

1. Einleitung und Zielsetzung

Die Nebennierenrinde ist beim Menschen unter anderem für die Bildung und Sekretion von Glucocorticoiden (GCs) und Mineralocorticoiden (MCs) zuständig. Während die Glucocorticoide an der Regulierung des Stoffwechsels und der Funktion vieler Organe beteiligt sind, beeinflussen die Mineralocorticoide den Wasser- und Elektrolythaushalt. Die Effekte dieser beiden Hormone werden selektiv über den Glucocorticoid- bzw. den Mineralocorticoidrezeptor (GR, MR) vermittelt, wobei die lokalen Glucocorticoidkonzentrationen in den Geweben und auch die Selektivität des MR für MCs durch das Enzym 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (11 β -HSD) reguliert werden (siehe Abb. 1-1).

1.1. Reaktionen / Substrate der 11 β -HSD

Die 11 β -HSD katalysiert die Umwandlung von aktiven GCs in inaktive GCs und auch die entsprechende Rückreaktion dazu. Hierzu wird die für die Glucocorticoid- und Mineralocorticoidaktivität essentielle 11 β -Hydroxygruppe in eine Ketogruppe umgewandelt (44, 48, 49, 51, 116, 216). Für die Dehydrogenasereaktion liegt das pH-Optimum im leicht alkalischen Bereich mit einem Plateau zwischen pH 7-8 (-10), während die Reduktionsreaktion optimale Umsätze bei pH-Werten zwischen 5,5-6,5 erreicht (15, 91, 92, 123).

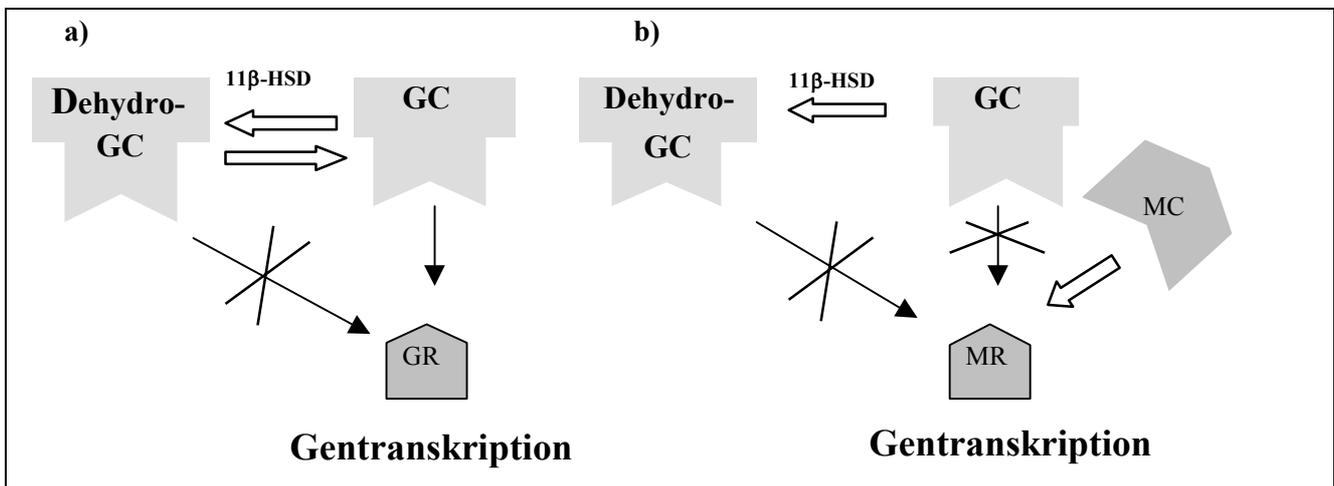


Abb. 1-1: Funktionen der 11 β -HSD:

- Regulierung der lokalen Glucocorticoid (GC)-Konzentration: Je nach Gewebe wird die Umwandlung von aktiven GCs, die an den Glucocorticoid-Rezeptor (GR) binden können, in inaktive GCs, die nicht an den GR binden können, katalysiert oder die entgegengesetzte Reaktion.
- Ermöglichen der Spezifität des Mineralocorticoid-Rezeptors (MR): Durch Inaktivierung der in höheren Konzentrationen vorkommenden GCs können MCs selektiv an den MR binden.

Bisher sind zwei Isoenzyme der 11 β -HSD in unterschiedlichen Spezies charakterisiert, isoliert und kloniert worden, die 11 β -HSD-1 (2, 157, 188, 212, 214) und die 11 β -HSD-2 (2, 3, 4, 22, 23, 33, 97, 218). Beide unterscheiden sich in ihrem Aufbau und ihren Eigenschaften stark voneinander und weisen nur eine etwa 14%ige Homologie ihrer Aminosäuresequenzen auf (5, 6). Enzymkinetische Untersuchungen an Schafnierenmikrosomen, an Leydig-Zellen von Ratten, an humanen Granulosazellen und an Lebermikrosomen von Meerschweinchen ergaben Hinweise auf ein weiteres Isoenzym mit einer hohen Affinität für GCs, aber einer NADP-Präferenz (56, 118, 155). Ein Nachweis auf Protein- oder DNA-Ebene ist bisher nicht erfolgt.

Die physiologischen Substrate beider Isoenzyme der 11 β -HSD sind beim Menschen Cortisol und Cortison, während es bei Ratten Corticosteron und 11-Dehydro-Corticosteron sind. Auch einige synthetische Steroide, wie Prednisolon/Prednison, die zur immunsuppressiven Therapie eingesetzt werden, setzt die 11 β -HSD um. Für die fluorierten Steroide Dexamethason und 9 α -Fluorocortisol konnte gezeigt werden, daß sie beim Typ-2-Isoenzym das Gleichgewicht der Reaktion in Richtung der Reduktion verschieben. Dies bedeutet, daß es zu einer Aktivierung von 11-Dehydro-Dexamethason zu Dexamethason bzw. von 9 α -Fluorocortison zu 9 α -Fluorocortisol kommt (38, 39, 71). Bei der 11 β -HSD-1 ist ebenfalls die Reduktion die überwiegend ablaufende Reaktion. Nach oraler Gabe von Dehydro-Dexamethason erfolgt eine Aktivierung zu Dexamethason, die durch die hepatische 11 β -HSD-1 und die renale 11 β -HSD-2 katalysiert wird. Dexamethason selbst wird durch die 11 β -HSD-1 nicht in relevantem Umfang umgesetzt und auch die Inaktivierung durch die 11 β -HSD-2 ist gering (47, 99).

