

1 Einleitung

1.1 Eigenschaften der Glukokortikoide

Glukokortikoide gehören zu den am weitesten verbreiteten Medikamenten in der Behandlung autoimmunologisch vermittelter Entzündungen. Seit der Entdeckung der antirheumatischen Wirksamkeit des Cortisons durch HENCH et al. [67] im Jahre 1949 sind zahlreiche verwandte Substanzen synthetisiert worden, von denen heute viele ein fester Bestandteil der Standardtherapie bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, Asthma bronchiale, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Schüben einer Multiplen Sklerose, Allergien und Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen geworden sind. Ein Vergleich agonistischer Eigenschaften dieser Stoffe *in vitro* steht im Mittelpunkt der vorliegenden Untersuchung.

1.1.1 Biologische Basis

Das hauptsächliche Glukokortikoid des Menschen, Cortisol, wird unter physiologischen Bedingungen nach Stimulation durch hypophysäres Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) in der Nebennierenrinde gebildet. Das aus 21 Kohlenstoffatomen aufgebaute Steroid weist eine 4,5-Doppelbindung, Ketofunktionen an C3 und C20 sowie Hydroxylgruppen in 11 β -, 17 α - und 21-Position auf (Abb. 1). Bei systemischer Gabe des selbst antiphlogistisch inaktiven Cortisons stellt es das wirksame Prinzip dar und wird, da es aus jenem *in vivo* durch Hydrierung der 11-Oxogruppe hervorgeht, synonym als Hydrocortison bezeichnet. Vorläufer für die normale Biosynthese des Cortisols und der anderen Kortikoide ist Pregnenolon, das seinerseits durch Abspaltung einer Kohlenstoffseitenkette an Position 20 aus dem Cholesterin hervorgeht. Strukturell leiten sich beide von dem aus vier Kohlenstoffringen bestehenden Grundgerüst des *Sterans* ab.

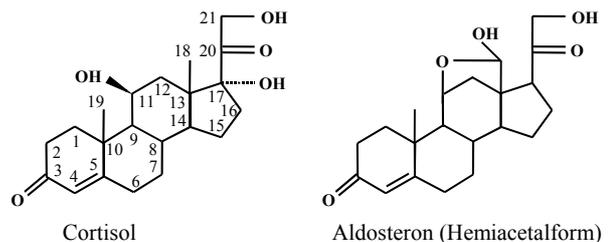


Abb. 1: Strukturformeln von Cortisol und Aldosteron.

Aldosteron, das wesentliche menschliche *Mineralokortikoid*, tritt in gelöster Form durch Bildung von 11,18-Hemiacetalbrücken in zwei Isomeren auf und unterscheidet sich strukturell neben der 18-Aldehydgruppe durch die fehlende 17 α -Hydroxylierung vom Cortisol. Seine peripher normalerweise um 0,35 nM liegenden Plasmaspiegel werden in erster Linie über das Renin-Angiotensin-System und die extrazelluläre Kaliumkonzentration reguliert [32].

Glukokortikoide entfalten ihre biologischen Wirkungen weitestgehend durch Beeinflussung der Transkriptionsrate verschiedener Gene unter Vermittlung des Gluko- (GR) und des Mineralokortikoidrezeptors (MR). Über den GR wird einerseits die natürliche Steuerung umfangreicher zellulärer Differenzierungs-, Proliferations- und Synthesevorgänge v. a. im Immunsystem ermöglicht, die auch die Grundlage der antiphlogistischen Wirksamkeit von Glukokortikoidgaben in supraphysiologischer Dosis bilden. Andererseits werden auch die bei immunsuppressiver Therapie unerwünschten metabolischen und zytotoxischen Effekte, die unten tabellarisch aufgeführt sind, über den GR gesteuert, während über den MR vor allem die ebenfalls nachteiligen Effekte auf Elektrolythaushalt und Zirkulation – vor allem Natrium- und Wasserretention, Hypokaliämie und Hypertension – in Gang gesetzt werden [133]. Die diesen biologischen Effekten zugrundeliegenden molekularen Mechanismen werden in 1.2 ausführlich erörtert.

ORGANSYSTEM	UNERWÜNSCHTE WIRKUNGEN
Auge	Glaukom Katarakt
Endokrinum	Cushing-Syndrom Diabetes mellitus Nebennierenrindeninsuffizienz Hypogonadismus
Gastrointestinaltrakt	Ulcus(blutung) Pankreatitis
Haut	Atrophie, Striae rubrae distensae Wundheilungsstörungen periorale Dermatitis Teleangiektasien, Petechien Hypertrichose
Muskulatur und Skelett	Muskelatrophie, Myopathie Osteoporose Knochennekrosen
ZNS	kognitive und emotionale Störungen Steroidabhängigkeit Hirnatrophie

Tab. 1: Über den GR vermittelte unerwünschte Wirkungen von Glukokortikoiden, die nicht unmittelbar auf der Immunsuppression beruhen (nach [133]).

1.1.2 Synthetische Modifikationen

Der Gedanke, durch strukturelle Veränderungen des Cortisons eine Trennung der Einflüsse auf metabolische Prozesse und den Elektrolythaushalt einerseits von den entzündungshemmenden Effekten andererseits zu erzielen, stimulierte schon mit Beginn seiner klinischen Verwendung die Suche nach solchen geeigneteren Analoga. Nachdem zunächst erfolglose Versuche die Ansicht stützten, eine Verbesserung des natürlichen Wirkungsprofils von Cortison bzw. Cortisol sei ausgeschlossen, konnte ab 1954 gezeigt werden, daß sowohl eine Wirkungsverstärkung als auch eine Verschiebung der quantitativen Verhältnisse zwischen den einzelnen biologischen Effekten der Glukokortikoide synthetisch herbeigeführt werden kann [106].

Die ersten dahingehenden Resultate erhielt man bei der Untersuchung 9α -halogener Cortisolderivate, zunächst im Tierversuch, wenig später in Studien an gesunden Probanden [147] und an Patienten mit Morbus Addison [62]. Bei der effektivsten dieser Substanzen, dem 9α -Fluorocortisol (= Fludrocortison), erwies sich die glukokortikoide Potenz als etwa zehnmal so groß wie die des Cortisols, während die natriumretinierende, d. h. mineralokortikoide Potenz um deutlich mehr als das 50fache über der des letzteren lag. Hierbei wird unter *Potenz* der Faktor verstanden, um den die für die Erzielung einer definierten biologischen Wirkung erforderliche Dosis des untersuchten Steroids *kleiner* ist als die der Referenzsubstanz (z. B. Cortisol).

