

4 Diskussion

4.1 Methoden

4.1.1 Analytik

Nach Vorarbeiten in der eigenen Arbeitsgruppe wurde zur Auftrennung von Kortisol und Kortison die Dünnschichtchromatographie (DC) benutzt, da gezeigt werden konnte, dass dieses Verfahren in Bezug auf seine Präzision zumindest gleichwertig der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)-Methode ist [66].

Obwohl die Methodik der Dünnschichtchromatographie zur Auftrennung der Steroide die eventuelle Bildung von Metaboliten nicht sicher erfassen kann, ist dies aus folgenden Gründen nur zu einem geringen Anteil möglich:

Erstens fand sich außerhalb der ausgeschnittenen Punkte nur geringe Mengen Radioaktivität auf der DC-Platte (max. 10 % der Gesamtaktivität) und keine Radioaktivität ($< 0,1$ %) im Laufmittel. Selbst beim Auftragen von zuvor mittels HPLC gereinigter Tracer gab es einen geringen Prozentsatz, der an der Auftragsstelle liegen blieb, so dass man dabei nicht unbedingt von anderen Metaboliten als F und E ausgehen kann.

Zweitens konnten vorherige Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass in Lebermikrosomen mit E als Substrat alternative Stoffwechselwege nur eine Bedeutung von $<10\%$ haben [30,61].

Natürlich könnte man vor allem in der Leber Metabolitenbildung der eingesetzten Substrate erwarten. Hauptmetabolite des F in Lebermikrosomen von Meerschweinchen sind neben Kortison (11 β HSD) vor allem 6 β -Hydroxy-F (6 β -Hydroxylase) [67]. Bisher wurde keine hepatische Ring-A-Reduktion von F beim Meerschweinchen gefunden [67] und die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die Ausscheidung von Tetrahydro-Metaboliten (THF, alloTHF und THE) im Urin beim Meerschweinchen um die Größenordnung 10^2 geringer ist im Vergleich zum Menschen (Normwerte bei Menschen: ca. 500-5000 μg /24h). Trotzdem bleibt unklar, ob die gemessenen Ring A reduzierten-Metaboliten in Serum und Urin des Meerschweinchens hepatische oder ausschließlich extrahepatische Metabolisierungswege darstellen. Gründe für die fehlende Ring A-Reduktion in den Gewebeschnitten im Vergleich zu den Beobachtungen *in vivo* könnte die größere Instabilität der Reduktasen im Vergleich

zur 11 β HSD sein, vor allem aber eine wesentlich höhere Affinität der 11 β HSD zu den Substraten.

4.1.2 Gewebepreparation und Inkubation

Bei den Homogenatuntersuchungen wurde versucht, optimierte pH-Bedingungen für die jeweilige Reaktion herzustellen. Basierend auf Literaturangaben wurde daher ein pH von 6,0 für die Reduktions- und ein pH von 8,5 für die Oxidationsreaktion gewählt [68,69,70]. Dies repräsentiert demnach nicht die Verhältnisse *in vivo* und lässt deshalb nur eingeschränkt Rückschlüsse auf die vorherrschende Reaktionsrichtung in einem bestimmten Gewebe zu.

Vergleicht man die Ergebnisse der Gewebeschnitte und der Homogenate in der Leber, so zeigt sich, dass das Vorherrschen der Reduktionsreaktion bei den Gewebeschnitten der Kontrolltiere (Oxidation 33,7%; Reduktion 50,2%; siehe Abschnitt 3.4) in den Homogenaten nicht mehr zu beobachten war (siehe Abschnitt 3.6.2). Dies demonstriert die bekannte Neigung der 11 β HSD1, bei zunehmender Homogenisierung des Gewebes eine vermehrte Dehydrogenase-Aktivität aufzuweisen, bzw. dies unterlegt, dass die Reduktase-Aktivität labil ist und bei der Homogenisierung zerstört wird [71, 37].

Interessanterweise waren die in den Schnitten der Leber beobachteten Unterschiede der Konversionsraten nach ACTH-Gabe nicht auf die Homogenatversuche übertragbar. Solch eine Konstellation wurde beim Meerschweinchen schon bei anderen steroidogenen Enzymen beobachtet [78]. Dieses Phänomen hat zu der Hypothese geführt, dass möglicherweise posttranskriptionelle Mechanismen eine Rolle in der Regulation einiger steroidogener Enzyme spielen, die dann bei der Homogenisierung und damit verbundenen Aufbewahrung bei -80°C verloren gehen. Außerdem kommen für diese Beobachtung ein instabiler Kosubstrat-Quotient und ein nicht mehr funktionierende An- und Abtransport von Substrat und Produkt in Betracht [37].

4.2 Versuchsprotokoll

In diesem Experiment wurden bei den Versuchstieren ein elementarer Teil der physiologischen Stressadaptation in Form einer dreitägigen ACTH-Injektionen simuliert. Hinsichtlich der Kortisolwerte kam es zu der erwünschten und hochsignifikanten Zunahme in Serum und Urin (siehe Tabelle 2 und 3). Man muss allerdings bedenken, dass die klassische endokrine Stresssituation zwar maßgeblich durch eine Kortisolerhöhung charakterisiert ist, es

aber zusätzlich noch zu einer Veränderung in vielen andere Hormonachsen kommt [72], die hier unberücksichtigt bleiben. Somit könnte es andere neuroendokrine Veränderungen geben, die ebenfalls einen Einfluss auf das hier untersuchte Enzym haben und dem Effekt des Kortisols entgegenwirken oder ihn möglicherweise verstärken.