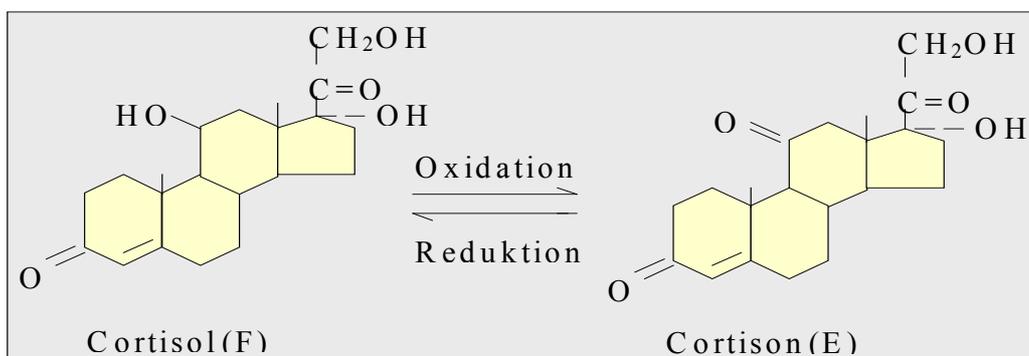


Abb. 1-2: Reaktion der 11 β -HSD: Umwandlung des aktiven Glucocorticoids Cortisol (F) in das inaktive Glucocorticoid Cortison (E) und umgekehrt.

1.2. Vorkommen / Enzymkinetik der 11 β -HSD-1 und -2

Die 11 β -HSD-1 kommt ubiquitär vor, mit besonders hohen Konzentrationen in der Leber, der Lunge, den Gonaden und im ZNS (206). An Homogenaten und Mikrosomen konnte gezeigt werden, daß sie eine niedrige Substrataffinität besitzt und der Km-Wert im μ molaren Bereich liegt (181, 182). Obwohl sie experimentell in Homogenaten und Mikrosomen sowohl als Oxidase als auch als Reduktase fungieren kann, katalysiert sie in vivo in intakten Zellen vorwiegend die Reduktion (162, 198). Somit kommt es hauptsächlich zu einer Aktivierung von inaktiven GCs. Als Cosubstrat sind beim Typ-1-Enzym NADP⁺/NADPH am effektivsten. Es besteht praktisch keine Endprodukthemmung durch Cortison oder 11-Dehydro-Corticosteron (167, 215).

Die 11 β -HSD-2 dagegen kommt in MR-haltigen Geweben wie der Niere, dem Colon und den Speicheldrüsen vor, aber auch in der Placenta (9). Sie besitzt eine hohe Substrataffinität mit einem Km-Wert im nmolaren Bereich (7, 9, 47, 181, 182). Beim Typ-2-Enzym überwiegt bei physiologischen Substraten die Oxidation, die zu einer Inaktivierung von GC führt. Die höchsten Umsätze können mit NAD⁺/NADH als Cosubstrat erzielt werden. Die lange vorherrschende Hypothese, daß die 11 β -HSD-2 unidirektional ist und ausschließlich die Oxidation katalysiert, ist nicht mehr haltbar, da in Untersuchungen mit fluorierten Steroiden eine Reduktionsreaktion gezeigt werden konnte (16, 38, 39, 99, 175). Durch die Produkte läßt sich eine deutliche Endprodukthemmung erzeugen, wie Brem et al. für 11-Dehydro-Corticosteron 1991 in Kurzschlußstromexperimenten und dann 1993 an Krötenharnblasenhomogenaten zeigen konnten (20, 21). Diese Ergebnisse wurden auch von anderen Autoren belegt (127, 136, 159, 215).

11 β -HSD-Aktivität kann in der Mikrosomenfraktion von Geweben nachgewiesen werden (138, 139). Zusätzlich konnten einige Arbeitsgruppen eine geringere Enzymaktivität in der Kernfraktion von klassischen MC-Zielgeweben wie Niere und Colon zeigen (83, 150, 173).

1.3. Aufbau und Struktur der 11 β -HSD-1 und -2

Die 11 β -HSD gehört zur Familie der short-chain dehydrogenase reductases (SDR, früher: short chain nonmetalloenzyme alcohol dehydrogenases: SCAD) (188). Beim Vergleich der Primärsequenzen verschiedener SDR-Mitglieder wurden sechs signifikant konservierte Domänen festgestellt. Von der ersten konservierten Domäne ist bekannt, daß sie den Cofaktor bindet. Die zweite und dritte konservierte Domäne ist hydrophob mit zwei stark konservierten Glycinen, die die Konformation des Enzyms mitbestimmen. Die vierte Domäne beinhaltet ein hoch konserviertes Tyrosin als erste Aminosäure und weitere stark konservierte saure Aminosäuren gegen Ende der Domäne. Kristallographische Analysen lassen vermuten, daß durch diese Domäne der Hydrid-Radikal-Transfer vom Cofaktor zum Steroid stattfindet. Die fünfte und sechste Domäne kommen bei der 11 β -HSD nicht vor. Typisch für die Sekundärstruktur der NAD/NADP-bindenden Domänen ist eine Rossmann-Schlinge bestehend aus zwei hintereinander liegenden β -Faltblatt- α -Helix- β -Faltblatt- α -Helix- β -Faltblatt-Sequenzen. Die Nicotinamid-Bindungstasche weist eine typische Aminosäuresequenz auf: Gly-X-X-X-Gly-X-Gly. Die weiteren Aminosäuren, die in der Cofaktorbindung involviert sind, liegen relativ stark verstreut, aber tendenziell eher am amino-terminalen Ende. Aufgrund ihrer Struktur neigen die SDR-Familienmitglieder zur Bildung von Multimeren, besonders von Di- oder Tetrameren (41).

Die humane 11 β -HSD-1 ist ein 34 kDa schweres, an drei Stellen glykosyliertes Enzym, das aus 292 Aminosäuren aufgebaut wird. Das C-terminale Ende mit einem Großteil des Enzyms ragt ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums, während am hydrophoben N-terminalen Ende ein transmembranäres Segment, gefolgt von einem kürzeren Teil des Enzyms, das ins Cytosol zeigt, vorkommt. Das Enzym wird von Chromosom 1 codiert und besitzt ein 9 kb langes Gen mit 6 Exons (188). Insgesamt sind mehrere durch alternatives Splicing und unterschiedlichen Promotorgebrauch entstandene Transkriptionsprodukte bekannt, die experimentell allerdings keine Enzymaktivität aufwiesen (87, 119). Diejenigen, die translatiert werden, könnten an der Regulation des aktiven Enzyms beteiligt sein oder als intrazelluläre Steroidbindungsproteine fungieren. Inzwischen ist die 11 β -HSD-1 in verschiedenen Spezies kloniert worden. Zwischen diesen Enzymen zeigt sich eine große Homologie, die

beispielsweise zwischen dem der Maus und dem des Menschen 79 % beträgt.

