

4 Diskussion

4.1 Methodik

Transaktivierungsassays gehören zu den am weitesten verbreiteten molekularbiologischen Techniken, die Wirksamkeit von Steroidhormonen zu bestimmen. Die gebräuchliche Größe zur Charakterisierung ihrer Potenz ist der Quotient aus der EC_{50} einer Referenzsubstanz und der des untersuchten Kortikoids (siehe 1.3.2). Bei der Übertragung *in vitro* gewonnener Daten auf die Situation im Gesamtorganismus sind je nach eingesetztem Testsystem eine Reihe methodischer Einschränkungen zu beachten, die durch die künstlichen DNA-Konstrukte ebenso bedingt sind wie durch deren zelluläres Umfeld. Darüber hinaus wird die Aussagekraft jedes derartigen Assays von der experimentellen und theoretischen Ausrichtung auf einen Einzelaspekt der hormoninduzierten Rezeptoraktivierung limitiert.

4.1.1 Modellsystem

Die Bedingungen im verwendeten Zellkulturverfahren unterscheiden sich von denen *in vivo* in zahlreichen Punkten. So ist das steroidresponsive Reporterplasmid sowohl im Hinblick auf die aus einem viralen Genom stammende Promotorsequenz samt der darin enthaltenen *response elements* als auch auf seine von normalem zellulärem Chromatin abweichende nicht-nukleosomale Organisation [138] ein unphysiologisches Konstrukt. Beide Umstände beeinflussen die selektive Promotorregulation durch verschiedene Steroidrezeptoren und andere Transkriptionsfaktoren [108;139]. Durch die Überexpression des Rezeptors und die von humanen Geweben eventuell abweichende Ausstattung der CV-1-Zellen mit verschiedenen Kofaktoren der mRNA-Synthese entstehen weitere Abweichungen von den Normalbedingungen. Dies dürfte auch für die Rolle der Homo- und Heterodimerisierung von Steroidrezeptoren [60;109] gelten.

Erhebliche Bedeutung für die Aktivierbarkeit der Rezeptoren und ihre zelluläre Lokalisation kommt ihrer Interaktion mit Hitzeschockproteinen zu [17;41;66]. Da die Bildung von hsp90 enthaltenden Heterokomplexen ein evolutionär hoch konservierter Prozeß ist und auch mit Komponenten aus verschiedensten Eukaryonten funktionell ungestört stattfindet [117], sind diesbezüglich keine wesentlichen Differenzen zwischen Zellkultur und Situation *in vivo* zu erwarten. Hinsichtlich der im nächsten Abschnitt diskutierten Auswirkungen einer 11 β -HSD-Aktivität auf die augenscheinliche Wirksamkeit und Selektivität bestimmter Steroide stellt sich der Sachverhalt hingegen völlig anders dar. Ein weiterer Aspekt ist die extrazelluläre Proteinbindung, für die *in vitro* (fetales Kälberserum) keine verlässlichen Daten vorliegen.

Abgesehen von den spezifischen Abweichungen des hier eingesetzten Testverfahrens von den natürlichen Gegebenheiten kann systembedingt nur die Transaktivierung als Ausdruck von „Agonismus“ berücksichtigt werden. Durch Transrepression hervorgerufene Wirkungen werden ebensowenig modelliert wie nichtgenomische Effekte. Daher sollten anderweitig nicht zu erklärende Diskrepanzen zwischen den Potenzen *in vivo* und in den hier verwendeten Assays zur Untersuchung jener Aspekte in geeigneten Versuchssystemen Anlaß geben.

Ein wesentliches Kriterium, das für den Einsatz der CV-1-Zellen in der Untersuchung von Gluko- und Mineralokortikoiden spricht, ist die in 3.3.1 belegte Abwesenheit einer funktionell relevanten Menge endogener Gluko- oder Mineralokortikoid-Rezeptoren zum einen und endogener Gluko- oder Mineralokortikoide zum anderen. Ohne diese Eigenschaft wäre die isolierte Messung gluko- oder mineralokortikoider Effekte unter der Annahme vergleichbarer Rezeptordichten nicht einwandfrei durchzuführen. Ein weiterer großer Vorteil der CV-1-Zelllinie ist der mit den hier eingesetzten Mengen transfizierter Plasmide zu findende Konzentrations-Wirkungs-Verlauf, der im Rahmen der Meßgenauigkeit für alle Steroide monoton wachsend ist und dementsprechend keine die Bestimmung einer EC₅₀ vereitelnden lokalen Extrema aufweist. Hierin liegt z. B. ein Unterschied zu den Daten, die RUPPRECHT et al. in einer humanen Neuroblastom-Zelllinie (SK-N-MC) für Aldosteron mit dem MR und Dexamethason mit dem GR gewannen [131]. Auf die fehlende Expression des großen T-Antigens als Voraussetzung für eine quantitativ angenähert lineare Plasmidreplikation – und damit die intakte Funktion des dualen Luciferaseassays – wurde bereits hingewiesen (siehe 2.2.1).

4.1.2 Prärezeptormetabolismus

Die Bedeutung der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen für die systemische Aktivierung von 11-Keto-Prodrugs und die lokale Inaktivierung bestimmter 11-Hydroxysteroiden in der Niere und anderen Mineralokortikoid-Zielorganen ist umfangreich dokumentiert (siehe 1.1.3). Ihr Einfluß erschwert eine Abschätzung der rezeptorvermittelten Wirksamkeit in Zellkulturen, die diese Enzyme exprimieren. 11 β -Dehydrogenaseaktivität in intakten CV-1-Zellen wurde von LOMBÈS et al. beschrieben [92], der für Corticosteron eine maximale Umsatzgeschwindigkeit von $2 \cdot 10^{-15}$ mol/min pro 1000 Zellen bei einer Substratkonzentration von 1 μ M fand. Dieser Wert ergab sich auch für die verwandten COS-7-Zellen, in denen eine differenziertere Analyse der Enzymaktivität unternommen wurde. Dabei zeigten sich für die Konversion von Cortisol zu Cortison mit $5 \cdot 10^5$ Zellen die in Abb. 19 dargestellten prozentualen Umsätze nach 1 h. Überträgt man die entsprechenden Daten unter der Annahme einer gleichartigen Enzymausstattung auf die in der vorliegenden Arbeit verwendete CV-1-Zellzahl von $5 \cdot 10^4$ pro well, kann der in 24 h zu erwartende Umsatz nach oben abgeschätzt werden (Tab. 21).