Hatte man mit Fludrocortison somit unbeabsichtigt ein hochwirksames und bis heute in der Substitutionstherapie bei primärer Nebenniereninsuffizienz verwendetes Mineralokortikoid gefunden, gelang um 1955 der erste entscheidende Fortschritt zu einem nebenwirkungsärmeren Glukokortikoid durch die Einführung einer zweiten Doppelbindung im A-Ring des Cortisols in Position 1,2 [69]. Die im Vergleich mit diesem etwas verminderte mineralokortikoide und etwa vierfach erhöhte glukokortikoide Potenz von Δ^1 -Hydrocortison (= Prednisolon) führte zu seiner weiten klinischen Verbreitung, wenn auch das unveränderte Fortbestehen der in Tab. 1 zusammengefaßten unerwünschten Effekte bald offenbar wurde.

Mit der Entdeckung dieser und weiterer wirkungssteigernder Strukturmodifikationen ergab sich auch die Frage nach den Auswirkungen von Kombinationen solcher Veränderungen. In

einer umfangreichen Auswertung experimenteller und klinischer Forschungsergebnisse stellten FRIED und BORMAN 1958 fest, daß der quantitative Einfluß einer funktionellen Gruppe auf die glukokortikoide Aktivität des Steroids weitgehend unabhängig von dem anderer Substituenten oder Bindungen ist [53], was in semiquantitativer Weise auch für die mineralokortikoiden Effekte gilt. Anhand der vorliegenden Daten ordneten sie definierten chemischen Veränderungen bestimmte „Verstärkungsfaktoren“ zu, deren Multiplikation eine relativ genaue Vorhersage der glukokortikoiden Potenz neu synthetisierter Kortikoide zuläßt. Hierfür gibt Tab. 2 ein Beispiel, wobei die verstärkende Wirkung der 9 α -Fluorierung dort verglichen mit den oben zitierten Resultaten geringer erscheint.

STEROID	ZUSÄTZLICHE FUNKTIONEN	VERSTÄRKUNGS-FAKTOR	ANTIARTHRITISCHE WIRKSAMKEIT
Cortisol	-	1	1
16 α -Methylcortisol	16 α -Methyl	2,5	2,5
16 α -Methylprednisolon	16 α -Methyl 1-Dehydro	2,5 2	5
16 α -Methyl-9 α -fluorocortisol	16 α -Methyl 9 α -Fluor	2,5 5	11
16 α -Methyl-9 α -fluoroprednisolon (Dexamethason)	16 α -Methyl 9 α -Fluor 1-Dehydro	2,5 5 2	26

Tab. 2: Aktivität von 16 α -Methylkortikoiden beim Menschen (modifiziert nach [53]), vgl. Abb. 4 (S. 28).

Zwar konnten in der Folgezeit durch weitere, komplexere Variationen wie die Kondensation heterozyklischer Ringsysteme in kleinsten Mengen wirksame und damit z. B. für die inhalative Verwendung geeignete Verbindungen synthetisiert werden. Weder der Austausch bestimmter Gruppen noch der Ersatz einzelner Kohlenstoffatome im Steroidgerüst führte aber zu einer wesentlichen Reduktion ihrer typisch „glukokortikoiden“ Nebenwirkungen bei systemischer Verfügbarkeit. Lediglich für das 16,17-Oxazolinderivat Deflazacort wurde ein geringeres Osteoporoserisiko postuliert, was aber aufgrund der in den betreffenden Studien nicht sicher eingehaltenen Äquivalenzdosen auch angezweifelt wird [12;43]. Daß die angestrebte Dissoziation erwünschter und unerwünschter GR-vermittelter Effekte dennoch möglich sein sollte, ist in jüngerer Zeit mit der Aufklärung zahlreicher Einzelaspekte der im Organismus von den Gluko- und Mineralokortikoiden vermittelten und auf sie selbst

einwirkenden Regulationsvorgänge deutlich geworden [19]. Ein bedeutsamer Ansatz könnte künftig in der völligen Abkehr von der Steroidstruktur und der Erzeugung von Substanzen bestehen, die einzelne Funktionen des Glukokortikoidrezeptors selektiv modulieren [134].

1.1.3 Pharmakokinetische Aspekte

Für die gluko- und mineralokortikoide Potenz und Spezifität von Kortikoiden sind neben ihren jeweiligen pharmakodynamischen Eigenschaften individuelle Unterschiede in Resorption, Verteilung und systemischem wie lokalem Metabolismus von großer Bedeutung. Auf einige für die Beurteilung agonistischer Eigenschaften relevante Aspekte soll daher im folgenden eingegangen werden.

Globale Charakteristika. Die gängigen oral gegebenen Cortisolderivate werden aus dem Verdauungstrakt gut resorbiert. In Position 21 veresterte Glukokortikoide sind erst nach der Spaltung dieser Bindung biologisch aktiv. Inhalative Kortikoide wirken überwiegend lokal, da sie nach Resorption schnell zu inaktiven Metaboliten umgewandelt werden. Der Transport endogener Glukokortikoide erfolgt zu über 90 % proteingebunden, hauptsächlich an Corticosteroidbindendes Protein (CBG), zu dem sie ebenso wie Prednisolon eine hohe Affinität haben. Im Gegensatz dazu binden die meisten anderen synthetischen Analoga sowie Aldosteron zu etwa zwei Dritteln an Albumin, während das übrige Drittel frei vorliegt [5]. Der Abbau zirkulierender Gluko- und Mineralokortikoide erfolgt vor allem hepatisch über diverse Reduktions-, Hydroxylierungs- und Konjugationsreaktionen (z. B. Glukuronidierung), die Ausscheidung der Produkte weitestgehend renal. Während die Plasmahalbwertszeiten dosisabhängig im Bereich von ca. 1-5 h liegen (bei Aldosteron unter 30 min), ist die tatsächliche Wirkdauer durch Umverteilungsvorgänge und den translationsvermittelten Wirkmechanismus um ein Mehrfaches größer.

