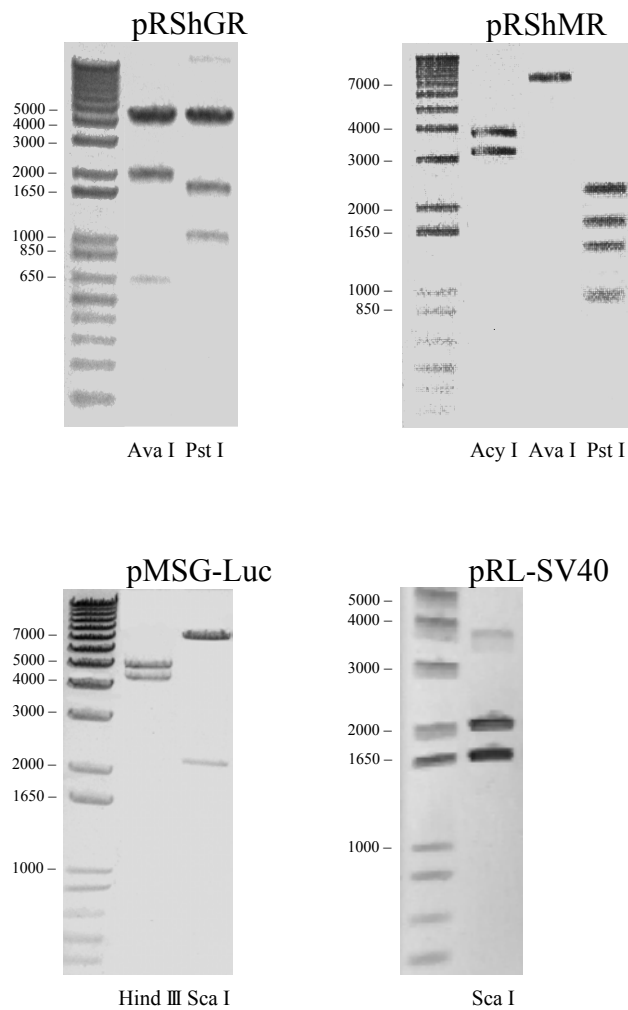


3 Ergebnisse

3.1 Identifikation der Plasmide

Die Restriktionsanalysen der präparierten Plasmid-DNA lieferten identisch reproduzierbare Muster in der Gelelektrophorese, die unten für einige Enzyme beispielhaft wiedergegeben sind. Die Banden stimmen mit den anhand der bekannten Sequenz vorhergesagten, in den nebenstehenden Tabellen aufgeführten Fragmentlängen überein.



ENZYM	FRAGMENTLÄNGE in kb	
	pRShGR	pRShMR
Acy I	7,0	3,7
	0,4	3,1
		0,5
Ava I	4,9	7,3
	1,9	
	0,6	
Pst I	4,85	2,2
	1,6	1,7
	0,95	1,4
		1,0
		1,0

ENZYM	FRAGMENTLÄNGE in kb	
	pMSG-Luc	pRL-SV40
Hind III	4,9	3,7
	4,4	
Sca I	7,1	2,0
	2,2	1,7

Tab. 8: erwartete Fragmentlängen in Kilobasen, *oben*: Expressionsvektoren für die Rezeptoren, *unten*: Reporterplasmide.

Abb. 5: Beispiele für Restriktionsanalysen der vier Plasmide, Agarosegel-Elektrophoresen. Schwarzweiß-invertierte und kontrastverstärkte Darstellung.

3.2 11 β -Konversion unter Assaybedingungen

Bei der Bestimmung der Oxidation von Cortisol in 11 β -Position unter den Bedingungen des Transaktivierungsassays ergaben sich die in Abb. 6 und Tab. 9 zusammengefaßten Resultate. Danach läßt die hier semiquantitativ erfaßte Enzymaktivität einen Sättigungseffekt bei zunehmender Substratkonzentration erkennen: während das Cortison/Cortisol-Verhältnis nach

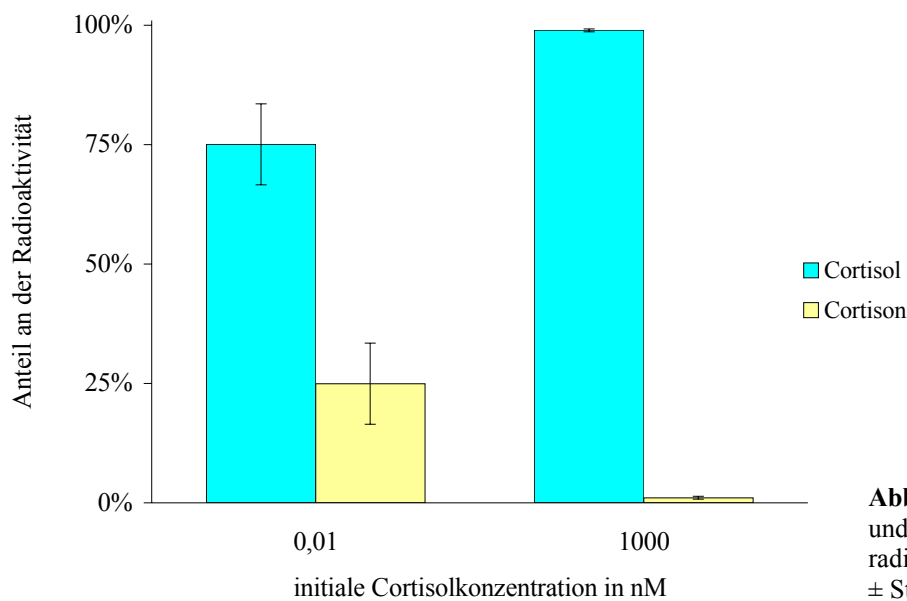


Abb. 6: Anteil von Cortisol und Cortison an der Gesamtradioaktivität nach 24 h. Wert \pm Standardabweichung (n = 8).

24 h Inkubation bei einer initialen Cortisolkonzentration von 10^{-11} M ungefähr 1:3 beträgt, liegt es bei Zugabe von 10^{-6} M nur noch bei 1:99. Am Ende des für den zu messenden biologischen Effekt relevanten Versuchsabschnitts liegen also bei eingesetzten 0,01 nM nur noch 0,075 nM, bei anfänglichen 1 μ M jedoch noch 0,99 μ M vor. Der Zehnerexponent verringert sich dadurch von $-11,000$ auf $-11,125$ im ersten bzw. von $-6,000$ auf $-6,004$ im zweiten Fall. Die konzentrationsabhängigen Unterschiede sind statistisch signifikant ($p = 0,011$ bezüglich der anteiligen Steroidkonversion).

KONZENTRATION EINGESETZTEN CORTISOLS IN nM	ANTEIL VON CORTISON AN GESAMTER RADIOAKTIVITÄT NACH 24 h IN %	KONZENTRATION ENTSTANDENEN CORTISONS NACH 24 h IN nM
0,01	24,9 \pm 8,5	0,0025 \pm 0,00085
1000	1,1 \pm 0,3	10,6 \pm 3,0

Tab. 9: 11 β -HSD-Aktivität. Umsätze \pm Standardabweichung (n = 4).

3.3 Transaktivierung in CV-1-Zellen

In den Abschnitten zu den jeweiligen Rezeptoren finden sich die für die agonistischen Eigenschaften aller untersuchten Substanzen relevanten Daten. Besonderes Gewicht wurde auf die Standardkurven (Referenzsteroid) gelegt sowie auf solche Ergebnisse, die für die Diskussion der Reproduzierbarkeit und der biologischen Aussagekraft einzelner Parameter, insbesondere in Verbindung mit Daten zum Steroidmetabolismus, bedeutsam sind. Der Beschreibung einzelner Steroide ist eine Zusammenfassung allgemeiner Charakteristika der erhaltenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven vorangestellt.

