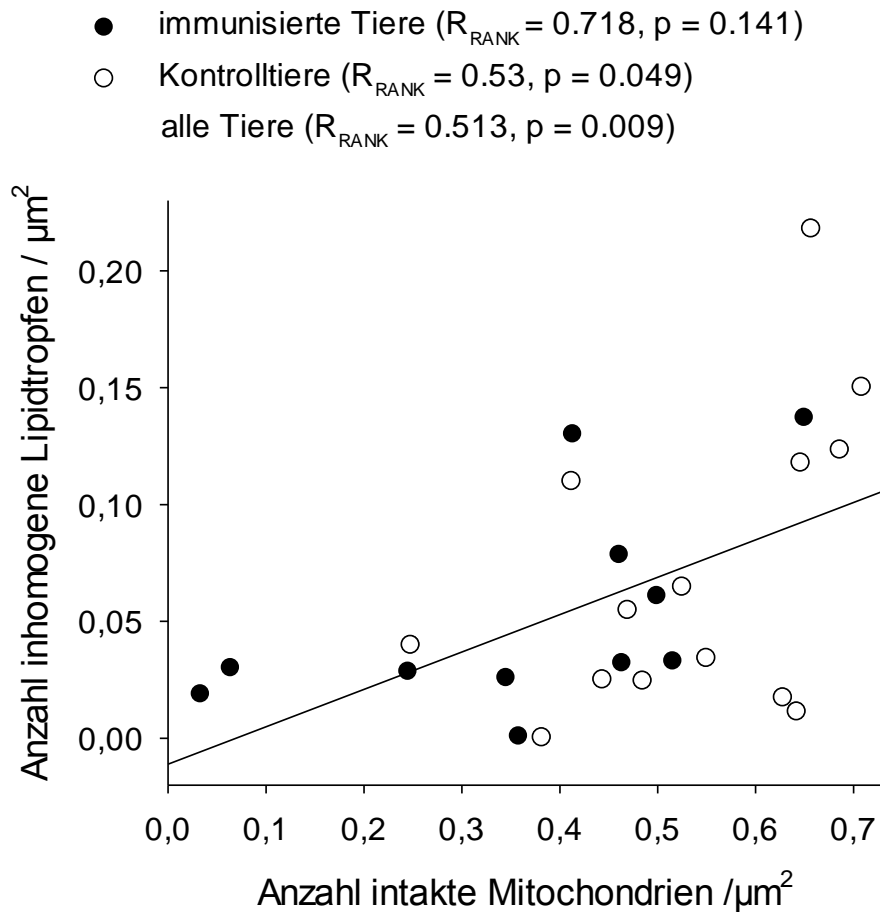


**Abb. 4.10:** Intakte und nicht- intakte Mitochondrien in der *Zona fasciculata* der Nebenniere von DA-Ratten. In den adrenokortikalen Zellen der Kontrolltiere findet man signifikant mehr intakte und gleichzeitig signifikant weniger nicht- intakte Mitochondrien als bei den immunisierten Tieren. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 96 Bildern je Zeitpunkt und Gruppe (MWU- Test).

#### 4.5 Zusammenhänge zwischen adrenokortikalen Lipidtropfen und Mitochondrien

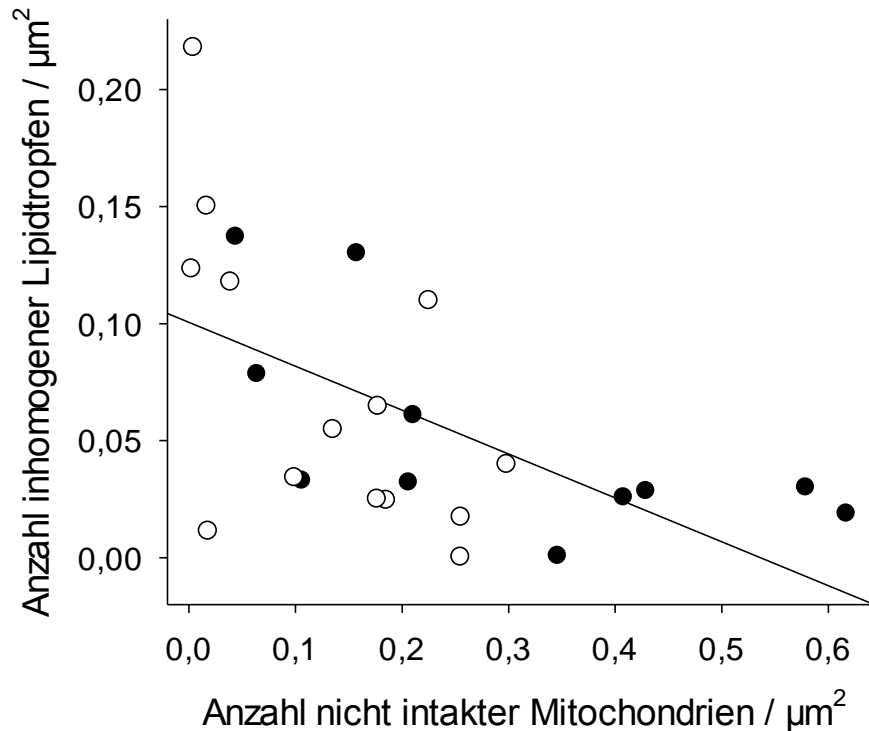
Die Lipidtropfen sind der Speicherort des Cholesterins und Cholesterin ist der Ausgangsstoff der Steroidogenese, die in den Mitochondrien und im ER abläuft. Deshalb wurden im Folgenden die Zusammenhänge zwischen den Lipidtropfen und den Mitochondrien untersucht. So bestand eine positive Korrelation zwischen den intakten Mitochondrien und den inhomogenen Lipidtropfen in den adrenokortikalen Zellen aller Tiere (Abb. 4.11). Betrachtet man den Zusammenhang bei Kontrolltieren und immunisierten Tieren getrennt, ist er bei den Kontrolltieren signifikant, bei den immunisierten Tieren jedoch nicht (Abb. 4.11).

Zudem zeigt die Abb. 4.12, dass eine negative Korrelation zwischen den adrenokortikalen nicht- intakten Mitochondrien und den inhomogenen Lipidtropfen besteht. Diese Korrelation besteht auch, wenn man beide Gruppen einzeln betrachtet (Abb. 4.12).



**Abb. 4.11:** Positive Korrelation zwischen adrenokortikalen intakten Mitochondrien und inhomogenen Lipidtropfen bei Kontrolltieren und immunisierten Tieren. Die Regressionslinie für alle Tiere und die Spearman Korrelationskoeffizienten (für alle Tiere, für immunisierte Tiere und für Kontrolltiere) sind dargestellt.

- immunisierte Tiere ( $R_{\text{RANK}} = -0.809, p < 0.001$ )
- Kontrolltiere ( $R_{\text{RANK}} = -0.587, p < 0.026$ )
- alle Tiere ( $R_{\text{RANK}} = -0.619, p < 0.001$ )



**Abb. 4.12:** Negative Korrelation zwischen adrenokortikalen nicht- intakten Mitochondrien und inhomogenen Lipidtropfen bei Kontrolltieren und immunisierten Tieren. Die Regressionslinie für alle Tiere und die Spearman Korrelationskoeffizienten (für alle Tiere, für immunisierte Tiere und für Kontrolltiere) sind dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Vorkommen von adrenokortikalen Lipidtropfen, die abgebaut werden, positiv mit dem Vorkommen von adrenokortikalen intakten Mitochondrien und negativ mit dem Vorkommen von adrenokortikalen nicht-intakten Mitochondrien korreliert.

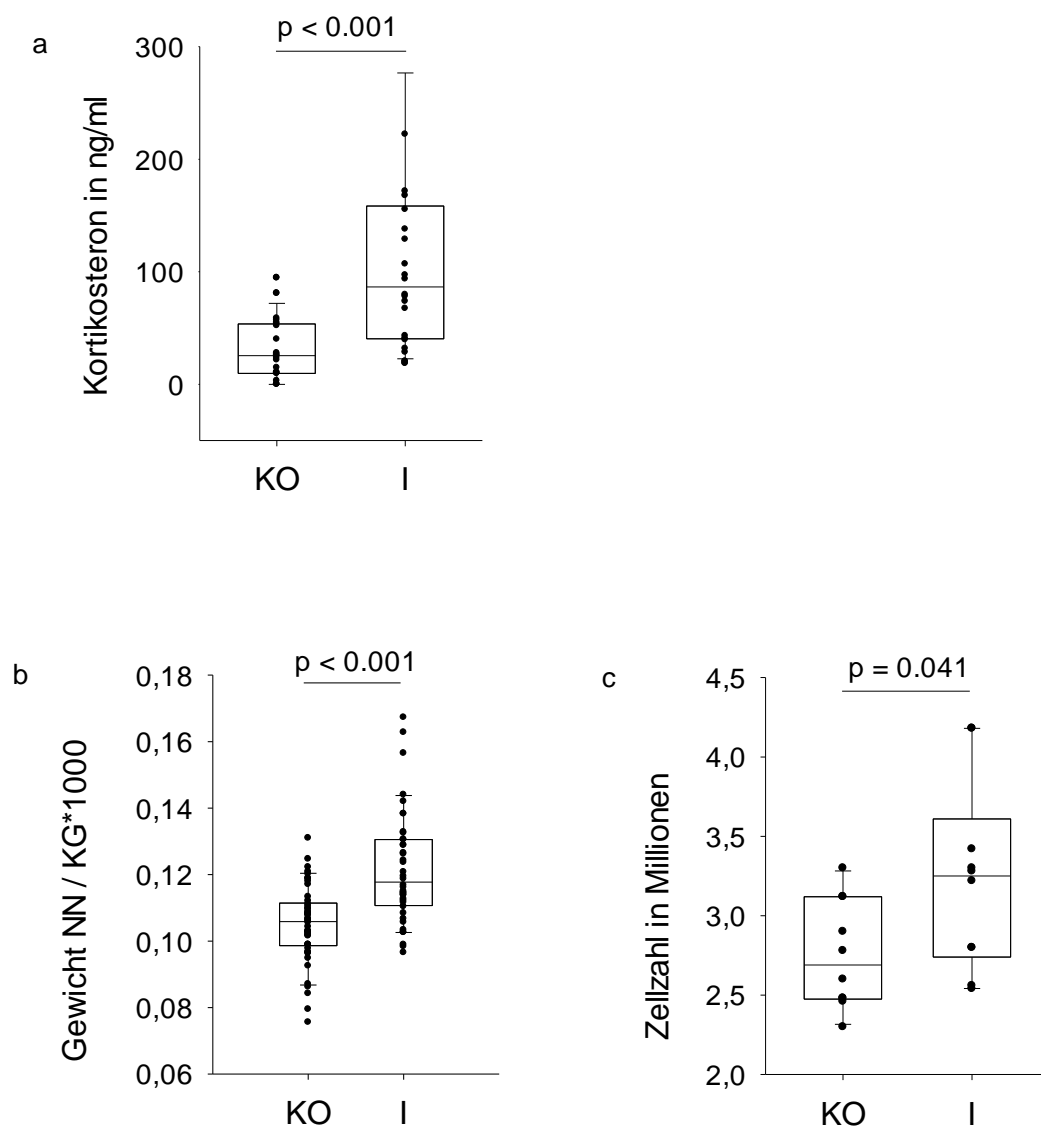
#### 4.6 Messung der mitochondrialen Aktivität adrenokortikaler Zellen