Bedeutung der 11 β -HSD. Die Interkonversion von 11 β -Hydroxy- und -oxosteroiden durch 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (11 β -HSD) spielt eine wichtige Rolle für die zellspezifischen Effekte von Kortikosteroiden, da 11-Oxosteroide keine gluko- oder mineralokortikoide Aktivität besitzen. Zwei strukturell und funktionell verschiedene „Isoenzyme“ der 11 β -HSD sind identifiziert und kloniert worden [3;146]. Die in zahlreichen

Organen, insbesondere der Leber, exprimierte 11 β -HSD1 katalysiert *in vivo* vorrangig eine NADPH-abhängige Reduktion von 11-Oxosteroiden. Die 11 β -HSD2 ist vor allem in den typischen Zielorganen der Mineralokortikoide (Niere, Dickdarm und Speicheldrüsen) sowie der Plazenta zu finden und oxidiert bei *endogenen* Glukokortikoiden NAD-abhängig die 11 β -Hydroxylgruppe [144]. Der K_m -Wert für die bei der 11 β -HSD1 ebenfalls nachweisbare Dehydrogenaseaktivität ist mit 2 μ M etwa zehnmal so hoch wie bei der 11 β -HSD2.

Cortisol bindet *in vitro* mit vergleichbarer Affinität wie Aldosteron an den humanen MR und wirkt über diesen als Agonist [9]. Da nicht proteingebundenes Cortisol im Plasma normalerweise 50fach höher als Aldosteron konzentriert vorliegt, ist seine Inaktivierung durch die 11 β -HSD2 der entscheidende Mechanismus, der physiologischerweise die Selektivität der MR-Aktivierung für Aldosteron gewährleistet [54]. Dies wird klinisch durch das Syndrom des scheinbaren Mineralokortikoidüberschusses (apparent mineralocorticoid excess, AME) verdeutlicht, dem funktionsmindernde Mutationen der 11 β -HSD2 mit einer konsekutiven Aktivierung des MR durch endogenes Cortisol in der Niere zugrunde liegen [122;143;157]. Der gleiche Effekt läßt sich durch exzessiven Lakritzegenuß herbeiführen, bei dem es zu einer Hemmung des Enzyms durch die aus dem Genußmittel freigesetzte Glyzyrrhetinsäure kommt [101].

Die reduzierende Tätigkeit der 11 β -HSD1 führt nicht nur zu einer Regeneration 11 β -oxidierter endogener Glukokortikoide, sondern auch zur Aktivierung der Prodrugs Cortison und Prednison zu Cortisol bzw. Prednisolon. Konsistente Untersuchungsergebnisse aus Gewebshomogenisaten und enzymexprimierenden Zellkulturen zeigen, daß *synthetische* Steroide in Abhängigkeit vom Vorhandensein bestimmter Substituenten auch von der 11 β -HSD2 reduziert, d. h. aktiviert werden können [45]. Dies gilt insbesondere bei einer Fluorierung in 6 α - oder 9 α -Position, wodurch auch ein Teil der starken mineralokortikoiden Wirkung von 9 α -Fluorocortisol erklärbar ist [110]. Hingegen führt die 1-Dehydrokonfiguration zu einer vermehrten Oxidation durch die 11 β -HSD2, was gut mit der unterschiedlichen mineralokortikoiden Potenz von Prednisolon und Cortisol vereinbar ist.

Jedes biologische Testsystem, in dem typische agonistische Qualitäten von Glukokortikoiden geprüft werden sollen, bedarf aufgrund dieser speziellen pharmakokinetischen Gegebenheiten einer Charakterisierung der enzymatischen Aktivität der 11 β -HSD-Typen.

1.2 Wirkungsmechanismen

1.2.1 Gluko- und Mineralokortikoidrezeptor

Der Glukokortikoidrezeptor (hGR) und der Mineralokortikoidrezeptor (hMR) des Menschen gehören ebenso wie der Progesteron-, Östrogen- und Androgenrezeptor zur Gruppe der *Steroidhormonrezeptoren* (SHR), einer Familie intrazellulär lokalisierter Proteine, die als ligandeninduzierbare Transkriptionsfaktoren agieren: Die Bindung eines geeigneten Hormons führt zu einer aktivierenden Konformationsänderung des Rezeptors, als deren mittelbare Folge die Expression spezifischer Gene über zellkerngebundene Mechanismen stimuliert oder supprimiert wird. Der primäre natürliche Ligand des hGR ist dabei Cortisol, der des hMR Aldosteron. Unter funktionellen wie strukturellen Gesichtspunkten sind die SHR in die Superfamilie der von einer Reihe verwandter Gene kodierten *nukleären Rezeptoren* einzuordnen. Neben den als Typ I bezeichneten SHR zählen zu jenen auch die Rezeptoren für Schilddrüsenhormon, Vitamin D und Retinsäuren (Typ II) sowie diverse Vertreter, für die bisher kein Ligand identifiziert werden konnte und die daher als *orphan nuclear receptors* (Typ III) bezeichnet werden [98].

Die Aminosäuresequenzen von hGR und hMR weisen eine deutliche Homologie auf [9]. Innerhalb der Primärstruktur kann man, wie bei allen nukleären Rezeptoren, mehrere funktionelle Domänen unterscheiden [59;71;82;148]. Die stark divergente aminoterminal

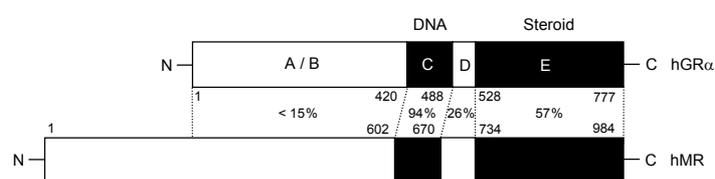


Abb. 2: Schematischer Vergleich der Primärstrukturen von hGR α und hMR (nach [9]). Angabe der Aminosäurehomologie in %.

A/B-Region trägt eine für die Kontrolle der Transkription von Zielgenen bedeutende, konstitutiv tätige Aktivierungsfunktion (AF-1), die mit ubiquitären Transkriptionsfaktoren wechselwirkt. Die hoch

konservierte Region C, die *DNA-bindende Domäne* (DBD), enthält als zentrale Struktur zwei Cys₂/Cys₂-Zinkfinger-Motive, die sowohl für die DNA-Bindung als auch die Rezeptordimerisierung verantwortlich sind und deren Spezifität bestimmen; daneben ist die DBD an der nukleären Translokation des Rezeptors beteiligt. Der sogenannten

„Scharnierregion“ D folgt die carboxyterminal liegende *ligandenbindende Domäne* (LBD) oder Region E, die die von der spezifischen Hormonbindung abhängige transkriptionsregulierende Aktivität (AF-2) beinhaltet. Die komplexen Funktionen der LBD umfassen auch eine Beteiligung an der Bindung von Hitzeschockproteinen (s. u.) und von Kofaktoren für die Transaktivierung, beim hGR zudem an Rezeptordimerisierung und -translokation. Diese letzteren sind für den hMR nicht gesichert [129].