Bereits einige Stunden nach intramuskulärer ACTH-Injektion beim Meerschweinchen kann man einen maximalen Anstieg der Serumkortisolwerte beobachten [75]. Trotzdem wurde in der vorliegenden Untersuchung ein Zeitraum von drei Tagen für die ACTH-Injektion gewählt, um einer eventuellen Änderung im Enzymexpressionsmuster die nötige Zeit zu geben.

In anderen Untersuchungen kam es nach 7-tägiger ACTH-Injektion zu einer Zunahme des Gewichts der Nebennieren und zu einer Aktivitätszunahme von den meisten steroidbildenden Enzymen der Nebennierenrinde [73, 74]. Auch in unserem Experiment kam es makroskopisch zu einer Zunahme der Nebennierengröße bei den über drei Tage mit ACTH behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.3 Serum

4.3.1 Glukokortikoide

Bei den mit NaCl behandelten Meerschweinchen (Kontrollgruppe) lagen die Serumwerte im Bereich von 500 nmol/l für F und 40 nmol/l für E und spiegeln damit die bekannten hohen GK-Konzentrationen des Meerschweinchens im Vergleich zu anderen Spezies wider (siehe auch Abschnitt 1).

In der Gruppe der Meerschweinchen, die über drei Tage mit ACTH behandelt worden waren, zeigten sich mehr als fünffach höhere GK-Werte für F (ca. 2700 nmol/l) und E (ca. 250 nmol/l). Diese Zunahme beweist die Wirksamkeit der ACTH-Injektion und zeigt darüber hinaus, dass die Haltung in Zweierkäfigen und die zweimal tägliche NaCl-Injektion der Kontrollgruppe nicht zu einer Stressreaktion mit entsprechenden endokrinen Veränderungen in der Hypophysen-Nebennieren-Achse führte. Allerdings hatten wir keine Vergleichsgruppe ohne Intervention bzw. Injektion, so dass theoretisch auch die Werte der Kontrollgruppe schon eine gestresste Situation repräsentieren könnten. Dagegen spricht die Analyse der 24h-Urine, die bei der Kontrollgruppe im Verlauf der dreitägigen NaCl-Injektion eine in der Tendenz eher abnehmende Menge an F und E zeigte (siehe auch Abschnitt 4.4). Wir

interpretieren diese Ergebnisse als eine zunehmende Eingewöhnung der Tiere an die neue Situation und als Beleg für einen ungestressten Zustand der Kontrollgruppe während der Injektionstage mit NaCl.

Im Vergleich mit anderen ähnlich konzipierten Experimenten zeigen sich vergleichbare hormonelle Veränderungen. Zum Beispiel berichtet Fenske *et al.* über Kortisolwerte um 260 nmol/l nach einmaliger NaCl-Injektion und 2420 nmol/l 4 Stunden nach einmaliger ACTH-Injektion (20 IU Synacthen depot[®]) [75]. Belanger *et al.* publizierten Kortisolwerte um 300 nmol/l bei unstimulierten Tieren und 5000 nmol/l eine Stunde nach einmaliger ACTH-Injektion [77]. In einer 30 Jahre alten Publikation mit vergleichbar schweren Meerschweinchen wurden Kortisolwerte im peripheren Plasma von 490 nmol/l gemessen [76]. Allerdings sind alle diese Werte im Plasma gemessen und deshalb naturgemäß etwas niedriger als die in unserer Studie gemessenen Serumwerte. Auch die zirkadiane Variation ist erheblich und muss bei diesem Vergleich der Hormonkonzentrationen berücksichtigt werden. Der Kortisolwert bei Meerschweinchen bewegt sich innerhalb eines Tages in einer Schwankungsbreite von 280 - 830 nmol/l [7]. Die hier vorgestellten Werte wurden 3h nach der letzten Injektion, also gegen 12.00 Uhr vormittags gewonnen. Zu dieser Zeit befand sich das Serumkortisol in der oben genannten Studie [7] zur zirkadianen Rhythmik bei ungefähr 690 nmol/l und liegt somit im selben Bereich der hier gemessenen F-Werte.

Kortisonwerte im Blut bei Meerschweinchen lassen sich in der Literatur nicht finden, liegen aber mit 40 nmol/l im Vergleich zum Menschen (circa 70 nmol/l) erstaunlicherweise etwas niedriger [39].

Bildet man einen Quotienten aus F durch E im Serum und vergleicht die ACTH-Gruppe mit der NaCl-Gruppe, blieb der Quotient im Wesentlichen unverändert und betrug ungefähr 15 bzw. 9 bei beiden Gruppen, je nach Bestimmungsmethode (Tabelle 2). Da beide Methoden die Gesamtkonzentration der Steroide im Serum messen, kann der geringe Unterschied nicht durch Bindungsphänomen erklärt werden.

Wenn man annimmt, dass das Verhältnis von F/E im Serum die Veränderungen im Gesamtorganismus und v.a. in Leber und Niere widerspiegelt, müsste man bei den ACTH-behandelten Tieren nach den Ergebnissen der Gewebeschnitte einen Anstieg erwarten.

Bei Patienten mit ektope ACTH-Syndrom konnte beobachtet werden, dass das Verhältnis von F/E im Serum ansteigt im Vergleich zur Normalpopulation [39]. Wieso dies bei den

Meerschweinchen nicht der Fall ist, obwohl wir eine hochsignifikante Zunahme der Reduktionsreaktion in Leber- und Nierenschnitten feststellen konnten, ist nicht offensichtlich. Möglicherweise wird die 11 β HSD in den Organen, in denen die Oxidation überwiegt (Kolon, Lunge, Nebenniere, Herz), unter ACTH-Einfluß auch aktiviert, so dass dadurch die vermehrte hepatische und renale Reduktion ausgeglichen wird. Aufgrund des Versuchsaufbaus können wir über diese Organe und ACTH induzierte Veränderungen der Enzymaktivität keine Aussage machen. Denn aus Kapazitätsgründen war es nicht möglich, unmittelbar nach der Tötung Gewebeschnittuntersuchungen an weiteren Organen durchzuführen.