3.3.1 Allgemeine Resultate

Basale Effekte (Tab. 10). Alle untersuchten Steroide riefen eine Wirkung hervor, die sich mit abnehmender Konzentration einem konstanten positiven Wert näherte. Dieser *Nulleffekt* war für beide Rezeptoren signifikant verschieden, jedoch unabhängig von der verwendeten Substanz, und entsprach dem normierten Effekt bei Zugabe steroidfreien Mediums. Er wurde als η_0 wie in 2.4.1 beschrieben bei der Berechnung der Regressionsparameter berücksichtigt. Ebenfalls quantifiziert wurde der in *Abwesenheit* transfizierter Rezeptor-DNA eintretende Effekt bei Zusatz von 10^{-7} bis 10^{-5} M Dexamethason für den GR bzw. von 10^{-8} bis 10^{-6} M Aldosteron für den MR. In diesem Konzentrationsbereich trat in *Gegenwart* des jeweils überexprimierten Rezeptors eine wie in 2.4.1 definierte Effektsättigung ein, wobei die *nicht* normierten Werte für den GR (mit Dexamethason) im Mittel um den Faktor 6,3 größer waren als für den MR (mit Aldosteron).

TRANSFIZIERTES REZEPTORGEN	ZUGEgebenES STEROID	NORMIERTER EFFEKT
hGR α	keines	0,00112 \pm 0,00002
hMR	keines	0,01352 \pm 0,00023
keines	Dexamethason	0,00176 \pm 0,00007
keines	Aldosteron	0,00651 \pm 0,00018

Tab. 10: Nulleffekt und Effekt ohne Rezeptorgentransfektion. Normierter Effekt \pm SEM (n = 8).

Sättigungskurve. Abhängig vom vermittelnden Rezeptor riefen einige Steroide entweder keinen oder einen nur äußerst geringen Effekt hervor, so daß kein Halbmaximum bestimmt werden konnte. Bei den übrigen eingesetzten Substanzen nahm die Steroidwirkung mit steigender Konzentration deutlich zu und näherte sich einem individuell verschiedenen Sättigungswert (E_{\max}). Im *Run*-Test wies die experimentelle Beziehung zwischen Steroidkonzentration und Effekt durchweg keine signifikanten Abweichungen von der in 2.4.1 postulierten Funktion auf. Die Streuung um die Ausgleichskurve ist mit wenigen Ausnahmen gering (Tab. 11).

STEROID	R^2 (GR)	R^2 (MR)	STEROID	R^2 (GR)	R^2 (MR)
Aldosteron	0,98	0,95	Flumetason	0,82	0,95
Beclometason	0,84	0,98	6 α -Fluorocortisol	0,99	0,81
Betamethason	0,92	0,99	9 α -Fluorocortisol	0,96	0,74
Budesonid	0,81	0,97	Isoflupredon	0,96	0,63
2-Chlorfluocortolon	0,98	0,98	6 α -Methylprednisolon	0,96	0,98
Cortisol	0,97	0,96	Prednisolon	0,97	0,98
Desacetyldeflazacort	0,96	0,96	Prednyliden	0,94	0,99
Dexamethason	0,91	0,95			

Tab. 11: Bestimmtheitsmaß R^2 in repräsentativen Versuchen mit dem Gluko- (GR) und dem Mineralokortikoidrezeptor (MR). Nicht aufgeführte Steroide: Regressionskurve nicht für beide Rezeptoren erstellbar.

Rezeptorspezifische Wirkungen. Für jedes Steroid mit erkennbarer Tendenz zur Effektsättigung unterschied sich (als Beleg einer spezifischen Wirkungsvermittlung) dessen Konzentrations-Wirkungs-Kurve am Mineralokortikoidrezeptor deutlich von der am Glukokortikoidrezeptor. Durch Bildung des Quotienten aus der jeweils mit GR bzw. MR bestimmten EC_{50} konnte auch numerisch zwischen zwei Substanzgruppen unterschieden werden, die den typischen „Mineralokortikoiden“ zum einen und den „Glukokortikoiden“ zum anderen entsprechen. Diese Zuordnung wird, im Anschluß an die detaillierte Darstellung der an den einzelnen Rezeptoren gewonnen Daten in den beiden folgenden Abschnitten, am Ende dieses Kapitels beschrieben.

3.3.2 Agonismus via Glukokortikoidrezeptor

Dexamethason als Referenzsubstanz. Der Normierung aller E_{\max} -Werte auf eine gemeinsame Bezugsgröße gemäß 2.4.1 lagen insgesamt sechs Versuche mit Dexamethason zugrunde. Im Mittel wurden pro Ansatz 22 Werte (18 bis 25) bestimmt, entsprechend 19 Freiheitsgraden (15 bis 22) in der Auswertung mittels nichtlinearer Regression.

Bei dem auf 1,00 normierten Wert für E_{\max} lag dessen relativer Standardfehler im Bereich von 2 bis 4%. Der Hill-Exponent schwankte erheblich zwischen Werten von 0,38 und 1,98 bei einem relativen SE von 11 bis 48%. Diese geringe Reproduzierbarkeit wirkte sich jedoch nicht in vergleichbarer Weise auf die Lage des Halbmaximums aus: Die ermittelten EC_{50} -Werte lagen um einen Faktor von höchstens 2,21 auseinander, nämlich in dem Intervall von $3,8$ bis $8,4 \cdot 10^{-10}$ M. Dabei betrug der SE für $\log EC_{50}$ stets weniger als 0,13, was einem Fehlerintervall von maximal $0,74 \cdot EC_{50}$ bis $1,35 \cdot EC_{50}$ entspricht (Tab. 12).

Dies spiegelt sich auch in der statistischen Analyse wieder: wenn alle Meßwerte als unabhängig angesehen wurden, ließen sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der EC_{50} bei nur zwei der fünfzehn Kurvenpaarungen finden, bezüglich des Hill-Exponenten aber in sechs Fällen. Die entsprechenden p -Werte sind in Tab. 13 angegeben. Betrachtet man die in Abb. 7 grafisch wiedergegebenen *Mittelwerte* des Effekts, fällt als eine der Ursachen abweichender Regressionsergebnisse eine große Streuung bei 10^{-10} M auf, wobei zwei Gruppen von jeweils drei Datenpunkten (bei einem Effekt um 0,3 bzw. 0,05) vorliegen.

Trotz dieser nicht-normalen Verteilung wurden *alle* gewonnenen Mittelwerte zur Errechnung einer Dexamethason-Standardkurve am $hGR\alpha$ herangezogen (Abb. 8), wobei angesichts ähnlicher Standardfehler alle Mittelwerte gleich gewichtet wurden. Eine Renormierung des E_{\max} auf 1,00 wurde nicht durchgeführt. Man erhält somit für die über den Glukokortikoidrezeptor vermittelte Transaktivierung durch Dexamethason einen E_{\max} von 0,987 und eine EC_{50} von $5,61 \cdot 10^{-10}$ M. Bei Berücksichtigung nur einer der beiden beschriebenen Datengruppen im untersten Konzentrationsbereich weicht die EC_{50} um einen Faktor 0,70 bzw. 1,17 von der unter Verwendung aller Daten erhaltenen ab.

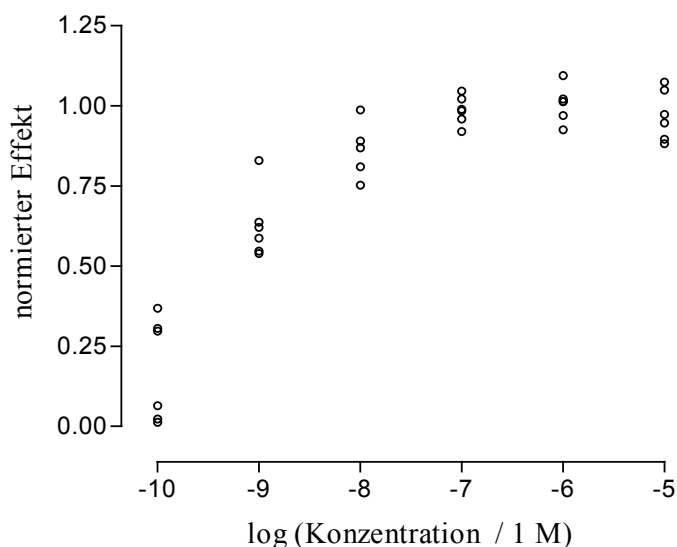


Abb. 7: Transaktivierung durch Dexamethason via hGR α , Mittelwerte aus sechs Versuchen.