Der hGR kommt in zwei durch alternatives Splicing erzeugten, 777 bzw. 742 Aminosäuren umfassenden Isoformen vor, die seit der Klonierung der cDNA 1985 bekannt sind [72]. In der vorliegenden Arbeit wird stets auf die längere α -Form (hGR α) Bezug genommen. Die mögliche Rolle der kürzeren, nicht hormonbindenden Variante (hGR β) als Inhibitor der hGR α -vermittelten glukokortikoiden Effekte wird kontrovers diskutiert [31;56;109;151]. Der hGR α ist ein 94-kDa-Protein, das in ligandenfreiem Zustand als Teil eines Heterokomplexes mit bestimmten Chaperonen, wie den Hitzeschockproteinen hsp90 (als Dimer) und hsp70 sowie Hop (hsp-Organisatorprotein) und p23, vorliegt [103;117]. Die Funktion von hsp90, den hGR in einem durch den Liganden aktivierbaren Zustand zu halten, ist unstrittig [16;17]. Bei Eintreten einer solchen Aktivierung erfolgt die Dissoziation des Multiproteinkomplexes und die definitive Translokation des hormontragenden Rezeptors in den Zellkern.

Der hMR, ein 107-kDa-Protein aus 984 Aminosäuren, teilt mit dem hGR viele der oben beschriebenen Charakteristika. So ist seine Aktivierbarkeit ebenso von der Interaktion mit hsp90 abhängig wie die des hGR [17]. Auf die Unterschiede bezüglich der N-terminalen und der ligandenbindenden Domäne wurde bereits hingewiesen. Der hMR besitzt eine zehnfach höhere Affinität zu Cortisol und Corticosteron als der hGR [131] und bindet, wie in 1.1.3 beschrieben, Cortisol und Aldosteron *in vitro* mit ungefähr gleicher Dissoziationskonstante. Da in den meisten Zellkultursystemen dennoch eine nicht allein durch 11 β -HSD2-Aktivität erklärable Selektivität des hMR für Aldosteron zu beobachten ist, werden zu deren Erklärung zusätzliche, rezeptorintrinsic Mechanismen angenommen [65;66;92]. Neue Hinweise zur Erklärung der Bindungseigenschaften von hGR und hMR sind vom Vergleich ihrer dreidimensionalen Struktur zu erwarten, deren Aufklärung man sich durch die kürzlich gelungene Kristallisierung der ligandenbindenden Domäne des hGR [24;80] weiter genähert hat. Für den hMR steht ein solcher Schritt allerdings noch aus.

1.2.2 Transaktivierung und Transrepression

Die Regulation von Glukokortikoid-Zielgenen vollzieht sich hauptsächlich durch zwei Mechanismen: Der erste geht mit einer direkten Bindung des Hormon-Rezeptor-Komplexes an die DNA einher, was sowohl zu einer Steigerung als auch zu einer Verminderung der Transkriptionsrate führen kann. Supprimiert wird die Genexpression jedoch in größtem Umfang durch den zweiten Wirkungsweg, der auf einer Inhibition proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren beruht. Da solche durch diffundible Faktoren hervorgerufenen Einflüsse unter den Begriff der *trans*-Regulation fallen, spricht man je nach Konsequenz von Transaktivierung bzw. Transrepression.

Transaktivierung liegt der durch Glukokortikoide induzierten Konzentrationszunahme verschiedener antiinflammatorischer Proteine ebenso zugrunde wie dem größten Anteil ihrer metabolischen Effekte und den von Mineralokortikoiden hervorgerufenen Veränderungen im Elektrolyt- und Wasserhaushalt [18;129]. Hierbei binden zunächst zwei aktivierte Rezeptoren als Homodimer an eine als *glucocorticoid response element* (GRE) bezeichnete DNA-Sequenz im Promotor bzw. Enhancer des Zielgens. Danach kommt es dort zur Anlagerung basaler Proteinkomponenten für die Initiation der Transkription durch die RNA-Polymerase II [16]. Die zuerst in der Promotorregion des *mouse mammary tumor virus* (MMTV) identifizierten GREs [33;73] besitzen ein 15 Basenpaare umfassendes Kernmotiv aus zwei zueinander palindromischen Hälften, die durch drei beliebige Basenpaare (N) getrennt sind [95]. Entsprechend lautet seine Sequenz AGAACANNNTGTTCT. *In vitro* transaktivieren an den GREs aus der MMTV-DNA neben dem GR auch MR, Progesteron- und Androgenrezeptor. *In vivo* könnten neben der Verfügbarkeit des Liganden, dem Einfluß von Koregulatoren und der Interferenz zwischen mehreren Bindungsstellen möglicherweise auch Variationen der genannten Kernsequenz zur Rezeptorselektivität steroidresponsiver Elemente beitragen [108]. Durch Transaktivierung über den GR regulierte entzündungshemmende Proteine sind z. B. der IL-1-Rezeptor-Antagonist und Serumleukoprotease-Inhibitor [18]. Daneben werden zahlreiche andere – darunter Schlüsselenzyme der Gluconeogenese – auf diesem Wege induziert. Über den MR wird die Expression von Untereinheiten der Natrium-Kalium-ATPase und des epithelialen Natriumkanals (ENaC) sowie von ENaC-Regulatoren wie der Serum- und Glukokortikoid-regulierten Kinase (Sgk) ebenfalls mittels Transaktivierung kontrolliert [79;129].

Neben den beschriebenen gibt es GREs mit abweichender Sequenz und Aktivität, z. B. *composite GREs* (cGREs) [44;114;115;159] mit transaktivierender *und* transrepressiver Funktion – welche der beiden ausgeübt wird, hängt vom Einfluß bestimmter nicht essentieller Transkriptionsfaktoren ab. Darüber hinaus wurden rein transrepressiv tätige sogenannte negative GRE (nGRE) gefunden, deren Prototyp im Proopiomelanocortin-Gen dem einfachen GRE nur wenig ähnelt und ein GR-Dimer zusammen mit einem monomeren GR bindet [49]. Hingegen wird z. B. die transkriptionelle Repression des Osteocalcin-Gens durch Überlappung seiner atypischen TATA-Box mit einem klassischen GRE hervorgerufen [99;100].