Aus Zeitgründen konnte der folgende Versuch nur für den Tag 1 nach der Arthritisinduktion durchgeführt werden. Es wurden 23 Kontrolltiere und 22 immunisierte Tiere (Tag 1) verwendet.



#### 4.6.1 Nebennierengewichte, Nebennierenzellzahlen und Plasmakortikosteron

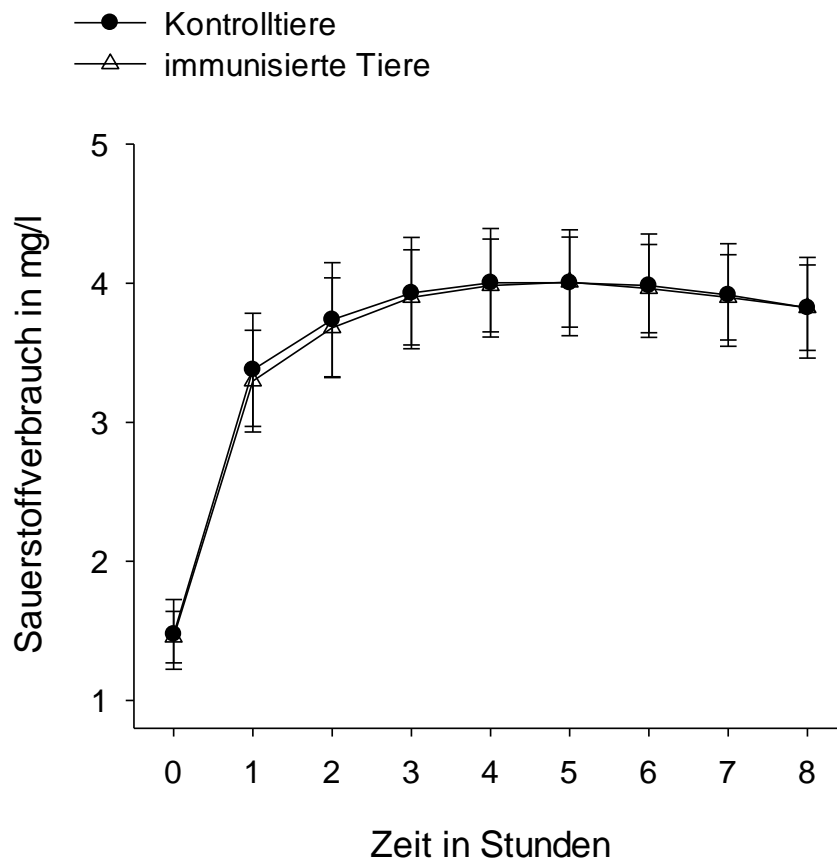
Am Tag 1 nach Arthritisinduktion ist das Kortikosteron im Plasma der immunisierten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöht (Abb. 4.13a). Auch die Gewichte der Nebennieren, bezogen auf das gesamte Körpergewicht und die Zellzahlen in der Nebenniere, sind bei den arthritischen Tieren gegenüber den Kontrolltieren signifikant höher (Abb. 4.13b und c).



**Abb. 4.13:** (a) Plasmakortikosteron, (b) Nebennierengewichte bezogen auf das Körpergewicht (KG), (c) Nebennierenzellzahlen von Kontrolltieren (KO) und immunisierten Tieren (I) (Tag 1). Die Kortikosteronspiegel, Nebennierengewichte und Nebennierenzellzahlen sind bei den immunisierten Tieren signifikant höher als bei den Kontrolltieren. Insgesamt 22-23 Tiere pro Gruppe für Graph (a) und (b) und 10 Tiere pro Gruppe für Graph (c), Box- Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile, (MWU- Test).

#### 4.6.2 Sauerstoffverbrauch in adrenokortikalen Zellen gesunder und immunisierter DA- Ratten

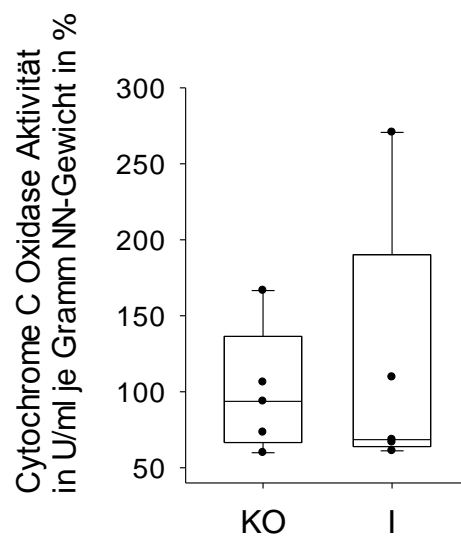
Für dieses Experiment wurden in zwei Versuchen die linken Nebennieren von 23 Kontrolltieren und 22 immunisierten Tieren (Tag 1) verwendet. Vergleicht man den Sauerstoffverbrauch adrenokortikaler Zellen gesunder und immunisierter Ratten (Tag 1), so zeigt sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen (Abb. 4.14).



**Abb. 4.14:** Sauerstoffverbrauch von Nebennierenzellen immunisierter und gesunder DA-Ratten (Tag 1) über eine Messzeit von 8 Stunden. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen gefunden. Insgesamt 22-23 Tiere pro Gruppe, Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM

### 4.6.3 Cytochrom- c- Oxidase Aktivität in adrenokortikalen Mitochondrien gesunder und immunisierter DA- Ratten

Für dieses Experiment wurden in zwei Versuchen die rechten Nebennieren von 23 Kontrolltieren und 22 immunisierten Tieren (Tag 1) verwendet. Die adrenokortikalen Zellen wurden in je fünf Pellets pro Versuchsgruppe gepoolt. Aus den Zell- Pellets wurden die adrenokortikalen Mitochondrien isoliert und anschließend die COX- Aktivität gemessen. Die COX ist ein intramitochondriales Enzym und katalysiert in einer gekoppelten Reaktion die Oxidation von Cytochrom c mit der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser und dem Transport von Protonen über eine biologische Membran. Durch die Reaktionen der Atmungskette wird Energie bereitgestellt. In diesem Versuch ließen sich jedoch keine Unterschiede in der COX- Aktivität der adrenokortikalen Mitochondrien gesunder und immunisierter Tiere an Tag 1 feststellen (Abb. 4.15).



**Abb. 4.15:** Aktivität der COX bei Kontrolltieren (KO) und immunisierten Tieren (I) am Tag 1 nach Immunisierung, insgesamt 22-23 Tiere pro Gruppe, gepoolt in je 5 Gruppen, Box- Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile, (MWU- Test).

Somit kann man zusammenfassen, dass die Plasmakortikosteronspiegel, Nebennierengewichte und Nebennierenzellzahlen bei immunisierten Tieren an Tag 1 signifikant höher sind als bei Kontrolltieren. Jedoch unterschieden sich die

Kontrolltiere und die immunisierten Tiere (Tag 1) nicht im Sauerstoffverbrauch oder der mitochondrialen COX- Aktivität adrenokortikaler Zellen.

## 5 Diskussion

Sowohl bei der RA (33, 75) als auch bei der experimentellen Arthritis (41, 132) findet man, in Relation zur bestehenden Entzündung, inadäquat niedrige Kortisol/ Kortikosteron- Spiegel im Plasma. Um mögliche Gründe für die relative adrenale Insuffizienz bei Arthritis aufzudecken, wurde in dieser Arbeit eine vergleichende Untersuchung elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Nebennieren (*Zona fasciculata*) gesunder und immunisierter Ratten durchgeführt. Da der Ausgangsstoff für die Steroidogenese, das Cholesterin, in den Lipidtropfen der *Zona fasciculata* gespeichert wird (130, 120) und entscheidende Schritte der Steroidogenese in den adrenokortikalen Mitochondrien ablaufen (90), wurden diese beiden Zellbestandteile in der vorliegenden Arbeit vergleichend untersucht. Autoren wie de Almeida et al. konnten bereits zeigen, dass altersbedingte Veränderungen im Serumkortikosteron bei Ratten mit Veränderungen der adrenokortikalen Lipidtropfen und Mitochondrien einhergehen (38).

### 5.1 Ultrastrukturelle Morphologie adrenokortikaler Lipidtropfen von DA- Ratten im Verlauf der Arthritis

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich die Morphologie, die Anzahl oder die Fläche der adrenokortikalen Lipidtropfen im Arthritisverlauf verändern. Insgesamt wurden drei mögliche Szenarien angenommen: A) Es liegt ein Problem der Nebenniere bei der Lipidaufnahme oder -speicherung vor, was zu einer starken Abnahme der Lipidtropfen in der *Zona fasciculata* im Verlauf der Arthritis führt. Eine solche Abnahme an adrenokortikalem Cholesterin wird im Tierversuch z.B. durch 4-Aminopyrazolo(3,4-d)pyrimidin induziert, das einen Lipoproteinmangel erzeugt. Diese induzierte Abnahme des adrenokortikalen Cholesterins hat eine verminderte ACTH-stimulierte Kortikosteron- Antwort zur Folge (170).