Die humane 11 β -HSD-2 dagegen ist 44 kDa schwer und unglykosyliert. Sie besteht aus 405 Aminosäuren. Wie auch bei der 11 β -HSD-1 liegt das C-terminale Ende des Enzyms im Lumen des endoplasmatischen Retikulums. Allerdings besitzt die 11 β -HSD-2 N-terminal drei transmembranäre Segmente gefolgt von dem Hauptanteil des Enzyms, der ins Cytosol ragt (138). Codiert wird das 6,2 kb lange Gen von Chromosom 16q22. Das Gen besteht aus 5 Exons (382, 215, 185, 139, 1018 bp). Die proximale Promotorregion besitzt keine TATA- oder CAAT-Box, ist aber sehr Guanin- und Cytosin-reich und enthält zwei Guanin-Cytosin-Boxen. Es bestehen zahlreiche mögliche Bindungsstellen für Sp1, AP2 und andere Transkriptionsfaktoren. Crosslinkage-Studien lassen vermuten, daß es sich bei der 11 β -HSD-2 um ein nicht kovalent gebundenes Dimer handelt. Zwischen den unterschiedlichen Spezies besteht eine über 90%ige Homologie innerhalb der ersten 382 Aminosäurereste. Die restlichen 14 bis 24 Aminosäuren sind nur sehr wenig konserviert. Auch von der 11 β -HSD-2 existieren verschiedene Transkripte, deren Funktion noch unklar ist (6).

1.4. Funktion der 11 β -HSDs in den Organen

Die höchste Konzentration an 11 β -HSD-1 ist in der Leber und die höchste Konzentration an 11 β -HSD-2 ist in den MR-Zielgeweben zu finden. Besonders in diesen Organen, aber auch in vielen anderen besitzt das Enzym eine bedeutende Funktion.

1.4.1. 11 β -HSD-1 in der Leber und dem Fettgewebe

In der Leber konnte 11 β -HSD-1 mit maximaler Expression um die Zentralvenen nachgewiesen werden, wobei die Reduktionsreaktion (= GC-Aktivierung) überwiegt (76, 163). Funktionell hat die hepatische 11 β -HSD einen Einfluß auf den Glucosestoffwechsel und die Konzentration von Xenobiotika im Körperkreislauf.

Der Einfluß der 11 β -HSD-1 auf den Glucosestoffwechsel wurde durch Hemmung des Enzyms bei Glucose-Clamp-Experimenten untersucht. Dabei beobachtete man eine leichte Erhöhung der Insulinsensitivität durch Modulation der hepatischen Gluconeogenese-Enzyme. An 11 β -HSD-1-knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, daß ohne 11 β -HSD-1 die Induktion dieser Enzyme durch GC bei Fasten oder Stress reduziert ist, und es dadurch zu geringeren Plasma-Glucosekonzentrationen kommt. Die Glykogenkonzentration in der Leber ist dagegen erhöht, da GCs bei gutem Ernährungszustand zur Glykogenolyse führen (85). Es konnte außerdem gezeigt werden, daß PPAR α -Agonisten zu einer Downregulierung der 11 β -HSD-1-mRNA und -aktivität führen. Es wird angenommen, daß es dadurch zu einem negativen Feedback mit verringerter GR-Stimulation und konsekutiv verringerter PPAR-Stimulierung kommt. Durch den im Endeffekt verringerten GC-Tonus könnte die beobachtete Verringerung der Insulinresistenz erklärt werden (64).

Neben ihrer Fähigkeit, die Konzentration an systemischen GCs zu regulieren, wirkt die 11 β -HSD in der Leber der Maus zusätzlich als Carbonyl-Reduktase von Xenobiotika. Ein mögliches Substrat ist NNK (4-(Methylnitrosoamino)-1-(3-Pyridyl)-1-butanon), ein tabakspezifisches Nitrosamin mit karzinogener Wirkung, das durch Carbonylreduktion und anschließende Konjugation mit Glucuronsäure unschädlich gemacht wird (113, 114, 115).

Im Fettgewebe von Ratten konnte 11 β -HSD-1-mRNA und -Aktivität nachgewiesen werden, und zwar sowohl in den Adipozyten als auch in der Stroma-Gefäßfraktion (26, 27, 134). Es überwiegt die Reduktion. Die damit verbundene Erhöhung der GC-Konzentration führt zu einer Reifung der Präadipozyten und einer Lipidakkumulation in den Präadipozyten durch Induktion von u.a. der Lipoproteinlipase und der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase. Das omentale Fettgewebe besitzt eine wesentlich höhere 11 β -HSD-1-Reduktaseaktivität als das subkutane Fettgewebe, wodurch die stammbetonte Adipositas bei GC-Überschuß erklärt werden könnte. Da es starke interindividuelle Schwankungen in der 11 β -HSD-Expression und -Induzierbarkeit gibt, könnte dies eine Ursache für die unterschiedliche Veranlagung der Individuen für zentrale Adipositas sein. Es besteht die Hypothese, daß die erhöhte GR-Aktivierung bei idiopathischer Fettsucht durch eine vermehrte lokale Reaktivierung von GCs

durch die 11 β -HSD-1 im Fettgewebe verursacht wird, und es so zu einem Circulus vitiosus kommt (105). Im Tiermodell bei „obese“ Zucker-Ratten sind die GC-Konzentrationen im Blut und auch die ausgeschiedenen 11-Dehydro-Corticosterone-Metabolite im Urin erhöht. In der Leber ist die 11 β -HSD-1-Aktivität vermindert, während sie im omentalen Fettgewebe erhöht ist (85, 105). Die erhöhten peripheren GCs verstärken also die Fettsucht, während die gesenkte hepatische GC-Reaktivierung die metabolischen Komplikationen der Fettsucht eindämmt. Bei adipösen Patienten ist die basale Plasma-GC-Konzentration in der Regel normal mit erhöhter Ausscheidung von Cortisolmetaboliten und erhöhter Cortisolproduktion. Diese könnte durch die gesteigerte Cortisol-Produktion im omentalen Fett erklärt werden, was durch den Ausdruck „Cushing-Erkrankung des Omentum“ beschrieben wird (28).

1.4.2. 11 β -HSD-2 in der Niere

In der menschlichen Niere konnte die 11 β -HSD-2 in den Hauptzellen der Sammelrohre nachgewiesen werden. Proximal geht das Gebiet mit starker 11 β -HSD-2-Expression bis zum distalen Ende des dicken aufsteigenden Schenkels der Henle-Schleife (18, 67, 86, 88, 173). Die 11 β -HSD-2 enthaltenden Gebiete entsprechen somit der MR-Lokalisation (135, 160). Bei Ratten wurde ferner 11 β -HSD-1 in den proximalen Tubuli nachgewiesen (10). Durch Experimente mit Sammelrohrzellen-Monolayers auf einer permeablen Unterlage konnte gezeigt werden, daß die Edukte bei einer Zellpassage fast vollständig metabolisiert werden und daß dieser Effekt durch einen 11 β -HSD-Inhibitor auf $\frac{1}{4}$ reduziert werden kann (136).

