

6 Diskussion

Im Rahmen der Diskussion sollen zunächst die zu beachtenden Aspekte der angewandten Methoden zur Sprache kommen. Im sich anschließenden Kapitel 6.2 werden die gewonnenen Ergebnisse diskutiert.

6.1 Diskussion der Methoden

6.1.1 Transaktivierungsversuche

6.1.1.1 CV-1-Zelllinie

Die CV-1-Zelllinie entstammt der Niere einer männlichen erwachsenen afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) und wurde 1964 von F. C. Jensen et al. zu Transformationszwecken mit dem Rous Sarcoma Virus kultiviert[68]. Die Zellen bilden in der Zellkultur flächige fibroblastenartige Zellrasen und sind daher besonders für Transfektionszwecke geeignet. Im Rahmen von Transfektionsversuchen mit Steroidrezeptoren und deren Reporterplasmiden wurden die CV-1-Zellen bereits häufig verwendet, da sie keinen eigenen Glucocorticoidrezeptor exprimieren[138, 30]. Eine Expression des MR in CV-1-Zellen wurde bisher nicht beschrieben. Die durchgeführten Inkubationen mit Aldosteron und Cortisol der nur mit den Reporterplasmiden transfizierten Zellen zeigten jedoch keine von der Basalexpression abweichenden Transaktivierungsquotienten. Hieraus lässt sich ableiten, dass die CV-1-Zellen keinen MR exprimieren bzw. in der Zelle möglicherweise exprimierte Rezeptoren nicht an das Reporterplasmid binden bzw. hier zu keiner Transaktivierung führen.

Bisher wurde die Enzymausstattung der CV-1-Zellen im Hinblick auf den Progesteronmetabolismus noch nicht charakterisiert, eine mögliche Metabolisierung der in den Inkubationen verwendeten Steroide lässt sich daher nicht sicher ausschließen. Um den möglichen Einfluss einer Metabolisierung gering zu halten, wurden große (1ml) Inkubationsvolumina gewählt.

6.1.1.2 Transfektion

Bei den hier durchgeführten Transaktivierungsversuchen wurde einer Zelllinie durch Transfektion die Plasmid-DNA des hMR sowie zweier Reporterplasmide zugeführt. Durch diese Versuchskonzeption ist es möglich, Aussagen über die biologische Aktivität der zugeführten Substanzen am untersuchten Rezeptor und seinem zugehörigen Reporterplasmid im verwendeten System zu machen. Da die Transfektionseffizienz nicht konstant ist, wurde

als Maß für die Transaktivierung der Quotient aus der Aktivität der induzierbaren Firefly-Luciferase und der konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase gebildet.

Eine Einschränkung des Modells besteht darin, dass das cytosolische Umfeld in der gewählten Gastzelle nicht der menschlichen Zelle entspricht; einen derartigen Aspekt stellt z. B. die Bindung des hMR an die Hitzeschockproteine im Cytosol dar. Auch der Prozess der Transaktivierung entspricht nicht dem, der in der menschlichen Zelle stattfindet. Da die rezeptorresponsiblen Elemente auf dem Reporterplasmid im Zytoplasma und nicht in der normalerweise kondensierten DNA des Zellkerns liegen, entfallen Vorgänge wie die Wanderung in den Zellkern und im Vorfeld der Bindung an die DNA stattfindende Prozesse. Das Modell stellt somit nur eine Näherung an die physiologischen Prozesse in der menschlichen Zelle dar. Aussagen sind nur für den Aspekt der Bindung eines Steroids an den Rezeptor und die unter den gegebenen Bedingungen erreichte Transaktivierung oder Hemmung der Transaktivierung im Vergleich zu anderen eingesetzten Steroiden im verwendeten Zell- bzw. Transfektionsmodell möglich.

6.1.1.3 Inkubation der Zellen mit den Steroiden

Sowohl in den Transaktivierungsversuchen als auch in den Rezeptorbindungsversuchen wurden die Steroide in Konzentrationen von 10^{-11} mol/l bis 10^{-6} mol/l eingesetzt, um zu erreichen, dass der gewählte Konzentrationsbereich die physiologisch auftretenden Steroidkonzentrationen abdeckt und die Konzentrationen in den zwei Versuchsansätzen vergleichbar sind. Hierzu wurde je Steroid einmalig eine Stammlösung mit einer Konzentration des Steroids von 10^{-3} mol/l in Ethanol hergestellt und für alle durchgeführten Versuche verwendet, um systematische Fehler durch unterschiedliche Konzentrationen des Steroids auszuschließen.

6.1.2 Rezeptorbindungsstudie

Scatchard-Experiment

Die gebräuchliche Bezeichnung des hier beschriebenen Experiments als Scatchard-Experiment geht auf die historisch gewählte Art der Analyse der gewonnenen Daten zurück[131]. Vor den Zeiten der computergestützten und weit verbreiteten nichtlinearen Regression wurden die Werte im sogenannten Scatchard-Plot linearisiert und daraus der K_d -Wert ermittelt. Die Prämisse der linearen Regression, dass die Standardabweichung unabhängig von X ist, ist jedoch nicht gegeben, auch die Berechnung von Y aus X im Scatchard-Plot widerspricht den Voraussetzungen der linearen Regression.