Transrepression findet hauptsächlich ohne Interaktion des GR mit einem inhibitorischen responsiven Element statt (Tab. 3). Vielmehr ist die Hemmung bestimmter anderer DNA-bindender Proteine der Schlüsselmechanismus für die immunsuppressive Wirkung von Glukokortikoiden [1]. Zahlreiche proinflammatorische Gene besitzen in ihrer Promotorregion Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- κ B, deren Aktivität über ein komplexes Netzwerk von Signaltransduktionswegen durch verschiedenste Entzündungsreize induziert wird. Durch Modulation der Chromatinstruktur, Steuerung des Zugangs von TATA-Box-bindendem Protein zur DNA und Rekrutierung der RNA-Polymerase II steigern solche Transkriptionsfaktoren die mRNA-Synthese für Zytokine und ihre Rezeptoren, chemotaktische Proteine und Adhäsionsmoleküle. Der Glukokortikoidrezeptor interferiert mit diesen Vorgängen auf mehreren sich ergänzenden Ebenen [39], wobei stets Protein-Protein-Kontakte die entscheidende Rolle spielen. Daher sind auch GR-Mutanten ohne DNA-Bindungsfunktion zur Transrepression befähigt [126].

Posttranskriptionelle Inhibition der Proteinsynthese durch Transaktivierung von Ribonuclease-Genen ist ein weiterer Mechanismus, durch den der GR Einfluß auf die Produktion von Entzündungsmediatoren nimmt. Die durch diese Enzyme hervorgerufene Reduktion der mRNA-Halbwertszeit ist z. B. mitverantwortlich für den repressiven Effekt von Glukokortikoiden auf GM-CSF und die Cyclooxygenase 2 (COX-2) [1].

Abkürzungen (weitere siehe Text)

AP: activator protein; CINC/gro: cytokine-induced neutrophil chemoattractant/growth-related cytokine; C/EBP: CCAAT enhancer binding protein; CREB: cAMP response element-binding protein; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony stimulating factor; ICAM: intercellular adhesion molecule; IFN: Interferon; IL: Interleukin; iNOS: induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; NF: nuclear factor; RANTES: regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; TNF: Tumornekrosefaktor; VCAM: vascular cellular adhesion molecule

GEN(PRODUKT)	TRANSKRIPTIONSFAKTOREN
<i>Zytokine</i>	
IL-2	NF-AT, AP-1, NF-κB
IL-6	NF-κB, C/EBP-β, AP-1
TNF-α	NF-κB
IL-1β	CREB, C/EBP-β, NF-κB
GM-CSF	NF-κB
IFN-γ	AP-1
<i>Chemokine</i>	
IL-8	NF-κB
CINC/gro	NF-κB
RANTES	NF-κB
<i>Enzyme</i>	
iNOS	NF-κB
COX-2	NF-κB
Kollagenase	AP-1
<i>Adhäsionsmoleküle</i>	
ICAM-1	NF-κB
E-Selektin	NF-κB
VCAM-1	NF-κB

Tab. 3: Proinflammatorische Gene, die durch Glukokortikoide unabhängig von einem nGRE herunterreguliert werden, und ihre hauptsächlichen Transkriptionsfaktoren (nach [39]).

1.2.3 Nichtgenomische Effekte

Sowohl für Gluko- und Mineralokortikoide als auch für andere Steroidhormone werden neben den in die Proteinsynthese eingreifenden Mechanismen weitere, sogenannte *nichtgenomische* Wirkungsweisen angenommen, die teilweise von den beschriebenen zytosolisch-nukleären Rezeptoren unabhängig sein sollen. Zu dieser Vermutung motiviert die Beobachtung solcher Kortikoideffekte *in vivo* und *in vitro* [25;30], die

- (a) eine Latenzzeit von wenigen Minuten nach Gabe der Substanz aufweisen,
- (b) durch Hemmstoffe der Proteinsynthese nicht beeinflussbar sind.

Dabei sind unspezifische (nicht rezeptorabhängige) von spezifischen nichtgenomischen Wirkungen zu unterscheiden. Während für die ersten eine direkte Wechselwirkung mit der Zellmembran angenommen wird, setzen die letzten eine Bindung entweder an die bekannten intrazellulären oder an noch zu charakterisierende membranständige Rezeptoren voraus. Hinweise sowohl für alternative Signaltransduktionswege über den klassischen GR als auch für die Existenz membranärer Steroidrezeptoren liegen vor [30].

Zu den nichtgenomischen Effekten sollen z. B. die innerhalb weniger Minuten nach Erhöhung der Aldosteronkonzentration im Serum eintretende Zunahme der renalen Natriumresorption oder der Menge freien Kalziums in Lymphozyten, glatten Gefäßmuskel- und Endothelzellen gehören [35]. Auch werden sie für die schnelle Wirksamkeit von Glukokortikoiden bei asthmatischen Anfällen oder allergischen Reaktionen sowie deren Effektivität in der hochdosierten Pulstherapie bei Multipler Sklerose verantwortlich gemacht [61]. Hierbei ist möglicherweise ein grundlegend anderes Verhältnis der immunsuppressiven Potenzen gängiger Glukokortikoide als bei genomischer Wirkung zu erwarten [29]. In der vorliegenden Arbeit bleiben diese Aspekte weitestgehend außer Betracht.

1.3 Bindung und Agonismus

Für die Quantifizierung der über einen bestimmten Rezeptor vermittelten Wirkungen eines Steroids sind zwei Gesichtspunkte von grundlegender Bedeutung: die *Bindung* an diesen Rezeptor und dessen daraufhin in unterschiedlichem Ausmaß erfolgende *Aktivierung*. Zwar wird der biologische Gesamteffekt von zahlreichen Mechanismen moduliert, die sich sowohl auf die Verfügbarkeit des Liganden für den Rezeptorkontakt auswirken (Kinetik) als auch auf die Art und Stärke der von dem aktivierten Rezeptor ausgelösten zellulären Reaktionen (Signaltransduktion). Jedoch ist die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung als das Bindeglied zwischen den ersten, auf sie konvergierenden, und den zweiten, von ihr ausgehenden regulativen Einflüssen der elementare Aspekt für die Frage nach der agonistischen Qualität von Hormonen und ihren synthetischen Analoga.

1.3.1 Konventionelle Kenngrößen

Die Bindung an seinen Rezeptor ist eine notwendige Voraussetzung für die spezifische Wirkung eines Liganden. Die Intensität und Beständigkeit dieser Bindung wird mit dem Begriff der *Affinität* umschrieben. Wie sich experimentell gezeigt hat, gibt dieser allein keinen verlässlichen Aufschluß über Art und Ausmaß der durch den Ligand-Rezeptor-Kontakt ausgelösten physiologischen Veränderungen. Diese hängen von der *Wirkfähigkeit* des gebundenen Stoffes im Kontext des betrachteten biologischen Systems ab, die zu definieren

und inhaltlich zu deuten Gegenstand ständig erweiterter pharmakologischer Modelle ist. Weitgehend unabhängig vom jeweiligen theoretischen Konzept erlaubt die kombinierte Betrachtung von Affinität und Wirkfähigkeit auf anschaulicher Ebene die Unterscheidung neutraler, antagonistischer und agonistischer Substanzen (Tab. 4).