4.3.2 Progesteron / 17 α -Hydroxy-Progesteron/ Androstendion

Sowohl Progesteron als auch 17 α -Hydroxy-Progesteron und Androstendion waren im Serum der Meerschweinchen nach dreitägiger ACTH-Gabe im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht (Tabelle 2).

In einer Arbeit, bei der vergleichbar mit unseren Experiment Meerschweinchen mit ACTH behandelt wurden [75], konnte ein Anstieg der Plasma-Progesteron Konzentrationen um das dreifache und entsprechend post mortem eine verstärkte adrenale Progesteron-Synthese gezeigt werden. Diese Ergebnisse sind -ebenso wie in anderen Arbeiten publizierte basale Serum-Konzentrationen [77; Progesteron: ca. 1 nmol/l, 17-OH-Progesteron: ca. 0,32 nmol/l]- in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen.

Interessanterweise war in unserer Studie bei den ACTH-behandelten Tieren nicht nur das Progesteron, sondern ebenfalls das 17 α -Hydroxy-Progesteron und das Androstendion deutlich erhöht. Diese beiden Schritte werden durch die 17 α -Hydroxylase (CYP17) katalysiert. Beim Meerschweinchen zeigt dieses Enzym eine Präferenz für Δ^4 Steroide (17 α -hydroxy-Prog) und eine nur geringe Aktivität für Δ^5 Steroide (17 α -hydroxy-Preg) [77]. In Einklang mit unseren Ergebnissen kommt es in einer anderen Untersuchung zu einer erhöhten mRNA Expression und Enzymaktivität der CYP17, allerdings ohne signifikanten Unterschied auf Proteinebene [78]. Es kommt also nach ACTH-Stimulation sowohl zu einer vermehrten Synthese von Prog als auch von 17-OH-Prog und Androstendion; letzteres offenbar durch posttranskriptionelle Mechanismen, die zu einer vermehrte Enzymaktivität der CYP17 führen.

Der Effekt von Progesteron und seiner Metabolite auf die 11 β -HSD wurde bereits in verschiedenen Arbeiten untersucht, wobei man vorwiegend einen hemmenden Einfluss auf

das Enzym zeigen konnte. An menschlichen Mikrosomenpräparationen von Nierenrinde war Progesteron der stärkste Inhibitor der 11 β -HSD2 ($IC_{50} = 4.8 \times 10^{-8}$ mol/L), wobei auch andere Progesteronmetabolite eine Hemmwirkung aufwiesen (unter anderem auch 17 α -OH-Progesteron) [79]. In anderen Untersuchungen [80] zeigte sich auch ein hemmender Einfluss auf das Isoenzym 11 β -HSD1 in menschlichen primären Leberzellkulturen, wobei sich dieser Effekt nicht auf Leberzellkulturen von Ratten übertragen ließ, so dass hier offenbar eine Spezies spezifische Regulation vorliegt und man die oben zitierten Daten nicht ohne Weiteres auf das Meerschweinchen übertragen kann.

4.4 Urin

In der hier vorgestellten Untersuchung zeigte sich nach dreitägiger ACTH-Injektion ein hochsignifikanter Anstieg der im Urin ausgeschiedenen Mengen sowohl von F als auch von E. In der Kontrollgruppe kam es dagegen tendenziell zu einem Abfall der Steroidmengen im Urin (Tabelle 3). Dies zeigt wiederum die bereits im vorherigen Abschnitt angesprochene Wirksamkeit der ACTH-Behandlung. Zudem ist der Abfall der Werte in der Kontrollgruppe ein Hinweis darauf, dass die Haltung und die Injektion von NaCl kein Stress per se in Form einer erhöhten F und E Produktion bei den Meerschweinchen auslöste.

Vergleicht man den Quotienten von F/E im Urin, der beim Meerschweinchen im Gegensatz zum Menschen (2:1) bei ungefähr 20:1 liegt, kommt es zu keiner signifikanten Veränderung nach ACTH-Injektion, sowohl im Vergleich zum Ausgangswert als auch im Vergleich mit der Kontrollgruppe. (Tabelle 4)

Wahrscheinlich ist der Quotient von F zu E beim Meerschweinchen nicht so aussagekräftig wie beim Menschen, da das basale E im Vergleich zum F sehr niedrig ist, so dass Veränderung hier nicht so gut erfasst werden können wie beim Menschen. Beim Menschen gilt die Messung des freien F und E und deren Verhältnis im Urin als Referenzmethode zur Bestimmung der renalen 11 β HSD(2)-Aktivität *in vivo* [81,82]. Allerdings ist dies nur bedingt auf das Meerschweinchen übertragbar, da in den Nieren dieser Spezies neben der 11 β HSD2 auch die 11 β HSD1 in signifikanten Mengen exprimiert wird und dementsprechende Enzymaktivitäten in Nierenschnitten und Mikrosomen darstellbar sind [33,30]. Somit kann man beim Meerschweinchen nicht davon ausgehen, dass das Verhältnis von F/E im Urin

alleine die renale Aktivität der 11 β HSD2 widerspiegelt, sondern eher den Summationseffekt beider gegensätzlich arbeitender Isoenzyme in der Niere reflektiert (siehe auch 4.5.3).