VERSUCH	FG	E_{\max}	$\log(\text{EC}_{50} \div 1 \text{ M})$	EC_{50} IN nM	CI_{95} IN nM	HILL-EXPONENT
A	15	$1,00 \pm 0,04$	$-9,10 \pm 0,10$	0,80	0,48 bis 1,33	$1,03 \pm 0,25$
B	17	$1,00 \pm 0,04$	$-9,37 \pm 0,13$	0,43	0,23 bis 0,79	$1,86 \pm 0,54$
C	22	$1,00 \pm 0,02$	$-9,08 \pm 0,05$	0,84	0,67 bis 1,05	$1,98 \pm 0,95$
D	21	$1,00 \pm 0,02$	$-9,26 \pm 0,08$	0,55	0,38 bis 0,80	$0,58 \pm 0,06$
E	20	$1,00 \pm 0,02$	$-9,42 \pm 0,08$	0,38	0,26 bis 0,56	$0,66 \pm 0,08$
F	21	$1,00 \pm 0,03$	$-9,30 \pm 0,11$	0,50	0,29 bis 0,86	$0,38 \pm 0,05$
alle	32	$0,987 \pm 0,023$	$-9,251 \pm 0,080$	0,561	0,387 bis 0,816	$0,825 \pm 0,117$

Tab. 12: Regressionsparameter für Dexamethason am hGR α . Gerundete Werte \pm Standardfehler (außer EC_{50}), CI_{95} : 95%-Konfidenzintervall für die EC_{50} . FG: Freiheitsgrade bei der nichtlinearen Regression.

	A	B	C	D	E	F	
A		0,1785	0,3919	0,0905	0,1743	0,0159	A
B	0,1061		0,9571	0,0244	0,0359	0,0099	B
C	0,8603	0,5393		0,1934	0,2221	0,1387	C
D	0,2244	0,4563	0,0610		0,4082	0,0143	D
E	0,0187	0,7499	0,0008	0,1555		0,0041	E
F	0,1988	0,6708	0,0824	0,7737	0,3840		F
	A	B	C	D	E	F	

Tab. 13: t -Tests zu den Versuchen mit Dexamethason am hGR α . p -Werte bezüglich EC_{50} (linke untere Hälfte) und Hill-Exponent (rechte obere Hälfte), **fett**: $p < 0.05$.

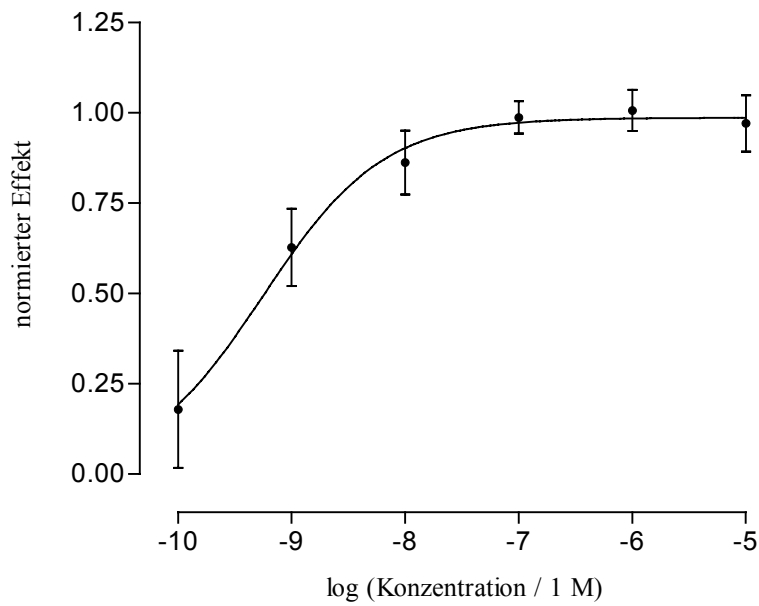


Abb. 8: Transaktivierung durch Dexamethason via $hGR\alpha$, gemittelt aus sechs Versuchen. Mittelwerte \pm Standardabweichung (Fehlerbalken).

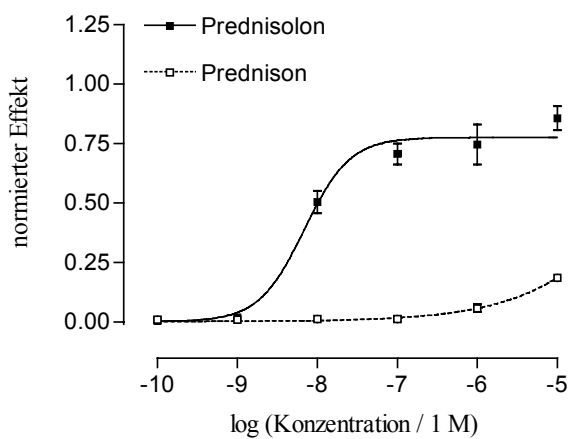
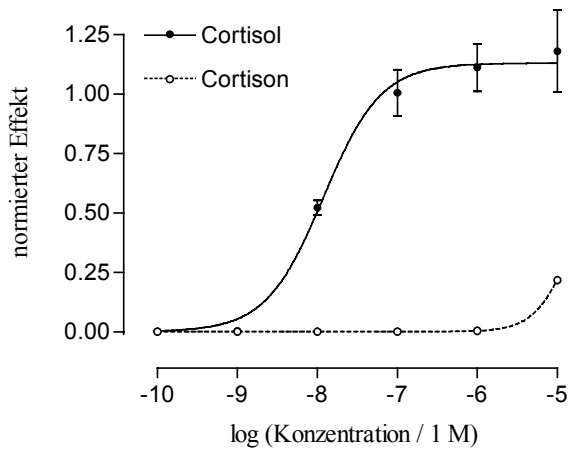


Abb. 9: Transaktivierung durch Cortisol und Cortison (*oben*) bzw. Prednisolon und Prednison (*unten*) via $hGR\alpha$. Die 11-Oxo-Substanzen erzeugen nur bei den höchsten Konzentrationsstufen einen signifikanten Effekt. Dieser beträgt jeweils einen Bruchteil der Maximalwirkung des korrespondierenden 11β -Hydroxysteroids. Mittelwerte ($n = 4$) \pm Standardabweichung (Fehlerbalken).

Andere Steroide. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung wurde neben Dexamethason für weitere 19 teils natürliche, teils synthetische Steroidhormone bestimmt. Bei 15 von ihnen zeigte sich ebenfalls die typische Sättigungskurve, während mit den 11-Oxosteroiden Cortison und Prednison sowie mit Progesteron nur eine geringe Transaktivierung im obersten Konzentrationsbereich erreichbar war und Dehydroepiandrosteron keinen signifikanten Effekt hervorrief. Die Kurvenverläufe für Cortison und Prednison sind in Abb. 9 zusammen mit denen ihrer 11 β -reduzierten Partner Cortisol bzw. Prednisolon dargestellt.

In Abb. 10 und Tab. 14 sind die berechneten Maximaleffekte (E_{\max}) dargestellt; für die letztgenannten vier Hormone wird anstelle von E_{\max} die höchste meßbare Transaktivierung (Mittelwert) verwendet. Sie liegt bei diesen unter 0,250. Bei den übrigen befinden sich alle E_{\max} -Werte oberhalb von 0,750 sowie für 11 dieser 14 Steroide unterhalb von 1,250 – also in einer Umgebung von einem Viertel um die maximale Dexamethason-Wirkung. Am weitesten nach oben weicht davon Flumetason ab, allerdings mit einem weiten Konfidenzintervall. Signifikante Unterschiede zwischen nach Maximaleffekt benachbarten Steroiden bestehen in der Gruppe mit einer $E_{\max} > 0,750$ bei Flumetason und Prednylidin ($p = 0,016$), Isoflupredon und 6 α -Methylprednisolon ($p = 0,015$) sowie 9 α -Fluorocortisol und Prednisolon ($p < 0,001$).

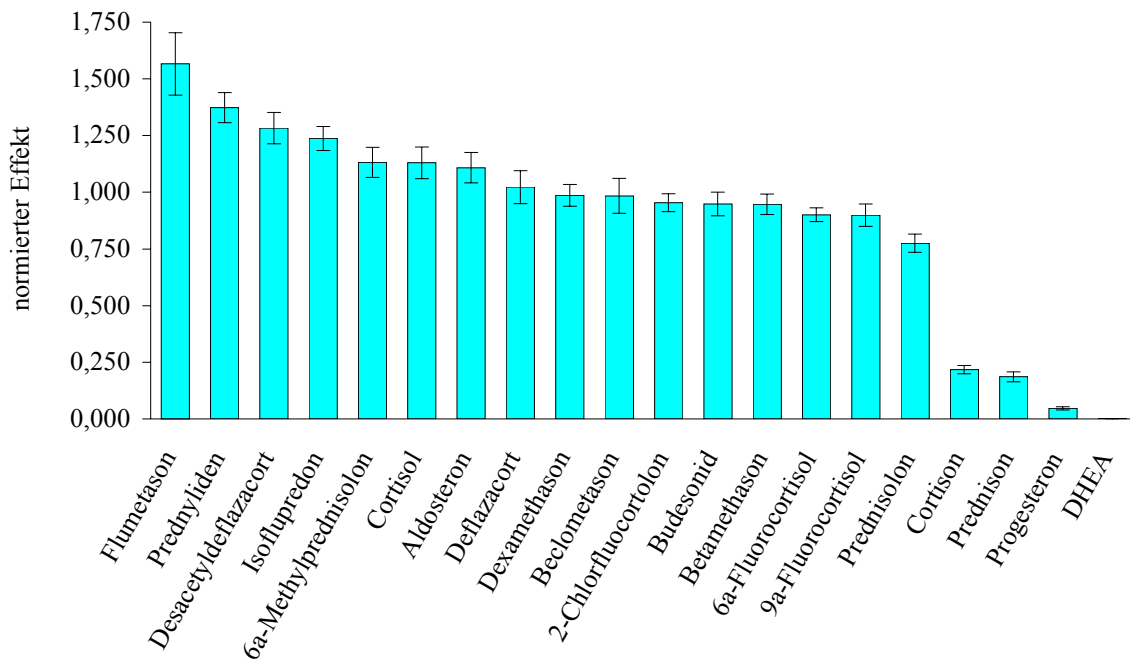


Abb. 10: Transaktivierung über hGR α , E_{\max} -Werte \pm 95%-Konfidenzintervall. Bei Cortison, Prednison, Progesteron, DHEA: mittlere Höchstwerte \pm 2 · Standardabweichung.

STEROID	E_{\max}	SE	CI ₉₅
Flumetason	1,566	0,070	0,138
Prednyliden	1,373	0,032	0,066
Desacetyldeflazacort	1,283	0,033	0,069
Isoflupredon	1,237	0,025	0,053
6 α -Methylprednisolon	1,132	0,032	0,066
Cortisol	1,130	0,033	0,070
Aldosteron	1,108	0,032	0,067
Deflazacort	1,023	0,035	0,073
Dexamethason	0,987	0,023	0,048
Beclometason	0,984	0,037	0,077
2-Chlorfluocortolon	0,954	0,019	0,040
Budesonid	0,948	0,025	0,052
Betamethason	0,947	0,022	0,045
6 α -Fluorocortisol	0,901	0,014	0,030
9 α -Fluorocortisol	0,899	0,024	0,050
Prednisolon	0,776	0,019	0,040
Cortison	<i>0,218</i>	<i>0,005</i>	<i>0,018</i>
Prednison	<i>0,186</i>	<i>0,006</i>	<i>0,022</i>
Progesteron	<i>0,047</i>	<i>0,002</i>	<i>0,006</i>
DHEA	<i>0,001</i>	<i>0,000</i>	<i>0,000</i>

Tab. 14: E_{\max} bei Transaktivierung via hGR α . SE: Standardfehler, CI₉₅: 95%-Konfidenzintervall (halbe Weite). Kursive Angaben: mittlerer Höchstwert, Standardfehler, zweifache Standardabweichung (v. l. n. r.).

Auffällig ist der hohe Maximaleffekt von Aldosteron, der sich von dem des Cortisols nicht signifikant unterscheidet. Daß diesem nicht eine ebenso große glukokortikoide Potenz entspricht, läßt sich aus Abb. 11 ersehen. Dort ist die deutlich nach rechts verschobene Lage der Aldosteronkurve gegenüber der des Cortisols zu erkennen.

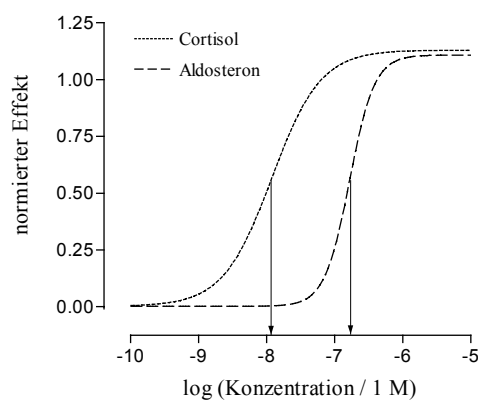


Abb. 11: Transaktivierung via hGR α durch Cortisol und Aldosteron. Regressionskurven und EC₅₀ (Pfeile).

Für alle Steroide, bei denen eine entsprechende Berechnung möglich war, ist ihre EC_{50} in Tab. 15 wiedergegeben. Setzt man diese Daten ins Verhältnis zur EC_{50} des Dexamethasons ($5,61 \cdot 10^{-10}$ M), erhält man die in Abb. 12 dargestellten relativen Werte.

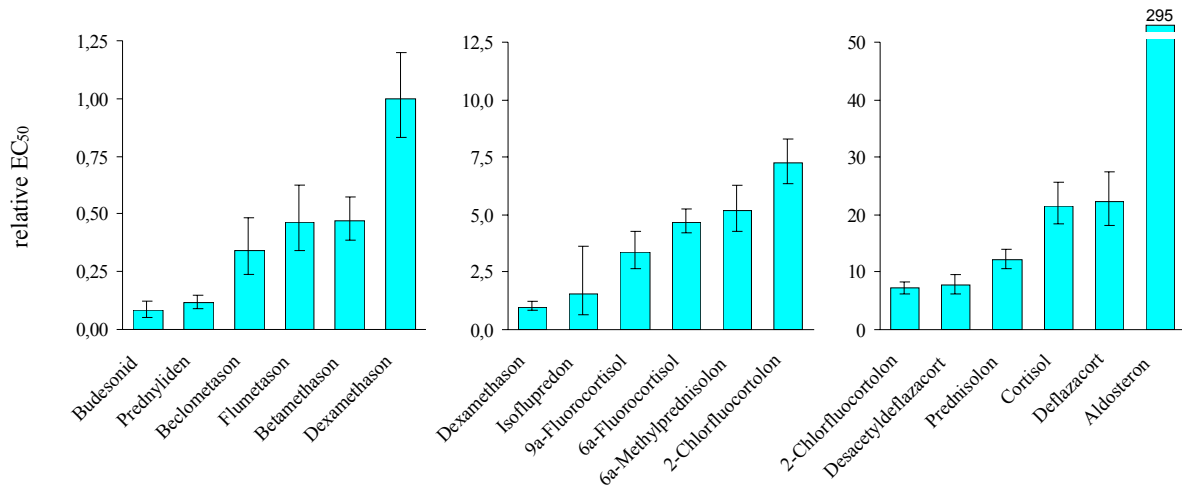


Abb. 12: Transaktivierung über $hGR\alpha$, EC_{50} relativ zu Dexamethason. Werte \pm 95%-Konfidenzintervall.

STEROID	$\log(EC_{50} \div 1 \text{ M})$	SE	EC_{50} IN nM	CI_{95}^- IN nM	CI_{95}^+ IN nM
Budesonid	-10,340	0,1728	0,0457	0,0307	0,0680
Prednylidin	-10,180	0,1018	0,0661	0,0523	0,0835
Beclometason	-9,719	0,1528	0,191	0,134	0,272
Flumetason	-9,585	0,1316	0,260	0,192	0,352
Betamethason	-9,578	0,0863	0,264	0,217	0,322
Dexamethason	-9,251	0,0796	0,561	0,467	0,674
Isoflupredon	-9,057	0,3684	0,877	0,375	2,048
9 α -Fluorocortisol	-8,722	0,1051	1,90	1,49	2,42
6 α -Fluorocortisol	-8,580	0,0469	2,63	2,36	2,93
6 α -Methylprednisolon	-8,535	0,0828	2,92	2,41	3,53
2-Chlorfluocortolon	-8,391	0,0582	4,06	3,55	4,65
Desacetyldeflazacort	-8,360	0,0903	4,37	3,55	5,37
Prednisolon	-8,161	0,0592	6,90	6,02	7,91
Cortisol	-7,922	0,0620	12,0	8,78	16,3
Deflazacort	-7,903	0,0896	12,5	10,2	15,4
Aldosteron	-6,781	0,1348	166	121	226

Tab. 15: Transaktivierung über $hGR\alpha$, $\log EC_{50}$ mit Standardfehler SE; EC_{50} mit unterer (CI_{95}^-) und oberer (CI_{95}^+) Grenze des 95%-Konfidenzintervalls.

Besonders niedrige Werte – bezogen auf Dexamethason etwa ein Zehntel – weisen Budesonid und Prednyliden auf, gefolgt von Beclometason, Flumetason und Betamethason, die sich mit ihrer EC_{50} im Bereich eines Drittels bis zur Hälfte der Referenz befinden. Zwischen Dexamethason und Prednisolon, dessen EC_{50} über eine Zehnerpotenz größer ist, sind weitere sechs Steroide einzuordnen. Cortisol und das nicht desacetylierte Deflazacort liegen jenseits dieser Gruppe, beide sind fast äquieffektiv. Aldosteron schließlich, das mit seiner EC_{50} Dexamethason etwa 300fach und Cortisol noch mehr als 10fach übersteigt, wirkt wie schon angedeutet erst bei hohen Konzentrationen glukokortikoid – dann allerdings mit dem oben beschriebenen, mit den „klassischen“ Glukokortikoiden vergleichbaren Maximaleffekt.

Bei nach EC_{50} benachbarten Steroiden bestehen signifikante Unterschiede nur zwischen Prednyliden und Beclometason ($p = 0,016$), Betamethason und Dexamethason ($p = 0,007$), Prednisolon und Cortisol ($p = 0,009$) sowie Deflazacort und Aldosteron ($p < 0,001$). Ebenfalls signifikant verschiedene Werte zeigten sich unter anderem für die nachstehend genannten, in der Rangordnung der EC_{50} nicht unmittelbar aufeinanderfolgenden Kortikoide:

- (a) Cortisol gegenüber 6α - und 9α -Fluorocortisol (jeweils $p < 0,001$),
- (b) Prednisolon gegenüber Chlorfluocortolon ($p = 0,008$), 6α -Methylprednisolon ($p < 0,001$), Isoflupredon ($p = 0,038$) und Prednyliden ($p < 0,001$),
- (c) Dexamethason gegenüber Flumetason ($p = 0,035$) und 9α -Fluorocortisol ($p < 0,001$),
- (d) Deflazacort gegenüber Desacetyldeflazacort ($p < 0,001$).

Die hieraus ableitbaren Einflüsse verschiedener funktioneller Gruppen auf die Potenz eines Steroids werden in 4.2.1 (S. 71) diskutiert.

3.3.3 Agonismus via Mineralokortikoidrezeptor

Aldosteron als Referenzsubstanz. Die folgende Auswertung stützt sich auf fünf Datensätze mit je 22 bis 24 Wertepaaren; dies kommt 19 bis 21 Freiheitsgraden in der nichtlinearen Regressionsanalyse gleich. Eine Übersicht der einzelnen Versuche gibt Tab. 16.

Ähnlich wie bei den Dexamethason-Referenzmessungen für den GR fand sich bei denen mit Aldosteron und dem MR ein Standardfehler von 2 bis 4% für den auf 1,00 normierten E_{\max} . Wesentlich stabiler als bei den Dexamethason-Versuchen war der im Bereich von 1,02 bis 1,35 liegende Hill-Exponent, allerdings auch hier mit einem relativ weiten Fehlerintervall (SE 12 bis 28%). Hinsichtlich der EC_{50} zeigte sich eine etwas größere Streuung, so daß Kleinst- und Höchstwert um einen Faktor 2,95 auseinanderfallen ($2,65$ bzw. $7,8 \cdot 10^{-11}$ M). Diese Unterschiede sind im t -Test in der Hälfte aller möglichen Paarungen statistisch signifikant, bezüglich des Hill-Exponenten aber in keinem der Fälle (Tab. 17).

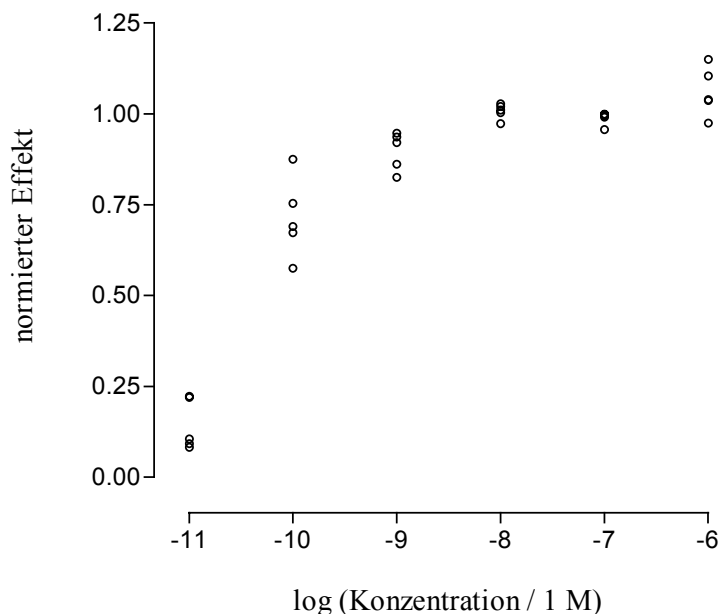


Abb. 13: Transaktivierung via MR durch Aldosteron, Mittelwerte aus fünf Versuchen.

Aus den oben abgebildeten Mittelwerten der Einzelversuche wurde analog zum Vorgehen in 3.3.2 eine neue Ausgleichskurve gewonnen (letzte Zeile in Tab. 16, Abb. 14). Man erhält für die vom MR vermittelte Transaktivierung durch Aldosteron eine EC_{50} von ca. $4,8 \cdot 10^{-11}$ M. Das Halbmaximum wird demnach schon mit weniger als einem Zehntel der äquieffektiven Konzentration von Dexamethason unter Vermittlung des GR erreicht.

VERSUCH	FG	E_{\max}	$\log(\text{EC}_{50} \div 1 \text{ M})$	EC_{50} IN pM	CI_{95} IN pM	HILL-EXPONENT
a	21	$1,00 \pm 0,02$	$-10,45 \pm 0,06$	35	26 bis 47	$1,02 \pm 0,12$
b	19	$1,00 \pm 0,04$	$-10,24 \pm 0,10$	58	36 bis 95	$1,35 \pm 0,38$
c	20	$1,00 \pm 0,03$	$-10,11 \pm 0,07$	78	55 bis 110	$1,10 \pm 0,21$
d	21	$1,00 \pm 0,04$	$-10,58 \pm 0,12$	26	15 bis 47	$1,32 \pm 0,31$
e	21	$1,00 \pm 0,03$	$-10,25 \pm 0,08$	56	38 bis 82	$1,11 \pm 0,21$
alle	27	$1,002 \pm 0,018$	$-10,319 \pm 0,057$	48,0	36,7 bis 62,6	$1,090 \pm 0,127$

Tab. 16: Regressionsparameter für Aldosteron am hMR. Gerundete Werte \pm Standardfehler (außer EC_{50}), CI_{95} : 95%-Konfidenzintervall für die EC_{50} . FG: Freiheitsgrade bei der nichtlinearen Regression.

	a	b	c	d	e	
a		0,4113	0,7696	0,3782	0,7245	a
b	0,0721		0,5552	0,9926	0,5814	b
c	0,0007	0,3112		0,5342	0,9582	c
d	0,3611	0,0345	0,0016		0,5614	d
e	0,0486	0,9133	0,1963	0,0272		e
	a	b	c	d	e	

Tab. 17: t -Tests zu den Versuchen mit Aldosteron am MR, p -Werte bezüglich EC_{50} (links unten) und Hill-Exponent (rechts oben), **fett**: $p < 0,05$.

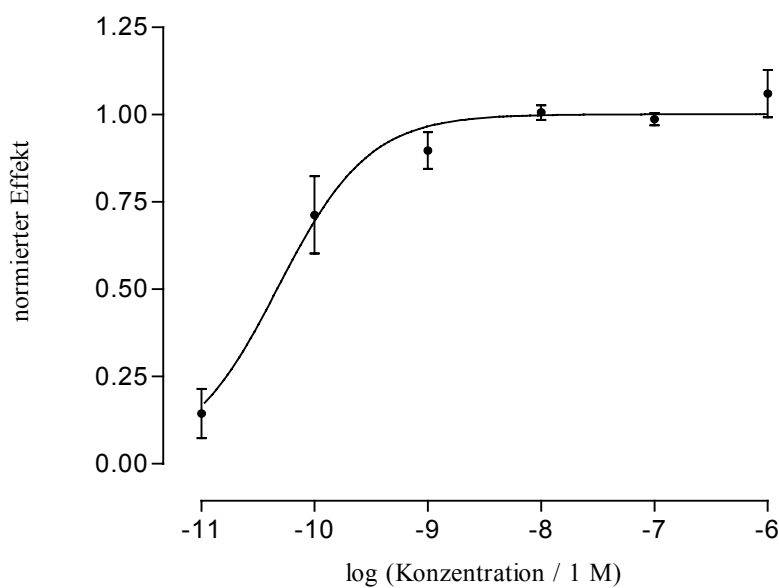


Abb. 14: Transaktivierung via hMR durch Aldosteron, gemittelt aus fünf Versuchen (siehe Text). Mittelwerte \pm Standardabweichung (Fehlerindikatoren).

Andere Steroide. Die gleichen zwanzig am hGR α untersuchten Steroide wurden auch auf ihre Transaktivierungsfähigkeit über den hMR getestet. Dabei zeigte sich sowohl im Hinblick auf die maximale Wirkung als auch auf die EC₅₀ eine wesentlich größere Wertespanne. Für Deflazacort, Prednison, Cortison und Dehydroepiandrosteron können nur mittlere Höchstwerte für den Effekt angegeben werden, da kein sigmoider Kurvenverlauf erkennbar ist.

Bezüglich des E_{\max} (Abb. 15 und Tab. 18) sind sieben der getesteten Steroide mit Werten von 1,46 bis 1,85 signifikant effektiver als Aldosteron ($p < 0,001$). Prednisolon ist das schwächste, sein 6 α -Methyl-Derivat das stärkste dieser Gruppe; die dazwischenliegenden Steroide sind sämtlich fluoriert (6 α - bzw. 9 α -Position), zwei sind 16 α -methyliert. Signifikant schwächer als Aldosteron ($p \leq 0,002$) sind ebenfalls sieben der 16 einer E_{\max} -Berechnung zugänglichen Substanzen, darunter drei halogenierte. Von den letzteren besitzt Chlorfluocortolon den mit knapp einem Drittel des Referenzwertes kleinsten mineralokortikoiden E_{\max} .

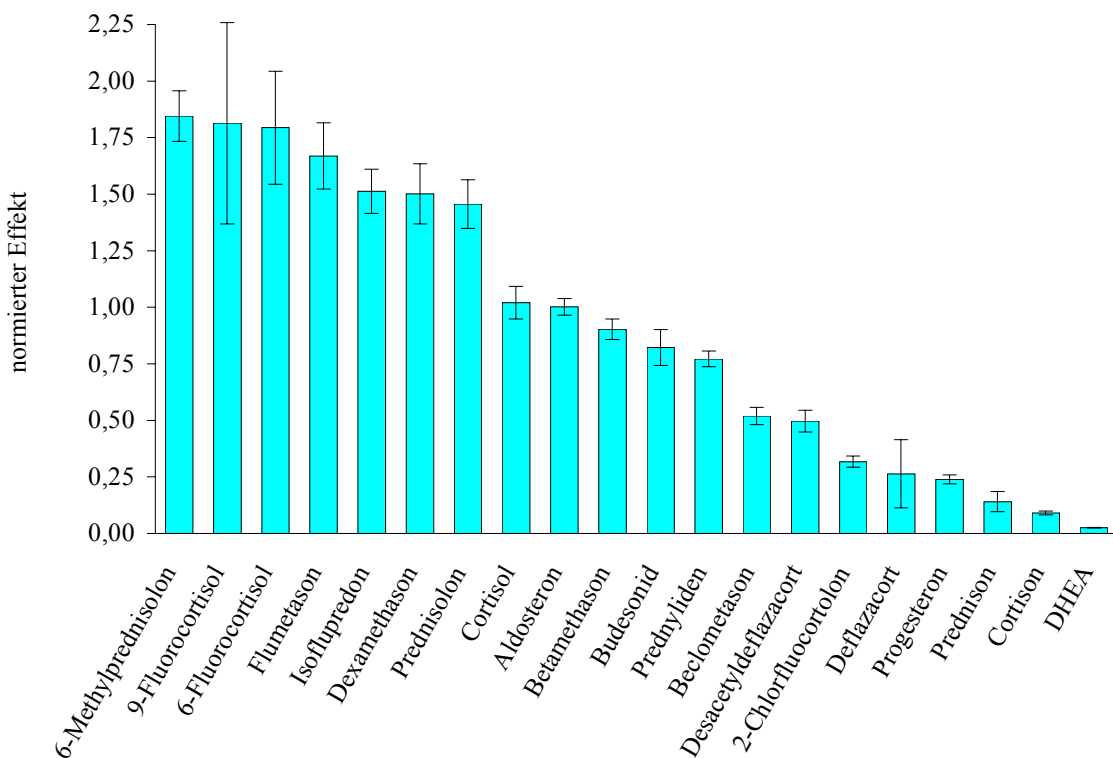


Abb. 15: Transaktivierung über hMR, E_{\max} -Werte \pm 95%-Konfidenzintervall. Bei Deflazacort, Prednison, Cortison, DHEA: mittlere Höchstwerte \pm 2 · Standardabweichung.

STEROID	E_{\max}	SE	CI ₉₅
6 α -Methylprednisolon	1,845	0,054	0,112
9 α -Fluorocortisol	1,814	0,220	0,445
6 α -Fluorocortisol	1,794	0,121	0,250
Flumetason	1,669	0,070	0,146
Isoflupredon	1,513	0,047	0,098
Dexamethason	1,502	0,064	0,133
Prednisolon	1,456	0,051	0,107
Cortisol	1,020	0,035	0,072
Aldosteron	1,002	0,018	0,036
Betamethason	0,902	0,022	0,045
Budesonid	0,822	0,038	0,080
Prednyliden	0,772	0,017	0,034
Beclometason	0,520	0,018	0,038
Desacetyldeflazacort	0,497	0,023	0,048
2-Chlorfluocortolon	0,318	0,012	0,025
Deflazacort	<i>0,264</i>	<i>0,038</i>	<i>0,151</i>
Progesteron	0,239	0,009	0,019
Prednison	<i>0,140</i>	<i>0,011</i>	<i>0,044</i>
Cortison	<i>0,090</i>	<i>0,002</i>	<i>0,009</i>
DHEA	<i>0,025</i>	<i>0,000</i>	<i>0,001</i>

Tab. 18: E_{\max} bei Transaktivierung über hMR. SE: Standardfehler, CI₉₅: 95%-Konfidenzintervall (halbe Weite). *Kursive Angaben:* mittlerer Höchstwert, Standardfehler, zweifache Standardabweichung (v. l. n. r.).

Die Differenzierung nach der EC₅₀ ermöglicht eine Einteilung der untersuchten Steroide in vier Klassen mineralokortikoider Potenz (Abb. 16): hoch potent sind 9 α - und 6 α -Fluorocortisol, Isoflupredon und Aldosteron; Flumetason und Cortisol bilden mit untereinander nicht signifikant verschiedenen EC₅₀-Werten im Bereich des zeh- bis zwanzigfachen von Aldosteron die nächst schwächere Gruppe. Methylprednisolon liegt am Übergang zu sechs mäßig potenten Steroiden (Prednisolon, Dexamethason, Budesonid, Progesteron, Desacetyldeflazacort, Betamethason), deren Halbmaximums-Konzentrationen 170fach ($\pm 50\%$) höher als die Aldosteron-Referenz ($4,8 \cdot 10^{-11}$ M) sind. Schwach potent sind Beclometason, Prednyliden und 2-Chlorfluocortolon, deren EC₅₀ den Bezugswert um etwa drei Zehnerpotenzen übertrifft (Tab. 19).

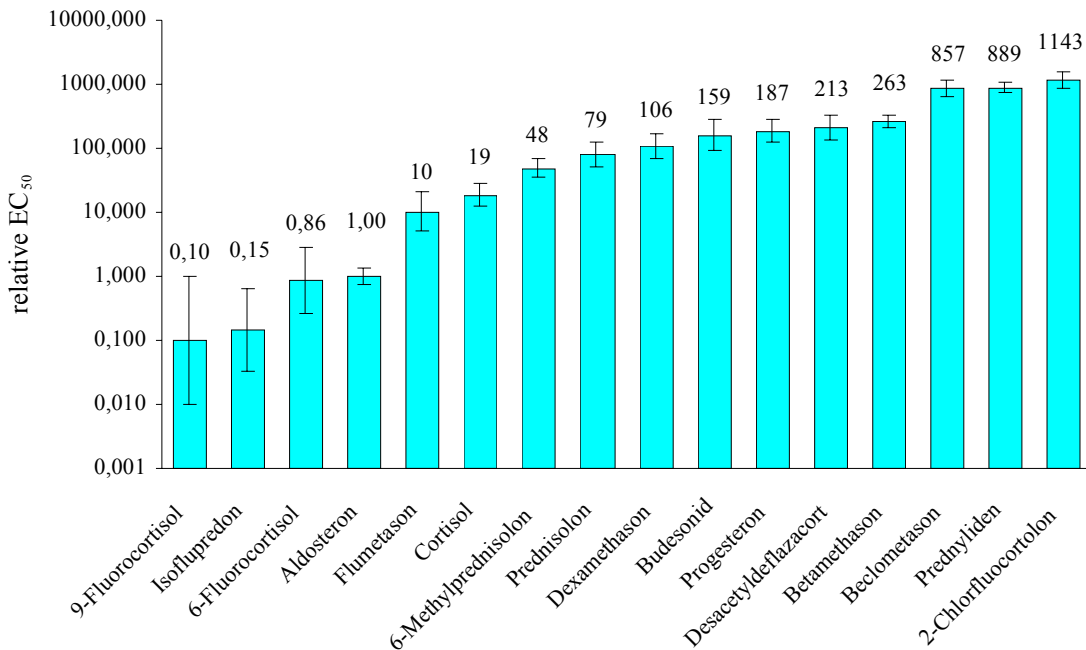


Abb. 16: Transaktivierung über hMR, EC₅₀ relativ zu Aldosteron (Werte angegeben). Fehlerindikatoren: 95%-Konfidenzintervalle. Ordinate logarithmisch skaliert.

Signifikante Unterschiede bei nach EC₅₀ benachbarten Steroiden bestehen jeweils zwischen Aldosteron und Flumetason, Cortisol und 6 α -Methylprednisolon sowie Betamethason und Beclometason. Daneben ist Cortisol signifikant weniger potent als seine 6 α - und 9 α -fluorierten Derivate, aber potenter als sein 1-Dehydro-Abkömmling Prednisolon. Dieses wiederum ist potenter als Prednyliden und Desacetyldeflazacort, aber weniger effektiv als sein 9 α -Fluor-Derivat Isoflupredon. Die EC₅₀ des Dexamethasons ist signifikant größer als die von Isoflupredon und Flumetason. (Für alle genannten Vergleiche ist $p < 0,001$.)

Der Begriff der Potenz im oben gebrauchten Sinne bezieht sich nur auf die EC₅₀, nicht aber auf E_{max} : ein „potentes“ Steroid mit kleinem maximalen Effekt ist ein (partieller) Antagonist. Dies fällt beim MR stärker ins Gewicht als beim GR, wo die Maxima weniger divergieren. Zwei sowohl nach EC₅₀ als auch nach Maximalwirkung sehr wenig mineralokortikoide Steroide sind Chlorfluocortolon und Prednyliden, in beiderlei Hinsicht sehr effektiv sind z. B. Isoflupredon, 6 α - und 9 α -Fluorocortisol. Die im nächsten Abschnitt vorgenommene Gegenüberstellung mineralo- und glukokortikoider Aspekte dieser und der übrigen untersuchten Substanzen gestattet noch weiter reichende Aussagen über den für ihre Wirkung dominierenden Rezeptor.

STEROID	$\log(\text{EC}_{50} \div 1 \text{ M})$	SE	EC_{50} IN nM	CI_{95}^- IN nM	CI_{95}^+ IN nM
9 α -Fluorocortisol	-11,321	0,4975	0,0048	0,00047	0,048
Isoflupredon	-11,157	0,2988	0,0070	0,0016	0,031
6 α -Fluorocortisol	-10,383	0,2524	0,041	0,012	0,139
Aldosteron	-10,319	0,0570	0,048	0,037	0,063
Flumetason	-9,306	0,1413	0,494	0,251	0,974
Cortisol	-9,048	0,0883	0,895	0,587	1,367
6 α -Methylprednisolon	-8,636	0,0694	2,31	1,66	3,23
Prednisolon	-8,423	0,0913	3,78	2,44	5,85
Dexamethason	-8,293	0,0911	5,09	3,29	7,89
Budesonid	-8,118	0,1129	7,62	4,44	13,09
Progesteron	-8,046	0,0902	8,99	5,84	13,86
Desacetyldeflazacort	-7,991	0,0940	10,2	6,5	16,1
Betamethason	-7,899	0,0442	12,6	10,2	15,6
Beclometason	-7,386	0,0620	41,1	30,6	55,3
Prednyliden	-7,370	0,0395	42,7	35,5	51,3
2-Chlorfluocortolon	-7,261	0,0601	54,8	41,1	73,1

Tab. 19: Transaktivierung über hMR. $\log \text{EC}_{50}$ mit Standardfehler SE, EC_{50} mit unterer (CI_{95}^-) und oberer (CI_{95}^+) Grenze des 95%-Konfidenzintervalls.

3.3.4 Vergleichende Betrachtung

Für 15 der getesteten 20 Steroide konnten sowohl bei Transaktivierung über den Gluko- als auch über den Mineralokortikoidrezeptor die Parameter E_{max} und EC_{50} mittels nichtlinearer Regression aus den Meßdaten abgeleitet werden. Über die paarweise Zuordnung der jeweils bezüglich des GR und des MR ermittelten EC_{50} läßt sich zusammen mit den Maximaleffekten ein Maß für die Rezeptorselektivität dieser Substanzen definieren.

Trägt man die relativen, d. h. auf die Referenzsubstanz Dexamethason bzw. Aldosteron normierten EC_{50} -Werte von beiden Rezeptoren gegeneinander auf, ergibt sich das in Abb. 17 wiedergegebene Diagramm. Dort ist ein Steroid bei umso geringeren Konzentrationen glukokortikoid wirksam, je weiter links es liegt, und umso eher mineralokortikoid, je weiter es nach unten hin abgebildet ist. Zu beachten ist die logarithmische Skalierung beider Achsen, durch die die Konfidenzintervalle zeichnerisch symmetrisch erscheinen.

Legende zu Abb. 17: I Prednyliden, II Beclometason, III Budesonid, IV Betamethason, V 2-Chlorfluocortolon, VI Dexamethason, VII Desacetyldeflazacort, VIII Flumetason, IX 6 α -Methylprednisolon, X Prednisolon, XI Cortisol, XII 6 α -Fluorocortisol, XIII Isoflupredon, XIV 9 α -Fluorocortisol, XV Aldosteron