AFFINITÄT	WIRKFÄHIGKEIT	BEZEICHNUNG
fehlend	fehlend	neutrale Substanz
vorhanden	fehlend	Antagonist
vorhanden	mäßig	partieller Agonist
vorhanden	maximal	(voller) Agonist
vorhanden	entgegengesetzt	inverser Agonist

Tab. 4: Zusammenhang von Rezeptoraffinität, Wirkfähigkeit und Agonismus eines Liganden.

Die Ligand-Rezeptor-Bindung wird traditionell mit Hilfe der Dissoziationskonstanten K_D beschrieben, die definiert ist als

$$K_D = \frac{[L] \cdot [R]}{[LR]} .$$

[R], [L] bezeichnen die Konzentrationen von frei verfügbarem Rezeptor bzw. Liganden und [LR] die des gebildeten Ligand-Rezeptor-Komplexes *im chemischen Gleichgewicht*, d. h. in der Situation, für die die Reaktionen $R + L \rightarrow LR$ und $LR \rightarrow R + L$ mit den gleichen Raten $v_{\rightarrow} = k_{\rightarrow} \cdot [R] \cdot [L] = k_{\leftarrow} \cdot [LR] = v_{\leftarrow}$ ablaufen. Die Dissoziationskonstante ist daher zum einen das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten k_{\leftarrow} und k_{\rightarrow} . Andererseits entspricht sie der Ligandenkonzentration, die erforderlich ist, um *im Äquilibrium* die Hälfte aller Rezeptoren zu besetzen, wie sich für $[L] = K_D$ aus der Definition ergibt. Vorausgesetzt wird hierbei stets, daß es durch die Bindung zu keiner relevanten Verringerung von [L] kommt (Ligandenüberschuß).

Die Effektivität, mit der ein Wirkstoff den Rezeptor aktiviert, wird oft mit dem Konzept der *intrinsic efficacy* (intrinsischen Wirksamkeit) abzubilden versucht, das ein wesentlicher Bestandteil der auf STEPHENSON und FURCHGOTT zurückgehenden Fassung der Rezeptorbesetzungstheorie (*occupation theory*) ist [55;142]. Diese geht davon aus, daß der in einem

Bioassay beobachtete Effekt über eine systemspezifische monotone Funktion f auf einen „Stimulus“ S zurückzuführen ist, der proportional zur Konzentration der Ligand-Rezeptor-Komplexe ist. Unter Anwendung des Massenwirkungsgesetzes läßt sich dies formal durch die Beziehung

$$\frac{E}{E_{\infty}} = f(S) = f\left(\frac{\varepsilon \cdot [R]_{\text{tot}} \cdot [L]}{K_D + [L]}\right)$$

ausdrücken, wobei E den beobachteten Effekt, E_{∞} den größtmöglichen Effekt (für $S \rightarrow \infty$) und ε die *intrinsic efficacy* des Liganden bezeichnet. Somit wird die Wirkung eines Agonisten in zwei Anteile zergliedert: den ligandenabhängigen, durch K_D und ε determinierten, sowie den gewebs- oder assayabhängigen Beitrag, der durch die Gesamtkonzentration aktivierbarer Rezeptoren $[R]_{\text{tot}}$ und die Kopplungsfunktion f definiert ist [22].

Die bedeutendsten Schwächen dieses Modells ergeben sich aus folgenden Punkten:

- (1) Es wird eine einheitliche Funktion f für alle Liganden unterstellt, d. h. eine stets gleichartige Kopplung zwischen „Stimulus“ und Effekt. Dafür gibt es *a priori* keinen Grund.
- (2) Die intrinsische Wirksamkeit ε kann nur relativ zu einer Referenzsubstanz bestimmt werden, absolute Werte festzulegen ist theoretisch unmöglich [97]. Zudem fehlt eine effektunabhängige Definition und Meßbarkeit von ε [37], so daß diese Größe erkenntnistheoretisch wenig Zugewinn bringt.
- (3) Zwischen der Konzentration aktivierter und sonstiger Ligand-Rezeptor-Komplexe wird nicht unterschieden. Falls tatsächlich solche unterschiedlichen Isomere LR^0 (inaktiv) und LR^* (aktiv) existieren, kann dies je nach Art der experimentellen K_D -Wert-Bestimmung zu grundlegenden Fehlern in der Bewertung von ε führen. Auch wenn man annimmt, daß keine spontane (ohne Ligandenbindung eintretende) Rezeptoraktivierung in relevantem Umfang erfolgt und im einfachsten Fall die Reaktionssequenz



abläuft, wird $[LR^*]$ im Äquilibrium von vier Geschwindigkeitskonstanten bestimmt [36]. Im Gegensatz zu der von FURCHGOTT eingeführten Rezeptoralkylierungsmethode [55],

bei der nur die tatsächlich aktiven Komplexe LR^* berücksichtigt werden, gehen bei den gewöhnlichen Radioligandenassays für Steroide immer *alle* Hormon-Rezeptor-Paare (LR^0 und LR^*) in die Messung ein. Verwendet man Dissoziationskonstanten aus solchen reinen Bindungsstudien, ist für zwei äquieffektive Liganden L_1 und L_2 auch bei gleichen K_D -Werten nicht notwendig eine gleiche *intrinsische* Wirksamkeit zu folgern: denn es bleibt unbekannt, ob bei konstantem $[R]_{\text{tot}}$ und $[L_1] = [L_2]$ auch $[L_1R^*] = [L_2R^*]$ ist.

- (4) Die aus der Erforschung membranständiger Rezeptoren stammende Annahme eines thermodynamischen Gleichgewichts zwischen freiem und gebundenem Liganden ist für die Steroidhormone und ihre intrazellulären Rezeptoren angesichts der in 1.2 erörterten Verhältnisse problematisch, da für sie *Fließgleichgewichte in vivo* und in Zellkulturen ebensogut möglich erscheinen. Deren Lage wäre von bestimmten geschwindigkeitsbegrenzenden Schritten abhängig, die nicht allein aus der Affinität des Liganden abgeleitet werden können.