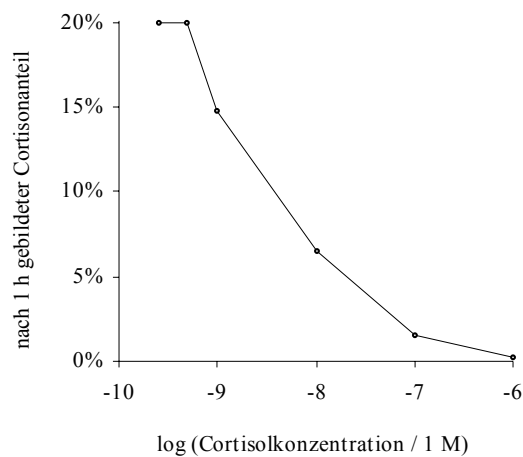


Abb. 19: Anteil entstandenen Cortisons an der eingesetzten Cortisolmenge in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration (nach Daten von LOMBÈS [92]), Inkubation von $5 \cdot 10^5$ COS-7-Zellen für 1 h bei 37 °C

INITIALE KONZENTRATION VON CORTISOL / 1 nM	OBERGRENZE DES UMSATZES NACH 24 h
1000	0,4 %
100	3,6 %
10	16 %
1	36 %
0,5	48 %
0,25	48 %

Tab. 21: Abschätzung der oberen Grenze für den Cortisolumsatz bei Inkubation von $5 \cdot 10^4$ CV-1-Zellen für 24 h bei 37 °C (unter Verwendung der Daten aus Abb. 19), s. Text.

Nach eigenen Bestimmungen unter den Bedingungen des Transaktivierungsassays (siehe 3.2) lag der dehydrogenierte Cortisolanteil nach 24 h mit 1 % bei einer Ausgangskonzentration von 10^{-6} M bzw. 25 % bei initialen 10^{-11} M in einem mit den Literaturwerten gut verträglichen Bereich. LOMBÈS zeigte in COS-7-Zellen die partielle Hemmbarkeit der katalytischen

Aktivität durch Carbenoxolon (CBX), konnte jedoch in einem Transaktivierungsassay in CV-1-Zellen mit Corticosteron keinen signifikanten Effekt einer Präinkubation mit 1 μM CBX auf die Lage der Wirkungskurve nachweisen (was vermutlich auf einer unzureichenden 11 β -HSD-Hemmung beruhte). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die 11-Oxosteroide Cortison und Prednison sowohl über den GR (Abb. 9, S. 47) als auch den MR (S. 54) selbst bei hohen Konzentrationen nur gering transaktivieren. Dies ist mit einer wesentlichen Expression der 11 β -HSD1 schlecht vereinbar [45]. Aus der Kombination aller genannten Resultate ergibt sich daher, daß von der Gegenwart der 11 β -HSD2 in den eingesetzten CV-1-Zellen in einem für die Beurteilung der Steroidpotenzen bedeutsamen Umfang auszugehen ist.

Die rein pharmakodynamisch bedingte Wirksamkeit, d. h. die eigentliche *efficacy*, wird für alle Substanzen, die von der 11 β -HSD2 effektiv dehydrogeniert werden, unterbewertet. Dies betrifft am meisten Prednisolon, in kaum geringerem Ausmaß Cortisol. Hingegen werden z. B. fluorierte Steroide, die schlechte Substrate für die Inaktivierung durch die 11 β -HSD2 sind, relativ bevorzugt; gleiches gilt für Aldosteron. Zwei besondere Gesichtspunkte sind bei diesen Einflüssen zu beachten:

- (1) Je kleiner der K_D -Wert für seinen Rezeptor ist, desto eher wird die Potenz eines durch die 11 β -HSD2 oxidierten Steroids unterschätzt. Denn bei niedrigen Konzentrationen wird ein größerer prozentualer Anteil der Substanz als bei hohen inaktiviert.
- (2) Im Gegensatz zu den Verhältnissen *in vivo* ist die Metabolisierung von 11 β -Hydroxysteroiden im Transaktivierungsassay nicht an die Wirkungsdominanz des MR gekoppelt. Daher wird der Quotient aus den EC_{50} von beiden Rezeptoren als Maß für die Selektivität eines Liganden durch die 11 β -HSD2 weniger verfälscht als die isoliert betrachteten Potenzen bezüglich GR oder MR. Wegen (1) wird die Selektivität für den GR dennoch zu hoch bzw. die für den MR zu niedrig bewertet, wenn die untersuchte Substanz ausgiebig inaktiviert wird und die K_D für den GR größer ist als für den MR. Dies trifft z. B. auf Cortisol und Prednisolon zu.

Bei der Diskussion der speziellen Transaktivierungsdaten wird auf diese Feststellungen detailliert eingegangen.

4.1.3 Reliabilität

Wie aus 2.4.2 hervorgeht, sind alle Fehlerintervalle, die mit den Ergebnissen der beschriebenen nichtlinearen Regression angegeben werden, aus der Varianz der Residuen bei dem individuellen Versuch abgeleitet. Sie liefern daher zwar eine Abschätzung des jeweiligen Meßfehlers und abgeleiteter Größen, beschreiben jedoch nicht eventuelle Lageverschiebungen der Konzentrations-Wirkungs-Kurve bei Versuchswiederholungen, wie sie u. a. durch etwas schwankende Steroidkonzentrationen in den Kulturmedien oder unterschiedliche Effizienz der Transfektion und der Proteinsynthese in den CV-1-Zellen auftreten können. Für die Referenzsubstanzen – Dexamethason (GR) und Aldosteron (MR) – zeigte die statistische Analyse von sechs bzw. fünf vollständig unabhängigen Versuchen trotz z. T. deutlicher Unterschiede zwischen den einzelnen Regressionskurven eine gute Reproduzierbarkeit der EC_{50} (Tab. 12, Tab. 16). Insgesamt muß bei dieser Größe offenbar mit einer Ungewißheit um den Faktor 1,5 bis 1,8 in beiden Richtungen gerechnet werden.

Da ebenso zahlreiche Wiederholungen des gleichen Versuchs für alle übrigen getesteten Kortikoide einen unverhältnismäßigen Aufwand bedeutet hätten, wurde auf die Erstellung einer gemittelten Kurve wie für die Referenzsubstanzen (Abb. 8 und Abb. 14) verzichtet. Bei drei Steroiden (Prednyliden, 6α - und 9α -Fluorocortisol) lagen die Regressionskurven aus jeweils zwei gleichen, unabhängigen Versuchen mit dem MR so eng ohne statistisch signifikante Abweichungen beieinander, daß zur Erhöhung der Genauigkeit beide Datensätze für dieselbe Substanz zu einem einzigen zusammengefaßt und die Parameter erneut berechnet wurden. Ansonsten beschränkt sich die Darstellung der Transaktivierungsdaten auf einen für das Steroid-Rezeptor-Paar repräsentativen Versuch mit möglichst geringer Streuung der Einzelwerte. Im Hinblick auf die oben festgestellten Unsicherheiten muß man daraus die Konsequenz für den Vergleich gluko- bzw. mineralokortikoider Potenzen ziehen, daß auch formal signifikante Unterschiede der EC_{50} nur dann als wirklich verwertbar anzusehen sind, wenn die Werte wenigstens um das 2,25fache ($1,5^2$) auseinanderliegen.

Die Verlässlichkeit der E_{max} -Bestimmung ist schwer zu bestimmen, da wegen der unumgänglichen Normierung auf die Referenzsubstanzen deren variierende Rohwerte kaschiert in den Meßfehler eingehen und die Zahl identischer Versuche bei den anderen Substanzen klein ist. Kleinere Differenzen beim Maximaleffekt sind daher zurückhaltend zu bewerten.