B) Als zweites mögliches Szenario käme eine Behinderung beim Abbau bzw. bei der Weiterverarbeitung des gespeicherten Cholesterins in Frage, was eine Akkumulation von Lipiden in der Nebennierenrinde zur Folge hätte. Eine solche Akkumulation von Lipidtropfen in der Nebenniere von Ratten zeigt sich beispielsweise nach der Gabe von CRH- Antagonisten (19) oder Inhibitoren der Steroidogenese (31, 110). Zudem konnten Li et al. zeigen, dass die Lipidtropfen in den Nebennieren von HSL- KO- Mäusen akkumulieren. Diese vermehrte Lipidspeicherung hatte zwar keinen Einfluss

auf die basalen Kortikosteronspiegel im Blut der Versuchstiere, jedoch waren die Kortikosteronspiegel nach ACTH- Stimulation im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich niedriger (102).

C) Die dritte Möglichkeit ist ein völlig anderes Szenario, bei welchem die Lipidtropfen nicht zahlenmäßig beeinflusst werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass es 2 verschiedene Typen der adrenokortikalen Lipidtropfen gibt: die homogenen Lipidtropfen, die eine einheitlich dunkle Matrix aufweisen und die inhomogenen Lipidtropfen, die verschiedene Aufhellungen zeigen. Mit Hilfe von ATGL- KO- Mäusen, die nur homogene adrenokortikale Lipidtropfen besitzen und Wildtyp- Mäusen, die beide Lipidtropfenformen in den adrenokortikalen Zellen aufweisen, konnte festgestellt werden, dass homogene Lipidtropfen die Speicherform darstellen und inhomogene Lipidtropfen diejenigen sind, die durch Lipasen abgebaut werden.

Diese Vermutung wurde dadurch bekräftigt, dass die Anzahl der adrenokortikalen inhomogenen Lipidtropfen durch Stimulation mit ACTH oder Isoproterenol signifikant anstieg. Auch Tokar et al. beschrieben unterschiedliche Morphologien von Lipidtropfen in der *Zona fasciculata* von Rattennebennieren (176). Die Autoren beobachteten, dass Lipidtropfen, deren Inhalt nicht elektronendicht ist, vor allem in Zellen vorkommen, in denen viel Steroidogenese betrieben wird. Dagegen fanden sie Lipidtropfen mit elektronendichtere Matrix eher in Zellen, die wenige Steroide herstellen (176).

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die immunisierten Tiere in den *Fasciculata*- Zellen mehr homogene, aber weniger inhomogene Lipidtropfen als die Kontrolltiere besitzen. Das bedeutet, dass in den Nebennieren der immunisierten Tieren weniger Lipide abgebaut und für die Steroidogenese verwendet werden als bei den Kontrolltieren. Diese Beobachtung passt auch zu einem weiteren Ergebnis unserer Arbeitsgruppe: Ab Tag 28 nach der Arthritisinduktion ist die Lipidspeicherung (gemessen als SudanIII- Positivität) in der Nebenniere bei arthritischen Tieren höher als bei Kontrolltieren (192). Außerdem konnten wir zeigen, dass bei experimenteller Arthritis vermutlich kein Problem in der Lipidaufnahme in adrenokortikale Zellen besteht. Denn es konnte kein Unterschied in der Expression des Cholesterinrezeptors SR- B1 in den Nebennieren gesunder und immunisierter Ratten festgestellt werden. Außerdem zeigte sich auch kein Unterschied zwischen beiden Gruppen hinsichtlich der Aufnahme von NBD- Cholesterin in adrenokortikale

Zellen. Interessanterweise konnte aber bei den Kontrolltieren eine positive Korrelation zwischen der NBD- Cholesterin- Aufnahme und den Plasmakortikosteronspiegeln festgestellt werden. Eine solche Korrelation war bei den arthritischen Tieren nicht vorhanden, was als Entkopplung der Cholesterinaufnahme von der Glukokortikoidsekretion interpretiert wurde (192).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die experimentelle Arthritis weder mit einer Akkumulation, noch mit einer Verarmung von Lipidtröpfchen in der *Zona fasciculata* einhergeht. Stattdessen zeigte sich ein veränderter Lipidabbau, der möglicherweise zur inadäquaten Kortikosteronproduktion bei Arthritis beiträgt. Die Gründe hierfür sind allerdings noch unklar.

## **5.2 Ultrastrukturelle Morphologie adrenokortikaler Mitochondrien von DA- Ratten im Verlauf der Arthritis**

Da wichtige Schritte der Steroidogenese in den Mitochondrien ablaufen (90) und eine Dysfunktion adrenokortikaler Mitochondrien zum Funktionsverlust der HPA- Achse beitragen könnte, wurden die adrenokortikalen Mitochondrien gesunder und immunisierter DA-Ratten hinsichtlich ihrer Anzahl und ultrastrukturellen Morphologie vergleichend untersucht.

Auch die adrenokortikalen Mitochondrien konnten in zwei verschiedene Typen unterteilt werden. Die normalen Mitochondrien, hier als intakte Mitochondrien bezeichnet, weisen ein homogenes dicht gepacktes Cristae- Muster auf. Die veränderten Mitochondrien, hier als nicht- intakte Mitochondrien bezeichnet, haben ein geschwollenes Aussehen, wenige geschwollene Cristae sowie eine lockere transparente Matrix. Nun stellt sich die Frage, was zu diesem veränderten Aussehen der nicht- intakten Mitochondrien in der Nebenniere führt. Einige Autoren konnten zeigen, dass die Anzahl der mitochondrialen Cristae von der Aktivität der HPA- Achse abhängt. So wurde im Tierversuch gezeigt, dass Stress oder auch die Gabe von ACTH oder CRH zu einer Zunahme der Cristae der adrenalen Mitochondrien führt (17, 20, 77 128). Passend dazu zeigten Bornstein et al., dass durch die Gabe eines CRH- Antagonisten die Cristaezahl in den adrenalen Mitochondrien abnahm (19). Außerdem konnten Canick et al. eine Schwellung der vesikulären Cristae in den Fasciculatamitochondrien von Ratten nach einer Hypophysektomie beobachten (25). Weiterhin wurde eine lockere transparente Mitochondrienmatrix mit der Gabe des

P450scc– Inhibitors Aminoglutethimid oder mit der Gabe von Zyanoketosteroid, das die 3 $\beta$ -HSD inhibiert, in Verbindung gebracht (51, 112, 140).

Fakt ist jedoch, dass sich morphologische Veränderungen von Mitochondrien auch relativ schnell wieder zurückbilden können. Nach dem Absetzen von Aminoglutethimid dauert es beispielsweise lediglich zehn Tage bis die Mitochondrien ihr normales Aussehen wieder zurückerlangt haben (78).

Die in dieser Arbeit beobachteten morphologischen Veränderungen der Mitochondrien sind wahrscheinlich Einlagerungen von Wasser. Gehen Mitochondrien unter, so wird die Membran durchlässig für Wasser (56, 99). Wie in der Abbildung 4.9 gezeigt, ähneln die nicht-intakten Mitochondrien vom Aspekt her stark den mitochondrialen Fragmenten von geplatzten Zellen auf den EM-Bildern des Zellpellets. Diese morphologische Ähnlichkeit legt die Vermutung nahe, dass es sich bei den normalen Mitochondrien um intakte und bei den veränderten Mitochondrien um nicht-intakte Zellorganellen handelt. Diese veränderten/ nicht-intakten Mitochondrien können ihre Funktion vermindert oder gar nicht ausführen.

Die Auszählung der adrenokortikalen Mitochondrien an den Tagen 1, 5 und 55 ergab eine größere Anzahl intakter Mitochondrien und eine kleinere Anzahl nicht-intakter Mitochondrien bei den Kontrolltieren im Vergleich zu den immunisierten Tieren. An den Tagen 14, 28 und 40 waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen sichtbar. Somit ist es als sehr wahrscheinlich anzusehen, dass eine mitochondriale Dysfunktion zum relativen Steroidhormonmangel bei Arthritis beiträgt.

### **5.3 Zusammenhänge zwischen adrenokortikalen Lipidtropfen und Mitochondrien**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass immunisierte DA-Ratten signifikant mehr homogene Lipidtropfen und nicht-intakte Mitochondrien in adrenokortikalen Zellen aufweisen als Kontrolltiere. Weiterhin wurden nun mögliche Zusammenhänge zwischen adrenokortikalen Lipidtropfen und Mitochondrien bei gesunden und immunisierten DA-Ratten untersucht. Dabei zeigte sich, dass zwischen den intakten Mitochondrien und den inhomogenen Lipidtropfen adrenokortikaler Zellen bei den Kontrolltieren eine positive Korrelation besteht, nicht aber bei den immunisierten Tieren. Außerdem konnte eine negative Korrelation zwischen den nicht-intakten Mitochondrien und den inhomogenen Lipidtropfen adrenokortikaler Zellen sowohl bei den immunisierten als auch bei den Kontrolltieren



nachgewiesen werden. Andere Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe haben zudem gezeigt, dass die Anzahl der adrenokortikalen intakten Mitochondrien positiv mit den Kortikosteronwerten im Plasma von DA- Ratten korrelierte (192). Wurden hingegen die Anzahl der adrenokortikalen nicht- intakten Mitochondrien und die Kortikosteronspiegel im Plasma korreliert, war eine deutliche Tendenz zur negativen Korrelation vorhanden (192).

Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass bei immunisierten Tieren die bei Kontrolltieren beobachtete positive Korrelation zwischen intra- adrenalem Lipidabbau und Anzahl der intakten Mitochondrien verloren geht. Zum anderen zeigen sie, dass je mehr nicht- intakte Mitochondrien vorhanden sind, desto weniger Lipidabbau stattfindet und desto weniger Kortikosteron produziert wird, was bei immunisierten DA- Ratten der Fall ist. Dies alles bestätigt, dass es bei experimenteller Arthritis zu einem verschlechterten Lipidabbau, wahrscheinlich verursacht durch eine Dysfunktion adrenokortikaler Mitochondrien, kommt, was zur inadäquaten Kortikosteronproduktion in Relation zur Entzündung bei experimenteller Arthritis beiträgt.