Funktionell sorgt die 11 β -HSD für eine Mineralocorticoid-Selektivität des MR. Da der MR Cortisol und Aldosteron mit vergleichbarer Affinität bindet (116, 143, 170) und die Plasma-Cortisolkonzentration 100-1000fach höher liegt als die Plasma-Aldosteronkonzentration, kann die Selektivität nur durch lokale Inaktivierung der GCs erreicht werden (49, 184, 124). Die 11-Keto-Metabolite haben im Vergleich zu den 11-Hydroxy-Steroiden eine stark reduzierte Affinität (< 1%) sowohl am MR als auch am GR (51).

1.4.3. 11 β -HSD-1 und -2 in weiteren Organen

Organe	Eigenschaften / Funktion
Testes (53, 194)	<u>Isoenzym:</u> 11 β -HSD-1 <u>Lokalisation:</u> interstitiell in den Leydig-Zellen <u>Wirkung:</u> (Oxidation) Aufrechterhaltung der Testosteron-Biosynthese trotz hoher GC-Konzentrationen
Sperma (133)	unbekannt
Prostatakarzinomzellen LNCaP (137, 144)	<u>Wirkung:</u> (Oxidation) vermehrte Zellproliferation
Mamma (107, 156)	<u>Lokalisation:</u> Fettgewebe und in geringeren Konzentrationen auch im Epithel der Brustdrüse von Schwangeren/ Stillenden <u>Wirkung:</u> Regulierung des Wasser-Elektrolyt-Haushalts, Hemmung einer vorzeitigen Milchproduktion (Enzymaktivität nimmt im Verlauf der Schwangerschaft bis zur Stillzeit ab)
Ovar (30, 118, 190, 191)	<u>Isoenzym:</u> 11 β -HSD-1 und 11 β -HSD-2 <u>Wirkung:</u> während Follikulogenese: Verschiebung von überwiegender 11 β -HSD-2-Oxidation zu einer überwiegender 11 β -HSD-1-Reduktion in Luteinzellen, Förderung der Keimzellreifung, antiinflammatorischer Effekt bei der Keimzellreifung 11 β -HSD-2 bewirkt einen Schutz der ovarielle Steroidogenese in den Luteinzellen, Einfluß auf die Reifung des fetalen Organsystems
Placenta (102, 172)	<u>Isoenzym:</u> überwiegend 11 β -HSD-2 <u>Lokalisation:</u> besonders im Syncytiotrophoblasten, Decidua (Reduktase) <u>Wirkung:</u> Erhöhung der 11 β -HSD-Aktivität: während Schwangerschaft durch Östrogene: zunehmende Schranke zwischen den mütterlichen und den fetalen Glucocorticoiden, Entwicklung der fetalen hypothalamisch-hypophysären-Achse induziert Autonomie des Feten
Immunsystem (63, 68)	<u>Lokalisation:</u> hohe Enzymaktivität in der Milz und den peripheren und mesenterialen Lymphknoten, geringere Aktivität in den Peyerschen Plaques und dem Thymus. <u>Wirkung:</u> Regulierung der Zytokinsekretion der Lymphozyten: hohe GC-Konzentrationen führen zu einem Überwiegen der Typ-2-Zytokine (Il-4 und Il-10) und niedrige Konzentrationen fördern die Typ-1-Zytokine (IFN γ und Il-2), Hemmung der Apoptose von Thymozyten
ZNS (93, 120, 121, 166, 171, 207, 211, 213)	<u>Lokalisation:</u> 11 β -HSD-1: Neuronen des Kleinhirns, der Hypophyse, des cerebralen Cortex und des Hippocampus (geringe Aktivität in der olfaktorischen Region, im Hypothalamus, im Hirnstamm, im Nucleus amygdalae centralis und in der Area praeoptica) 11 β -HSD-2: nur in einzelnen Hirnregionen wie z.B. dem Nucleus tractus solitarius und dem Hypothalamus <u>Wirkung:</u> Regulierung des Zugang von Corticosteroiden zum MR und GR; zusätzlich regionenspezifische Funktionen diskutiert: Modulation des CRF-vermittelten negativen Glucocorticoidfeedbacks; Beeinflussung des cerebralen Glucosestoffwechsels; Einfluß auf Prolaktintranskription, Regulierung des Blutdruckes, der durch zentrale GC und MC entgegengesetzt beeinflusst wird; Regulierung des Salz- und Wasserhaushaltes in den Ependymzellen.
Haut (82, 154, 209)	<u>Lokalisation:</u> Hautfibroblasten (Reduktion), Epidermis (Oxidation) <u>Wirkung:</u> Wirkungsbeendigung von dermal applizierten Steroiden: enzymatisch und sekundär durch Durchblutungsregulierung

Organe	Eigenschaften / Funktion
Knochen (17, 34)	<p><u>Isoenzyme</u>: 11β-HSD-1 und -2</p> <p><u>Lokalisation</u>: 11β-HSD-1 besonders in aktiven Osteoblasten (Tumor, Frakturheilung), Osteoclasten, Osteosarcomzellen und in Osteocyten; 11β-HSD-2 war in menschlichen Osteosarkomzellen und in fötalem Knochen zusammen mit dem GR zu finden</p> <p>Reduktaseaktivität überwiegt</p> <p><u>Wirkung</u>: Förderung der Proliferation und Differenzierung des Knochens, Dehydrogenaseaktivität erst bei supraphysiologischen Steroidkonzentrationen/synthetischen Steroiden relevant, Modulation der interindividuellen GC-Empfindlichkeit der Knochen</p>
Lunge (72, 73, 74).	<p><u>Wirkung</u>: (Reduktion) beim Feten gegen Ende der Schwangerschaft: Erhöhung der Phosphatidylcholinsynthese, Steigerung der Surfactant-Faktorbildung und damit Lungenreifung und Herabsetzung der Oberflächenspannung in der luftgefüllten Lunge</p>
Gefäße (19, 61, 62, 84, 202, 210)	<p><u>Lokalisation</u>: 11β-HSD-1: glatte Muskulatur besonders von kleinen Widerstandsgefäßen, mit CR kolokalisiert; 11β-HSD-2: Mesenterialarterien und Ratten-Aortaepithelzellen</p> <p><u>Wirkung</u>: 11β-HSD-1: (Reduktase) Blutdruckregulierung, Protektion der Corticoidrezeptoren; 11β-HSD-2: Hemmung der durch Noradrenalin und Angiotensin II hervorgerufenen Vasokonstriktion</p>
Herz (108, 140)	unbekannt
Gastrointestinaltrakt (66, 88, 145, 146, 189)	<p><u>Lokalisation</u>: MR Kolokalisation: Oberflächenepithel von terminalem Ileum, Colon, Parietalzellen des Magenfundus, Gangepithelien der Speicheldrüsen.</p> <p><u>Wirkung</u>: Mineralocorticoid-Selektivität des MR, Regulierung der Darmentwicklung.</p>
Nebennierenrinde (117, 173, 174)	<p><u>Lokalisation</u>: 11β-HSD-1: hauptsächlich am corticomedullären Übergang</p> <p><u>Wirkung</u>: 11β-HSD-1: Regulierung der Catecholaminbiosynthese im Mark (benötigt hohe Glucocorticoidkonzentration)</p> <p>11β-HSD-2: Feinregulierung der Freisetzung von aktiven und inaktiven Glucocorticoiden</p>