4.2 Transaktivierung

Während traditionelle Methoden der Wirksamkeitsbestimmung von Glukokortikoiden verschiedene kumulative Parameter (siehe 1.3.3) verwenden, ziehen neuere molekularbiologisch-biochemische Ansätze Bindungs- und Kompetitionsdaten sowie modellhafte Indikatoren für Transaktivierung und Transrepression heran, mit denen eine weitgehende Isolierung der rein vom Rezeptor bestimmten Wirkungskomponente angestrebt wird. Insbesondere bei den letztgenannten schwanken die Absolutwerte, aber auch die relativen Potenzen abhängig von den Assaybedingungen erheblich, was die Erstellung einer konsistenten pharmakodynamisch definierten Rangliste sehr erschwert. Zudem ist eine Abschätzung der Selektivität bezüglich des Gluko- oder Mineralokortikoidrezeptors anhand von EC_{50} -Werten aus unterschiedlichen Testsystemen *in vitro* damit praktisch ausgeschlossen. Transaktivierungsdaten zu GR und MR in einem sonst gleichbleibenden Assay liegen für viele klinisch relevante Substanzen nicht oder nur in geringem Umfang bei oft suboptimalen Untersuchungsbedingungen vor. Die nachfolgend diskutierten Ergebnisse könnten daher einen erweiterten Einblick in einige dieser Verhältnisse ermöglichen.

4.2.1 Glukokortikoide Potenz

Einen Vergleich der in dieser Arbeit gewonnenen mit in der Literatur zu findenden Daten liefert Tab. 22. Dort beziehen sich die Werte *in vivo* auf die entzündungshemmenden Effekte bei Gabe p. o., s. c. oder i. m., nicht jedoch bei inhalativer, intraartikulärer oder epidermaler Applikation. Sie stammen teils aus Tierversuchen, teils aus klinischen Studien. *In vitro* wurde die Fähigkeit zur Transaktivierung oder zur Hemmung chemisch stimulierter Lymphozyten getestet. Für einige der aus pharmakologischen Standardwerken entnommenen Angaben konnte eine Primärpublikation nicht ermittelt werden.

Unter Berücksichtigung pharmakokinetischer Einflüsse zeigt sich bei den meisten Substanzen eine gute Übereinstimmung der tradierten glukokortikoiden Potenz im intakten Organismus mit der hier ermittelten Transaktivierungsbereitschaft bezüglich des GR, wie sie durch das Verhältnis der $EC_{50\text{ GR}}$ von Cortisol (12 nM) zu der des jeweiligen Steroids ausgedrückt wird. So wurde durch DAHLBERG et al. [38] im Rattenohr-Ödemtest eine hohe Effektivität von

Budesonid beschrieben. Im Vergleich mit Dexamethason erwies es sich als neunmal potenter, was sowohl mit den vorliegenden Transaktivierungsdaten als auch seiner etwa 8- bis 9fach höheren Affinität zum GR [38;130] gut vereinbar ist; bei oraler Gabe ist es wegen eines ausgeprägten first-pass-Effekts deutlich weniger wirksam als bei lokaler Applikation.

STEROID	12 nM ÷ EC ₅₀ GR	LITERATURWERT FÜR GLUKOKORT. POTENZ		LITERATURWERT FÜR AFFINITÄT ZUM GR
		<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	
Budesonid	263	240 ^{†a} [38]	*	195 [38] 85 [130]
Prednyliden	182	4 [57]	*	*
Beclometason	63	*	*	11 ^{†b} [130]
Flumetason	46	*	*	*
Betamethason	45	25 [136]	12 [84]	8 ^{†b} [130]
Dexamethason	21,4	26 [53]	5 [131]	~14 ^{†††} [131]
Isoflupredon	14	15 [53]	*	*
9α-Fluorocortisol	6,3	10 - 13 [53]	2 [132]	1,7 [132]
6α-Fluorocortisol	4,6	*	*	*
6α-Methylprednisolon	4,1	3 - 6 [53]	9 [84]	2,5 [130]
2-Chlorfluocortolon	3,0	*	*	*
Desacetyldeflazacort	2,7	*	*	*
Prednisolon	1,7	3 - 4 [53]	9 [†] [150]	1,1 [130]
Cortisol	1,0	1,0	1,0	1,0
Deflazacort	0,96	3 - 4 ^{††}	*	*
Aldosteron	0,07	0 [5;57]	0,2 [131]	0,8 [65] 0,2 [131]
Prednison	**	4 [136]	0 [85]	*
Cortison	**	0,8 [136]	0 [85]	*
Progesteron	**	*	0,2 [132]	0,9 [132] 0,7 [125]

† Vergleich mit Dexamethason, kein Wert für Cortisol; Normierung durch Multiplikation mit 26 (a) bzw. 14 (b)

†† kein direkter Vergleich mit Cortisol oder Dexamethason, widersprüchliche Daten im Vergleich mit Prednisolon und 6α-Methylprednisolon [12;43;135]; im Mittel ungefähr äquivalent zu Prednisolon

††† andere Werte: 3 [65], 11 [130], 25 [38]

* keine entsprechenden Daten verfügbar

** nicht berechenbar, da keine Effektsättigung im untersuchten Konzentrationsbereich

Tab. 22: Vergleich der im GR-Transaktivierungsassay ermittelten Potenz (bezogen auf Cortisol) mit Daten aus der Literatur. Angabe von *in-vivo*-Werten nur bei systemischer Wirkung. Weiteres siehe Text.

Beclometason und *Flumetason* werden ebenso wie Budesonid nicht systemisch angewendet. Die hohe Wirksamkeit dieser drei Stoffe in niedrigsten Dosen ist angesichts der ermittelten EC_{50} nicht allein mit ihrer pharmakodynamischen Potenz zu erklären. Vielmehr dürfte die hohe Konzentration am Wirkort durch Applikation als Spray bzw. Salbe dafür hauptverantwortlich sein. Für *Dexamethason* bestätigt die – gegenüber Untersuchungen von RUPPRECHT et al. [132] deutlich niedrigere – relative EC_{50GR} mit nur geringer Abweichung die von BOLAND *in vivo* gewonnenen Daten (in [53]) auf molekularer Ebene. Die Potenz von *Betamethason* wird, bei etwas schwächerer GR-Bindung [38;130], im allgemeinen mit der von Dexamethason gleichgesetzt [136]; hier erschien sie etwa doppelt so groß. Allerdings kann, wie in 4.1.3 erwähnt, ein Unterschied in dieser Größenordnung durchaus noch artifiziell sein, so daß auf eine tatsächlich differierende Transaktivierungsaktivität nicht mit ausreichender Sicherheit geschlossen werden kann. Mit ähnlicher Vorsicht muß die Wirkung von *Isoflupredon* beurteilt werden, obwohl die zwischen 9α -Fluorocortisol und Dexamethason liegende Potenz *in vitro* fast genau der *in vivo* (antirheumatischer Effekt beim Menschen) entspricht.