Es wurde daher die computergestützte nichtlineare Regression als iteratives Verfahren unter Verwendung der GraphPad[®] Prism[®] 3.0-Software zur Ermittlung der Konzentrations-Bindungs-Kurve und somit zur Berechnung des K_d -Wertes eingesetzt.

Der vorbeschriebene K_d -Wert von [³H]Aldosteron am hMR beträgt 0,8 – 3nmol/l[90, 7, 84, 15], wobei die Versuche entweder an zerstörten oder intakten Zellen durchgeführt wurden. In unseren Experimenten wurde ein K_d -Wert für Aldosteron von 5,2 nmol/l in einem zellfreien System ermittelt. Dieses zellfreie System entspricht nicht genau den *in vivo*-Bindungsbedingungen, da die Bindungsaffinität durch Interaktionen des Rezeptors mit Hitzeschockproteinen beeinflusst wird, die in intakten Zellen oder Zelllysaten enthalten sind, hier aber nicht. Daher müssen die gemessenen Bindungsaffinitäten unter Berücksichtigung dieser Tatsache vorsichtig interpretiert werden. Für eine recht gute Annäherung an die *in vivo*-Bedingungen spricht jedoch, dass für keine der untersuchten Substanzen eine wesentliche Diskrepanz zwischen Bindungsaffinität und Transaktivierung bzw. Hemmung der Transaktivierung besteht.

Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass Diskrepanzen der K_d - und K_i -Werte zwischen den verschiedenen Laboratorien möglicherweise auf Unterschiede in der Inkubationszeit, den Berechnungsverfahren und die Tatsache, dass lipophile Steroide (wie z. B. Progesteron) sehr leicht an Glas oder Plastik haften, zurückzuführen sind[122, 106, 138, 84].

6.1.3 Progesteroninfusionsstudie

Im Rahmen der Progesteroninfusionsstudie wurden Patienten ohne Nebennierenrindenfunktion als Probanden gewählt. Der entscheidende Vorteil beim vorliegenden Studiendesign gegenüber gesunden Probanden liegt in der eingeschränkten gegenregulatorischen Antwort auf von außen hervorgerufene Störungen der Elektrolyt- und Wasserhomöostase. Da neben den männlichen Probanden nur postmenopausale Frauen in die Studie eingeschlossen wurden, waren des weiteren bei allen Probanden sehr niedrige Progesteronkonzentrationen zum Beginn der Studie zu erwarten, was sich wie dargestellt bestätigte.

Als Parameter für den Grad der Aktivierung bzw. Hemmung des Mineralocorticoidrezeptors steht die Natrium- und Kaliumexkretion bzw. der daraus berechnete Natrium/Kalium-Quotient zur Verfügung. Um jedoch innerhalb einer akzeptablen Zeit Veränderungen in der Elektrolytexkretion feststellen zu können, muss die Bestimmung der Ausscheidung pro Zeit in möglichst kleinen Zeitabständen erfolgen. Die Anlage eines Dauerkatheters als optimale Möglichkeit, das Zeitintervall der Elektrolytexkretionsbestimmung zu minimieren, schied

jedoch auf Grund der verständlicherweise fehlenden Akzeptanz durch die Probanden aus. Als Kompromiss des praktisch Machbaren und des Erwünschten wurde daher bei dieser Studie eine etwas großzügiger bemessene festgesetzte Trinkmenge pro Stunde von 250ml gewählt, um ein halbstündliches Entleeren der Blase zu ermöglichen. Als Nachteil aus der gesteigerten Trinkmenge resultiert die Einschränkung der Beurteilbarkeit der Steigerung der Urinausscheidung pro Zeit. Ob diese mehr durch die Trinkmenge oder durch die Progesteroninfusion hervorgerufen wurde, lässt sich nicht beurteilen.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Antimineralocorticoide Eigenschaften des Progesterons am hMR

Während der Schwangerschaft steigt die Konzentration des hMR-Antagonisten Progesteron im Plasma stark an und überschreitet die Konzentration von Aldosteron im Plasma um das 100fache[69, 123, 108], wobei dieser Überschuss durch die stärkere Proteinbindung des Progesterons auf das etwa 10fache vermindert wird[37]. Der antimineralocorticoide Effekt von Progesteron wird *in vivo* durch fortschreitende Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) deutlich[109]. Zwei weitere Beobachtungen deuten auf die antimineralocorticoide Eigenschaften des Progesterons hin:

- Unsere Arbeitsgruppe betreute mehrere Frauen mit M. Addison in der Schwangerschaft. Bei diesen Frauen musste im Verlauf der Schwangerschaft die Tagesdosis der Mineralocorticoidsubstitution (durch 9α -Fluoro-cortisol) laufend gesteigert werden, um den Blutdruck und das Serum-Kalium im Referenzbereich zu halten[110].
- Bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus normalisieren sich der Blutdruck und die Kaliumkonzentration im Serum in der Schwangerschaft häufig, wobei nach der Entbindung die Hypokaliämie und die arterielle Hypertension wieder auftreten[110, 105].