Tabelle 1-1: Eigenschaften und Funktion der 11 β -HSD-Isoenzyme in unterschiedlichen Geweben.

1.5 Regulierung der 11 β -HSD durch Hormone

Die Regulierung der 11 β -HSD durch Hormone ist nach wie vor unklar jedoch gibt es hierzu eine Vielzahl von Publikationen, deren Ergebnisse hier kurz dargestellt werden.

Sexualhormone	<ul style="list-style-type: none"> • Medroxyprogesteronacetat: humane Ishikawa-Endometrium-Adenocarcinomzellen mit 11β-HSD-2-Expression: Aktivitäts- und mRNA-Expressionssteigerung (36) • Progesteron: humane Placentatrophoblasten: Verringerung der 11β-HSD-2-Aktivität/-mRNA (187) • Östrogene: in Pavianplazenta: 11β-HSD-Oxidation erhöht (12, 147, 148); 17β-Östradiol in humanen Ishikawa-Endometrium-Adenocarcinomzellen mit 11β-HSD-2-Expression: Aktivitäts- und mRNA-Expressionssteigerung (36) • Östradiol: humane Placentatrophoblasten/Rattenhoden, -niere, uterus: Hemmung der 11β-HSD-2-Aktivität bzw. mRNA-Expression (8, 141) • Östrogene: Leber-11β-HSD-1: Enzymhemmung, evtl. Prolaktin-vermittelt (8, 11, 12, 78, 96) • Testosteron: Steigerung der 11β-HSD-Aktivität in Rattenlebermikrosomen (96), Hemmung der 11β-HSD-Aktivität in Rattentestis (141)
Glucocorticoide	<ul style="list-style-type: none"> • GC: 11β-HSD-1 der Leber, des Hippocampus, der Lunge; 11β-HSD-2 der Niere: Verstärkung der 11β-HSD-Aktivität (36) • GC (21 Tage lang): Hypophyse, Thymus, Milz: Erhöhung der 11β-HSD-1-Aktivität; andere ZNS-Areale nicht beeinflusst (79) • Adrenalektomie: 11β-HSD-1-Expression kurzfristig verringert, dann Normalisierung; bei Dexamethasongabe nach Adrenalektomie: Aktivitätshemmung (59, 76, 77, 109, 195, 201) • wiederholter Stress mit erhöhten Plasma-Glucocorticoidspiegeln im peripheren und zentralen Nervensystem: keine Veränderung der 11β-HSD-1-Aktivität (79) • Rattenleber-Zelllinie: GRE am Transkriptionsstartpunkt des 11β-HSD-1-Gens (198)
Wachstumshormon	<ul style="list-style-type: none"> • in primären Ratten-Hepatozytenkulturen: Hemmung der 11β-HSD-1 (103) • in humanem omentalen Fettgewebe und in mit humaner 11β-HSD-1 oder -2 transfizierten Zellen: keine Beeinflussung der 11β-HSD-Aktivität (126) • Patienten mit Wachstumshormon-Substitutionstherapie: Verminderung des Urin-Quotienten aus 11-Hydroxy / 11-Oxo-Cortisol-Metabolite und Tetrahydrocortisol/Tetrahydrocortison bei unverändertem freiem Cortisol und Cortison im Urin und Plasma: Reduktion der hepatischen 11β-HSD-I-Aktivität (IGF-1 vermittelt) (54, 126, 193)
Insulin	<ul style="list-style-type: none"> • Hemmung der 11β-HSD-1 erst bei höheren Konzentrationen (10^{-8} bis 10^{-5} mol/l) (103) • keine Hemmung der Basalexpression der 11β-HSD-1; Hemmung der 11β-HSD-Induktion durch Dexamethason /TNF-α (60, 76)

Schilddrüsenhormon	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperthyreose: Anstieg der 11β-HSD-1-Genexpression in Rattenleber (104, 162) • Ratten-Leber und –Hypophyse: Reduktion der 11β-HSD-1-Aktivität nach T₃-Gabe nur in vivo (162, 208), (indirekter Effekt evtl. über Anstieg der Testosteronkonzentration durch vermehrte Differenzierung von Leydig-Zellvorläufern) (13, 81, 104) • 11β-HSD-2-Aktivität in Mineralocorticoid-Zielgeweben wie Colon und Niere nicht beeinflusst (146, 208)
--------------------	--

Tabelle 1-2: Einfluß verschiedener Hormone auf die Aktivität der 11 β -HSDs.

1.6. Erkrankungen mit 11 β -HSD-Aktivitätsverminderung

Eine Reihe von Erkrankungen steht in Verdacht, durch einen 11 β -HSD-Aktivitätsmangel verursacht zu werden, der entweder durch Genmutationen oder endogene bzw. exogene Inhibitoren verursacht wird. Zu diesen Erkrankungen gehören unter anderem das „Syndrome of Apparent Mineralocorticoid Excess“ (SAME), der Lakritze-Abusus, der 11-Oxoreduktase-Defekt, das ektope ACTH-Syndrom und die essentielle Hypertonie.