Eine erhebliche Abweichung innerhalb der Gruppe hochpotenter Glukokortikoide ist bei *Prednyliden* festzustellen. Diese ist durch die Pharmakokinetik der Substanz, insbesondere hinsichtlich der 11β -HSD [45], nicht zu erklären. Daher wäre für dieses Steroid eine Charakterisierung des Verhältnisses von Transaktivierung und Transrepression von besonderem Interesse; allerdings wäre ein eventueller dissoziativer Effekt in diesem Fall therapeutisch ungünstig. Daß beide Mechanismen in der umgekehrten Weise divergieren können, wurde durch VAYSSIÈRE [150] und BAMBERGER [15] gezeigt; ein klinisch verwertbarer Vorteil eines in der erstgenannten Arbeit gefundenen dissoziativen Glukokortikoids konnte jedoch nicht belegt werden [20].

Von Cortisol bis zu Dexamethason entspricht die Rangliste aus der vorliegenden Arbeit der klassischen Reihenfolge, wenngleich die genauen quantitativen Relationen etwas voneinander abweichen. 9α -Fluorocortisol weist eine stärkere Rezeptorbindung und eine höhere Wirksamkeit bei der Ratte und am Menschen auf als Cortisol und Prednisolon [53;130;132]. Seine EC_{50} fällt relativ zu Cortisol und 6α -Methylprednisolon einerseits sowie zu Isoflupredon und Dexamethason andererseits höher aus als anhand seiner größeren Wirkung *in vivo* erwartet.

Da es im Gegensatz zu Cortisol durch die 11 β -HSD2 nicht inaktiviert wird, scheidet deren Einfluß als mögliche Erklärung aus. Hingegen könnte ein solcher enzymatischer Abbau die Ursache für die relativ niedrige Potenz von *Prednisolon* sein, da es von der 11 β -HSD2 in größerem Umfang als Cortisol und 6 α -Methylprednisolon dehydrogeniert wird [45].

Die geringe Transaktivierungspotenz von *Deflazacort* ist nicht überraschend, da für die höhere Wirksamkeit *in vivo* sein aktiver Metabolit, *Desacetyldeflazacort*, verantwortlich ist. Dessen EC₅₀ ist hier zwischen der von Prednisolon und 6 α -Methylprednisolon einzuordnen, einem Bereich, der trotz widersprüchlicher Resultate hinsichtlich einer genaueren Bestimmung beim Menschen [11;12;43;104] seiner in der klinischen Praxis angenommenen glukokortikoiden Potenz entspricht. Zur Klärung der Frage, ob die geringere Osteoporoserate unter Deflazacort im Vergleich zu Prednisolon auf einer Unterschätzung seiner Äquivalenzdosis beruht, sind sowohl genauere Untersuchungen seiner Transaktivierungs- und Transrepressionsfähigkeit in unterschiedlichen Zelllinien als auch breiter angelegte klinische Studien erforderlich. Das Grundproblem, welche Meßgrößen überhaupt als repräsentativ für immunsuppressive und andere Effekte von Glukokortikoiden angesehen werden sollten, stellt sich dabei in beispielhafter Weise [12].

Aldosteron fungiert *in vitro* als GR-Agonist (S. 49; [132]), jedoch mit einer hier 14fach höheren EC₅₀ als Cortisol. Beachtet man die im Normalfall etwa 100-500fach höheren peripheren Plasmaspiegel von freiem Cortisol, erklärt sich der fehlende glukokortikoide Effekt von Aldosteron *in vivo*. Auch bei primärem Hyperaldosteronismus werden keine systemischen Konzentrationen erreicht, die für eine relevante Aktivierung des GR ausreichen würden [112]. Die *in vitro* beschriebene Transaktivierung über den GR durch *Progesteron* [132] konnte unter den Bedingungen des hier etablierten Assays nicht reproduziert werden.

Daß *Prednison* und *Cortison* nur im obersten Konzentrationsbereich zu einer signifikanten Transaktivierung führen, belegt erstens die Abwesenheit einer relevanten 11-Ketoreduktase-Aktivität in CV-1-Zellen (s. S. 63) und zweitens die Grundthese von der antiinflammatorischen Inaktivität 11-dehydrogenerter Glukokortikoide, die ihre biologische Wirkung *in vivo* erst nach Reduktion durch die 11 β -HSD entfalten.

Bindung und Agonismus. Mit Blick auf die in 1.3 dargestellten theoretischen Konzepte stellt sich die Frage, inwieweit die gefundenen Differenzen in der EC_{50} durch unterschiedlich affine Bindungen an den Rezeptor erklärbar sind. Stellt man die Transaktivierungsdaten den in der Literatur angeführten Resultaten von Radioligandenassays (letzte Spalte von Tab. 22) gegenüber, gibt dies Aufschluß über das Verhältnis beider Aspekte. Zunächst fällt auf, daß der Quotient aus relativer Transaktivierungspotenz und relativer Rezeptoraffinität für fast alle typischen Glukokortikoide, für die Bindungsdaten vorliegen, etwa zwischen 1 und 4 liegt. Die mit einem Wert um 0,55 einzige deutliche Ausnahme bildet Prednisolon, das aber zugleich das beste 11β -HSD2-Substrat ist (s. o.). Da zudem die absolute EC_{50} von Cortisol mit 12 nM kleiner als seine (aus Kompetitionsstudien bei niedrigeren Temperaturen abgeleitete) Dissoziationskonstante am GR [131] ist, spricht dies für die ungefähre Gültigkeit des operationalen Modells (s. 1.3.2), nach dem die EC_{50} eines Liganden höchstens so groß sein kann wie sein K_D -Wert. Andererseits wird deutlich, daß die Affinität alleine kein ausreichender Prädiktor der glukokortikoiden Potenz ist. So wirken z. B. 9α -Fluorocortisol, Betamethason und Beclometason erheblich effektiver, als es die Rezeptorbindung annehmen läßt. Interessanterweise stehen die EC_{50} von Beclometason und Betamethason im selben Verhältnis (1,4 : 1) zueinander wie ihre von ROHDEWALD [130] gemessenen Affinitäten zum GR aus humanem Lungengewebe; das hier weniger potente Dexamethason hingegen band den Rezeptor in derselben Testreihe etwa doppelt so affin wie Betamethason. Ein weiteres Beispiel für die mit reinen Bindungsstudien verbundenen Ungewißheiten gibt Progesteron, das in seiner Bindungsfähigkeit am GR fast an Cortisol heranreicht, aber praktisch keine Transaktivierung induzierte. Letztlich wird ein echtes Verständnis dieser Diskrepanzen nur mit der Klärung der dreidimensionalen Struktur der Ligand-Rezeptor-Komplexe im Zusammenwirken mit anderen transkriptionsregulierenden Proteinen und der DNA erreicht werden. Eine formale Erörterung dieses Problems wird in 4.2.3 (S. 79) vorgenommen.