Da die antimineralocorticoide Effekte von Progesteron *in vivo* moderat erscheinen, stellte unsere Arbeitsgruppe die Hypothese auf, dass Progesteron im MC-Zielgewebe, analog zur Inaktivierung des Cortisols zu Cortison durch die 11β -HSD Typ 2, enzymatisch durch Metabolisierung inaktiviert wird und identifizierte so ein potentes und effizientes Enzymsystem in männlichen und weiblichen prä- und postmenopausalen menschlichen Nieren[118, 117]. Progesteron wurde in großem Maße (sogar bei hohen Progesteronkonzentrationen von 10^{-6} mol/l) zu 20α -DH-Progesteron, 17α -OH-Progesteron, 17α -OH, 20α -DH-Progesteron, 5α -DH-Progesteron, 20α -DH, 5α -DH-Progesteron, $3\beta,5\alpha$ -TH-Progesteron und anderen Ring-A-reduzierten Metaboliten umgewandelt[118]. In dieser Arbeit wurden das Bindungsverhalten sowie die agonistischen und antagonistischen Eigenschaften der Progesteronmetabolite am hMR bestimmt, auf die im folgenden Kapitel 6.2.2 eingegangen wird. In der Progesteroninfusionsstudie wurde die antimineralocorticoide Wirkung parenteral verabreichten Progesterons *in vivo* bestimmt (Kapitel 6.2.3).

6.2.2 Die molekulare Struktur des hMR

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde der hMR noch nicht kristallisiert. Bisher vorliegende Konzepte zur Funktion des hMR wurden in Analogie zur Kristallstruktur des menschlichen Progesteronrezeptors durch dreidimensionale computergestützte Simulation entwickelt [43, 42, 62, 61, 121]. Aus diesen theoretischen Überlegungen und vorliegenden Untersuchungen am verkürzten oder mutierten hMR lassen sich einige Aspekte der Bindung eines Steroids an den hMR beschreiben [43, 42, 62, 61, 121], die im Folgenden dargestellt werden.

Um agonistische und antagonistische Effekte zu vermitteln, ist die Bindung an den hMR Voraussetzung. An der Bindung eines Liganden an den hMR scheinen zumindest zwei Regionen (Site I und Site II) des hMR beteiligt zu sein.

In der Ligandenbindungsdomäne (LBD) des hMR interagiert die Site I (bestehend aus Helix H3 und H5) mit der C3-Ketogruppe eines Steroids sowohl bei agonistischer als auch bei antagonistischer Aktivität des Liganden. Site II bindet an Ring D des Steroids durch mehrere Bindungen, wobei dies nur bei Agonisten der Fall ist.

Durch die agonistische Bindung biegen sich die Helices H12 und H3 in Richtung LBD, und durch die Konformationsänderung werden Bindungsstellen für Cofaktoren freigelegt. Die Stabilität von Helix H12 und Helix H3 in diesem aktivierten Zustand ist kritisch für die agonistische Aktivität [62, 61, 44]. Mutationen in der LBD können zu Konformationsänderungen des hMR und zu vollständig unterschiedlichem Agonisten- und Antagonistenverhalten führen, wie z. B. zur konstitutiven Aktivierung des hMR und zu einer starken Aktivierung durch Antagonisten des ursprünglichen hMR wie Spironolacton oder Progesteron [55].

6.2.3 Transaktivierungs- und Wettbewerbsversuche

Die durchgeführten Transaktivierungs- und Wettbewerbsversuche dienten der Charakterisierung des Bindungsverhaltens und der Bestimmung der intrinsischen Aktivität der untersuchten Steroide. Hierbei stand insbesondere die Veränderung der genannten Eigenschaften bei den untersuchten Progesteronmetaboliten im Vergleich zu Progesteron im Vordergrund.

6.2.3.1 Cortisol am hMR

Mehrere Arbeitsgruppen haben ähnliche Affinitäten von Cortisol und Aldosteron zum hMR gefunden [90, 126, 138, 7], was durch diese Arbeit bestätigt wird (Abbildung 5.5 A, Tabelle 5.1). Ebenso im Einklang mit dieser Arbeit steht die durch einige Autoren vorbeschriebene

etwa 10fach schwächere Transaktivierungsaktivität von Cortisol am hMR gegenüber Aldosteron trotz ähnlicher Bindungsaffinität (Abbildung 5.1 A, Abbildung 5.3, Tabelle 5.1)[62, 61, 121, 84]. Nur in einer Arbeit von Rupprecht et al. wurde eine stärkere agonistische Aktivität von Cortisol im Vergleich mit Aldosteron beschrieben[126].

Die schwächere Transaktivierung durch Cortisol am hMR ist wahrscheinlich auf bestimmte Aspekte der Interaktion des hMR mit Aldosteron und Cortisol zurückzuführen; die 11,18-Hemiacetalgruppe des Aldosterons verstärkt die Stabilisierung der aktiven hMR-Konformation, wohingegen die 11 β - oder 17 α -Hydroxylgruppe des Cortisols die aktive hMR-Konformation destabilisiert[43, 42, 62, 61, 44]. Diese Destabilisierung des Liganden-Rezeptor-Komplexes führt wahrscheinlich zu einer zwei- bis viermal so schnellen Dissoziation des Cortisols vom hMR-Komplex im Vergleich zu Aldosteron[90].