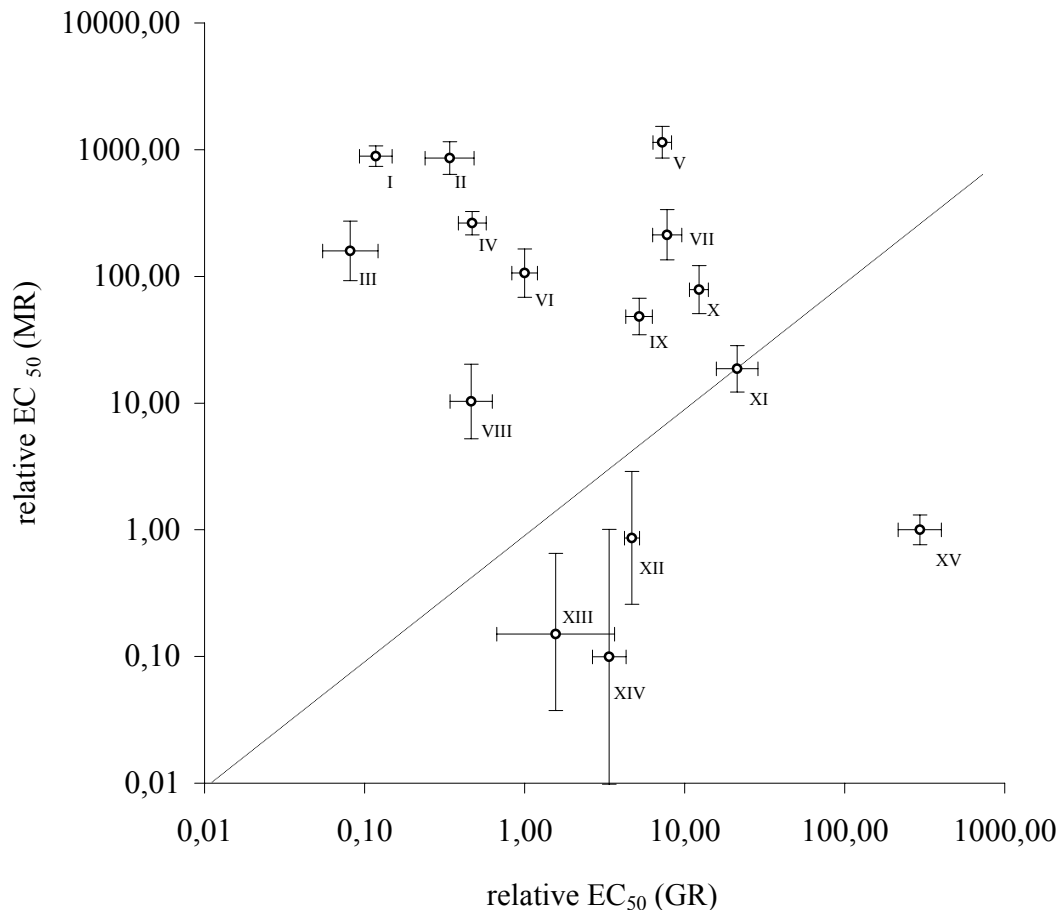


Abb. 17: EC₅₀ bei Transaktivierung über hGR α (Abszisse) bzw. hMR (Ordinate), Werte relativ zur EC₅₀ der Referenzsubstanz (Dexamethason bzw. Aldosteron). Fehlerindikatoren: 95%-Konfidenzintervalle. Die Achsen sind logarithmisch skaliert.

Die eingezeichnete Gerade verbindet Punkte mit dem gleichen EC₅₀-Verhältnis wie dem des Cortisols. Der senkrechte Abstand zu dieser korreliert mit der Bevorzugung eines Rezeptors: Alle links oberhalb gelegenen Steroide sind relativ zu ihrer glukokortikoiden Potenz schwächere Mineralokortikoide als Cortisol (Flumetason besitzt zwar eine etwas geringere EC₅₀ am MR, aber eine noch vielfach kleinere am GR), während jene im rechten unteren Bereich effektivere Mineralo- als Glukokortikoide sind. Demnach sind die in diesem Sinne selektivsten Glukokortikoide Prednyliden, Beclometason und Budesonid, das selektivste Mineralokortikoid ist das natürliche Hormon – Aldosteron.

Das numerische Äquivalent zu dieser grafischen Einteilung ist in Tab. 20 dargestellt. Dem auf den Wert von Cortisol normierten Quotienten aus den EC_{50} -Werten bezüglich MR und GR (Q_{50}) ist zur genaueren Differenzierung der Rezeptorselektivität der Maximaleffekt am MR an die Seite gestellt. Die Kombination beider Werte relativiert in gewissem Umfang die Unterschiede zwischen einigen Steroiden: So bevorzugt Dexamethason hinsichtlich der Potenz den GR gegenüber dem MR vierfach stärker als Desacetyldeflazacort; während jenes aber einen hohen maximalen Effekt über den MR hervorruft, ist ein solcher bei letztem nur schwach ausgeprägt. Daher kann beiden eine weniger verschiedene Selektivität zugeschrieben werden, als es der alleinige Vergleich der EC_{50} -Quotienten suggeriert. Eine ähnliche Argumentation gilt auch für Chlorfluocortolon, das mit seinem niedrigen E_{max} im MR-Assay tendentiell den hochselektiven Glukokortikoiden zugeordnet werden kann. Diese beginnen mit Betamethason und reichen bis zu dem ebenfalls systemisch einsetzbaren Prednyliden, dessen Q_{50} den des Dexamethasons um mehr als das 70fache übertrifft.

STEROID	Q_{50}	$\log Q_{50}$	E_{max} (MR)
Prednyliden	8586	3,9	mittel
Beclometason	2863	3,5	niedrig
Budesonid	2217	3,3	mittel
Betamethason	635	2,8	mittel
2-Chlorfluocortolon	180	2,3	niedrig
Dexamethason	120	2,1	hoch
Desacetyldeflazacort	31	1,5	niedrig
Flumetason	25	1,4	hoch
6 α -Methylprednisolon	11	1,0	hoch
Prednisolon	7	0,9	hoch
Cortisol	1	0	mittel
6 α -Fluorocortisol	0,2	-0,7	hoch
Isoflupredon	0,1	-1,0	hoch
9 α -Fluorocortisol	0,03	-1,5	hoch
Aldosteron	0,004	-2,4	mittel

Tab. 20: Verhältnis gluko- zu mineralokortikoider Potenz und maximaler mineralokortikoider Effekt in Graden (hoch: $E_{max} > 1,333$; niedrig: $E_{max} < 0,666$; mittel: E_{max} dazwischen). Die Werte in der dritten Spalte sind proportional zu den senkrechten Distanzen der Datenpunkte von der Geraden in Abb. 17.

Fünf Steroide sind in obigem Schema nicht aufgeführt: Dehydroepiandrosteron zeigte weder über den GR noch den MR einen meßbaren Effekt, Cortison und Prednison riefen nur bei hohen Konzentrationen eine geringfügige Transaktivierung hervor. Dagegen war für Deflazacort mit dem GR und für Progesteron mit dem MR eine gewisse Wirkung mit ermittelbarer EC_{50} zu verzeichnen, während dies beim jeweils anderen Rezeptor nicht der Fall war. Da somit kein Q_{50} -Wert angegeben, aber trotzdem eine Wirkungsselektivität ausgemacht werden kann, sind die entsprechenden Kurven zur Veranschaulichung unten wiedergegeben.

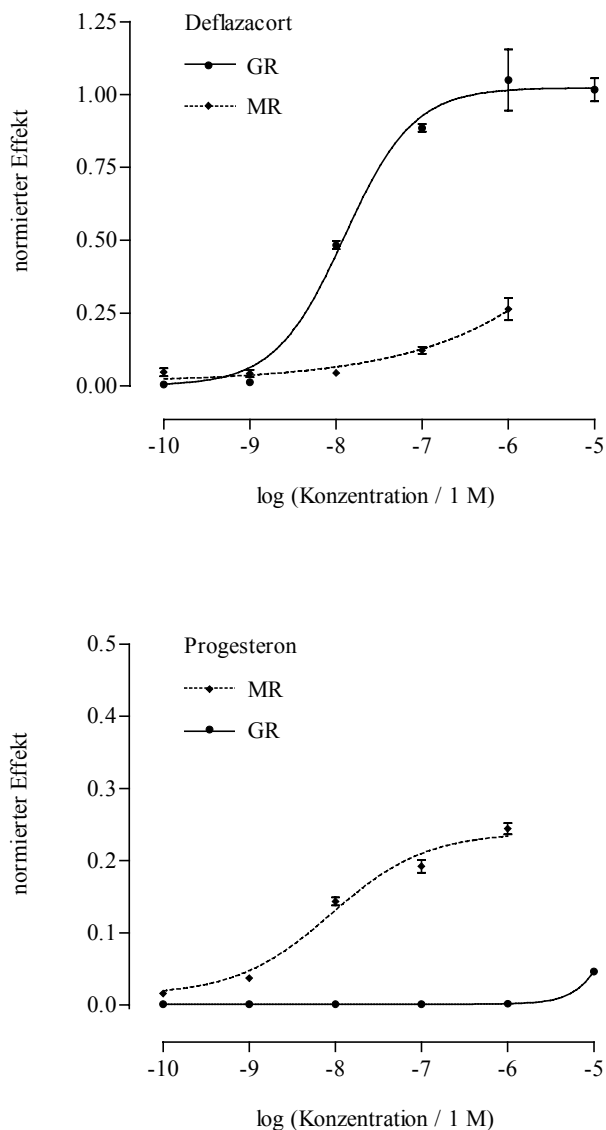


Abb. 18: Transaktivierung über GR und MR durch Deflazacort (*oben*) und Progesteron (*unten*). Fehlerindikatoren: SEM (n = 4).