Einfluß funktioneller Gruppen. Die Schlußfolgerungen von FRIED und BORMAN [53] zur Auswirkung bestimmter Substituenten auf die Potenz eines Steroids *in vivo* (s. 1.1.2) lassen sich auch auf Rezeptorebene exemplarisch nachvollziehen (Tab. 23): Der 6α -Methylierung wurde bei Testung an der Ratte (nicht aber beim Menschen) eine Verstärkung der glukokortikoiden Wirkung um den Faktor 2 zugeschrieben, was dem hier gefundenen Wert

nahekommt. Die entsprechende Modifikation in 16 α -Position hatte eine Verbesserung der antirheumatischen Aktivität um das 1,1- bis 2,5fache (Mensch) zur Folge. Dies ist tendentiell auch bei der EC₅₀ *in vitro* der Fall, ohne daß ein statistisch signifikanter Unterschied erreicht wurde. Ähnliches gilt für die 1,2-Dehydrokonfiguration, mit der die EC₅₀ im Transaktivierungsassay auf die Hälfte abgesenkt zu sein scheint – passend zu dem Verstärkungsfaktor *in vivo* (s. S. 8). Eindeutig nachweisbar waren der Effekt einer 16-Methylengruppe (Prednyliden) und der eines Fluoratoms in 6 α - oder 9 α -Stellung. Die infolge 9 α -Fluorierung 6- bis 8fach höhere Potenz *in vitro* korreliert mit den Ergebnissen aus tierexperimentellen und klinischen Studien. Der deutliche Einfluß einer 6 α -Fluorierung, auch im Zusammenspiel mit einer 9 α -Fluorierung, konnte hier erstmals in Zellkultur gezeigt werden. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß diese mit einer Fluorierung einhergehenden Wirkungsverstärkungen *in vitro* zumindest teilweise auf einer gegenüber den Vergleichssubstanzen Cortisol und Prednisolon verminderten Dehydrogenierung durch die 11 β -HSD2 beruhen (s. 4.1.2), also pharmakokinetisch *mitbedingt* sind. Dies ist auch bei dem geringen, nicht signifikanten Effekt der Oxazolingruppe in Deflazacort zu bedenken, so daß diese *in vitro* wahrscheinlich keine wesentliche Wirkungsverstärkung bewirkt.

Alle in diesem Abschnitt erwähnten Verstärkungsfaktoren *in vivo* sind [53] entnommen.

CHEMISCHE FUNKTION	AUSWIRKUNG	VERGLICHENE STEROIDE	
1-Dehydro	+ (+)	Cortisol 9 α -Fluorocortisol	Prednisolon Isoflupredon
6 α -Fluoro	++ +	Cortisol Dexamethason	6 α -Fluorocortisol Flumetason
9 α -Fluoro	++ ++	Cortisol Prednisolon	9 α -Fluorocortisol Isoflupredon
11 β -Hydroxy statt 11-Keto	++ ++	Cortison Prednison	Cortisol Prednisolon
6 α -Methyl	+	Prednisolon	6 α -Methylprednisolon
16 α -Methyl	(+)	Isoflupredon	Dexamethason
16 β -Methyl	(+)	Isoflupredon	Betamethason
16-Methylen	++	Prednisolon	Prednyliden
2'-Methyl-16,17-oxazolin	(+)	Prednisolon	Desacetyldeflazacort

Tab. 23: Auswirkung funktioneller Gruppen auf die Transaktivierung via GR. ++ signifikante, > 3fache Verstärkung; + signifikante, < 3fache Verstärkung, (+) nicht signifikante Tendenz zur Verstärkung.

4.2.2 Mineralokortikoide Potenz

Ein Vergleich der mineralokortikoiden Potenz im intakten Organismus mit der im Transaktivierungsassay ist aus zwei Gründen schwierig: zunächst sind Daten zu den untersuchten Steroiden *in vivo* für den MR weniger gut dokumentiert als für den GR, vor allem aber spielt hier der Einfluß der 11 β -HSD2 eine weitaus größere Rolle. Die Kollokalisierung dieses Enzyms mit dem MR in den natürlichen Zielgeweben der Mineralokortikoide führt zu einem entscheidenden Einfluß der Pharmakokinetik auf die mineralokortikoide Wirksamkeit bzw. Unwirksamkeit bestimmter Steroide (s. 1.1.3). So ist die äußerst geringe MR-vermittelte Transaktivierung durch das 11-Oxosteroid *Cortison* (s. S. 55) zusammen mit der schwachen Rezeptorbindung Voraussetzung für die Selektivität des MR für Aldosteron. Bei einer Mutation des MR in Kodon 810, die zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Leucin führt, wird Cortison zu einem potenten Agonisten [123]; das klinische Resultat ist eine arterielle Hypertonie mit frühem Beginn. Diese exazerbiert bei betroffenen Frauen in der Schwangerschaft, da über den veränderten Rezeptor auch *Progesteron* agonistische Eigenschaften gewinnt. Progesteron wirkt eigentlich als Mineralokortikoid-Antagonist, wie aus der hohen relativen Affinität zum MR bei gleichzeitig niedrigem mineralokortikoiden Maximaleffekt (s. Abb. 18) ersichtlich ist. Die naheliegende Frage, wie der Wildtyp-MR in der Schwangerschaft vor einer funktionellen Inaktivierung durch die hohen Progesteronspiegel geschützt wird, konnte mit Befunden zum lokalen Metabolismus dieses Steroids in der Niere [119-121] und zur unterschiedlichen Stabilität des Hormon-Rezeptor-Komplexes im Vergleich mit Aldosteron [141] bislang nur partiell beantwortet werden.

Die Tätigkeit der 11 β -HSD2 ist auch im Transaktivierungsassay mit dem MR besonders zu berücksichtigen. Insbesondere wird Cortisol in dem für den MR relevanten Konzentrationsbereich (K_D -Wert um 0,1 nM) in CV-1-Zellen nicht unerheblich metabolisiert (s. 4.1.2). Dennoch dient seine $EC_{50\text{ MR}}$ (0,895 nM) als Bezugswert in Tab. 24, da Cortisol in den meisten Studien zur mineralokortikoiden Potenz von Glukokortikoiden beim Menschen als Referenzsubstanz verwendet wurde. Selbstverständlich sollte seine rein *pharmakodynamische* Mineralokortikoidpotenz näher an der von renal praktisch nicht inaktivierten Steroiden wie 9 α -Fluorocortisol oder Isoflupredon liegen, als es die kumulativen Werte *in vivo* zunächst suggerieren.

STEROID	0,895 nM ÷ EC ₅₀ MR	LITERATURWERT FÜR MINERALOKORT. POTENZ		LITERATURWERT FÜR AFFINITÄT ZUM MR
		<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	
9 α -Fluorocortisol	186	155 [102] 125 [136]	7,5 [132]	3 [28] 0,4 [132]
Isoflupredon	128	> 50 [53]	*	*
6 α -Fluorocortisol	22	*	*	2 [28]
Aldosteron	19	~150 [†] [111;136]	15 [131]	~1 [28;65;132]
Flumetason	1,8	*	*	*
Cortisol	1,0	1,0	1,0	1,0
6 α -Methylprednisolon	0,39	0,5 [136] 0 [53]	*	0,7 [28]
Prednisolon	0,24	0,8 [136]	*	0,5 [28]
Dexamethason	0,18	0 [136]	0,6 [131]	0,7 [65] 0,35 [28;131]
Budesonid	0,12	*	*	*
Progesteron	0,10		0,05 [132]	> 13 [132] 3 [28]
Desacetyldeflazacort	0,088	*	*	*
Betamethason	0,071	0 [136]	*	*
Beclometason	0,022	*	*	*
Prednyliden	0,021	0 [57]	*	0,06 [28]
2-Chlorfluocortolon	0,016	*	*	*
Cortison	**	0,8 [136]	*	0,02 [28]
Deflazacort	**	*	*	*
Prednison	**	0,8 [136]	*	*

[†] abgeleitet aus üblichen Substitutionsdosen für 9 α -Fluorocortisol bei M. Addison und der täglichen Aldosteron-Sekretionsrate; kein direkter Vergleich mit Cortisol

* keine entsprechenden Daten verfügbar

** nicht berechenbar, da keine Effektsättigung im untersuchten Konzentrationsbereich

Tab. 24: Vergleich der im MR-Transaktivierungsassay ermittelten Potenz (bezogen auf Cortisol) mit Daten aus der Literatur. Weiteres siehe Text.