Es ist bemerkenswert, dass Cortisol ein Plateau des agonistischen Effekts bei 10⁻⁸ mol/l erreichte (Abbildung 5.1 A), was auf einen möglichen partialantagonistischen Effekt hindeutet. Dieses Plateau des agonistischen Effekts ist in Übereinstimmung mit den Studien von Rogerson et al. [121]. Die signifikanten antagonistischen Effekte am hMR sind überraschend (Abbildung 5.3) und könnten auf das verwendete Expressionssystem, eine mögliche Heterodimerisierung (von Cortisol- und Aldosteron-besetzten Rezeptoren) oder auf mehrere Bindungspositionen zurückzuführen sein.

6.2.3.2 DOC am hMR

DOC trägt die gleiche 21-Hydroxy-Gruppe wie Aldosteron, weist jedoch keine Substituenten in Position C11, C17 und C18 auf. DOC zeigt eine Bindungsaffinität zum hMR vergleichbar mit der des Aldosterons (Abbildung 5.5 A, Tabelle 5.1), erreicht ein Plateau des agonistischen Effekts bei 10⁻⁹ mol/l (Abbildung 5.1 A) und zeigt geringere Transaktivierungseigenschaften (~70%) als Aldosteron bei höheren Konzentrationen (Abbildung 5.3). Eine ähnliche Beobachtung wurde von Hellal-Levy et al. gemacht [60]. Dies lässt vermuten, dass DOC dem Cortisol ähnlich einen partialantagonistischen Effekt am hMR zeigt. DOC zeigte im untersuchten Konzentrationsbereich eine Verminderung der aldosteronvermittelten Transaktivierung von etwa 20% (Abbildung 5.2 A, Abbildung 5.3). Die DOC-Konzentrationen betragen in der Proliferations- und Sekretionsphase des weiblichen Zyklus zwischen 0,2 und 0,3nmol/l, erreichen jedoch in der Schwangerschaft Werte von bis zu 1,8nmol/l [69, 123], wodurch ein kompensatorischer Effekt für die ansteigenden Progesteronkonzentrationen vermittelt wird, welcher auf die Bildung von DOC aus Progesteron zurückzuführen sein kann.

6.2.3.3 *Progesteron am hMR*

Die vorbeschriebene höhere Affinität des Progesterons im Vergleich zu Aldosteron zum hMR[126, 106] wird durch diese Arbeit bestätigt (Abbildung 5.5 A, Tabelle 5.1). Arriza et al. [7] beschreiben eine geringere Bindungsaffinität für Progesteron am hMR, jedoch war die Inkubationszeit mit nur 2,5h bei einer Verwendung von [³H]Aldosteron als Tracer vermutlich zu kurz gewählt, um ein Gleichgewicht zu erreichen, wenn man die Halbwertszeit des Aldosteron-hMR-Komplex mit 600min[138] berücksichtigt.

Souque et al. zeigten, dass Progesteron geringe agonistische Aktivität am hMR mit ca. 24% der maximal durch Aldosteron induzierbaren Wirkung bei Progesteronkonzentrationen von 10^{-6} mol/l zeigt[138]. Wir fanden eine fast gleiche agonistische Aktivität mit 27% Transaktivierung bei 10^{-6} mol/l (Abbildung 5.1 A).

Die relativ schwache antimineralocorticoide Potenz von Progesteron *in vivo* verglichen mit der starken Bindung an den hMR könnte unter anderem auf die Instabilität des Progesteron-MR-Komplexes zurückzuführen sein. Progesteron ist wahrscheinlich nicht in der Lage, eine starke Bindung an Helix H12 auszubilden und die Konformationsänderung zu induzieren, die für die aldosteronvermittelte hMR-Aktivierung beschrieben wurde. Diese größere Instabilität des Antagonist-hMR-Komplex könnte zu einer schnelleren Abdissoziation von Progesteron vom Rezeptor führen[138].

Die antagonistische Potenz von Progesteron wurde mit IC_{50} -Werten von 2 bis 10nmol/l vorbeschrieben [126, 9, 55]. Die in dieser Arbeit ermittelte halb-maximale Inhibition der Aldosteron-induzierten Transaktivierung durch Progesteron ($IC_{50(Aldo)}$) von 11nmol/l ist mit diesen Werten in Einklang zu bringen (Tabelle 5.1).

6.2.3.4 *17 α -OH-Progesteron und 17 α -OH,20 α -DH-Progesteron am hMR*

17-hydroxylierte Progesteronmetabolite zeigen keine oder eine geringe Bindungsaffinität zum MR der Ratte und des Schafs[75, 150, 21, 97, 134]. Geller et al. [55] konnten kürzlich zeigen, dass 17 α -OH-Progesteron am hMR eine sehr geringe Transaktivierungsaktivität (weniger als 10% der durch Aldosteron erreichbaren Transaktivierung) aufweist.