1.6.1. „Syndrome of Apparent Mineralocorticoid Excess“ (SAME)

Ein Defekt der 11 β -HSD-2-katalysierten Oxidation in der Niere führt zu einem Syndrom, bei dem die Patienten unter einem verminderten Umsatz von Cortisol zu Cortison leiden. Folglich erscheinen im Urin kaum Cortison-Metabolite (Tetrahydrocortison), sondern fast ausschließlich Derivate des Cortisols (5 α - und 5 β -Tetrahydrocortisol). Klinisch kommt es zu Gedeih- und Wachstumsstörungen und einem Hypertonus mit Hypokaliämie, die bis zur Rhabdomyolyse oder einem renalen Diabetes insipidus führen kann (50, 180, 204, 205). Dabei sind die Reninaktivität und das Aldosteron niedrig, während das Cortisol im Serum normal hoch ist. Zur Blutdrucksenkung ist eine salzarme Diät kombiniert mit dem MR-Antagonisten Spironolacton oder anderen kaliumsparenden Diuretika indiziert. Alternativ ist auch Dexamethason durch Hemmung der endogenen Cortisolsekretion wirksam. Pathogenetisch kommt es beim SAME durch den autosomal-rezessiv vererbten 11 β -HSD-2-Defekt zu einer vermehrten Bindung des Cortisols an den MR, so daß dieser seine Aldosteronspezifität verliert und daueraktiviert wird (31, 131, 142, 205). Bis jetzt wurden 30-50 Patienten weltweit beschrieben (57).

1.6.2. Lakritze-Abusus

Auch durch Konsum von großen Mengen an Lakritze kann ein SAME-ähnlicher Zustand hervorgerufen werden, da Lakritze Inhibitoren der 11β -HSD-1 und -2, die Glycyrrhetinsäure und die Glycyrrhizinsäure, enthält. Wie beim SAME verliert der MR durch diese Lakritzebestandteile seine Spezifität für Mineralocorticoide und wird daher von aktiven GCs übermäßig aktiviert (80, 128). Stewart und Edwards zeigten 1987, daß durch Einnahme von 200 g Lakritze/d (entspricht 580 mg Glycyrrhetinsäure, was zu einer Plasmakonzentration von 80 bis 480 ng/ml führt) ein solcher Zustand hervorgerufen werden kann (185). Die maximale Wirkung der Hemmung wird bei Glycyrrhetinsäure etwa 3 h nach Gabe erreicht (111).

1.6.3. 11-Oxoreduktase-Defekt (Apparent Cortisone Reductase Deficiency)

Bisher wurden mindestens 7 Patienten mit defekter Umwandlung von Cortison nach Cortisol und daher einem erhöhten Quotienten von Urinoxometaboliten (THE) zu Urinhydroxymetaboliten des Cortisols (THF + allo-THF) in der Literatur beschrieben (151). Es handelt sich in 6 der Fälle um Frauen mit Nebennierenvergrößerung und Hyperandrogenismus-Symptomen wie Hirsutismus, Oligomenorrhoe und Infertilität. Auch Fettsucht kam gehäuft vor. Dabei waren die Androgene (DHEA, Testosteron, Androstendione) im Serum erhöht, ebenso wie die metabolische Clearancerate des Cortisols. Durch negativen Feedback führt diese zu einer Erhöhung der ACTH-Sekretion mit daraus resultierendem Androgenüberschuß bei normaler Cortisolkonzentration im Serum. Dexamethason kann zur Unterdrückung des erhöhten ACTH und damit auch des Androgenüberschusses therapeutisch eingesetzt werden. Als Ursache wird ein Defekt im 11β -HSD-1-Gen vermutet, der bisher noch nicht sicher nachgewiesen wurde (32, 75).

1.6.4. Ektopes ACTH-Syndrom

Ein weiterer Zustand, bei dem die Mineralocorticoid-Spezifität des MR verloren zu gehen scheint, ist das ektopes ACTH-Syndrom, das durch ACTH-sezernierende Tumoren ausgelöst wird. Die Patienten weisen einen hohen Cortisol/Cortison-Quotienten im Plasma auf und scheiden hohe Mengen an freiem Cortisol und an Cortisolmetaboliten im Urin aus. Ob es, wie Ulick postuliert, zu einer Substratübersättigung der 11β -HSD kommt oder ob die

Nebennierenstimulation durch ACTH zur Ausschüttung eines Inhibitors der 11 β -HSD führt, ist noch nicht geklärt (183, 197, 199).

1.6.5. Essentielle Hypertonie

Weil beim SAME eine ausgeprägte Hypertonie auftritt, wird vermutet, daß eine geringe Hemmung der 11 β -HSD zu einer leichteren Form des Bluthochdruckes führen und eine essentielle Hypertonie auslösen kann (177, 200). Da die 11 β -HSD der Placenta den Schutz des Fetus vor den mütterlichen GCs übernimmt, wurde in verschiedenen Studien ein Zusammenhang zwischen einem niedrigen Geburts- und Plazentagewicht, wie es bei Glucocorticoidüberschuß des Fetus vorkommt und einem essentiellen Hypertonus beim Erwachsenen untersucht (43). Die Ergebnisse dieser Studien erlauben allerdings keine klare Aussage über einen Zusammenhang zwischen einem niedrigen Geburtsgewicht und einem essentiellen Hypertonus im Erwachsenenalter (101). Ebenfalls noch widersprüchlich diskutiert wird, ob endogene, renal ausgeschiedene Inhibitoren, die in Anlehnung an den Lakritzeabusus GALFs (Glycyrrhetic Acid Like Factors) genannt werden, für einen essentiellen Hypertonus verantwortlich sein können. (129, 203). Lediglich eine Studie von vielen fand eine Assoziation zwischen einem Mikrosatellitenmarker nahe der 11 β -HSD und einem Bluthochdruck bei Farbigen mit renalen Erkrankungen. Die verlängerte Cortisolhalbwertszeit, die in zwei kleineren Studien demonstriert werden konnte, könnte durch andere Enzymaktivitätsminderungen (z.B. der 5 β -Reduktase) erklärt werden. Eine bei hyporeninämischen Hypertonikern erhöhte GALF-Exkretion könnte auch durch deren Abhängigkeit von der Natriumexkretion erklärt werden.

1.7. Inhibition der 11 β -HSDs

Wegen der großen Bedeutung der 11 β -HSDs in der Regulierung der lokalen Glucocorticoid-Konzentration und dem daraus resultierenden Einfluß auf den gesamten Stoffwechsel stehen Inhibitoren der 11 β -HSD sowohl als experimentelle Werkzeuge als auch als mögliche Erklärungen für metabolische Regulationsstörungen im Interesse der Forschung. Der durch seine mineralocorticoide Wirkung am längsten bekannte Inhibitor ist die Lakritze mit ihren beiden aktiven Bestandteilen, der Glycyrrhetinsäure und dem in vitro 200fach schwächer

hemmenden Glucuronid, der Glycyrrhizinsäure (44, 46, 80, 110, 111). Auch die inhibitorische Wirkung von Carbenoxolon, dem wasserlöslichen Succinylester der Glycyrrhetinsäure, wurde vielfach beschrieben (125, 130, 179, 184). Es konnte gezeigt werden, daß die Hemmung auf einer kompetitiven Inhibition beruht (125). Die weiteren 11 β -HSD-Inhibitoren lassen sich in zufällig entdeckte Hemmstoffe, in durch klinische Beobachtungen auffällig gewordene Substanzen und in Stoffe, die aufgrund ihrer Struktur untersucht wurden, unterteilen. Zu den zufällig entdeckten Substanzen gehören steroidale Detergenzen wie [Cholamidopropyl-dimethylammonio]-1-Propan-Sulfonat (CHAPS), deren Hemmwirkung bei kinetischen Untersuchungen der 11 β -HSD auffielen (siehe Tab. 1-3) (66).