Nach den hier gewonnenen Transaktivierungsdaten ist 9 α -Fluorocortisol ein etwa 200fach effektiveres Mineralokortikoid als Cortisol, gegenüber 6 α -Fluorocortisol und Aldosteron ist es 8- bis 10fach potenter. Dies ist angesichts vergleichbarer Rezeptoraffinitäten der genannten Steroide bemerkenswert. Der Wirkungsvorsprung von 9 α -Fluorocortisol vor Cortisol wird

in vivo ganz entscheidend durch seine geringe renale 11 β -Oxidation determiniert [46;110]. Es ist nicht auszuschließen, daß der gleiche Effekt auch *in vitro* vorliegt. Durch diesen Mechanismus läßt sich aber die hohe Potenz im Vergleich mit den anderen beiden Steroiden nicht ausreichend begründen [45]. Eher scheint die 9 α -Fluorierung von Cortisol auch eine deutliche pharmakodynamische Steigerung der mineralokortikoiden Potenz mit sich zu bringen. Für eine Verallgemeinerung dieser These spricht der Vergleich des ebenfalls hoch potenten Mineralokortikoids *Isoflupredon* (= 9 α -Fluoroprednisolon) mit Prednisolon, wo eine analoge Argumentation gilt. Allerdings muß darauf hingewiesen werden, daß von RUPPRECHT et al. in COS-1-Zellen eine wesentlich niedrigere, zwischen der von Cortisol und Aldosteron liegende Potenz für 9 α -Fluorocortisol mit dem MR beschrieben wurde [132].

Die schwächere Transaktivierung durch *Prednisolon* und *6 α -Methylprednisolon* korreliert qualitativ mit den Wirkungen *in vivo*, wenn man die 11 β -Oxidation mit in Betracht zieht. Inwieweit bei Prednisolon ein zusätzlicher, rein rezeptorbedingter Wirkungsverlust gegenüber Cortisol besteht, kann ohne eine genaue Bestimmung der Metabolisierung beider Steroide *in vitro* nicht festgestellt werden, auch wenn ein gewisser Trend in diese Richtung angedeutet ist. Dagegen spielt für den weitgehenden Verlust der mineralokortikoiden Potenz bei *Dexamethason* gegenüber *Isoflupredon* die Aktivität der 11 β -HSD2 in den CV-1-Zellen keine wesentliche Rolle. Auch ist bemerkenswert, daß *Flumetason* (= 6 α -Fluorodexamethason) eine 10fach höhere Potenz als Dexamethason besitzt – dies stützt im Zusammenhang mit den Daten für Cortisol und 6 α -Fluorocortisol die Vermutung einer Effektivitätssteigerung durch 6 α -Fluorierung auch auf Ebene des Rezeptors.

Ebenso wie Dexamethason gehören *Betamethason*, *Desacetyldeflazacort* und *Prednyliden* zu den schwächsten systemisch eingesetzten Glukokortikoiden. Bei den beiden letztgenannten ist eine im Vergleich mit Prednisolon massive Reduktion der MR-vermittelten Transaktivierung durch die 16,17-Methyloxazolingruppe bzw. die 16-Methylengruppe zu bemerken. Mit den zwei erstgenannten konnte ein gleichartiger Effekt – relativ zu *Isoflupredon* – auch für eine Methylierung in Position 16 belegt werden. Somit stellt die räumliche Ausdehnung des C₁₆-Substituenten offenbar ein kritisches Merkmal für die Bindung bzw. Aktivierung des MR dar. Anders als beim GR steht dabei die Polarität der betreffenden Gruppe nicht im Vordergrund (s. 4.2.3).

Für die inhalativen Kortikoide *Budesonid* und *Beclometason* liegen keine genaueren Informationen zu systemischen Wirkungen vor, diese sind bezüglich des MR selbst im Falle einer geringen Aufnahme in den Blutkreislauf angesichts der minimalen Transaktivierungspotenz nicht zu erwarten. Daß die mineralokortikoide Wirkung von Cortison und Prednison *in vivo* ebenso wie ihr glukokortikoider Effekt auf der systemischen Aktivierung durch die 11 β -HSD1 [48] beruht, wurde bereits ausführlich erörtert.

Die oben ebenfalls genannten Auswirkungen bestimmter funktioneller Gruppen auf die Transaktivierung über den MR sind in Tab. 25 systematisch wiedergegeben. Zusammengefaßt beeinflussen die Fluorierung in 6 α - oder 9 α -Position und die Reduktion der 11-Keto- zur 11 β -Hydroxylgruppe die mineralokortikoide Potenz qualitativ in der gleichen Weise wie die glukokortikoide. Hingegen ist sowohl der Effekt der 1-Dehydrokonfiguration als auch der eines 16-Methyl- oder -Methylensubstituenten ausgeprägt gegensinnig zu dem mit dem GR.

CHEMISCHE FUNKTION	AUSWIRKUNG	VERGLICHENE STEROIDE	
1-Dehydro	— (-)	Cortisol 9 α -Fluorocortisol	Prednisolon Isoflupredon
6 α -Fluoro	++ ++	Cortisol Dexamethason	6 α -Fluorocortisol Flumetason
9 α -Fluoro	++ ++	Cortisol Prednisolon	9 α -Fluorocortisol Isoflupredon
11 β -Hydroxy statt 11-Keto	++ ++	Cortison Prednison	Cortisol Prednisolon
6 α -Methyl	(+)	Prednisolon	6 α -Methylprednisolon
16 α -Methyl	—	Isoflupredon	Dexamethason
16 β -Methyl	—	Isoflupredon	Betamethason
16-Methylen	—	Prednisolon	Prednyliden
2'-Methyl-16,17-oxazolin	—	Prednisolon	Desacetyldeflazacort

Tab. 25: Auswirkung funktioneller Gruppen auf die Transaktivierung via MR. ++: signifikante, > 3fache Verstärkung; --: signifikante, > 3fache Abschwächung. (+) bzw. (-): nicht signifikante Tendenzen.

4.2.3 Ebenen der Selektivität

Bestimmte strukturelle Modifikationen des Cortisols oder eines seiner Derivate führen, wie dargelegt, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu charakteristischen Veränderungen seiner glukokortikoiden Eigenschaften – in teils gleicher, teils entgegengesetzter Richtung. Relativ zur Ausgangssubstanz wird dadurch je nach Ausmaß und Vorzeichen dieser Einflüsse der GR oder der MR als Wirkungsvermittler bevorzugt. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen lassen sich drei verschiedenen Ebenen zuordnen, deren variable Bedeutung nachfolgend am Beispiel einiger therapeutisch wichtiger Kortikoide diskutiert wird.