In unseren Versuchen zeigte 17 α -OH-Progesteron mit einem $K_i = 14,8$ nmol/l eine noch relativ hohe Bindungsaffinität zum hMR (Abbildung 5.5 B, Tabelle 5.1.), was etwa einem Viertel der Bindungsaffinität von Aldosteron entspricht. Die Transaktivierungsaktivität war mit 4,2% der durch Aldosteron maximal erreichbaren Transaktivierung sehr gering (Abbildung 5.1, Abbildung 5.3), wobei 17 α -OH-Progesteron eine relativ hohe antagonistische

Potenz mit einer $IC_{50(Aldo)}$ von 132 nmol/l zeigte (Abbildung 5.2 B, Tabelle 5.1). Daher ist 17α -OH-Progesteron ein potenter Antagonist am hMR und nicht ein Agonist, wie in früheren Studien vermutet[21, 97]. Die Konzentrationen von 17α -OH-Progesteron im Plasma steigen in der Schwangerschaft auf Werte von bis zu 29nmol/l im dritten Trimester an[20]. Auf Grund der hohen Bindungsaffinität könnte 17α -OH-Progesteron eine Rolle bei der Besetzung des hMR *in vivo* spielen.

Eine Reduktion in Position C20 zu 17α -OH, 20α -DH-Progesteron vermindert sowohl die Bindungsaffinität (Abbildung 5.5 B), als auch die agonistische und antagonistische Potenz (Abbildung 5.1 B, Abbildung 5.2 B, Abbildung 5.3).

Die congenitale adrenale Hyperplasie (CAH) wird vorwiegend durch den autosomal-rezessiv auftretenden 21-Hydroxylasemangel hervorgerufen. Mutationen oder Deletionen im 21-Hydroxylasegen verursachen Glucocorticoid- und häufig auch Mineralocorticoidmangel[154]. Bei diesen Patienten erreichen die Progesteron- und 17α -OH-Progesteronkonzentrationen sehr hohe Werte. Bei Patienten mit der einfachen virilisierenden Form ohne Salzverlust wurden 17α -OH-Progesteronkonzentrationen im Plasma von 70 – 240nmol/l und bei Patienten mit Salzverlust von 400-1000nmol/l gemessen[154, 162]. Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit bestimmten antimineralocorticoiden Potenz und den vorliegenden hohen Konzentrationen kann der kompensatorische Hyperaldosteronismus bei Patienten mit der einfachen virilisierenden Form erklärt werden[75, 12].

Bei der CAH mit Salzverlust ist dieser vermutlich auf den fast kompletten Ausfall der 21-Hydroxylaseaktivität und die dadurch ausbleibende Aldosteron- und Cortisolproduktion zurückzuführen. Die antimineralocorticoiden Effekte von Progesteron und 17α -OH-Progesteron führen vermutlich zu einer weiteren Minderung der Aktivierung des hMR.

6.2.3.5 5α -DH-Progesteron und 5β -DH-Progesteron am hMR

Unterschiede der Bindungsaffinität von 5α - und 5β -reduzierten Progesteronderivaten können auf der Grundlage der Planarität des Moleküls erklärt werden. Eine ebene Konformation von Ring A und B (wie sie bei 5α -DH-Progesteron vorliegt) zeigt bei der Ratte am MR eine höhere Bindungsfähigkeit als das unebene Isomer[53]. Auch für andere Steroidhormone wurde ein Einfluss der Ebenheit auf das Bindungsverhalten am MR gezeigt. Der ebene Metabolit 5α -DH-Aldosteron zeigt immer noch 1/30, 5α -DH-Cortisol 1/500 der Aktivität von Aldosteron am MR der Ratte[94, 102]. Interessanterweise scheint die flache Steroidkonformation effizienter bezüglich der inhibitorischen Potenz einiger Enzyme zu sein,

z. B. zeigen 5α -reduzierte Metabolite eine höhere inhibitorische Potenz für die 11β -HSD Typ 1 und 2 als 5β -reduzierte Metabolite[82].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 5α -DH-Progesteron eine zehnmal stärkere Bindungsaffinität zum hMR zeigt als 5β -DH-Progesteron und somit die Molekülebenheit auch am hMR eine Rolle spielt (Abbildung 5.5 C, Tabelle 5.1). Die hohe Bindungsaffinität von 5α -DH-Progesteron ($K_i = 11,8 \text{ nmol/l}$) legt nahe, dass dieser Metabolit *in vivo* unter bestimmten Bedingungen eine Rolle spielen könnte, da im dritten Trimester der Schwangerschaft Konzentrationen von bis zu 29 nmol/l auftreten[115]. 5α -DH-Progesteron und 5β -DH-Progesteron zeigen eine ähnlich geringe agonistische und antagonistische Potenz am hMR (Abbildung 5.1 C, Abbildung 5.2 C). 5β -DH-Progesteron spielt unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich keine Rolle im Bezug auf die Besetzung des hMR, da in der Schwangerschaft nur geringe Konzentrationen im Serum von bis zu $2,3 \text{ nmol/l}$ auftreten[115].