Auch Rebuffat et al. konnten bei Ratten einen Zusammenhang zwischen adrenalen Mitochondrien und Lipidtropfen herstellen (144). Die Autoren beobachteten, dass durch die Gabe von Ciclosporin A die Anzahl der intramitochondrialen Cristae abnahm. Diese Abnahme war an eine Aktivitätsänderung der steroidogenetischen Enzyme gekoppelt (118, 125). Da daraufhin das Cholesterin nicht verbraucht wurde, nahm die Zahl der Lipidtropfen zu (144). Schon vor mehr als 40 Jahren wurde die Theorie aufgestellt, dass Veränderungen in der Oberfläche der mitochondrialen Cristae mit einer Aktivitätsänderung der Enzyme der Steroidogenese in Zusammenhang stehen (153, 196). In einer aktuelleren Arbeit konnte nach ACTH- Gabe bei Ratten eine signifikante Zunahme intramitochondrialer Cristae beobachtet werden, die von einem Anstieg des Plasmakortikosterons begleitet wurde (77). Aber nicht nur die mitochondriale Morphologie, sondern auch die mitochondriale Aktivität konnte von einigen Autoren direkt mit der Steroidogenese in Verbindung gebracht werden. So geht bei einigen seltenen Erkrankungen erhöhter oxidativer Stress mit einer mitochondrialen Dysfunktion und einer adrenalen Insuffizienz einher (137). Zudem konnten Wang et al. zeigen, dass intra- adrener oxidativer Stress und adrenokortikale mitochondriale Dysfunktion bei Mäusen zu einer abgeschwächten ACTH- stimulierten Kortikosteronantwort führten (183).

Die Ursachen für die Veränderungen der adrenokortikalen Mitochondrien und Lipidtropfen bei experimenteller Arthritis sind bisher nicht bekannt. Weitere Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe legen jedoch nahe, dass das Zytokin IL-1 $\beta$  hierbei eine wichtige Rolle spielen könnte (192). So kann z.B. die mitochondriale Aktivität durch entzündliche Prozesse im Körper, v.a. durch Enzyme wie MMPs und Zytokine wie IL-1 $\beta$  inhibiert werden, wobei IL-1 $\beta$  in der Lage ist, die COX direkt zu inhibieren (71, 100, 185).

#### **5.4 Mitochondriale Aktivität adrenokortikaler Zellen gesunder oder immunisierter DA-Ratten**

Alle bisherigen Ergebnisse basieren auf vergleichenden morphologischen Untersuchungen adrenokortikaler Mitochondrien und Lipidtropfen bei gesunden und immunisierten DA- Ratten. Deshalb war es ein letztes Ziel dieser Arbeit, auch die mitochondriale Aktivität gesunder und immunisierter Tiere zu untersuchen, was aus Zeitgründen leider nur für den Tag 1 nach Immunisierung möglich war. Es wurden sowohl der Sauerstoffverbrauch als auch die Aktivität der mitochondrialen COX untersucht. Die COX ist eines der Enzyme innerhalb der Atmungskette, durch deren Reaktionen Sauerstoff zu Wasser reduziert wird. Wie bereits beschrieben, stellt die mitochondriale Atmungskette hierbei Energie in Form von ATP her. Dieses ATP dient der einzelnen Zelle als Treibstoff für ihre vielfältigen Funktionen. Die Zellen der Nebennierenrinde benötigen diese Energie u.a. für die Steroidogenese. Auch die Sauerstoffverbrauchsmessung ist eine anerkannte Methode zur Messung der mitochondrialen Aktivität (45, 50, 132).

Wie die Ergebnisse des letzten Teils dieser Arbeit zeigen, waren die Kortikosteronspiegel im Plasma, die Nebennierengewichte und die Nebennierenzellzahlen am Tag 1 nach der Immunisierung mit Kollagen Typ II im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöht. Einen solchen signifikanten Anstieg der Kortikosteronwerte kurz nach der Immunisierung konnten wir und andere Gruppen bereits mehrfach zeigen, allerdings sanken die Glukokortikoidspiegel im weiteren Arthritisverlauf wieder auf das Normalniveau und waren somit in Relation zur Entzündung inadäquat niedrig (42, 192). Die erhöhte Nebennierenzellzahl spricht für eine Hyperplasie der Nebennierenzellen. Es ist bekannt, dass eine Aktivierung der HPA- Achse zu einer Hyperplasie und Hypertrophie der Zellen in der *Zona*

*fasciculata* führen kann (162). Auch erhöhte Nebennierengewichte bei experimenteller Arthritis wurden beschrieben (9, 133). Die hypophysäre Stimulation der Nebennieren fordert eine vermehrte Syntheseleistung von diesen, so dass es zu Hyperplasie und Hypertrophie der Zellen kommt und auch das Organgewicht ansteigt (13, 39).

Eine Hypophysektomie hingegen führt zu einer Abnahme des Nebennierengewichtes, wahrscheinlich durch eine Atrophie der *Zona fasciculata* und der *Zona reticularis* (147). Auch CRH- Antagonisten wie Antalarmin können die Nebennieren von Versuchstieren um bis zu 31% verkleinern (18).

Aufgrund der erhöhten Kortikosteronspiegel, Nebennierengewichte und Nebennierenzellzahlen wurde angenommen, dass die adrenokortikalen Zellen der immunisierten Tiere sowohl einen höheren Sauerstoffverbrauch als auch eine erhöhte COX- Aktivität zeigen würden. Denn die Vorgänge, die früh nach der Immunisierung ablaufen, wie Hyperplasie und vermehrte Glukokortikoidsekretion, benötigen Energie, die durch die Mitochondrien bereitgestellt wird (88, 161). Gegen diese Vermutung spräche allerdings die Beobachtung, dass bereits am Tag 1 nach Immunisierung signifikant mehr nicht- intakte Mitochondrien in den adrenokortikalen Zellen immunisierter Tiere nachweisbar waren als bei den Kontrollen.

Tatsächlich konnten in dieser Arbeit keine Unterschiede im Sauerstoffverbrauch zwischen adrenokortikalen Zellen immunisierter und nicht- immunisierter DA- Ratten an Tag 1 festgestellt werden. Der Sauerstoffverbrauch adrenokortikaler Zellen CII- immunisierter Tiere wurde bis jetzt von keiner anderen Arbeitsgruppe untersucht. Aber Solinas et al. bringen eine altersbedingt verminderte oxidative Phosphorylierung in der Nebenniere von Fischer- Ratten in Zusammenhang mit einer Abnahme der Steroidhormonsynthese (161). Um eventuell ähnliche Zusammenhänge herstellen zu können, müssen noch weitere Tage im Arthritisverlauf hinsichtlich des Sauerstoffverbrauches adrenokortikaler Zellen untersucht werden. Gerade am Tag 55 nach Immunisierung würde man die ausgeprägteste Veränderung im Sauerstoffverbrauch erwarten, da an diesem Tag bei immunisierten Tieren fast ausschließlich nicht- intakte Mitochondrien nachgewiesen werden konnten.

Poli et al. konnten nach Gabe eines Zytostatikums eine Veränderung der mitochondrialen Morphologie (Schwellung und Cristae- Abnahme) mit einem drastisch verringerten Sauerstoffverbrauch in Zusammenhang bringen (136). Allerdings wurden hier aus humanen Nebennierenkarzinomzellen isolierte

Mitochondrien für die Sauerstoffmessung verwendet und ein anderes Gerät, das *Oxygraph system* mit *Clark type electrode*, genutzt. Auch andere Autoren benutzten vor allem *Clark-* oder *Seahorse-* Elektroden zur Sauerstoffverbrauchsmessung von Zellen (49, 50, 71, 103, 141), während in der vorliegenden Arbeit optische Sensoren, sogenannte Optoden, verwendet wurden.

Auch bei der Messung der mitochondrialen COX- Aktivität adrenokortikaler Zellen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den immunisierten Tieren (Tag 1). Jedoch wurden hier die isolierten adrenokortikalen Mitochondrien der Kontrolltiere und der immunisierten Tiere in lediglich je fünf Gruppen gepoolt und dann die COX- Aktivität gemessen. Deshalb ist es möglich, dass sich auf Grund der kleinen Probenzahl kein deutliches Bild ergibt. Grundsätzlich ist die Bestimmung der COX- Aktivität schwierig, da dieses Enzym durch sein Produkt (das oxidierte Cytochrom c) schnell inhibiert wird (145). Zudem stellt die äußere Mitochondrienmembran eine Barriere für das Cytochrom c dar (84).

Neben der Messung des Sauerstoffverbrauchs und der COX- Aktivität gibt es weitere Methoden die mitochondriale Aktivität zu messen, die möglicherweise besser geeignet sein könnten. Manche Autoren messen zur Bestimmung der mitochondrialen Aktivität beispielsweise den ATP- Gehalt in bestimmten Geweben (146, 185), die Aktivität anderer Komplexe der mitochondrialen Atmungskette (141, 185) oder das mitochondriale Membranpotenzial (5, 70).

## 6 Zusammenfassung

Sowohl bei der RA als auch bei der experimentellen Arthritis liegen in Relation zur bestehenden Entzündung inadäquat niedrige Glukokortikoidspiegel im Plasma vor. Die Gründe hierfür sind jedoch weitgehend unbekannt. Da die *Zona fasciculata* der Nebenniere der Ort der Glukokortikoidproduktion ist und es in der Literatur Hinweise auf eine relative adrenale Insuffizienz bei Arthritis gibt, wurden in der vorliegenden Arbeit elektronenmikroskopische Aufnahmen der *Zona fasciculata* von Nebennieren gesunder und arthritischer Ratten vergleichend untersucht, wobei ein besonderes Augenmerk auf die adrenokortikalen Lipidtropfen und Mitochondrien gelegt wurde.

Bei den immunisierten Tieren fand sich im Gegensatz zu den Kontrolltieren ein verminderter Lipidabbau in der Nebennierenrinde. Zudem konnten bei den immunisierten Tieren vermehrt Mitochondrien gefunden werden, welche den Mitochondrien von untergegangenen Zellen morphologisch stark ähneln. Diese Veränderungen der mitochondrialen Morphologie erinnerten ferner an Veränderungen, die durch Hemmstoffe der Steroidogeneseenzyme hervorgerufen werden können. Somit wurde diese Mitochondrien als nicht- intakt bezeichnet und die These formuliert, dass mitochondriale Veränderungen zur Arthritis beitragen können.

Zudem konnte eine negative Korrelation zwischen den nicht- intakten Mitochondrien und dem Lipidabbau nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde versucht, die mitochondriale Aktivität von Nebennierenzellen gesunder und immunisierter Ratten zu vergleichen. Aus Zeitgründen konnte dieser Versuch nur für den ersten Tag nach der Immunisierung durchgeführt werden. Hier fand sich kein eindeutiges Ergebnis. Möglicherweise lassen sich Zusammenhänge zwischen Arthritis und mitochondrialer Aktivität herstellen, wenn zusätzlich weitere Tage nach der Immunisierung untersucht werden, da sich die morphologischen mitochondrialen Veränderungen am ausgeprägtesten auch erst an Tag 55 nach der Arthritisinduktion zeigten.

## 7 Literaturverzeichnis

- (1) Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. Molekularbiologie der Zelle. 4. Auflage, Weinheim, Germany WILEY- VCH Verlag GmbH und Co. KGaA, 2004, Seite 894-908.
- (2) Aletaha D., Neogi T., Silman A.J. et al., 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010; 62:2569-81.
- (3) Arnett F.C., Edworthy S.M., Bloch D.A., McShane D.J., Fries J.F., Cooper N.S. et al., The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
- (4) Azhar S., Reaven E., Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2002; 195:1-26.
- (5) Bagkos G., Koufopoulos K., Piperi C., A new model for mitochondrial membrane potential production and storage. *Med Hypotheses.* 2014; 83:175-81.
- (6) Bathon J. M. et al., A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 1586–1593.
- (7) Bendele A., Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2001; 1: 377-85.
- (8) Bendele A., McAbee T., Sennello G., Frazier J., Chlipala E., McCabe D., Efficacy of sustained blood levels of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 498–506.

- (9) Benson R.O., Anderson A.W., Observations on the adrenal glands of normal swine and swine affected with arthritis, *Am J Vet Res.* 1973; 34:1247-51.
- (10) Berglin E. et al. (2006), Radiological outcome in rheumatoid arthritis is predicted by presence of antibodies against cyclic citrullinated peptide before and at disease onset, and by IgA-RF at disease onset. *Ann Rheum Dis* 65: 453–458.
- (11) Besedovsky H.O., del Rey A., Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view. *Brain Behav Immun* 2007; 21: 34–44.
- (12) Blass S., Engel J.M., Burmester G.R., The immunologic homunculus in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 2499-506.
- (13) Bornstein S.R. 1996, The adrenal functional unit. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; Seite 1–172.
- (14) Bornstein S.R., Chrousos G.P., Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)-and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84:1729-36.
- (15) Bornstein S.R, Ehrhart-Bornstein M., Basic and clinical aspects of intraadrenal regulation of steroidogenesis. *Z Rheumatol.* 2000; 59: 12-7.
- (16) Bornstein S.R., Ehrhart-Bornstein M., Ultrastructural evidence for a paracrine regulation of the rat adrenal cortex mediated by the local release of catecholamines from chromaffin cells. *Endocrinology.* 1992; 131: 3126-8.
- (17) Bornstein S.R., Ehrhart-Bornstein M., Güse-Behling H., Scherbaum W.A., Structure and dynamics of adrenal mitochondria following stimulation with corticotropin releasing hormone (CRH). *Anat Rec.* 1992; 234: 255–262.
- (18) Bornstein S.R., Uhlmann K., Haidan A., Ehrhart-Bornstein M., Scherbaum W.A., Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to

the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes* 1997; 46: 1235–1238.

- (19) Bornstein S.R., Webster E.L., Torpy D.J., Richman S.J., Mitsiades N., Igel M., Lewis D.B., Rice K.C., Joost H.G., Tsokos M., Chrousos G.P., Chronic effects of a nonpeptide corticotropin-releasing hormone type I receptor antagonist on pituitary-adrenal function, body weight, and metabolic regulation., *Endocrinology*. 1998; 139:1546-55.
- (20) Boshier D.P., Rebuffat P., Nussdorfer G.G., Cellular responses of the rat adrenal zona fasciculata to acute ACTH stimulation: a morphometric study. *Endocr Res*. 1990; 16:377-89.
- (21) Bowes J., Barton A., Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2008; 47: 399–402.
- (22) Brackertz D., Mitchell G.F., Mackay I.R., Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 1977; 20: 841-50.
- (23) Brand D.D., Kang A.H., Rosloniec E.F., Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 2003; 25: 3-18.
- (24) Buckingham J.C. et al., The neuroendocrine system: anatomy, physiology and responses to stress. In: *Stress, Stress Hormones & the Immune System*. J.C. Buckingham, A.-M. Cowell & G. Gillies, 1997, Eds. Chichester, UK: John Wiley & Sons., 1997; Seite 9-47.
- (25) Canick J.A., Purvis J.L., The maintenance of mitochondrial size in the rat adrenal cortex zona fasciculata by ACTH. *Exp Mol Pathol*. 1972; 16: 79-93.
- (26) Carr B.R., Porter J.C., MacDonald P.C., Simpson E.R., Metabolism of low density lipoprotein by human fetal adrenal tissue. *Endocrinology*. 1980; 107: 1034-40.



- (27) Carty S.M., Snowden N., Silman A.J., Should infection still be considered as the most likely triggering factor for rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 46-49.
- (28) Chikanza I.C., Petrou P., Kingsley G., Chrousos G., Panayi G.S., Defective hypothalamic response to immune and inflammatory stimuli in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1992; 35: 1281-8.
- (29) Chrousos G.P., Regulation and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: the corticotropin-releasing hormone perspective. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1992; 21: 833-858.
- (30) Chrousos G.P., The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332.
- (31) Chung K.W., Effect of aminoglutethimide on the structure and function of rat adrenals. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1982; 37: 215-26.
- (32) Crofford L.J., Kalogeras K., Mastorakos G. et al. 1997., Circadian relationship between interleukin (IL)-6 and hypothalamus-pituitary-adrenocortical axis hormones: failure of IL-6 to cause hypercortisolism in patients with early, untreated rheumatoid arthritis. *J. Clin. Endocr. Metab.* 82: 1279–1283.
- (33) Cutolo M., Foppiani L., Minuto F., Hypothalamic-pituitary-adrenal axis impairment in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and polymyalgia rheumatica. *J Endocrinol Invest* 2002; 25: 19–23.
- (34) Cutolo M., Foppiani L., Prete C., Ballarino P., Sulli A., Villaggio B. et al., Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis function in premenopausal women with rheumatoid arthritis not treated with glucocorticoids. *J Rheumatol* 1999; 26: 282–8.

- (35) Dallman M.F., Akana S.F., Levin N., Walker C.D., Bradbury M.J., Suemaru S. et al., Corticosteroids and the control of function in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 746: 22-31.
- (36) Darling G., Goldstein D.S., Stull R., Gorschboth C.M., Norton J.A., Tumor necrosis factor: immune endocrine interaction. *Surgery*. 1989 Dec; 106: 1155-60.
- (37) Dayer J.M., Choy E., Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology* 2010; 49: 15-24.9.
- (38) de Almeida H., Magalhães M.C., Magalhães M.M., Age-related changes in the inner zone of the adrenal cortex of the rat--a morphologic and biochemical study. *Mech Ageing Dev*. 1998; 105:1-18.
- (39) Deane H.W., The anatomy, chemistry and physiology of adrenocortical tissue. In: Deane HW, ed. *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, vol 14, part 1. Berlin, Goettingen, Heidelberg: Springer; 1962, Seite 1–185.
- (40) DeJoy S.Q., Ferguson K.M., Sapp T.M., Zabriskie J.B., Oronsky A.L., Kerwar S.S., Streptococcal cell wall arthritis. Passive transfer of disease with a T cell line and crossreactivity of streptococcal cell wall antigens with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 1989; 170: 369-82.
- (41) del Rey A., Wolff C., Wildmann J., Randolph A., Hahnel A., Besedovsky H.O., Straub R.H., Disrupted brain-immune system-joint communication during experimental arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008 Oct; 58: 3090-9.
- (42) del Rey A., Wolff C., Wildmann J., Randolph A., Straub R.H., Besedovsky H.O., When Immune- Neuro- Endocrine Interactions Are Disrupted: Experimentally Induced Arthritis as an Example. *Neuroimmunomodulation* 2010; 17: 165-186.
- (43) Dorner T., Egerer K., Feist E., Burmester G.R., Rheumatoid factor revisited. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16: 246–253.

- (44) Dorożyńska I., Majewska-Szczepanik M., Marcińska K., Szczepanik M., Partial depletion of natural gut flora by antibiotic aggravates collagen induced arthritis (CIA) in mice. *Pharmacol Rep.* 2014; 66: 250-5.
- (45) Dranka B.P., Benavides G.A., Diers A.R. et al., Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radic Biol Med* 2011; 51: 1621–1635.
- (46) Ehrhart-Bornstein M., Hinson J.P., Bornstein S.R., Scherbaum W.A., Vinson G.P., Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev* 1998; 19: 101–43.
- (47) Feist E., Egerer K., Burmester G.R., Autoantibody profile in rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 2007; 66: 212-8.
- (48) Felten D.L., Livnat S., Felten S.Y., Carlson S.L., Bellinger D.L., Yeh P., Sympathetic innervation of lymph nodes in mice. *Brain Research Bulletin* 1986; 13: 693-9.
- (49) Ferramosca A., Pinto Provenzano S., Montagna D.D., Coppola L., Zara V., Oxidative stress negatively affects human sperm mitochondrial respiration. *Urology.* 2013 Jul; 82: 78-83.
- (50) Ferrick D.A., Neilson A., Beeson C., Advances in measuring cellular bioenergetics using extracellular flux. *Drug Discov Today* 2008; 13: 268–274.
- (51) Finegold M.J., Greene L.E., Mitochondrial damage in experimental congenital adrenal hyperplasia. *J Cell Biol* 1970; 45: 455–61.
- (52) Firestein G.S., Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423: 356–361.
- (53) Fortak W., Kmiec B., About occurrence of the chromophilic cells in the adrenal cortex of white rats. *Endokrynol Pol* 1968; 19: 117–128.

- (54) Fritsch H., Kühnel W., Taschenatlas der Anatomie, Band 2 Innere Organe, Georg Thieme Verlag Stuttgart 2001., Seite 362-366.
- (55) Gabriel S. E., The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 2001; 27: 269–282.
- (56) Gibson B.W., The human mitochondrial proteome: oxidative stress, protein modifications and oxidative phosphorylation. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 927
- (57) Goldstein D.S., Stress response patterns. In: Goldstein DS, ed. *Stress, catecholamines, and cardiovascular disease*. New York: Oxford University Press 1995; 287–328.
- (58) González-Hernández J.A., Bornstein S.R., Ehrhart-Bornstein M., Geschwend J.E., Adler G., Scherbaum W.A., Macrophages within the human adrenal gland. *Cell Tissue Res.* 1994; 278: 201-5.
- (59) González-Hernández J.A., Bornstein S.R., Ehrhart-Bornstein M., Gschwend J.E., Gwosdow A., Jirikowski G., Scherbaum W.A., IL-1 is expressed in human adrenal gland in vivo. Possible role in a local immune-adrenal axis. *Clin Exp Immunol.* 1995; 99: 137-41.
- (60) González-Hernández J.A., Bornstein S.R., Ehrhart-Bornstein M., Späth-Schwalbe E., Jirikowski G., Scherbaum W.A., Interleukin-6 messenger ribonucleic acid expression in human adrenal gland in vivo: new clue to a paracrine or autocrine regulation of adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 79: 1492–1497.
- (61) González-Hernández J.A., Ehrhart-Bornstein M., Späth-Schwalbe E., Scherbaum W.A., Bornstein S.R., Human adrenal cells express tumor necrosis factor-alpha messenger ribonucleic acid: evidence for paracrine control of adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81: 807-13.

- (62) Gregersen, P. K., Silver J., Winchester R.J., The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1987; 30: 1205-1213.
- (63) Gudbjörnsson B., Skogseid B., Oberg K., Wide L., Hällgren R., Intact adrenocorticotrophic hormone secretion but impaired cortisol response in patients with active rheumatoid arthritis. Effect of glucocorticoids. *J Rheumatol.* 1996; 23: 596-602.
- (64) Gwynne J.T., Strauss J.F. 3rd, The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. 1982; 3: 299-329.
- (65) Haemmerle G., Lass A., Zimmermann R., Gorkiewicz G., Meyer C., Rozman J., Heldmaier G., Maier R., Theussl C., Eder S., Kratky D., Wagner E.F., Klingenspor M., Hoefler G., Zechner R., Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science.* 2006; 312: 734-7.
- (66) Hall J., Morand E.F., Medbak S., Zaman M., Perry L., Goulding N.J., Maddison P.J., O'Hare J.P., Abnormal hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in rheumatoid arthritis. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs and water immersion. *Arthritis Rheum.* 1994; 37: 1132-7.
- (67) Härle P., Cutolo M., Schölmerich J., Straub R.H., Rheumatoid arthritis - pathogenetic role of neuroendocrine axes and the peripheral nervous system. *Med Klin (Munich)* 2002; 97: 720-9.
- (68) Hayes D.P.E., A case of Caplan's syndrome in a roof tile- maker. *Tubercle* 1960; 41: 143.
- (69) Hegen M., Keith J.C. Jr., Collins M., Nickerson-Nutter C.L., Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 1505-15.

- (70) Henson A.L., Moore J.B. 4th, Alard P., Wattenberg M.M., Liu J.M., Ellis S.R., Mitochondrial function is impaired in yeast and human cellular models of Shwachman Diamond syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 437: 29-34.
- (71) Herrera I., Cisneros J., Maldonado M., Ramírez R., Ortiz-Quintero B., Anso E., Chandel N.S., Selman M., Pardo A., Matrix metalloproteinase (MMP)-1 induces lung alveolar epithelial cell migration and proliferation, protects from apoptosis, and represses mitochondrial oxygen consumption. *J Biol Chem.* 2013; 288: 25964-75.
- (72) Herrmann M., Schölmerich J., Straub R.H., Influence of cytokines and growth factors on distinct steroidogenic enzymes in vitro: a short tabular data collection. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 166–86.
- (73) Holmdahl R., Klareskog L., Rubin K., Larsson E., Wigzell H., T lymphocytes in collagen II-induced arthritis in mice. Characterization of arthritogenic collagen II-specific T-cell lines and clones. *Scand J Immunol* 1985; 22: 295-306.
- (74) Imrich R., Rovenský J., Hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2010; 36: 721-7.
- (75) Imrich R., Vlcek M., Aldag J.C. et al., An endocrinologist's view on relative adrenocortical insufficiency in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1193: 134–8.
- (76) Ishikawa S., Mima T., Aoki C., Yoshio-Hoshino N., Adachi Y., Imagawa T., Mori M., Tomiita M., Iwata N., Murata T., Miyoshi M., Takei S., Aihara Y., Yokota S., Matsubara K., Nishimoto N., Abnormal expression of the genes involved in cytokine networks and mitochondrial function in systemic juvenile idiopathic arthritis identified by DNA microarray analysis. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68: 264-72.

- (77) Isola R., Solinas P., Concettoni C., Atzeni F., Loy F., Diana M., Isola M., Giacchetti G., Boscaro M., Riva A., Mariotti S., Cortical adrenal mitochondrial morphology changes in functional state: new insights. *Cell Tissue Res.* 2013; 351(3): 409-17.
- (78) Itoh G., Electron microscopic and histochemical study of the rat adrenal cortex treated with aminoglutethimide (Elipten, CIBA) and its reparative process. *Acta Pathol Jpn.* 1977; 27: 75-91.
- (79) Jäättelä M., Ilvesmäki V., Voutilainen R., Stenman U.H., Saksela E., Tumor necrosis factor as a potent inhibitor of adrenocorticotropin-induced cortisol production and steroidogenic P450 enzyme gene expression in cultured human fetal adrenal cells., *Endocrinology.* 1991; 128: 623-9.
- (80) Joe B., Wilder R.L., Animal models of rheumatoid arthritis. *Mol Med Today* 1999; 5: 367–9.
- (81) Johnson E.O., Kostandi M., Moutsopoulos H.M., Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in Sjögren's syndrome: mechanisms of neuroendocrine and immune system homeostasis. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1088: 41-51.
- (82) Jolly M., Curran J.J., Chlamydial infection preceding the development of rheumatoid arthritis: a brief report. *Clin Rheumatol* 2004; 23: 453-455.
- (83) Judd A.M., MacLeod R.M., Adrenocorticotropin increases interleukin-6 release from rat adrenal zona glomerulosa cells. *Endocrinology.* 1992; 130:1245-54.
- (84) Kadenbach B., Stroh A., Ungibauer M., Kuhn-Nentwig L., Büge U., Jarausch J., Isoenzymes of cytochrome c oxidase: characterization and isolation from different tissues. *Methods Enzymol,* 1986; 126: 32–45.
- (85) Kadioglu D., Harrison R.G., The functional relationships of mitochondria in the rat adrenal cortex. *J Anat* 1971; 110: 283–96.

- (86) Kang I., Lee W.W., Lee Y.S., Modulation of collage-induced arthritis by IL-4 and dexamethasone: the synergistic effect of IL-4 and dexamethasone on the resolution of CIA. *Immunopharmacology*, 2000; 49: 317–324.
- (87) Karouzakis E., Neidhart M., Gay R.E., Gay S., Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. 2006, *Immunol. Lett.*; 106: 8-13
- (88) Katou Y., Endo N., Suzuki T., Yu J., Kikuchi H., Oshima Y., Homma Y., Metarhizin A suppresses cell proliferation by inhibiting cytochrome c oxidase activity. *Life Sci.* 2014; 103: 1-7.
- (89) Keffer J., Probert L., Cazlaris H., Georgopoulos S., Kaslari E., Kioussis D. et al., Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. 1991; 10: 4025-31.
- (90) Kim H.A., Lee Y.J., Seong S.C., Choe K.W., Song Y.W., Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. *J Rheumatol* 2000; 27: 455-62
- (91) Kleine B., Rossmannith W., Hormone und Hormonsystem, Lehrbuch der Endokrinologie; Berlin Heidelberg, 3. Auflage, 2014, Seite 210- 227.
- (92) Kmiec B., Histologic and histochemical observations on regeneration of the adrenal medulla after enucleation in white rats. *Folia Morphol* 1968; 27: 238–245.
- (93) Kobayashi S., Momohara S., Kamatani N., Okamoto H., Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of environmental factors 2008; 275: 4456- 62.
- (94) Korczowska I., Rheumatoid arthritis susceptibility genes: An overview. *World J Orthop.* 2014; 5: 544-9.
- (95) Kouskoff V., Korganow A.S., Duchatelle V., Degott C., Benoist C., Mathis D., Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 1996; 87: 811-22.



- (96) Kraemer F.B., Adrenal cholesterol utilization. *Mol Cell Endocrinol.* 2007; 265-266: 42-5.
- (97) Kraemer F.B., Shen W.J., Harada K., Patel S., Osuga J., Ishibashi S., Azhar S., Hormone-sensitive lipase is required for high-density lipoprotein cholesteryl ester-supported adrenal steroidogenesis. *Mol Endocrinol.* 2004; 18: 549-57.
- (98) Kyburz D., Corr M., The KRN mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 2003; 25: 79-90.
- (99) Łabedzka K., Grzanka A., Izdebska M., Mitochondria and cell death. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2006; 60: 439-46.
- (100) Lee I., Hüttemann M., Energy crisis: the role of oxidative phosphorylation in acute inflammation and sepsis. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1842: 1579-86.
- (101) Lee H., Lee A., Criswell L., Seldin M., Amos C., et al., Several regions in the major histocompatibility complex confer risk for anti-CCP antibody positive rheumatoid arthritis, independent of the DRB1 locus. *Mol. Med.* 2008, 14: 293–300.
- (102) Li H., Brochu M., Wang S.P., Rochdi L., Côté M., Mitchell G., Gallo-Payet N., Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes lipid storage in the adrenal cortex and impaired corticosterone response to corticotropin stimulation. *Endocrinology.* 2002; 143: 3333-40.
- (103) Li Z., Graham B.H., Measurement of mitochondrial oxygen consumption using a Clark electrode. *Methods Mol Biol* 2012; 837: 63–72.
- (104) Li P., Schwarz E.M., The TNF-alpha transgenic mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 2003; 25: 19-33.
- (105) Lindqvist E., Eberhardt K., Bendtzen K. et al., Prognostic laboratory markers of joint damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 196–201.

- (106) Lipsky P. E. et al., Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 1594–1602.
- (107) Liu J.T., Guo X., Ma W.J., Zhang Y.G., Xu P., Yao J.F., Bai Y.D., Mitochondrial function is altered in particular chondrocytes of an endemic osteoarthritis, Kashin-Beck disease. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010; 18:1218-26.
- (108) MacGregor A.J., Snieder H., Rigby A.S., Koskenvuo M., Kaprio J., Aho K. et al., Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 30-7.
- (109) Madden K. S., Sanders V.M., Felten D.L., Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1995; 35: 417–448.
- (110) Malendowicz L.K., Comparative studies on the effects of aminoglutethimide on hamster and rat adrenal cortex. *Exp Toxicol Pathol.* 1992; 44: 81-5.
- (111) Manna S. K., Aggarwal B. B., Immunosuppressive leflunomide metabolite (A77 1726) blocks TNF-dependent nuclear factor-kappa B activation and gene expression. *J. Immunol.* 1999; 162: 2095–2102.
- (112) Marek J., Thoenes W., Motlík K., Lipoide Transformation der Mitochondrien in Nebennierenrindenzellen nach Aminoglutäthimid (Elipten Ciba). *Virchows Arch. Abt. B Zellpath.* 1970; 6: 116-131.
- (113) Martin M.P., Roep B.O., Smit J.W., Autoimmunity in Addison's disease. *Neth J Med* 2002; 60: 269–275.
- (114) Masi A.T., Bijlsma J.W.J., Cutolo M. et al., Neuroendocrine, immunologic and microvascular systems interactions in rheumatoid arthritis: physiopathogenic and therapeutic perspectives. *Semin. Arthritis Rheum.* 1999; 29: 65–81.

- (115) Mastorakos G., Chrousos G.P., Weber J.S., Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1690–4.
- (116) Mastorakos G., Ilias I., Relationship between interleukin-6 (IL-6) and hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones in rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol.* 2000; 59: 75-9.
- (117) Mavragani C.P., Fragoulis G.E., Moutsopoulos H.M., Endocrine alterations in primary Sjogren's syndrome: an overview. *J Autoimmun.* 2012 Dec; 39: 354-8.
- (118) Mazzocchi G., Malendowicz L.K., Rebuffat P., Robba C., Gottardo G., Nussdorfer G.G., Short- and long-term effects of ACTH on the adrenal zona glomerulosa of the rat: a coupled stereological and enzymological study. *Cell Tissue Res* 1986; 243:303.
- (119) Miller W.L., Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol.* 2013; 379: 62-73.
- (120) Morand E.F., Leech M., Hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation of inflammation in rheumatoid arthritis. *Immunol Cell Biol.* 2001; 79: 395-9.
- (121) Moses H.L., Davis W.W., Rosenthal A.S., Garren L.D., Adrenal cholesterol: localization by electron-microscope autoradiography. *Science.* 1969; 163: 1203-5.
- (122) Nell V. et al., The benefit of very early referral and therapy with disease-modifying antirheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; 49: 334.
- (123) Nuki G., Bresnihan B., Bear M.B. et al., Long-term safety and maintenance of clinical improvement following treatment with anakinra (recombinant human interleukin-1 receptor antagonist) in patients with rheumatoid arthritis:

extension phase of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2838–2846.

- (124) Nussdorfer G.G., Cytophysiology of the adrenal cortex. *Int Rev Cytol.* 1986; 98: 1–395.
- (125) Nussdorfer G.G., Mazzocchi G., Long-term effects of ACTH on rat adrenocortical cells: a coupled stereological and enzymological study. *J Steroid Biochem* 1983; 19:1753.
- (126) Palacios G., Lafraga M., Chromaffin cells in the glomerular zone of adult rat adrenal cortex. *Cell Tissue Res* 1975; 164: 275–278.
- (127) Paleolog E.M., Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002; 4: 81-90.
- (128) Páth G., Bornstein S.R., Spáth-Schwalbe E. et al., Direct effects of interleukin-6 on human adrenal cells. *Endocr. Res.* 1996; 22: 867–873.
- (129) Pawalec G., Solana R., Immunosenescence. *Immunol. Today* 1997; 18: 514–516.
- (130) Pearson C.M., Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 91: 95-101.
- (131) Pedersen R. C., Cholesterol biosynthesis, storage, and mobilization in steroidogenic organs. In *Biology of Cholesterol*, ed. P. L. Yeagle. CRC Press Inc., 1986, pp. 39–68.
- (132) Perry C.G., Kane D.A., Lanza I.R., Neuffer P.D., Methods for assessing mitochondrial function in diabetes. *Diabetes* 2013; 62: 1041–1053.
- (133) Persellin R.H., Kittinger G.W., Kendall J.W., Adrenal response to experimental arthritis in the rat. *Am J Physiol* 1972; 222: 1545–9.

- (134) Pignatelli D., Magalhaes M.M., Magalhaes M.C., Direct effects of stress on adrenocortical function. *Horm Metab Res.* 1998; 30: 464–474.
- (135) Pincus T. E., Brooks R. H., Callahan L. F., Prediction of long- term mortality in patients with rheumatoid arthritis according to simple questionnaire and joint count measures *Ann. Intern. Med.*, 1994; 120: 26–34.
- (136) Poli G., Guasti D., Rapizzi E., Fucci R., Canu L., Bandini A., Cini N., Bani D., Mannelli M., Luconi M., Morphofunctional effects of mitotane on mitochondria in human adrenocortical cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 2013; 20: 537-50.
- (137) Prasad R., Kowalczyk J.C., Meimaridou E., Storr H.L., Metherell L.A., Oxidative stress and adrenocortical insufficiency. *J Endocrinol.* 2014; 221: 63-73.
- (138) Probert A.W., Schrier D.J., Gilbertsen R.B., Effects of anti-arthritic compounds on type II collagen-induced arthritis in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1984; 269: 167–76.
- (139) Pugner K. M., Scott D. I., Holmes J. W., Hieke K., The costs of rheumatoid arthritis: an international long- term view. *Semin. Arthritis Rheum.* 2000; 29: 305–320.
- (140) Racela A., Azarnoff D., Svoboda D.: Mitochondrial cavitation and hypertrophy in rat adrenal cortex due to aminoglutethimide. *Lab. Invest.* 1969; 21: 51-60.
- (141) Ramamoorthy H., Abraham P., Isaac B., Mitochondrial dysfunction and electron transport chain complex defect in a rat model of tenofovir disoproxil fumarate nephrotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol.* 2014; 28: 246-55.
- (142) Rashid T., Leirisalo- Repo M., Tani Y. et al., Antibacterial and antipeptide antibodies in Japanese and Finnish patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2004; 23: 134—141.

- (143) Rebuffat P., Cavallini L., Belloni A.S., Mazzocchi G., Coi A., De Tos G.P., Nussdorfer G.G., A morphometric study of the reversal of ACTH-induced hypertrophy of rat adrenocortical cells after cessation of treatment. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1989; 21: 73-81.
- (144) Rebuffat P., Kasprzak A., Andreis P.G., Mazzocchi G., Gottardo G., Coi A., Nussdorfer G.G., Effects of prolonged cyclosporine-A treatment on the morphology and function of rat adrenal cortex. *Endocrinology.* 1989; 125: 1407-13.
- (145) Rustin P., Chretien D., Bourgeron T., Wucher A., Saudubray J.M., Rötig A., Munnich A., An improved representation of enzyme activities for assesment of the mitochondrial respiratory chain. *Lancet* 1991; 338: 60.
- (146) Saada A., Bar-Meir M., Belaiche C., Miller C., Elpeleg O., Evaluation of enzymatic assays and compounds affecting ATP production in mitochondrial respiratory chain complex I deficiency. *Anal Biochem* 2004; 335: 66–72.
- (147) Sabatini D. D., DeRobertis E. D. P., and Bleichmar H. B., Submicroscopic study of the pituitary action on the adrenocortex of the rat. *Endocrinology* 1962; 70: 390-406.
- (148) Schellekens G.A., Visser H., de Jong B.A.W., van den Hoogen F.H.J., Hazes J.M.W., Breedveld F.C., van Venrooij W.J., The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 155–63.
- (149) Schett G., Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Osteoclasts. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: 203.
- (150) Schmidt R.F., Lang F., Heckmann M., *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie.* 31. Auflage 2010., Heidelberg, Seite 454-461

- (151) Schwarz W., Suchowsky G.K., Die Wirkung von Metopiron und Amphenon B auf die Nebennierenrinde der Ratte. *Virchows Arch. Path. Anat.* 1963; 337: 270-278.
- (152) Scott D.L., Symmons D.P., Coulton B.L., Popert A.J., Long-term outcome of treating rheumatoid arthritis: results after 20 years. *Lancet* 1987; 1: 1108-11.
- (153) Sekiyama S., Yago N., A study on the correlation between function and ultrastructure in the rat adrenal cortex. *Acta Pathol Jpn* 1972; 22: 77–98.
- (154) Seldin M., Amos C., Ward R., Gregersen P., The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999; 42: 1071–79.
- (155) Siemasko K. F. et al., Inhibition of JAK3 and STAT6 tyrosine phosphorylation by the immunosuppressive drug leflunomide leads to a block in IgG1 production. *J. Immunol.* 1998; 160: 1581–1588.
- (156) Silman A.J., MacGregor A.J., Thomson W. et al., Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 1993; 32: 903–7.
- (157) Silman A.J., Pearson J.E., Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2002; 4: 265–S272.
- (158) Smolen J.S., Aletaha D., Koeller M., Weisman M.H., Emery P., New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet* 2007; 370: 1861-74.
- (159) Smolen J. S. et al., Validity and reliability of the twenty- eight joint count for the assessment of rheumatoid arthritis activity. *Arthritis Rheum.* 1995; 38: 38–43.
- (160) Smolen J.S., Steiner G., Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discovery* 2003; 2: 473–88.

- (161) Solinas P., Fujioka H., Radivoyevitch T., Tandler B., Hoppel C.L., Aging effects on oxidative phosphorylation in rat adrenocortical mitochondria., *Mech Ageing Dev.* 2014;138: 10-4.
- (162) Stark K., Rovenský J., Blazicková S., Grosse-Wilde H., Ferencik S., Hengstenberg C., Straub R.H., Association of common polymorphisms in known susceptibility genes with rheumatoid arthritis in a Slovak population using osteoarthritis patients as controls. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11: 70.
- (163) Stark K., Straub R.H., Blazicková S, Hengstenberg C., Rovenský J., Genetics in neuroendocrine immunology: implications for rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1193: 10-4.
- (164) Straub R.H., Glück T., Cutolo M., Georgi J., Helmke K., Schölmerich J., Vaith P., Lang B., The adrenal steroid status in relation to inflammatory cytokines (interleukin-6 and tumour necrosis factor) in polymyalgia rheumatica., *Rheumatology (Oxford).* 2000; 39: 624-31.
- (165) Straub R.H., Günzler C., Miller L.E., Cutolo M., Schölmerich J., Schill S., Anti-inflammatory cooperativity of corticosteroids and norepinephrine in rheumatoid arthritis synovial tissue in vivo and in vitro. *The FASEB Journal* 2002; 16: 993-1000.
- (166) Straub R.H., Konecna L., Hrach S., Rothe G., Kreutz M., Schölmerich J., Falk W., Lang B., Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 2012-7.
- (167) Straub R.H., Paimela L., Peltomaa R., Schölmerich J., Leirisalo-Repo M., Inadequately 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: 654-62.



- (168) Straub R.H., Pongratz G., Cutolo M., Wijbrandts C.A., Baeten D., Fleck M., Atzeni F., Grunke M., Kalden J.R., Schölmerich J., Lorenz H.M., Tak P.P., Sarzi-Puttini P., Increased cortisol relative to adrenocorticotrophic hormone predicts improvement during anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 976-84.
- (169) Straub R.H., Pongratz G., Schölmerich J., Kees F., Schaible T.F., Antoni C. et al., Long-term anti-tumor necrosis factor antibody therapy in rheumatoid arthritis patients sensitizes the pituitary gland and favors adrenal androgen secretion. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1504-12.
- (170) Szabó D., Szalay K.S., Tóth I.E., Correlation of lipid droplet content and steroidogenic capacity in zona glomerulosa and fasciculata cells from lipoprotein-deficient rats. *Mol Cell Endocrinol.* 1984; 34: 59-66.
- (171) Taurog J.D., Arthritis in HLA-B27 transgenic animals. *Am J Med Sci* 1998; 316: 250-6.
- (172) Teitelbaum S.L., Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289: 1504-8.
- (173) Telleson W., Rheumatoid pneumoconiosis (Caplan's syndrome) in an asbestos worker. *Thorax* 1961; 16: 372.
- (174) Templ E., Koeller M., Riedl M., Wagner O., Graninger W., Luger A., Anterior pituitary function in patients with newly diagnosed rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1996; 35: 350-6.
- (175) ten Wolde S. et al., Randomised placebo-controlled study of stopping second-line drugs in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1996; 347: 347–352.
- (176) Tokar S.L., Koval L.M., Javorska O.M., Lukianets O.O., Ultrastructural characteristics of lipid droplets in rat adrenocortical cells from zona fasciculata-reticularis. *Physiol J (Kiev)* 2004; 50: 107–113.

- (177) Trentham D.E., Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 911–6.
- (178) Trentham D.E., Townes A.S., Kang A.H., Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977; 146: 857–68.
- (179) van der Heide A. et al., The effectiveness of early treatment with ‘second–line’ antirheumatic drugs: a randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 1996; 124: 699–707.
- (180) Visser H., Gelinck L.B., Kampfraath A.H. et al., Diagnostic and prognostic characteristics of the enzyme linked immunosorbent rheumatoid factor assays in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 157–161.
- (181) Voet D., Voet J.G. Pratt C.W., *Lehrbuch der Biochemie*; 2. Auflage, WILEY-VCH Verlag GmbH und Co. KGaA, Weinheim 2008, Seite 649-686.
- (182) Waksman B.H., Immune regulation in adjuvant disease and other arthritis models: relevance to pathogenesis of chronic arthritis. *Scand J Immunol* 2002; 56: 12–34.
- (183) Wang C.N., Liu Y.J., Duan G.L., Zhao W., Li X.H., Zhu X.Y., Ni X., CBS and CSE Are Critical for Maintenance of Mitochondrial Function and Glucocorticoid Production in Adrenal Cortex. *Antioxid Redox Signal.* 2014.
- (184) Webster E.L., Torpy D.J., Elenkov I.J., Chrousos G.P., Corticotropin-releasing hormone and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 840: 21-32.
- (185) Weksler-Zangen S., Aharon-Hananel G., Mantzur C., Aouizerat T., Gurgul-Convey E., Raz I., Saada A., IL-1 $\beta$  hampers glucose-stimulated insulin secretion in Cohen diabetic rat islets through mitochondrial cytochrome c oxidase inhibition by nitric oxide. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014; 306: 648-57.

- (186) Wilder R.L., Griffiths M.M., Cannon G.W., Caspi R., Gulko P.S., Remmers E.F., Genetic factors involved in central nervous system/immune interactions. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 493: 59-67.
- (187) Wilder R.L., Griffiths M.M., Cannon G.W., Caspi R., Remmers E.F., Susceptibility to autoimmune disease and drug addiction in inbred rats. Are there mechanistic factors in common related to abnormalities in hypothalamic-pituitary-adrenal axis and stress response function? *Ann. NY Acad. Sci.* 2000; 917: 784–96.
- (188) Williams R.O., Collagen-induced arthritis as a model for rheumatoid arthritis. *Methods Mol Med* 2004; 98: 207–16.
- (189) Williams J.M., Felten D.L., Sympathetic innervation of murine thymus and spleen: a comparative histofluorescence study. *The Anatomical Record* 1981; 199: 531-42.
- (190) Williams R.O., Malfait A.M., Butler D.M., Walmsley M.J., Feldmann M., Maini R.N., Combination therapy with DMARDs and biological agents in collagen-induced arthritis. *Clin Exp Rheum* 1999; 17: 115–20.
- (191) Wolfe F. E., Hawley, D. J., The longterm outcome of rheumatoid arthritis. Work disability: a prospective 18 year study of 816 patients. *J. Rheumatol.* 1998; 25: 2108–2117.
- (192) Wolff C., Krinner K., Schroeder J.A., Straub R.H., Inadequate corticosterone levels relative to arthritic inflammation are accompanied by altered mitochondria/cholesterol breakdown in adrenal cortex: a steroid-inhibiting role of IL-1 $\beta$  in rats. *Ann Rheum Dis.*
- (193) Wooley P.H., The usefulness and the limitations of animal models in identifying targets for therapy in arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2004; 18: 47–58.

- (194) Yelin E., Wanke L. A., An assessment of the annual and long- term direct costs: the impact of poor function and functional decline. *Arthritis Rheum.* 1999; 42: 1209–1218.
- (195) Yoshimura S., Asano K., Nakane A., Attenuation of collagen-induced arthritis in mice by salmon proteoglycan. *Biomed Res Int.* 2014.
- (196) Yoshimura F., Harumiya K., Watanabe M., Omoto T., Sekiguchi T., Functional significance of the tubular agranular endoplasmic reticulum in the adrenocortical cells of albino rats. *Endocrinol Jpn* 1968; 15:145–169.
- (197) Yoshino S., Schlipkpter E., Kinne R., Hunig T., Emmrich F., Suppression and prevention of adjuvant arthritis in rats by a monoclonal antibody to the a/b T cell receptor. *Eur J Immunol* 1990; 20: 2805–8.
- (198) Zimmermann R., Strauss J.G., Haemmerle G., Schoiswohl G., Birner-Gruenberger R., Riederer M., Lass A., Neuberger G., Eisenhaber F., Hermetter A., Zechner R., Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science.* 2004; 306: 1383-6.

## **8 Danksagung**

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Menschen bedanken, die mich während der gesamten Zeit an dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Straub für die Überlassung des Themas und Frau Dr. Christine Wolff für die allzeit sehr gute Betreuung.

Ein großes Dankeschön geht auch an Dr. Josef Schröder und Heiko Siegmund vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg für die Erstellung der elektronenmikroskopischen Bilder und die ausführliche Beantwortung aller Fragen zu diesem Thema.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Susanne Klatt, Luise Rauch, Madlen Meltzer und allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Straub für die Unterstützung und Hilfestellungen bei meiner Arbeit.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Katharina Krinner
Geburtsdatum	06.11.1987
Geburtsort	Regensburg
Nationalität	deutsch

### Schulbildung

1994-1998	Grundschule Pestalozzi in Regensburg
1998-2007	Albrecht- Altdorfer- Gymnasium in Regensburg
2007	Allgemeine Hochschulreife

### Studium

seit 2007	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
2009	erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit April 2010	Doktorarbeit am Universitätsklinikum Regensburg in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I bei Prof. Dr. R.H. Straub zum Thema: „Vergleichende Untersuchung und Bewertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Nebennieren gesunder und arthritischer Ratten“
Juni 2014	zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2014	Approbation als Ärztin

## **10 Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht worden.

Regensburg, April 2016

Katharina Krinner

## 11 Zugrunde liegende Publikation

Wolff C., Krinner K., Schroeder J.A., Straub R.H., Inadequate corticosterone levels relative to arthritic inflammation are accompanied by altered mitochondria/cholesterol breakdown in adrenal cortex: a steroid-inhibiting role of IL-1 $\beta$  in rats.