Obgleich neuere mathematische Konzepte mit einem höheren Grad von Allgemeinheit einen Teil dieser Schwierigkeiten eliminieren [154], soll hier ein weniger komplexes und dennoch begrifflich akzeptables Modell zur Erfassung der agonistischen Eigenschaften von Gluko- und Mineralokortikoiden verwendet werden, dessen Grundlagen nachfolgend dargestellt sind.

1.3.2 Operationales Modell

Prinzipien. Die unzureichend erklärten Auffassungen von Stimulus-Effekt-Kopplung und intrinsischer Wirksamkeit veranlaßten BLACK und LEFF zur Formulierung eines allgemeinen operationalen Modells agonistischer Vorgänge [22]. Ausgangspunkt ihrer Überlegungen waren zwei experimentelle Tatsachen:

- (1) Die meisten Konzentrations-Wirkungs-Kurven, u. a. die für Steroide, sind Hyperbeln.
- (2) Der halbmaximale Effekt wird bei diesen Kurven im allgemeinen bei Konzentrationen erreicht, die von dem K_D -Wert des Liganden deutlich verschieden sind.

Unter der konventionellen Annahme, die Konzentration der Ligand-Rezeptor-Komplexe sei über ein chemisches Gleichgewicht gemäß

$$[\text{LR}] = \frac{[\text{R}]_{\text{tot}} \cdot [\text{L}]}{K_D + [\text{L}]} \quad (\text{I})$$

(mit den in 1.3.1 verwendeten Bezeichnungen) bestimmt, konnten sie zeigen, daß bei Gültigkeit von (1) und (2) die Beziehung zwischen Rezeptorbesetzung und Effekt notwendigerweise ebenfalls hyperbolisch ist. In einer Erweiterung auf nicht-hyperbolische, aber monoton wachsende Funktionen leiteten sie schließlich eine allgemeine Gleichung für die Konzentrations-Wirkungs-Kopplung ab:

$$\frac{E}{E_\infty} = \frac{[\text{R}]_{\text{tot}}^a \cdot [\text{L}]^a}{K_E^a (K_D + [\text{L}])^a + [\text{R}]_{\text{tot}}^a \cdot [\text{L}]^a} \quad (\text{II})$$

Neben in 1.3.1 eingeführten Größen treten hier zwei neue Parameter auf, während auf eine der intrinsischen Wirksamkeit analoge Konstante verzichtet wird. K_E ist theoretisch definiert als die Konzentration von Ligand-Rezeptor-Komplexen, mit dem die Hälfte des in dem System überhaupt möglichen Effekts E_∞ zu erzielen wäre. Der die Krümmung der Kurve beeinflussende Exponent a (eine positive reelle Zahl) hat keinen anschaulichen Gehalt.

Folgerungen. Jede Gleichung (II) gehorchende Konzentrations-Wirkungs-Kurve nähert sich mit steigender Substanzkonzentration $[\text{L}]$ asymptotisch einem hier als E_{max} bezeichneten Maximaleffekt; derjenige Wert von $[\text{L}]$, bei dem der Effekt die Hälfte von E_{max} beträgt, heißt 50 %-effektive Konzentration (EC_{50}). Durch einfache Umformungen lassen sich diese beiden wichtigen Lageparameter aus (II) bestimmen:

$$E_{\text{max}} = E_\infty \cdot \frac{\tau^a}{\tau^a + 1} \quad (\text{III})$$

$$\text{EC}_{50} = \frac{K_D}{\sqrt[a]{2 + \tau^a} - 1} \quad (\text{IV})$$

wobei der als *transducer ratio* (Überträgerverhältnis) bezeichnete Parameter τ definiert ist als

$$\tau = \frac{[\text{R}]_{\text{tot}}}{K_E} \quad (\text{V})$$

τ ist ein Maß für die Effizienz, mit der die Rezeptorbelegung in die biologische Wirkung umgesetzt wird [22;36]. Dies wird besonders für $a = 1$ (einfache Hyperbel) deutlich, wo

$$EC_{50} = \frac{K_D}{\tau + 1} = \frac{K_D \cdot K_E}{K_E + [R]_{\text{tot}}}$$

gilt (Abb. 3). Für eine wenig effiziente Umsetzung mit kleinem τ ist die EC_{50} nahe bei K_D , während sie bei hocheffizienter Kopplung mit großem τ deutlich unter der Rezeptordissoziationskonstante liegt. Insbesondere ist die EC_{50} abhängig von der Konzentration des insgesamt vorhandenen Rezeptors $[R]_{\text{tot}}$, so daß unterschiedliche Hormone anhand von Absolutwerten der EC_{50} nicht sinnvoll verglichen werden können, falls diese in verschiedenen Geweben oder Assays gemessen wurden.

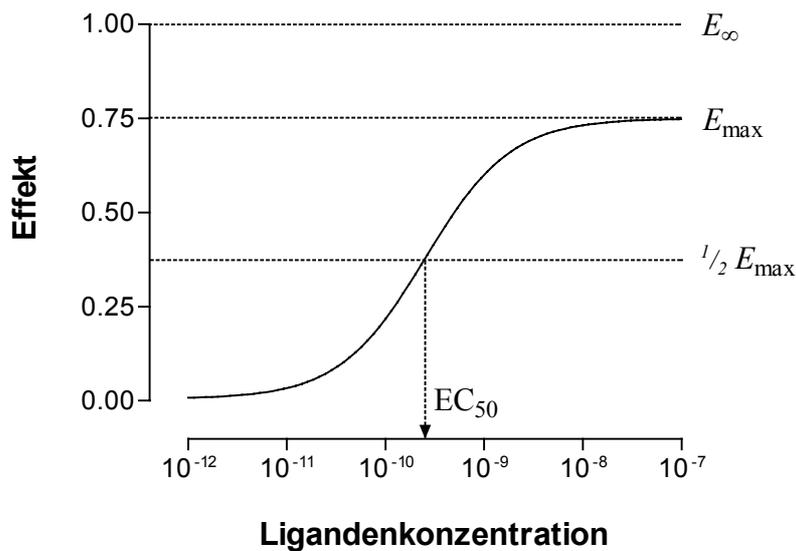


Abb. 3: Konzentrations-Wirkungs-Kurve (unter Fortlassung von Einheiten) mit $a = 1$, $\tau = 3$, $E_{\infty} = 1$, $K_D = 10^{-9}$ sowie den daraus abgeleiteten Lageparametern $E_{\text{max}} = 0,75$ und $EC_{50} = 2,5 \cdot 10^{-10}$. Die Kurve erscheint nur wegen der logarithmischen Skalierung der Abszisse sigmoid.