Das Verhältnis von Ring A-reduzierten Metaboliten von F und E im Urin (THF, alloTHF und THE) wird bestimmt durch die hepatische 11 β HSD, also die 11 β HSD1, da dies ein Prozess ist, der hauptsächlich in der Leber stattfindet [81]. In dieser Versuchsreihe kam es zu einem signifikanten Anstieg des Verhältnisses von THF/THE (Abbildung 4), wobei insgesamt die Ring A-Reduktion beim Meerschweinchen gering ausgeprägt ist. Dennoch ist diese Veränderung im Urin in Übereinstimmung mit der in den Leberschnitten beobachteten gesteigerten *in vivo* Aktivität der 11 β -HSD1.

Vergleichbare Ergebnisse, also ebenfalls einen Anstieg von THF/THE, konnte man bereits bei Patienten nach ACTH-Injektion finden [83]. Da dieser Effekt ebenfalls bei hohen Kortisolwerten und supprimiertem ACTH zu beobachten ist, lässt dies vermuten, dass es keine direkt ACTH-vermittelte Wirkung ist (siehe auch Abschnitt 4.5.2). Gestützt wird diese Beobachtung durch eine weitere Studie von Stewart *et al.* bei Cushing-Patienten [84]. Die erhöhte THF/THE Ratio, die bei allen Untersuchten - auch bei adrenalem Cushing- beobachtet wird, wurde auf eine Hemmung oder Substratüberladung der 11 β HSD2 zurückgeführt. Vor dem Hintergrund der hier präsentierten Ergebnisse könnte man als Ursache für dieses Phänomen vielmehr eine erhöhte 11 β HSD1 Aktivität in der Leber diskutieren. Das bedeutet, dass in Stresssituationen nicht nur die Nebenniere vermehrt F produziert, sondern auch die Leber !

Das Verhältnis von THE zu E im Urin gilt als ein Maß für die 5 β -Reduktase, da E ausschließlich ein Substrat für die 5 β -Reduktase, nicht aber die 5 α -Reduktase ist [85]. Dieses Verhältnis ist in der Meerschweinchengruppe nach 3-tägiger ACTH-Gabe signifikant erniedrigt (Abbildung 5; Seite 24), was auf einen hemmenden Effekt von ACTH oder ACTH-abhängigen Steroiden auf die 5 β -Reduktase hinweist. Eine Inhibition der 5 β -Reduktase in der Leber wäre ein durchaus sinnvolles Prinzip bei der Kortisolantwort in Stresssituationen, um den Abbau von GK zu verlangsamen und damit deren Halbwertszeit zu verlängern [86].

4.5 Gewebeschnitte

Mit den Untersuchungen an Gewebeschnitten wollten wir einen Versuchsaufbau wählen, der der *in vivo* Situation am nächsten kommt. Man weiß, dass die Aufarbeitung des Gewebes einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktionsrichtung der 11 β HSD1 hat [34-39]. Man muss daher davon ausgehen, dass die hier beobachteten Konversionsraten der Oxidation der 11 β HSD1 in Wirklichkeit niedriger anzusetzen sind und dass die hier vorgestellten Ergebnisse aus den oben angegebenen Gründen letztlich nur einen Hinweis auf die physiologische Situation darstellen und noch einer Bestätigung im *in vivo* Modell benötigen. Man kann allerdings erwarten, dass der hier gezeigte Effekt in der Leber mit Zunahme der Reduktion in Wirklichkeit noch ausgeprägter ist, als er hier bereits zur Darstellung kommt.

4.5.1 Lebergewebeschnitte

Bei den Tieren der Kontrollgruppe fand sich in den Gewebeschnitten der Leber eine stärkere Reduktionsreaktion als Oxidationsreaktion (50,2% vs. 33,7%; vgl. Abschnitt 3.4), wobei letztere eindeutig nachweisbar war. In der Meerschweinchenleber sind große Mengen 11 β HSD1-mRNA und deren Aktivität zu finden [33,61], wodurch die ausgeprägte Reduktionsreaktion in diesem Gewebe zu erklären ist.

Die in diesem Experiment beobachtete Oxidationsreaktion ist einerseits auf die bekannte Dehydrogenaseaktivität der 11 β HSD1 in Homogenaten zurückzuführen [37,71], andererseits könnte auch das bereits charakterisierte „dritte“ Isoenzym der 11 β HSD in der Leber, das als Dehydrogenase funktioniert [30], ursächlich sein.

Durch die 3tägige *in vivo* ACTH-Behandlung der Meerschweinchen stieg die Reduktaseaktivität in der Leber beträchtlich an, wohingegen die Dehydrogenaseaktivität abnahm (Abbildung 6 und Abbildung 7; Seite 25 und 26). Dadurch wurde das Reaktionsgleichgewicht eindeutig auf die 11-Hydroxy-Seite verschoben.

Die Zunahme der Reduktasereaktion in den Leberschnitten wird vermutlich verursacht durch eine Induktion bzw. Aktivierung der 11 β HSD1 und/oder einer Präferenz der Reduktasereaktion. Letzteres könnte ausgelöst sein durch eine Erhöhung des reduzierten Kosubstrats (NADPH) oder einen niedrigen intrazellulären pH durch die vermehrte anaerobe Glykolyse in Stresssituationen. Bei niedrigem pH (6,0) wird die Reduktasereaktion gegenüber der Dehydrogenasereaktion (pH 8,0) begünstigt [87].

