

## 1. Einleitung

Zunächst soll auf die essentielle Bedeutung von Glucocorticoiden und Mineralocorticoiden für den menschlichen Organismus eingegangen werden. Im zweiten Teil der Einleitung werden 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen als Schlüsselenzyme für die Regulation des Zugangs von Glucocorticoiden zu ihren Rezeptoren vorgestellt.

### 1.1. Glucocorticoide und Mineralocorticoide des Menschen

Die Glucocorticoide des Menschen werden hauptsächlich in der Zona fasciculata der Nebenniere unter Einwirkung des hypothalamischen CRH (Corticotropin **R**eleasing **H**ormon) und des hypophysären ACTH (Adrenocorticotropes **H**ormon) gebildet. Die adrenale Hormonsekretion unterliegt dabei „feedback-Mechanismen“ sowie einer ausgeprägten zirkadianen Rhythmik. Mit etwa 25 $\mu$ g/dl (690nmol/l) werden die höchsten Plasmaspiegel von Cortisol am frühen Morgen erreicht, während die Hormonsekretion gegen Mitternacht einen Tiefpunkt durchläuft (Plasmaspiegel gewöhnlich < 5 $\mu$ g/dl bzw. 135 nmol/l )(152). Die biologischen Hauptwirkungen der Glucocorticoide sind die Induktion von Enzymen der Gluconeogenese in der Leber, Suppression der zellularen Immunität durch Hemmung der Eiweißsynthese in Lymphozyten, antiphlogistische Wirkungen sowie begünstigende Effekte auf die Wirkung von Katecholaminen an der glatten Gefäßmuskulatur (92). Vor allem die immunmodulatorischen und antiphlogistischen Eigenschaften von Corticosteroiden führten zu ihrer breiten Verwendung in der Pharmakotherapie. Zahlreiche synthetische Nachahmersubstanzen wurden vor allem in den 50er und 60er Jahren des vorigen Jahrhunderts entwickelt (92).

Das bedeutendste Mineralocorticoid des Menschen ist Aldosteron. Es wird vorwiegend in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde gebildet. Die Hormonsekretion unterliegt vor allem der Kontrolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Mit 150 $\mu$ g beträgt die Tagessekretion nur etwa 1/100 der des Cortisols (152). Biologische Hauptwirkungen von Mineralocorticoiden sind die Steigerung von Kaliumsekretion und Natriumrückresorption im distalen Tubulus sowie im Sammelrohr der Niere mit konsekutiver Hypokaliämie, Hypervolämie und Ausbildung einer leichten metabolischen Alkalose (92).

Die biologische Wirkung von Glucocorticoiden wird über die Bindung an intrazelluläre Hormonrezeptoren vermittelt. Der aus drei Domänen bestehende Rezeptor entfaltet seine Wirkung entweder durch direkte Interaktion mit als „glucocorticoid response elements“ (GREs) bezeichneten spezifischen DNA-Sequenzen in der Promotor-Region des zu regulierenden Gens (Typ1-Mechanismus) oder durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren ohne spezifische DNA-Bindung (Typ 2 - Mechanismus). Letzterer vermittelt eher eine Hemmung der Transkription des Zielgens und scheint unter anderem für die immunsuppressiven Effekte von Steroiden eine Rolle zu spielen (18).

### **1.1.1. Metabolisierungswege von Steroidhormonen**

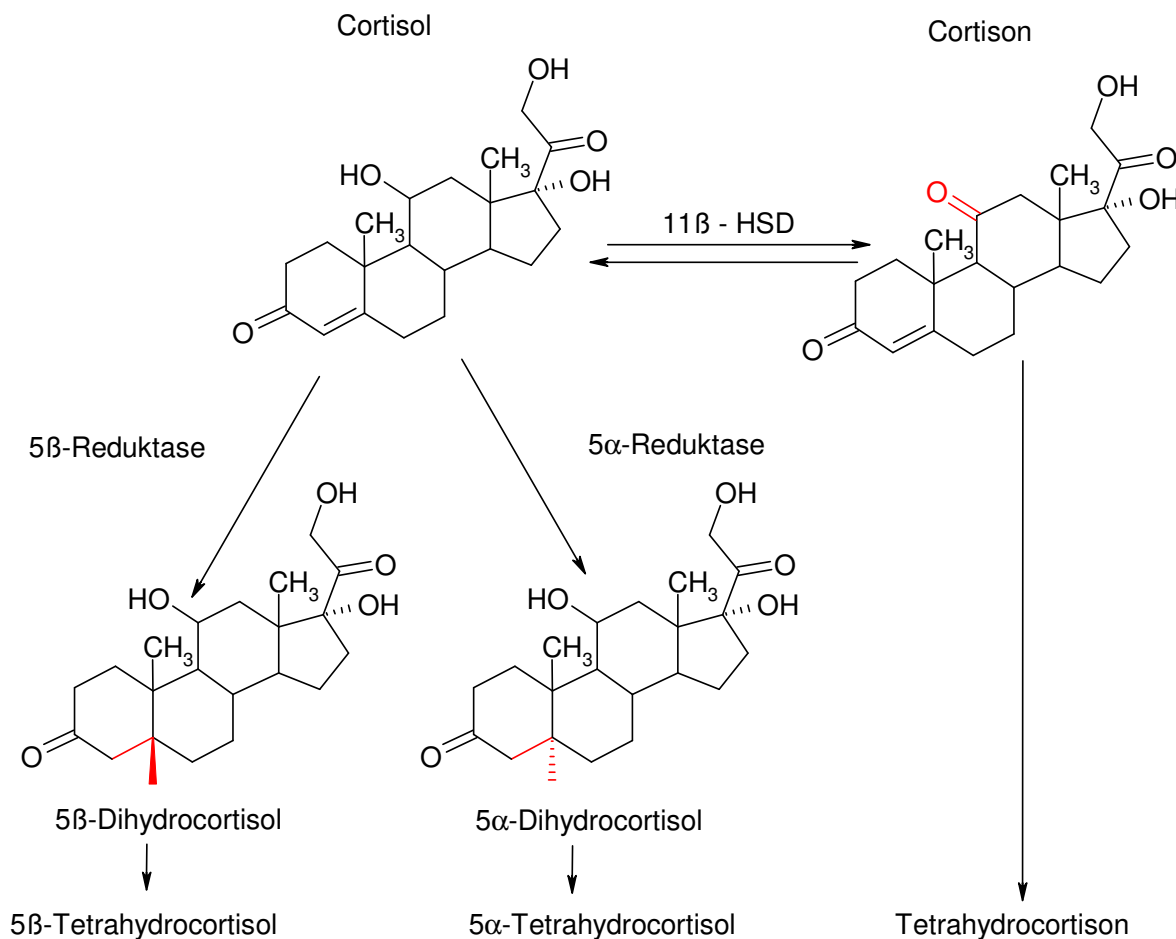
Die Plasmahalbwertszeit von zirkulierendem Cortisol (F) beträgt beim Menschen etwa 70 bis 120min. Hauptsächliche Metabolisierungswege sind die Oxidation an Position 11 zu Cortison (E) durch 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (11 $\beta$ -HSDs) sowie die Reduktion an Ring-A durch die 5 $\alpha$ - und die 5 $\beta$ - Reduktase und durch die 3 $\alpha$ - und 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (Abb.1.1.)(67). