

Aus der Medizinischen Klinik IV,  
Abteilung Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin des  
Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin

Leiter: Prof. Dr. med. A. F. H. Pfeiffer  
(ehem. Prof. Dr. W. Oelkers)

Bestimmung der agonistischen und antagonistischen Potenz von  
Progesteronmetaboliten am menschlichen Mineralocorticoidrezeptor  
*in vitro* sowie der antimineralocorticoiden Potenz des Progesterons  
und des menschlichen Progesteronmetabolismus *in vivo*

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
des Fachbereichs  
Humanmedizin  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Bernhard Meyer  
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. Wolfgang Oelkers

Korreferent: Prof. Dr. Friedrich Körber

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin  
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 05.09.2003

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	DIE REZEPTORFAMILIE DER CORTICOSTEROIDE	1
1.2	LOKALISATION UND FUNKTION DES MINERALOCORTICOIDREZEPTORS	2
1.3	CORTISOL, PROGESTERON UND ALDOSTERON AM MINERALOCORTICOIDREZEPTOR	6
1.4	PROGESTERONMETABOLITE	9
1.4.1	<i>Progesteronmetabolismus</i>	9
1.4.1.1	Hepatischer und extrahepatischer Progesteronmetabolismus	10
1.4.1.2	Renaler Progesteronmetabolismus	13
1.4.2	<i>Biologische Aktivität der Progesteronmetabolite</i>	15
1.4.2.1	PR-unabhängige biologische Aktivität von Progesteronmetaboliten	15
1.4.2.2	Bindung von Progesteronmetaboliten am Mineralocorticoidrezeptor	17
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALIEN</b>	<b>22</b>
3.1	TRANSAKTIVIERUNGSVERSUCHE	22
3.1.1	<i>Steroide</i>	22
3.1.2	<i>Plasmide</i>	23
3.1.3	<i>Transformation, Bakterienkultur und Plasmidpräparation</i>	23
3.1.4	<i>Restriktionsanalyse und Gelelektrophorese</i>	24
3.1.5	<i>Zellkultur, Transfektion und Lumineszenzmessung</i>	25
3.2	REZEPTORBINDUNGSSTUDIEN	26
3.3	PROGESTERONINFUSIONSSTUDIE	27
3.4	GERÄTE	30
3.5	GEFÄßE UND VERBRAUCHSMATERIAL	32
<b>4</b>	<b>METHODEN</b>	<b>34</b>
4.1	TRANSAKTIVIERUNGSVERSUCHE	34
4.1.1	<i>Versuchskonzept der Transaktivierungsversuche</i>	34
4.1.1.1	Beschreibung der verwendeten Plasmide	36
4.1.1.2	CV-1 Zellen	38
4.1.2	<i>Experimentelle Durchführung der Transaktivierungsversuche</i>	38
4.1.2.1	Herstellung der Plasmide	38
4.1.2.2	Zellkultivierung	40
4.1.2.3	Transfektion	42
4.1.2.4	Inkubation	42
4.1.2.5	Lysieren der Zellen und Messung der Lumineszenz	43
4.1.3	<i>Statistische Auswertung der Ergebnisse</i>	44
4.1.3.1	Agonismus	44
4.1.3.2	Antagonismus	46
4.2	REZEPTORBINDUNGSSTUDIEN	47
4.2.1	<i>Versuchskonzept der Rezeptorbindungsstudien</i>	47
4.2.1.1	Scatchard-Experiment	47
4.2.1.2	Kompetitionsversuche	49
4.2.1.3	Beschreibung des Plasmids pchMR	49
4.2.2	<i>Experimentelle Durchführung der Rezeptorbindungsstudien</i>	50
4.2.2.1	Herstellung der Puffer und Lösungen	50
4.2.2.2	Herstellung des hMR	50

4.2.2.3	Scatchard-Experiment .....	51
4.2.2.4	Kompetitionsversuche .....	51
4.2.3	<i>Statistische Auswertung der Ergebnisse</i> .....	52
4.2.3.1	Scatchard-Experiment .....	52
4.2.3.2	Kompetitionsversuche .....	53
4.3	PROGESTERONINFUSIONSSTUDIE .....	55
4.3.1	<i>Konzeption der Progesteroninfusionsstudie</i> .....	55
4.3.2	<i>Probanden</i> .....	55
4.3.3	<i>Herstellung der Infusionslösungen</i> .....	56
4.3.3.1	Herstellung der Progesteroninfusionslösung .....	56
4.3.3.2	Herstellung der Aldosteroninfusionslösung .....	57
4.3.4	<i>Durchführung und Ablauf der Studie</i> .....	57
4.3.4.1	Glucocorticoid- und Mineralocorticoid-Substitutionstherapie .....	57
4.3.4.2	Verabreichung der Aldosteron- und Progesteroninfusion .....	57
4.3.4.3	Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme während der Studie .....	57
4.3.4.4	Blutentnahmen .....	58
4.3.4.5	Urinproben .....	58
4.3.4.6	Kreislaufüberwachung .....	58
4.3.5	<i>Analyseverfahren</i> .....	59
4.3.5.1	Natrium, Kalium, Chlorid .....	59
4.3.5.2	Kreatinin, SHBG, Albumin .....	59
4.3.5.3	Renin .....	59
4.3.5.4	Aldosteron, Progesteron, 17 $\alpha$ -OH-Progesteron, DHEA, Androstendion, Estron, Testosteron, DOC .....	59
4.3.5.5	Prednisolon, Prednison .....	60
4.3.6	<i>Statistische Auswertung der Ergebnisse</i> .....	60
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>61</b>
5.1	TRANSAKTIVIERUNGSVERSUCHE .....	61
5.1.1	<i>Agonistische Potenz</i> .....	61
5.1.2	<i>Antagonistische Potenz</i> .....	63
5.2	REZEPTORBINDUNGSSTUDIEN .....	66
5.2.1	<i>Scatchard-Experiment</i> .....	66
5.2.2	<i>Kompetitionsversuche</i> .....	66
5.3	PROGESTERONINFUSIONSSTUDIE .....	69
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>77</b>
6.1	DISKUSSION DER METHODEN .....	77
6.1.1	<i>Transaktivierungsversuche</i> .....	77
6.1.1.1	CV-1-Zelllinie .....	77
6.1.1.2	Transfektion .....	77
6.1.1.3	Inkubation der Zellen mit den Steroiden .....	78
6.1.2	<i>Rezeptorbindungsstudie</i> .....	78
6.1.3	<i>Progesteroninfusionsstudie</i> .....	79
6.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE .....	81
6.2.1	<i>Antimineralocorticoide Eigenschaften des Progesterons am hMR</i> .....	81
6.2.2	<i>Die molekulare Struktur des hMR</i> .....	82
6.2.3	<i>Transaktivierungs- und Kompetitionsversuche</i> .....	82
6.2.3.1	Cortisol am hMR .....	82
6.2.3.2	DOC am hMR .....	83

6.2.3.3	Progesteron am hMR.....	84
6.2.3.4	17 $\alpha$ -OH-Progesteron und 17 $\alpha$ -OH,20 $\alpha$ -DH-Progesteron am hMR .....	84
6.2.3.5	5 $\alpha$ -DH-Progesteron und 5 $\beta$ -DH-Progesteron am hMR.....	85
6.2.3.6	20 $\alpha$ -DH-Progesteron am hMR.....	86
6.2.3.7	11-, 6- und 16-hydroxylierte Progesteronmetabolite am hMR .....	86
6.2.3.8	Ring-A-reduzierte Metabolite am hMR .....	87
6.2.4	<i>Infusionsstudie</i> .....	88
6.2.4.1	Elektrolyt- und Wasserekkretion unter Progesteron .....	88
6.2.4.2	Extraadrenaler Metabolismus von Progesteron.....	90
6.2.4.3	Metabolisierung von Progesteron zu DOC .....	91
6.2.4.4	Inhibition der 11 $\beta$ -HSD Typ 2 .....	91
6.2.4.5	Müdigkeit unter der Progesteroninfusion.....	92
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>100</b>
<b>10</b>	<b>ABBILDUNGS-, GLEICHUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>114</b>
10.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	114
10.2	GLEICHUNGSVERZEICHNIS .....	115
10.3	TABELLENVERZEICHNIS .....	115
<b>11</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>116</b>
<b>12</b>	<b>DANKSAGUNGEN .....</b>	<b>117</b>