Untersuchungen zur vermehrten mRNA-Expression der 11 β HSD1 nach GK-Gabe als Hinweis einer Enzyminduktion sind zum Teil widersprüchlich, so dass sicherlich dabei auch posttranskriptionelle Mechanismen eine Rolle spielen [37,88,90].

Die Abnahme der Oxidationsreaktion in der Leber nach dreitägiger *in vivo* ACTH-Behandlung könnte entweder Ausdruck der vermehrten Umwandlung des Produktes (E) durch die aktivierte 11 β HSD1 sein, oder es kommt zu einer Hemmung des oben bereits erwähnten dritten Isoenzym, so dass auch hieraus eine verminderte Oxidationsreaktion resultieren würde.

Dieser eindeutige Effekt, den die ACTH-Behandlung auf den Kortisolmetabolismus in der Leber des Meerschweinchens ausübt, ist sicherlich kein direkt ACTH vermittelter Mechanismus. Es konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine unmittelbare Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von ACTH (Synacthen[®]) keinen Einfluss auf eine der beiden Reaktionsrichtungen hat [61].

4.5.2 Regulation der 11 β HSD1 in der Leber

Es wurden bereits verschiedenste Modulatoren beider Isoenzyme der 11 β HSD beschrieben, u.a. Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone (z.B. Insulin, Dexamethason, Sexualsteroid, Thyroxin). Für eine genauere Darstellung verweisen wir auf eine kürzlich erschienene Übersichtsarbeit [71].

Die Frage ist, wodurch die 11 β HSD1 in Stresssituationen hochreguliert wird. Auf den ersten Blick könnte man vermuten, dass ACTH als trophes Hormon der Nebenniere auch für die Regulation der 11 β HSD in Stresssituationen zuständig ist. Allerdings konnte, wie oben bereits erwähnt, bei Inkubationsversuchen mit Gewebeschnitten der Leber und Niere gezeigt werden, dass ACTH keinen direkten Einfluss auf die 11 β HSD des Menschen oder des Meerschweinchens ausübt [89, 61]. Der Effekt muss vielmehr durch Kortisol selber oder durch andere ACTH-induzierte Steroide ausgelöst werden [37,90,91,95].

Einen Einfluss hat sicherlich auch das Redox-Potential in Form der Kosubstrat-Verhältnisse. Bekannt ist, dass NADP die Oxidation und NADPH die Reduktion durch 11 β HSD1 favorisiert [92]. Zudem scheint der pH einen Einfluss zu haben [92,69], wobei man hier, wie bei den Kosubstraten auch, von Veränderungen in zellulären Subkompartimenten ausgehen muss, weshalb in Versuchen mit intakten Zellen kein deutlicher Einfluss durch

Veränderungen des pH oder der Kosubstrate auf die 11 β HSD1-Aktivität beobachtet werden konnte [37].

4.5.3 Nierengewebeschnitte

Durch die dreitägige Behandlung der Meerschweinchen mit ACTH stieg wie auch in den Lebergewebeschnitten die Reduktaseaktivität an, während sich die Dehydrogenaseaktivität verringerte und sich damit das Gleichgewicht zu Gunsten von F verschob (Abbildung 8, Abbildung 9). Im Gegensatz zum Menschen finden sich beim Meerschweinchen in der Niere beide Isoformen der 11 β HSD [30]. Es ist anzunehmen, dass die hier beobachtete vermehrte Reduktion in den Nierenschnitten nach *in vivo* ACTH-Behandlung durch eine Zunahme der 11 β HSD1-Aktivität bedingt ist, da sich die 11 β HSD2 *in vivo* ausschließlich als Oxidase verhält. Dies ist neben den Ergebnissen in den Leberschnitten ein weiterer Hinweis für eine wichtige Rolle der 11 β HSD1 in der Stressanpassung beim Meerschweinchen.

Obwohl bekannt ist, dass auch die 11 β HSD2 durch GK induziert wird [93,94], scheint die Aktivierung der in der Niere exprimierten 11 β HSD1 zu überwiegen. Dies würde zu einer im Vergleich mit der Kontrollgruppe geringeren Dehydrogenaseaktivität führen, indem das entstehende E im Experiment vermehrt reduziert würde. Denkbar ist auch eine Inhibition der 11 β HSD2 durch die höheren Spiegel von Progesteron und seiner Metabolite in der ACTH-Gruppe (siehe auch 4.3.2).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die hier beschriebene experimentelle Stresssituation zu einer Aktivitätssteigerung der 11 β HSD1 führt und es dadurch zur verstärkten Aktivierung von inaktiven E in Leber und Niere kommt. Dass eines dieser Organe oder sogar beide auch eine Rolle bei der vermehrten Bereitstellung von systemischen F spielen, ist anzunehmen. Auch in anderen Organen, wie z.B. der Hippocampusregion, konnte man zeigen, dass chronischer Stress und GK Gabe bei Ratten zu einer Steigerung der Genexpression und Enzymaktivität der 11 β HSD1 führen [95]. Offenbar handelt es sich hier um ein ubiquitäres Prinzip im Rahmen der Stressregulation, das neben der oben angesprochenen systemischen, endokrinen Wirkung auch eine autokrine/parakrine Wirkung durch eine Aktivitätszunahme der 11 β HSD1 in unmittelbarer Nähe zum GK-Rezeptor in weiteren Organen haben könnte.

4.6 Homogenate

Die Homogenatversuche dienten einerseits mittels Zugabe von Kosubstrat zur Charakterisierung der verschiedenen Gewebe hinsichtlich ihrer Isoenzymexpression und andererseits zur Darstellung der hauptsächlichen Reaktionsrichtung des jeweiligen Gewebes. Einschränkend muss man jedoch sagen, dass die Reduktionsreaktion weniger stabil ist als die Oxidationsreaktion [70] und somit durch die Homogenisierung dieses Verhältnis verändert wird. Es wurde vorgeschlagen, die Oxidations- und Reduktionsreaktion unter optimierten Bedingungen zu messen und dann Rückschlüsse auf die vorwiegende Reaktionsrichtung zu machen [68].

4.6.1 Leber

In den Untersuchungen an Leberhomogenaten konnte man im Vergleich mit den anderen untersuchten Geweben einen auffällig hohen "Grundumsatz" von E zu F (= Reduktion) beobachten, der mehr als 10fach stärker ausgeprägt war als in den anderen Geweben (Tabelle 6). Diese Konversion ließ sich durch NADPH, nicht aber durch Zugabe von NADH steigern, so dass hier erwartungsgemäß eine ausgeprägte Aktivität der 11 β HSD1 vorliegt. Dies zeigt, dass neben der bekannten hohen Genexpression der 11 β HSD1 in der Leber des Meerschweinchens [33] auch in den von uns durchgeführten Homogenatuntersuchungen die Leber bei der Reduktion von E (=Aktivierung) eine herausragende Rolle im Organismus des Meerschweinchens spielt.

Die Oxidationsreaktion war in den Homogenatuntersuchungen der Leber ebenfalls stark ausgeprägt und lag sogar im selben Bereich wie die der Nierenhomogenate mit bekannt hoher Oxidaseaktivität (siehe auch Tabelle 6).

Nach Zugabe von NADP⁺ ließ sich eine signifikante Steigerung der Konversionsrate beobachten, so dass es sich durchaus um die bekannte *in vitro* Oxidaseaktivität der 11 β HSD1 nach Homogenisierung handeln könnte [96]. Allerdings war die Reaktion vor allem NAD⁺ abhängig (siehe Abbildung 11), obwohl eine Expression der 11 β HSD2 in der Leber bislang nicht als erwiesen gilt. Folglich zeigte sich hier viel eher die Aktivität des bereits charakterisierten dritten NAD⁺ abhängigen Isoenzym in der Leber des Meerschweinchens [30]. NAD⁺ abhängige Steigerung der Oxidationsreaktion in Meerschweinchen-

Mikrosomenpräparationen als Bestätigung für ein drittes Isoenzym in der Leber konnte kürzlich auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden [33].

4.6.2 Niere

In den Nierenhomogenaten von Rinde und Mark beobachteten wir eine hohe spontane Oxidaseaktivität, die sich unter Zugabe von NAD⁺ noch weiter steigern ließ, so dass es sich hierbei eindeutig um die Aktivität der 11 β HSD2 handeln muss (Abbildung 13 und 15). Da in anderen Spezies F eine gleich starke Affinität zu dem GK-R und MK-R hat, wäre es bei den hohen Kortisolspiegeln des Meerschweinchens anzunehmen, dass auch der MK-R, wie der GK-R, eine verminderte Affinität zu seinem Liganden aufweist. Dies ist allerdings nicht der Fall [97]. Diese normale Affinität von F zum Mineralokortikoidrezeptor verlangt daher die hier gezeigte hohe Aktivität der 11 β HSD2 in der Niere als Protektor vor einem mineralokortikoiden Exzess [5].

Offensichtlich und durch mehrfache Wiederholung des Experiments überprüft, kam es zu einer Hemmung der Reduktionsreaktion in den Homogenaten der Nierenrinde durch Zugabe von 10⁻³M NADH (Abbildung 12). Solch eine signifikante Hemmung einer Konversionsrate durch Zugabe von Kosubstrat ist in keiner anderen Versuchsreihe aufgetreten. In der Nierenrinde fallen *in vivo* durch die starke 11 β HSD2 Aktivität beträchtliche Mengen an NADH an. Da die Reduktion eine Funktion der 11 β HSD1 ist, scheint eine hohe Aktivität der 11 β HSD2 mit hoher NADH-Produktionsrate gleichzeitig die Rückreaktion von E nach F durch die 11 β HSD1 zu vermindern. Dieses ist im Sinne einer Optimierung der renalen Oxidationskapazität durchaus sinnvoll.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die nukleäre Translokation des menschlichen GK-R durch den Redox-Zustand reguliert wird, in dem Sinne, dass NADH zu einer Inhibition der Transkription führt [98]. Wenn dies auch beim MK-Rezeptor der Fall ist, besäße die 11 β HSD2 neben der Metabolisierung von F zu E zwei weitere Mechanismen, um den MK-R vor F zu schützen: einen Redox-Zustand durch Produktion von NADH herzustellen, so dass (1) die Reduktionsreaktion und (2) der MK-R als Transkriptionsfaktor gehemmt werden.

4.6.3 Lunge

In den Lungenhomogenaten der Meerschweinchen zeigte sich eine eindeutig durch NAD⁺-stimulierbare Oxidationsreaktion, was das Vorhandensein der 11 β HSD2 in diesem Gewebe nahe legt. Das Reaktionsgleichgewicht lag hierbei eindeutig auf Seite der Oxidation (Tabelle 6).

Weiterhin zeigte sich eine im Vergleich zur Oxidation eher mäßige, aber durch Hinzugabe von Kosubstrat stark stimulierbare, NADPH-abhängige Reduktionsreaktion, als Charakteristikum der 11 β HSD1. In der Lunge ließ sich in einer kürzlich publizierten Arbeit an Meerschweinchen mRNA dieses Isoenzym nachweisen [33].