6.2.3.6 20α -DH-Progesteron am hMR

20α -DH-Progesteron ist von besonderem Interesse, da es einen der Hauptmetabolite in der menschlichen Niere[118, 117] und anderen Organen[91] darstellt. Zusätzlich dazu erreicht 20α -DH-Progesteron im dritten Trimenon der Schwangerschaft sehr hohe Konzentrationen im Serum von bis zu 90 nmol/l [20].

20α -DH-Progesteron bindet etwa halb so stark an den hMR wie 17α -OH-Progesteron und erreicht etwa 15% der Affinität von Progesteron am hMR (Abbildung 5.5 D).

20α -DH-Progesteron zeigte mit 11,5% der durch Aldosteron maximal erreichten Transaktivierung die höchste maximale Transaktivierung der untersuchten Progesteronmetabolite (Abbildung 5.3). Die antagonistische Potenz ist mit der des 17α -OH-Progesteron vergleichbar (Abbildung 5.2 B + D).

Die Konzentrationen von 20α -DH-Progesteron im Serum deuten darauf hin, dass dieser Metabolit mit schwachen agonistischen und vorhandenen antagonistischen Eigenschaften eine Rolle bei der Besetzung des hMR *in vivo*, besonders am Ende des dritten Trimesters der Schwangerschaft spielen könnte.

6.2.3.7 11 -, 6 - und 16 -hydroxylierte Progesteronmetabolite am hMR

Bis jetzt wurde nur 11β -OH-Progesteron im Bezug auf seine Bindungsaffinität am MR der Ratte untersucht, hier zeigte es etwa 50% der Potenz verglichen mit Progesteron,

[³H]Aldosteron aus seiner Bindung an den MR zu verdrängen[150]. 11 α -OH-Progesteron und 11 β -OH-Progesteron zeigten in dieser Arbeit nur schwache agonistische Eigenschaften (5,1% bzw. 9% maximal erreichte Transaktivierung im Vergleich zur durch Aldosteron maximal erreichbaren Transaktivierung, Abbildung 5.3, Abbildung 5.1 B). Eine antagonistische Wirkung konnte erst bei sehr hohen Konzentrationen erreicht werden (Abbildung 5.2 B). Bemerkenswert ist das Auftreten eines Plateaus der Transaktivierung für 11 β -OH-Progesteron bei Konzentrationen von 10⁻⁹ mol/l. Dies lässt auf eine hohe Bindungsaffinität zum hMR schließen, die sich in den Bindungsversuchen mit einem K_i-Wert von 2,4 nmol/l bestätigt (Tabelle 5.1, Abbildung 5.5 B).

Im Gegensatz zum 11 β -OH-Progesteron bindet 11 α -OH-Progesteron mit wesentlich geringerer Affinität an den hMR (Tabelle 5.1, Abbildung 5.5 B).

Da keine Daten über die Konzentrationen dieser Steroide im Serum in der Schwangerschaft vorliegen, kann zu diesem Zeitpunkt die physiologische Bedeutung nicht abgeschätzt werden.

16 α -OH-Progesteron zeigte keine Bindungsaffinität zum hMR und zeigte keine agonistischen oder antagonistischen Eigenschaften am hMR (Abbildung 5.5 B, Abbildung 5.1 B, Abbildung 5.2 B).

6 β -OH-Progesteron bindet an den hMR mit einer Affinität in einer Größenordnung, die mit der von 17 α -OH,20 α -DH-Progesteron oder 11 α -OH-Progesteron vergleichbar ist (Tabelle 5.1), zeigte jedoch keine agonistische Aktivität und nur sehr geringe antagonistische Aktivität am hMR (Abbildung 5.1 B, Abbildung 5.2 B, Abbildung 5.3).

6.2.3.8 Ring-A-reduzierte Metabolite am hMR

Rupprecht et al. konnten zeigen, dass 3 α ,5 α -TH-Progesteron eine geringe Potenz besitzt, Aldosteron aus seiner Bindung an den hMR zu verdrängen[126]. Dieses Ergebnis kann durch diese Arbeit bestätigt werden. Die Bindungsaffinität von 3 β ,5 α -TH-Progesteron zum hMR war stärker als die von 3 α ,5 α -TH-Progesteron (Tabelle 5.1, Abbildung 5.5 C). 3 β ,5 α -TH-Progesteron zeigt außerdem die stärkste antagonistische Potenz der Ring A-reduzierten Metabolite, wobei diese im Vergleich zu Progesteron sehr gering ist (Tabelle 5.1, Abbildung 5.2 C).

Im Allgemeinen vermindert die Ring A-Reduktion und die C20-Reduktion die Bindungsaffinität von Progesteronmetaboliten (Abbildung 5.5, Tabelle 5.1), wobei diese Metabolite keine agonistische (Abbildung 5.1) und nur sehr schwache antagonistische Potenz (Abbildung 5.2) zeigen. Die Konzentrationen im Serum in der Schwangerschaft von 3 α ,5 α -

TH-Progesteron von bis zu 13,6 nmol/l, 3 β ,5 α -TH-Progesteron von bis zu 5nmol/l und von 3 β ,5 β -TH-Progesteron von bis zu 2,2nmol/l[115] deuten darauf hin, dass diese Substanzen *in vivo* keinen Effekt auf den hMR vermitteln.