Intrazelluläre Verfügbarkeit des Liganden

Der Beitrag der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (s. 1.1.3 und 4.1.2) zur Selektivität von Kortikosteroiden beruht zum einen auf der unterschiedlichen Gewebslokalisierung der Isoenzyme, zum anderen auf der Verlagerung des Reaktionsgleichgewichts zwischen inaktiver 11-Keto- und aktiver 11 β -Hydroxy-Form in Abhängigkeit von den eingeführten funktionellen Gruppen. Besonders deutlich ist dies bei 9 α -Fluorocortisol und Prednisolon zu erkennen, die sich jeweils nur durch eine einzelne chemische Abwandlung von Cortisol unterscheiden.

Wie aus der zweiten und dritten Spalte von Tab. 26 hervorgeht, übertrifft die gesteigerte Selektivität für den MR (9 α -Fluorocortisol) bzw. den GR (Prednisolon) die entsprechenden relativen Veränderungen der Rezeptoraffinitäten. Da 9 α -Fluorocortisol sowohl von der

STEROID	Q ₅₀ (TRANSAKTIVIERUNGSASSAY)	VERHÄLTNIS GLUKO- ZU MINERALOKORTIKOIDER POTENZ <i>in vivo</i>	VERHÄLTNIS GLUKO- ZU MINERALOKORTIKOID- REZEPTORAFFINITÄT
Dexamethason	130	> 100	5 - 75
6 α -Methylprednisolon	11	10	4
Prednisolon	7	5	2
Cortisol	1	1	1
9 α -Fluorocortisol	0,03	0,06	0,6 – 4

Tab. 26: Selektivität klinisch verbreiteter Kortikosteroide. Ungefähre Angaben unter Verwendung der in Tab. 20, Tab. 22 und Tab. 24 aufgeführten Daten. $Q_{50} = 13,41 \cdot EC_{50\text{MR}} \div EC_{50\text{GR}}$ (siehe S. 59).

11 β -HSD1 als auch der 11 β -HSD2 ganz überwiegend im aktiven Zustand gehalten wird [45;46;110], reflektieren die starken gluco- und mineralokortikoiden Effekte absolut betrachtet seine *Pharmakodynamik*, die relative Dominanz seiner durch den MR vermittelten Wirkungen im Vergleich zu Cortisol dagegen hauptsächlich seine renale *Pharmakokinetik*. Denn wie aus Abb. 20 hervorgeht, hat 9 α -Fluorocortisol praktisch ungehinderten Zugang zum MR, Cortisol wird hingegen weitgehend zu Cortison metabolisiert und kann somit kaum an den MR binden.

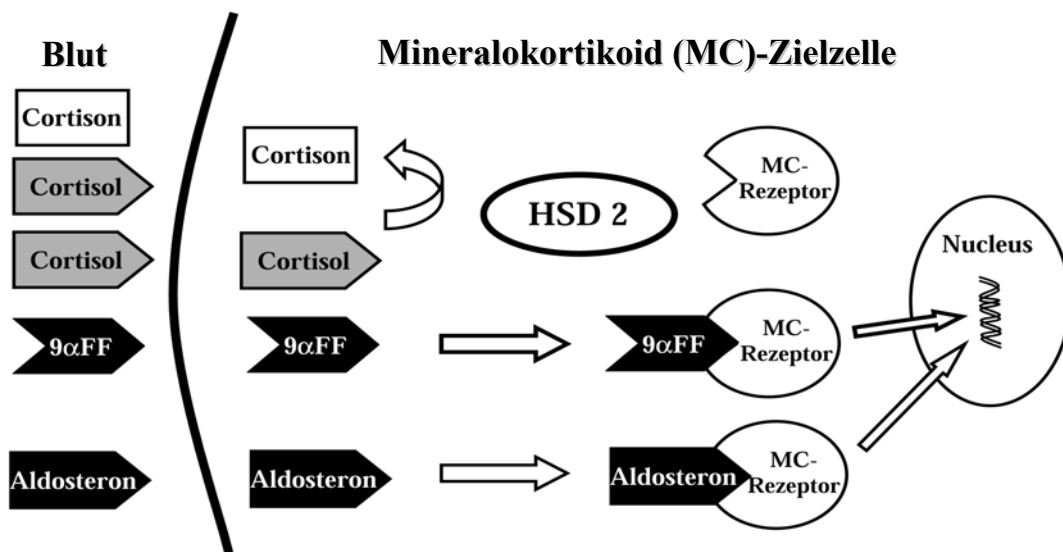


Abb. 20: Pharmakokinetik des 9 α -Fluorocortisols (9 α FF) in der Mineralokortikoid-Zielzelle. 9 α FF wird von der 11 β -HSD2 nur in sehr geringen Ausmaß inaktiviert und hat – vergleichbar mit Aldosteron – ungehinderten Zugang zum Mineralokortikoid (MC)-Rezeptor.

Diese enzymatische Inaktivierung findet mit Prednisolon in noch größerem Maße statt, so daß es in den Zielgeweben der Mineralokortikoide für den Rezeptor noch weniger verfügbar ist [45]. Umgekehrt sind dagegen die Verhältnisse bezogen auf die Aktivität der 11 β -HSD1, die das zu Prednison oxidierte Prednisolon in intakten Zellen stärker 11 β -reduziert [45]. So steht es systemisch und in Geweben ohne relevante 11 β -HSD2-Expression anteilig mehr in aktiver Form zur Verfügung als Cortisol und kann daher seine Wirkung über den GR besser entfalten.

Die große Übereinstimmung zwischen der im Transaktivierungsassay und am Menschen festgestellten Selektivität bei Vergleich von 9 α -Fluorocortisol, Cortisol und Prednisolon ist ein überraschender Befund, da die 11 β -HSD2 *in vitro* nicht nur die mineralokortikoide,

sondern auch die glukokortikoide Potenz unfluorierter Steroide schmälert (s. 4.1.2). Die Beobachtung könnte mithilfe willkürlicher Kombinationen aus enzym-, bindungs- und transkriptionsbedingten Mechanismen gedeutet werden. Die einfachste Erklärung besteht aber in der Annahme, daß die von der 11 β -HSD2 hervorgerufene Wirkungsminderung im MR-Assay gerade soviel größer als *in vivo* ist, daß die Wirkungsminderung im GR-Assay bei Bildung des Quotienten aus beiden Potenzen weitgehend kompensiert wird.

Folgt man dieser Argumentation, muß für den GR-Assay notwendigerweise eine geringere prozentuale Reduktion der Potenz durch die 11 β -HSD2 als für den MR-Assay postuliert werden. Daß dies eine plausible Hypothese ist, zeigt ein Vergleich der K_D -Werte für Cortisol am GR mit denen am MR. Einerseits ist unter gleichen Bedingungen seine Affinität für den MR 40- bis 100fach höher als für den GR [131;132]. Außerdem entspricht die Dissoziationskonstante von Cortisol am MR ungefähr der von Aldosteron (ca. 0,1 bis 1,3 nM) [9;131;132]. Demnach liegt der für die halbmaximale Besetzung des MR relevante Konzentrationsbereich in einer Größenordnung, bei der die anteilige Inaktivierung von Cortisol durch die 11 β -HSD weitaus größer ist als in dem entsprechenden Konzentrationsbereich beim GR. Unter Berücksichtigung der relativen Bindungsaffinitäten gilt für Prednisolon dieselbe Schlußfolgerung.

Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung

Die dargelegten Auswirkungen des Prärezeptormetabolismus erklären für die meisten der untersuchten Steroide nicht ihre deutliche (relative) Selektivität für den GR. Dexamethason beispielsweise besitzt – bezogen auf seine glukokortikoide Äquivalenzkonzentration – eine ca. 100mal schwächere Mineralokortikoidwirkung, obwohl es ebenso wie 9 α -Fluorocortisol von der 11 β -HSD2 im reduzierten Zustand gehalten wird [45-47]. Ein Unterschied besteht in dem Verhältnis der Affinitäten zu GR und MR. Während Cortisol und sein 9 α -fluoriertes Derivat den MR vielfach effektiver binden als den GR, sind die Dissoziationskonstanten bei Dexamethason für beide Rezeptoren etwa gleich. Relativ zu Cortisol entspricht dies einer Bindungsselektivität, die unterhalb der Wirkungsselektivität liegt. Die Rezeptoraffinitäten bestimmen die Präferenz für den GR sicherlich wesentlich mit; ob sie als alleinige Erklärung ausreichen, ist fraglich: angesichts der fehlenden 11 β -Oxidation müßte dafür der GR eigentlich noch weitaus effektiver als der MR gebunden werden. Die größte Schwierigkeit liegt hier in der unsicheren Übertragbarkeit der bei niedrigeren Temperaturen (0 - 20 °C) und

in einem unphysiologischen Milieu gewonnenen Bindungsdaten auf die Situation in der intakten Zelle. Außerdem wird die Kinetik der Hormon-Rezeptor-Bindung durch die Dissoziationskonstante nicht erfaßt. Daß diese zwischen verschiedenen Liganden erheblich variiert, zeigen entsprechende Untersuchungen an zellfrei translatierten Rezeptoren [65;123]: So ist die Halbwertszeit der Dissoziation vom MR für Dexamethason deutlich kürzer als für Cortisol, das sich wiederum schneller vom Rezeptor löst als Aldosteron. Hingegen verweilt Dexamethason um ein Vielfaches länger am GR als die beiden anderen Steroide. Die 17 α -Hydroxylgruppe von Dexamethason, die eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Glutaminrest 642 der Steroidbindungstasche im GR ausbildet [24], und eine in Gegenwart der 11 β -Hydroxylfunktion angenommene Destabilisierung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen der 21-OH-Gruppe des Steroids und Asn 770 des MR [50] tragen wahrscheinlich zu diesen Unterschieden im Vergleich mit Aldosteron bei. Die Differenzen zu Cortisol bleiben vorerst unerklärt. Da sich die zeitliche Stabilität der Bindung parallel zu der Fähigkeit des Steroids verhält, den Rezeptor vor limitierter Proteolyse zu schützen [65], dürfte die Bindungskinetik erhebliche Bedeutung für die der Ligand-Rezeptor-Bindung nachgeordneten Prozesse (s. u.) haben.

Postrezeptorgeschehen

Steroidhormonrezeptoren sind Transkriptionsfaktoren. Alle durch sie vermittelten Wirkungen, die auf dem Mechanismus der Transaktivierung beruhen, hängen in ihrem Ausmaß von Anzahl und Beständigkeit der gebildeten Hormon-Rezeptor-DNA-Komplexe in den Promotor- bzw. Enhancerregionen des Zielgens (s. S. 13) sowie deren funktioneller Qualität – der Fähigkeit, den Initiationskomplex korrekt zu rekrutieren – ab. Diese Eigenschaften sind bei jedem Steroid in individueller Weise durch die unter den jeweiligen Randbedingungen existierenden dreidimensionalen Strukturen der beteiligten Moleküle determiniert. Auf formal-deskriptive Weise können sie aber im Prinzip durch zwei allgemeine Größen abgebildet werden, nämlich zum einen die mit einem bestimmten Steroid-Rezeptor-Paar maximal erzielbare Transkriptionsrate, zum anderen die Konzentration von liganden-aktivierten Rezeptordimeren, mit der die Hälfte jener maximalen Transkriptionsrate erzielt wird. Die zweite Konstante ist eng verwandt, aber nicht identisch mit dem K_E -Wert im Modell von BLACK und LEFF (s. S. 19) und bildet u. a. die Affinität der Rezeptordimere zur DNA ab.

Experimentell lassen sich beide Parameter (mit den in 1.3 genannten Limitierungen) aus Transaktivierungsassays in Verbindung mit Rezeptorbindungsstudien über den Maximaleffekt (E_{\max}) und das Verhältnis von EC_{50} und K_D -Wert indirekt ableiten. Bezogen auf die in Tab. 26 aufgeführten Steroide, die alle eine vergleichbare Maximalwirkung hervorrufen, muß demnach zur Erklärung der nicht enzym- oder affinitätsbedingten Selektivitätsanteile von einer unterschiedlich effektiven, je nach Steroid zugunsten des GR oder des MR ausfallenden Kopplung zwischen der Konzentration von Hormon-Rezeptor-Komplexen im Zellkern und der durch sie hervorgerufenen Steigerung der Transkriptionsrate ausgegangen werden. Wie HELLAL-LÉVY et. al. für Aldosteron, Cortisol und Dexamethason zeigen konnten, korreliert die oben erwähnte antiproteolytische Wirkung dieser Steroide auf den Rezeptor eng mit der Transaktivierungspotenz [65]. Die längere Intaktheit der hormontragenden Rezeptordimere könnte einer der Mechanismen sein, die verschieden starke Rezeptor-Wirkungs-Kopplungen auf Transkriptionsebene erzeugen.

4.3 Schlußfolgerungen

Ausgehend von den eingangs formulierten Fragen (S. 24) lassen sich anhand der diskutierten Resultate folgende Feststellungen treffen:

- (1) Zwischen den bekannten gluko- und mineralokortikoiden Potenzen *in vivo* und den korrespondierenden Daten aus den Transaktivierungsassays besteht eine bemerkenswerte Übereinstimmung. Bestehende Divergenzen sind – mit wenigen erörterten Ausnahmen – auf die speziellen pharmakokinetischen Bedingungen zurückzuführen.
- (2) Eine über pharmakokinetische Effekte hinausgehende Beeinflussung der Potenz *in vitro* konnte für verschiedene funktionelle Gruppen und beide Rezeptoren gezeigt werden. Wo ein solcher Einfluß nachweisbar war, entsprach er semiquantitativ demjenigen *in vivo*.
- (3) Die Rezeptorselektivität wird durch den hier eingesetzten Assay wirklichkeitsnah wiedergegeben, da die Aktivität der 11 β -HSD2 mit in das Ergebnis eingeht. Rein pharmakodynamische Aussagen sind nicht möglich; hierzu müßte das Enzym wirksam inhibiert oder die 11 β -HSD1 in den CV-1-Zellen überexprimiert werden.