Auch bei Homogenatversuchen an anderen Spezies überwog die Oxidationsreaktion in Lungengewebe [68]. Außerdem zeigte sich vergleichbar mit den hier vorgestellten Versuchen charakteristische Enzymaktivitäten beider Isoformen der 11 β HSD oder es gelang der Nachweis von mRNA beider Isoenzyme [99,100].

In isolierter perfundierter Rattenlunge wird E schnell zu F umgewandelt, wohingegen die Lungen nur eine geringe Aktivität in der Konversion von F zu E aufwiesen [101]. Setzt man die Ratten vor dem gleichen Experiment einer Stresssituation aus, kommt es zudem zu einem Anstieg der Reduktion [102]. Bei der Charakterisierung dieses Enzyms zeigt sich eine NADPH-Präferenz als Hinweis, dass es sich hierbei um die 11 β HSD1 handelt. Somit ist auch in der Lunge eine Zunahme der Reduktion durch vermehrte 11 β HSD1-Aktivität in Stresssituation zu vermuten.

4.6.4 Nebenniere

Bei den Untersuchungen zur Kosubstratpräferenz der Nebennierenhomogenate zeigte sich eine hohe Oxidationsreaktion, die sich durch Zugabe von Kosubstrat nicht steigern ließ (siehe Abbildung 19).

Ganz im Gegensatz dazu war die Reduktionsreaktion ohne Kosubstrat nur schwach ausgeprägt, ließ sich aber sehr deutlich durch Zugabe von Kosubstrat steigern. Dabei bestand allerdings kein signifikanter Unterschied dieses Effektes zwischen NADH und NADPH (siehe Abbildung 18). Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass beide Isoenzyme in der Nebenniere exprimiert werden, auch wenn mittels Kosubstrat keine eindeutige Charakterisierung gelang. Der Grund dafür ist vermutlich in der Enzymausstattung der Nebenniere zu suchen, da dort

viel oxidiertes NAD⁺/NADP⁺ anfällt und deshalb durch exogene Zugabe keine wesentliche Veränderung auftritt.

In der Nebenniere des Meerschweinchens konnte von Pu *et al.* größere Mengen mRNA der 11 β HSD1 nachgewiesen werden, wobei deren Funktion unklar ist. In Rattenversuchen konnte im Übergang vom Nebennierenmark zur Rinde deutliche 11 β HSD1-Expression nachgewiesen werden. Man vermutet, dass das Enzym dazu dient, hohe GK-Konzentration im Mark für die Katecholaminbiosynthese aufrechtzuerhalten [103, 104].

Der Nachweis von mRNA in Nebennieren gelang nicht mit einer 11 β HSD2-Sonde [33]. Allerdings wurde hierbei keine PCR zur Amplifizierung der extrahierten Nukleinsäuren verwendet, so dass die Ergebnisse das Vorhandensein der 11 β HSD2 nicht ausschließen.

In einer anderen Studie mit Meerschweinchen kam es nach 7-tägiger ACTH-Injektion bei eindeutig erhöhten Serumkortisolspiegeln nicht zu einer erhöhten Konzentration der intraadrenalen Kortisolkonzentration [73]. Dies wurde als Hinweis für einen hohen Turnover im Kortisol produzierenden Nebennierengewebe interpretiert. Andererseits lässt es auch Raum für eine Rolle der Leber bei der Aufrechterhaltung der hohen Serumkortisolspiegel durch vermehrte Reduktion (=Aktivierung) von zirkulierendem E. Interessant in diesem Experiment ist ebenfalls, dass es zwar zu einer Erhöhung der Aktivität verschiedener für die Steroidogenese essentiellen Enzyme in der Nebenniere kam, sich dies allerdings nicht durch eine Zunahme auf mRNA-Ebene widerspiegelte. Man nimmt deshalb post-transkriptionelle Mechanismen für den ACTH-vermittelten Effekt an.

Nach ACTH-Bolus erhöhte sich im Rattenversuch an *in situ* perfundierten Nebennieren die Sekretion von Corticosteron (entspricht F) im Vergleich zu Kontrolltieren, aber es verringerte sich die 11-Dehydrocorticosteron (entspricht E) Sekretion [105]. Diese Ergebnisse konnten nicht auf Mikrosomeninkubationsversuche (wobei lediglich die Oxidationsreaktion untersucht wurde) übertragen werden, weshalb die Autoren von einem indirekten, hemmenden Mechanismus durch ACTH auf die 11 β HSD2 ausgehen. Sie erwähnen aber nicht ausdrücklich die Möglichkeit, dass auch eine Hochregulation der 11 β HSD1 in der Nebenniere für die beobachteten ACTH Effekte verantwortlich sein könnte. Dies wäre ein weiterer Hinweis auf die in dieser Arbeit gezeigte 11 β HSD1 Aktivitätszunahme nach ACTH-Gabe.

4.6.5 Kolon

11 β HSD2-Aktivität in der Kolonschleimhaut des Menschen konnte bereits in den frühen 80er Jahren nachgewiesen werden [106]. Später erfolgte eine genauere Charakterisierung und Lokalisierung dieses Isoenzym im Epithel des Kolons [107,108].

In einer Untersuchung an intestinalem Rattenepithel wurde neben der Kolo-kalisation der 11 β HSD2 und des MK-R auch eindeutige Hinweise auf die Funktion des Enzyms gewonnen, und zwar dass es - wie auch in der Niere- Voraussetzung für die Aldosteron-Spezifität *in vivo* ist [109].