Substanz	IC50-Wert der Oxidation (mol/l)	IC50-Wert der Reduktion (mol/l)
CHAPS	$(1,7 \pm 0,4) \times 10^{-4}$	$(8,2 \pm 2,5) \times 10^{-4}$
BIGCHAP	$(2,6 \pm 0,2) \times 10^{-6}$	$(5,8 \pm 0,4) \times 10^{-6}$
Deoxy-BIGCHAP	$(5,5 \pm 0,5) \times 10^{-5}$	$(5,8 \pm 0,3) \times 10^{-4}$

Tabelle 1-3: IC50-Werte verschiedener steroidaler Substanzen für die Oxidation und Reduktion der 11 β -HSD in Rattennierenmikrosomen.

Bei den Inhibitoren, die durch klinische Beobachtung entdeckt wurden, sind vor allem die Gallensäuren erwähnenswert. Diese wurden näher untersucht, weil bei Erkrankungen mit hohen Gallensäurekonzentrationen im Blut Veränderungen im Cortisolmetabolismus bemerkt worden waren (1, 35, 192). Auf eine weitere Gruppe von potentiellen 11 β -HSD-Inhibitoren, die Progesteronmetabolite, stieß man wegen einer erhöhten 11 β -HSD-Inhibitoraktivität bei Schwangeren (129). Es wurde aber kein systematischer Vergleich der 11 β -HSD-1- und -2-Oxidation und -Reduktion in menschlichen Geweben durchgeführt. Da sowohl Gallensäuren als auch Progesteronmetabolite Struktur analogien zu den natürlichen Substraten der 11 β -HSD besitzen, wurden weitere ähnlich aufgebaute Substanzen wie Sterole und synthetische Glucocorticoide auf ihre Hemmwirkung untersucht (siehe Tabelle 1-4 und Diskussion).

A)	Verbindung	IC50-Werte ($\mu\text{mol/l}$) Oxidation	
		Sitosterol	1395
	Stigmasterol	1968	
B)	Inhibitor	Ki ($\mu\text{mol/l}$) Oxidation	Ki ($\mu\text{mol/l}$) Reduktion
	Dexamethason	$12,3 \pm 2,5$	$8,4 \pm 0,5$
	Budesonid	$2,8 \pm 0,3$	$58,3 \pm 7,9$
	Deflazacort	$2,4 \pm 0,3$	$73,6 \pm 17,1$

Tabelle 1-4:

- A) IC50-Werte für Strukturanaloga der 11 β -HSD-Substrate (217). Die Untersuchungen wurden an Meerschweinchen-Nierenrinde mit Cortisol als Substrat und NADP als Cosubstrat durchgeführt.
- A) Ki-Werte für die Hemmung mit verschiedenen synthetischen Steroiden (71). Zur Untersuchung der Oxidation und Reduktion wurde rekombinante humane 11 β -HSD-1 in *Pichia-pastoris* –Hefezellen benutzt, Substrat war Cortisol bzw. Cortison.

Zusätzlich wurden Substanzen mit Einfluß auf den Elektrolythaushalt auf ihre 11 β -HSD-inhibitorische Potenz untersucht. Eine solche Substanz mit unklarer hypokaliämischer Wirkung ist Gossypol, ein Derivat aus Baumwollsamensamen, das wegen seiner vermuteten antikonceptiven Wirkung bei Männern bekannt wurde. Es konnte eine deutliche 11 β -HSD-Inhibition gezeigt werden mit IC50 Werten von 50,2 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 1143 $\mu\text{mol/l}$ und 147 $\mu\text{mol/l}$ für die 11 β -HSD-2 und die 11 β -HSD-1 (169, 176), so daß weitere Polyphenole wie die Bioflavonoide untersucht wurden. Auch bei diesen stellte sich eine Hemmwirkung auf die 11 β -HSD heraus (siehe Tabelle 1-5). Besonders potent war das Naringin, das in Grapefruitsaft vorhanden ist und in vivo bei einigen Versuchspersonen zu einer Enzymhemmung, die durch Messung der Urinmetabolite ermittelt wurde, führte (161). Das Naringin wird im Darm in Naringenin, das entsprechende Aglykon, verwandelt. Auch Teepolyphenole hemmten die 11 β -HSD (58, 161).

Inhibitor	IC50 (µmol/l) - NAD	IC50 (µmol/l) – NADP	weitere Daten
Quercetin	192 ± 18	355 ± 82	*K _i Oxidation(µM) = 350 ± 30,5 *K _i Reduktion (µM) = 327 ± 25 **IC 50 =336(µM)
Apigenin	284 ± 25	125 ± 16	
Kaempferol	322 ± 13	293 ± 62	
Naringenin	496 ± 77	264 ± 63	
Hesperetin	769 ± 69	509 ± 45	**IC 50 = 2373(µM)
Naringin	21,191 ± 4,949	10,550 ± 1,136	
Hesperidin	> 55,000	> 50,000	

Tabelle 1-5: IC50-Werte einiger Bioflavonoide, deren 11β-HSD-1 (NADP-abhängig) und 11β-HSD-2 (NAD-abhängige) inhibitorische Wirkung an Nierenrindenmikrosomen bei Meerschweinchen untersucht wurde. Es wurde jeweils nur die Oxidation mit Cortisol als Substrat getestet (98).

* Ki-Werte: (rekombinante humane 11β-HSD-I in Pichia-pastoris-Hefezellen mit Cortisol bzw. Cortison als Substrat)(71)

** IC 50-Werte (Meerschweinchen-Nierenrindenmikrosomen mit Cortisol als Substrat und NADP als Cosubstrat) (217)

Als weitere Inhibitorkandidaten wurden diverse Diuretika getestet, wieder aufgrund des Einflusses auf den Elektrolythaushalt. Dabei zeigte nur Furosemid eine Hemmung der 11β-HSD (siehe Tabelle 1-6). Fuster konnte zeigen, daß Furosemid in mit humaner 11β-HSD-2 transfizierten COS-1-Zellen kompetitiv mit einem K_i von 30 µmol/l hemmt (52).