6.2.4 Infusionsstudie

Im Mittelpunkt der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Infusionsstudie stand die Beobachtung, dass Progesteron *in vitro* eine starke antimineralocorticoide Potenz aufweist, jedoch *in vivo* der antimineralocorticoide Effekt wesentlich weniger stark ausgeprägt ist, als es die *in vitro*-Beobachtungen vermuten lassen.

Der antinatriuretische Effekt von Progesteron wurde bereits vor über 40 Jahren beim Menschen untersucht und beschrieben[78, 79, 80, 81, 111, 109]. In den meisten dieser Studien wurde den Probanden über mehrere Tage Progesteron in hohen Dosen intramuskulär verabreicht, wobei währenddessen die Natriumausscheidung im Urin und die Aldosteronsekretion gemessen wurde. Als ein Beispiel sei hier noch einmal die bereits in der Einleitung beschriebene 46jährige Addisonpatientin erwähnt, die mit Desoxycorticosteronacetat und Cortisonacetat behandelt wurde und die bei der zusätzlichen intramuskulären Verabreichung von 50mg Progesteron eine verstärkte Natrium- und Chloridexkretion aufwies[81].

Bei den erwähnten Studien wurden große Progesteronmengen verabreicht, wobei jedoch die Progesteronspiegel im Plasma nicht bestimmt wurden. Aus diesem Grund ist die „wahre“ antimineralocorticoide Potenz bisher nicht definitiv zu bewerten, wohingegen der auch postulierte antiglucocorticoide Effekt von Progesteron bereits durch Allolio et. al. [4] *in vivo* untersucht und nicht nachgewiesen werden konnte.

6.2.4.1 Elektrolyt- und Wasserexkretion unter Progesteron

Zum Zeitpunkt des Beginns der Infusionsstudie zeigten die Probanden einen leicht hypomineralocorticoiden Zustand, der aus der fehlenden Mineralocorticoids substitution resultierte und erwünscht war (Abbildung 5.8, S. 72). Unter der Aldosteroninfusion erreichte die Aldosteronkonzentration im Plasma Werte im Referenzbereich (Abbildung 5.6 A, S. 70). Die Reninkonzentration im Plasma und der Blutdruck zeigten im Verlauf der Studie keine Veränderung, wobei dies auf die relativ kurze Studiendauer zurückzuführen sein kann. Im Verlauf der Studie kam es sowohl unter der alleinigen Aldosteroninfusion als auch noch stärker unter der Progesteroninfusion zu einer Steigerung des Urinvolumens. Zum einen kann dies durch die Trinkmenge bedingt gewesen sein, zum Teil jedoch auch durch den

diuretischen Effekt des verabreichten Progesterons. Ein diuretischer Effekt durch Progesteron wurde bereits in früheren Studien beschrieben[79]. Ein möglicher Mechanismus ist die zusätzliche Inhibition der proximalen Natriumabsorption durch Progesteron[104] oder ein gesteigerter renaler Blutfluss durch die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur durch Progesteron, woraus ein wash-out-Effekt des Nierenmarks resultiert[111]. In Einklang damit ist auch die Beobachtung eines verminderten peripheren Gefäßwiderstandes und eines gesteigerten renalen Plasmaflusses in der Schwangerschaft und der Lutealphase zu bringen[26].

Die verabreichte Progesteroninfusion führte zu Progesteronkonzentrationen, die denen im dritten Trimenon der Schwangerschaft entsprechen. Ein messbarer Anstieg des Natrium/Kalium-Quotienten und der Natriumexkretion (Abbildung 5.8 A + D, S. 72) trat bei der durchgeführten Studie etwa drei Stunden nach dem Beginn der Progesteroninfusion ein. Diese Zeitspanne deutet auf einen genomischen MR-vermittelten Regulationsmechanismus, etwa die Verminderung der Expression von Transportproteinen, wie des ENaC oder der Natrium/Kalium-ATPase hin[141]. Ein nicht-genomischer, schneller Effekt, wie von Fronius et. al. in der Froschniere vorbeschrieben[47], konnte nicht beobachtet werden.

Auch die Chloridausscheidung im Urin zeigte im Verlauf der Studie einen signifikanten Anstieg (Abbildung 5.8 C, S. 72), wobei dieser etwas weniger deutlich ausgeprägt ausfiel, als die Steigerung der Natriumexkretion. Diese Beobachtungen können mit vorbeschriebenen Beobachtungen von Landau et. al. [80] in Einklang gebracht werden und könnten auf eine zusätzliche Hemmung der proximalen Natrium- und Chloridresorption im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife zurückzuführen sein[104].