Im Kolon des Meerschweinchens ist in einer kürzlich veröffentlichten Studie erwartungsgemäß 11 β HSD2-mRNA in großen Mengen gefunden worden [33]. Es ließ sich zudem auch mRNA der 11 β HSD1 nachweisen, jedoch nur mit sehr sensitiven Methoden. Vergleichende Aktivitätsmessungen der 11 β HSD an Gewebeschnitten von verschiedenen Spezies, darunter auch dem Meerschweinchen, zeigten eine erhöhte Oxidaseaktivität im Kolon im Vergleich zu den nicht kortisol-resistenten Spezies [110]. Intraindividuell wurde die höchste Aktivität bei Meerschweinchen im Zökum und im distalen Kolon, den Aldosteron-sensitiven Abschnitten des Darms [111], gemessen. Auch in dieser Untersuchung fand sich keine Reduktaseaktivität im Kolon.

Die Ergebnisse der Kolonhomogenate in unserem Experiment zeigen ebenfalls ein eindeutiges Überwiegen der Oxidationsreaktion, die sich vor allem durch NAD⁺ induzieren ließ, eine charakteristische Eigenschaft der 11 β HSD2.

Die Konversionsraten der Reduktionsreaktion waren sehr niedrig. Obwohl sich eine gewisse Stimulierbarkeit unter Zugabe von Kosubstrat -allerdings NADH- zeigte, könnte es sich auch um eine nicht-enzymatische Umwandlung handeln. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Homogenatuntersuchungen zur Kosubstratpräferenz anderer Arbeitsgruppen [110].

Demnach bestätigt sich auch beim Meerschweinchen die Expression und Aktivität der 11 β HSD2 im Kolon, wobei sie offenbar im Vergleich zu anderen Spezies eine erhöhte Aktivität aufweist. Das ist physiologisch durchaus sinnvoll, um den MK-R vor den extrem hohen Kortisolwerten dieser kortisol-resistenten Art zu schützen. Die geringe/fehlende Reduktaseaktivität weist daraufhin, dass es keine relevante 11 β HSD1 Aktivität im Kolon gibt, trotz des Nachweises von 11 β HSD1-mRNA.

4.6.6 Herz

Bei den Inkubationsversuchen der Herzhomogenate zeigte sich ein eindeutiges Überwiegen der Oxidationsreaktion bei niedriger Reduktionsreaktion (15% vs. 7% ohne Kosubstrat; Tabelle 6).

Diese niedrige Reduktionsrate bei 60 minütiger Inkubation und hoher Homogenatkonzentration (200µl) ließ sich auch nach Zugabe von Kosubstrat nicht steigern (Abbildung 17). Daher ist allenfalls von einer sehr niedrigen 11βHSD1-Aktivität in diesem Gewebe auszugehen. In einer kürzlich publizierten Arbeit konnte dementsprechend zwar 11βHSD1-mRNA im Herz von Meerschweinchen nachgewiesen werden, allerdings lediglich mittels der äußerst sensitiven RT-PCR/Southern Blot-Analyse [33]. Ob dieses Vorhandensein der mRNA bei Meerschweinchen auch mit einer Reduktaseaktivität *in vivo* einhergeht, lässt sich durch die hier vorgestellten Ergebnisse eher bezweifeln.

Die Oxidationsreaktion hingegen, also die Inaktivierung von F zu E, war deutlich NAD⁺-abhängig und auch schon ohne Zugabe von Kosubstrat ausgeprägt. Dies deutet auf das Vorhandensein der 11βHSD2 im Herzen des Meerschweinchens hin.

Größere Mengen von 11β-HSD2-mRNA konnten in einer kürzlich publizierten Studie im Herzen von Meerschweinchen jedoch nicht gefunden werden [33], so dass auch diskutiert werden muss, ob die beobachtete Oxidationsaktivität im Herz wie in der Leber auch durch ein drittes Isoenzym (NAD⁺-abhängig) bedingt ist. Dies könnte dann mit Proben für die 11βHSD2 molekularbiologisch nicht detektiert werden und würde die oben beschriebenen Befunde mit der eindeutigen Oxidationsreaktion in unserem Experiment erklären.

Bei Inkubationsversuchen mit Rattenherzhomogenaten und auch bei *in-situ*-Hybridisationsexperimenten konnte man keine bzw. nur eine sehr geringe Oxidaseaktivität nachweisen [60, 112]. Der Nachweis von 11βHSD1 mRNA oder eine Reduktionsreaktion bei Rattengewebe gelang bislang nicht [31, 50].

Bei verschiedenen Untersuchungen an menschlichem Gewebe konnte man im Gegensatz zu den Untersuchungen an Ratten 11βHSD2-mRNA [113] und auch vergleichbar mit den hier präsentierten Ergebnissen beim Meerschweinchen eine unidirektionale Enzymaktivität nachweisen [114,115].

Es wird vermutet, dass diese unterschiedlichen Beobachtungen eine Spezies-spezifische Variation darstellen [116]. Beim Meerschweinchen erscheint eine hohe 11βHSD2-Aktivität

zumindest physiologisch sinnvoll, um den MK-R, der im Gegensatz zum GK-R eine unveränderte Affinität zu F besitzt [97], vor einem Überangebot an F zu schützen und eine Aldosteronselektivität zu gewährleisten. Zusammen mit dem nachgewiesenen MK-R im Herz [97] und den hier präsentierten Ergebnissen, lässt sich eine selektive Aldosteronwirkung (z.B. Fibroseinduktion [117], Regulation von Ionenporter [118]) auf kardiales Gewebe auch beim Meerschweinchen postulieren.