Einschränkungen. Die in 1.3.1 aufgeführten Probleme hinsichtlich des angenommenen thermodynamischen Gleichgewichts und der fehlenden Unterscheidbarkeit verschieden aktiver Rezeptorisomere in Bindungsstudien bestehen auch innerhalb des operationalen Modells. Darüber hinaus ist aber die zweite dieser Schwierigkeiten aufgrund des Verzichts auf die intrinsische Wirksamkeit im operationalen Modell auch auf theoretischer Ebene gegeben und

führt dazu, daß die Existenz echter Partialagonisten ausgeschlossen wird. Folgt man nämlich der Annahme, E_∞ sei eine ligandenunabhängige, nur zellspezifische Größe, kann jeder noch so schwache Agonist mit großem K_E -Wert und einer deutlich unterhalb von E_∞ liegenden Asymptote durch gedankliche Steigerung der totalen Rezeptorkonzentration* und damit von τ volle Wirkung entfalten, wie sich aus (III) und (V) ergibt.

Falls experimentell gezeigt wird, daß bestimmte Agonisten auch bei beliebiger Konzentration von Ligand-Rezeptor-Komplexen submaximal wirken ($E_{\max} \ll E_\infty$), muß entweder E_∞ als ligandenabhängig angesehen werden oder eine für den Liganden charakteristische Konstante k mit einem Wert zwischen 0 und 1 eingeführt werden, so daß

$$\frac{E}{E_\infty} = k \cdot \frac{[R]_{\text{tot}}^a \cdot [L]^a}{K_E^a (K_D + [L])^a + [R]_{\text{tot}}^a \cdot [L]^a}$$

und

$$E_{\max} = k \cdot E_\infty \cdot \frac{\tau^a}{\tau^a + 1}$$

gilt, während die EC_{50} unbeeinflusst bleibt. Damit wird zwar ein agonistisches Kontinuum von Antagonisten ($k = 0$) bis zu vollen Agonisten ($k = 1$) beschrieben (inversen Agonisten müßte ein negatives k zugeordnet werden), zugleich aber die Grundlage des operationalen Modells angefochten, in dem die Ablehnung einer „Wirksamkeitskonstante“ zentrale Bedeutung hat.

Auf eine strenge Identifikation der globalen Lageparameter mit den oben dargestellten mikroskopischen Größen wird in der vorliegenden Arbeit aus den genannten Gründen verzichtet. Für die Diskussion der Ergebnisse, insbesondere im Verhältnis zu vorliegenden Daten aus Bindungsstudien und Untersuchungen *in vivo*, werden einige der abgeleiteten prinzipiellen Beziehungen gleichwohl verwendet.

* In Transaktivierungsassays ist eine solche Variation der Rezeptormenge auch praktisch möglich.

1.3.3 Datenquellen

Wie aus den beschriebenen Einflüssen auf die Wirkung eines Steroidhormons hervorgeht, wird diese durch das individuelle Zusammenspiel von aktiviertem Rezeptor und biologischem Versuchssystem determiniert. Die zell- oder assayspezifischen Randbedingungen spielen für die agonistische Kapazität der Kortikoide daher eine entscheidende Rolle. Dies ist deshalb zu betonen, weil für die Bestimmung ihrer gluko- und mineralokortikoiden Potenzen, wie sie in vielen Standardwerken der medizinischen Pharmakologie wiedergegeben sind, verschiedenste Testverfahren *in vivo* und *in vitro* herangezogen werden.

Eine Vielzahl von Daten stammt aus Tierexperimenten, vor allem mit adrenaletomierten Ratten und Hunden [53]. Dabei dienen z. B. die Unterdrückung eines induzierten Ödems oder Granuloms, das Ausmaß der Thymusinvolution und die Verringerung des Eosinophilenanteils im Blut als Maß für die immunsuppressive Potenz, während die metabolischen Effekte u. a. über die Glykogenspeicherung in der Leber quantifiziert werden. Mineralokortikoide Wirkungen werden durch Diurese und Natriumretention abgebildet. Ein globaler Ansatz ist die Untersuchung der minimalen lebenserhaltenden Glukokortikoiddosis nach bilateraler Adrenaletomie. Beachtet werden muß dabei, daß Corticosteron (nicht Cortisol) das hauptsächliche Glukokortikoid der Ratte ist. Auf Beispiele für experimentelle und klinische Untersuchungen am Menschen wurde bereits hingewiesen (s. 1.1.2). Einer ihrer Vorteile ist die Möglichkeit, auch subjektive Parameter wie die Linderung empfundener Schmerzen in die Bewertung der Steroidwirkung einzubeziehen.

Anders als in älteren Zellkulturassays [84] können die pharmakodynamischen Aspekte seit Klonierung der cDNAs für Gluko- und Mineralokortikoidrezeptor und Konstruktion steroid-responsiver Reporterplasmide weitgehend isoliert auf molekularer Ebene untersucht werden. Die verbreiteten Transaktivierungsassays entsprechen dem in 2.3.3 dargestellten Prinzip. Da der angestrebten Fokussierung auf einzelne Elemente der Signaltransduktion naturgemäß ein Verlust an Gesamtinformation gegenübersteht, sind solche *in vitro* gewonnenen Daten Mittel zur Erklärung, nicht zum Ersatz *in vivo* zu findender Resultate.

1.4 Fragestellung

Die biologische Aktivität diverser Glukokortikoide *in vivo* ist sowohl für ihre immunmodulierenden als auch ihre metabolischen und elektrolytverschiebenden Wirkungen gut dokumentiert. Für die allein rezeptorvermittelten Anteile ihrer Potenz trifft dies weitaus weniger zu. Zwar ist das Bindungsverhalten vieler dieser Substanzen eingehend untersucht worden, ein systematischer Vergleich ihrer Fähigkeit zur Rezeptoraktivierung mittels molekularbiologischer Techniken liegt jedoch nur für wenige der therapeutisch relevanten Glukokortikoide vor [74;75;132;150]. Einen Beitrag zur Schließung dieser Lücke zu leisten ist die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit. Es ergeben sich folgende Fragestellungen:

- (1) Bestehen Divergenzen zwischen Pharmakodynamik *in vitro* und tradierter Potenz *in vivo*?
- (2) Lassen sich die Einflüsse funktioneller Gruppen auch auf Rezeptorebene nachvollziehen?
- (3) Ist eine *rezeptorbedingte* gluko- oder mineralokortikoide Wirkungsselektivität feststellbar?

Gegenstand der Erörterung ist dabei das Ausmaß der steroidinduzierten Transaktivierung in einem Modellsystem transfizierter CV-1-Zellen.