Angesichts der Tatsache, dass unter den gegebenen experimentellen Bedingungen etwa 1000fach höhere Progesteronkonzentrationen vorlagen, und der starken antimineralocorticoiden Effekte des Progesterons *in vitro* erscheint die beobachtete antimineralocorticoide Wirkung im Hinblick auf die Natriumexkretion verwunderlich gering. Dies stützt unter anderem die aufgestellte Hypothese, dass der menschliche Mineralocorticoidrezeptor vor Progesteron durch renalen Metabolismus geschützt wird[118, 117], jedoch ist zu beachten, dass sich durch die relativ kurze Phase der alleinigen Aldosteroninfusion noch kein steady state des Na^+/K^+ -Quotienten eingestellt hatte. Dadurch könnte der progesteronvermittelte antimineralocorticoide Effekt kleiner erscheinen, als dies im steady state der Fall gewesen wäre. Unter dem Aspekt der ethischen Vertretbarkeit bzw. der Toleranz der Probanden ließ sich jedoch ein längerer Versuchsablauf nicht realisieren.

6.2.4.2 *Extraadrenaler Metabolismus von Progesteron*

Der in der Studie beobachtete Anstieg der 17α -OH-Progesteron-Konzentration in Plasma und Urin (Abbildung 5.7, S. 71) der Probanden deutet auf eine extraadrenale Bildung von 17α -OH-Progesteron aus Progesteron hin. Dieser könnte bei den männlichen Probanden in den Hoden lokalisiert sein; bei den postmenopausalen weiblichen Probanden ist diese Beobachtung von größerer Aussagekraft, da für deren Ovarien gezeigt wurde, dass die Synthese von Androgenen deutlich reduziert ist[31]. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Bildung von 17α -OH-Progesteron bei postmenopausalen Frauen und vermutlich auch bei Männern extraadrenal und extragonadal, z. B. in der Niere erfolgt.

Die Hypothese der renalen Metabolisierung von Progesteron zu 17α -OH-Progesteron lässt sich durch die Bestimmung der renalen Ausscheidung von 17 -OH-Progesteron untermauern. Gegen Ende der Studie wurden 17 -OH-Progesteron-Konzentrationen von $16 \pm 2,6$ nmol/l im Plasma bestimmt. Bei einer angenommenen durchschnittlichen glomerulären Filtrationsrate von 125ml/min [132] würden bei ausschließlicher Filtration von 17 -OH-Progesteron etwa 2 nmol/min ausgeschieden. Tatsächlich wurde jedoch eine Ausscheidung von 17 -Hydroxy-Progesteron von $3,5 \pm 0,75$ nmol/min gemessen (Abbildung 5.7 B, Seite 71). Dies lässt sich nur durch renale Bildung oder tubuläre Sekretion von 17 -OH-Progesteron erklären, wobei die Existenz von aktiven Sekretionsmechanismen für 17 -OH-Progesteron eher unwahrscheinlich erscheint.

Den beim Menschen wichtigsten Stoffwechselweg im Vorfeld der Androgensynthese stellt die Umwandlung von Pregnenolon in 17α -OH-Pregnenolon und weiter zu DHEA dar (Abbildung 6.1, grüne Pfeile)[137]. Der Weg über Progesteron und 17α -OH-Progesteron ist energetisch weniger günstig (Abbildung 6.1, rote Pfeile)[8]. Trotzdem konnte in dieser Studie ein Anstieg der Konzentration von Androstendion im Serum ohne einen Anstieg von DHEA beobachtet werden (Abbildung 5.10 B + E, S. 74). Dies könnte auf einen starken Substratüberschuss für das Enzym P450c17 hindeuten. Es liegt nahe, dass die Studienbedingungen nicht den physiologischen Verhältnissen entsprechen. Möglicherweise stellt sich bei längerfristigem Anstieg der Progesteronkonzentration, wie z. B. in der Schwangerschaft, eine Steigerung der Expression metabolisierender Enzyme ein. Der bei den Männern im Vergleich zu den weiblichen Probanden stärkere Anstieg von Androstendion ist vermutlich auf die testikuläre Metabolisierung des Progesterons zurückzuführen.

Progesteroninfusion einen signifikanten Anstieg (Abbildung 5.11, S. 75), wobei dies auf eine Hemmung der renalen 11β -HSD Typ 2 hindeutet.

6.2.4.5 *Müdigkeit unter der Progesteroninfusion*

Von allen Probanden wurde unter der Progesteroninfusion das Auftreten von Müdigkeit beschrieben. Dieser Effekt könnte auf die Bildung von neuroaktiven Metaboliten des Progesterons zurückzuführen sein. Wie in der Einleitung dargestellt, wurden bereits sedierende Effekte z. B. für $3\alpha,5\alpha$ -TH-Progesteron vorbeschrieben, die über den $GABA_A$ -Rezeptor vermittelt werden[93]. Auch in der Schwangerschaft kann bei werdenden Müttern im ersten und zweiten Monat eine gesteigerte Müdigkeit beobachtet werden, die mit dem schnellen Anstieg verschiedener Progesteronmetabolite im mütterlichen Blut in Verbindung gebracht wird[116]. Ob die eingetretene Müdigkeit jedoch tatsächlich in der Bildung sedierend wirkender Progesteronmetabolite begründet liegt, lässt sich beim vorliegenden Studiendesign nicht aussagen. Alleine die Tatsache, dass die Probanden über etwa acht Stunden liegend in einer ihnen fremden und abwechslungsarmen Umgebung verbringen mussten, könnte diese Müdigkeit zumindest verstärken, wenn nicht sogar alleine verursachen.