Hemmung der 11β-HSD durch Furosemid		
K _i Oxidation(µM) 0,33 ± 0,05	K _i Reduktion (µM) 0,55 ± 0,1	1
K _i Nieren-Oxidation 19,5 µM	K _i Leber-Oxidation 21,3 µM	2
IC50-Wert (Oxidation): 59 (µmol/l)		3

Tabelle 1-6: Hemmung der 11β-HSD durch Furosemid

¹ Mikrosomen mit rekombinante humane 11β-HSD-I in Pichia-pastoris-Hefe, Substrat: Cortisol und Cortison (71)

² Rattenleber-, -nierenmikrosomen, Substrat: Corticosteron (45)

³ Meerschweinchen-Nierenrindenmikrosomen, Substrat: Cortisol (217).

In vivo an Ratten läßt sich durch Furosemid der Quotient Tetrahydrocorticosteron + 5α-Tetrahydrocorticosteron/11-Dehydro-Tetrahydrocorticosteron erhöhen, nicht jedoch durch Torasemid. Auch andere Xenobiotika wurden auf eine 11β-HSD-Hemmung gescreent, wobei bei den meisten keine relevante Hemmung nachzuweisen war (siehe Tabelle 1-7).

Substanzen ohne relevante 11 β -HSD-Hemmung		
Spironolacton, (*)	Piroxicam	Digoxin
Acetazolamid	Naproxen	Cyclosporin
Amilorid	Indometacin (*)	Trimethoprim
Chlorthalidon	Ibuprofen	Sulindac
Clopamid	Acetylsalicylsäure	Atenolol
Bendroflumethiazid	Phenylbutazon (IC ₅₀ : 1358 μ mol/l)*	Aredia
Hydrochlorothiazid (*)		
Indapamid		
Etacrynsäure (IC ₅₀ : 452 μ mol/l)*		
Bumetanid*		

Tabelle 1-7: Bisher bereits untersuchte Substanzen ohne relevante 11 β -HSD-Hemmung (keine Hemmung im therapeutischen Bereich oder bei 10fach höheren Konzentrationen) Rattenleber- und Rattennierenmikrosomen, Corticosteron als Substrat (45) *IC₅₀-Werte (Meerschweinchen-Nierenrinden-Mikrosomen mit Cortisol als Substrat und NADP als Cosubstrat) (217).

Riddle et al. konnten eine Zunahme der 11 β -HSD-Aktivität in Rattennierenschnitten und in vivo bei Ratten durch Ramiprilat, der aktiven Form des ACE-Hemmers Ramipril, und durch Captopril zeigen (165). Glucose bzw. Insulin, Toradol oder Ethanol konnten in vivo bzw. in vitro in Rattennierengewebe eine Hemmung der 11 β -HSD-Aktivität um etwa 20-40 % auslösen (164). Auch für Komponenten der Ginsengwurzel konnte eine 11 β -HSD-Hemmung festgestellt werden, ohne daß die genauen Wirkstoffe bekannt sind. Cava Cava und Knoblauch waren selektive Oxidase-Inhibitoren, und Ginkgo biloba hemmte sowohl die Reduktion als auch die Oxidation (196).

1.8. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Die 11 β -HSD ist das Schlüsselenzym des lokalen Glucocorticoidmetabolismus in den verschiedenen Geweben. Da sie in fast allen Geweben nachgewiesen werden kann, erfüllt sie vielfältige Funktionen im Stoffwechsel des Körpers. Die Besonderheit ist, daß sich die beiden Isoenzyme stark in ihrer Struktur und ihren Eigenschaften unterscheiden und auch unterschiedliche Funktionen ausüben. Während die 11 β -HSD-1 überwiegend aktivierend auf Glucocorticoide wirkt, inaktiviert die 11 β -HSD-2 hauptsächlich. Dies macht es wahrscheinlich, daß es Substanzen gibt, die selektiv nur ein Isoenzym hemmen. Unser Ziel war es, einen solchen selektiven Inhibitor für die 11 β -HSD-1 zu finden.

Der Zweck eines solchen Stoffes wäre zum einen, unerwünschte Stoffwechselfvorgänge im Fettgewebe und in der Leber, die zu Erkrankungen führen, günstig zu beeinflussen. Von zentraler Bedeutung sind die endogenen Glucocorticoidkonzentrationen im Fettgewebe für die Reifung von Adipozyten und die Lipidakkumulation. Da die 11 β -HSD-1 besonders im omentalen Fettgewebe vorkommt und dort zu einer Reifung von Zellen und damit Erhöhung der 11 β -HSD-1 führt, könnte es bei Erkrankungen wie der zentralen Adipositas zu einem Circulus vitiosus kommen. In der Leber spielt die dortige Glucocorticoidkonzentration eine zentrale Rolle in der Regulierung des Glucosehaushaltes. Eine übermäßige Aktivität der 11 β -HSD-1 in der Leber mit nachfolgender Erhöhung der lokalen Glucocorticoidkonzentration fördert die Gluconeogenese und erhöht den Blutzuckerspiegel. Eine solche Induktion der 11 β -HSD-1 könnte beim Diabetes mellitus Typ 2 an der Entstehung der hepatischen Insulinresistenz kausal beteiligt sein. Beide Effekte der 11 β -HSD-1 im Fettgewebe und in der Leber führen zu Symptomen des metabolischen Syndroms, zu denen auch noch die Dyslipoproteinämie, die Hyperurikämie und der essentielle Hypertonus gehören.

Neben der lokalen endogenen GC-Konzentration reguliert die 11 β -HSD den Abbau von therapeutisch zugeführten Steroiden. Da die Isoenzyme der 11 β -HSD fluorierte inaktive Dehydro-Glucocorticoide wie 11-Dehydro-Dexamethason fast ausschließlich durch Reduktion aktivieren, wollten wir die Verschiedenheit der Isoenzyme nutzen, um ein drug-targeting zu

erreichen. Hierzu sollte durch einen selektiven 11 β -HSD-1-Inhibitor die Funktion der Leber 11 β -HSD-1 ausgeschaltet werden, so daß das inaktive Prodrug unmetabolisiert in den systemischen Blutkreislauf gelangen könnte. Es würde erst durch die ungehemmte 11 β -HSD-2, die hauptsächlich in der Niere und in geringeren Mengen im Kolon vorhanden ist, aktiviert werden und so in der Niere und im Colon wirken. Die beträchtlichen systemischen Nebenwirkungen der Glucocorticoide könnten verhindert bzw. vermindert werden.

Die Hemmbarkeit der 11 β -HSD-1- und -2-katalysierten Reduktion und Oxidation in humanen Mikrosomen sollte untersucht werden, um einen solchen selektiven Inhibitor zu finden. Anhand von IC₅₀-Werten für die einzelnen Reaktionen sollte eine quantitative Aussage über die Inhibitorstärke der jeweiligen Substanzen gemacht und ein Vergleich der Hemmung der 11 β -HSD-1 und -2 ermöglicht werden.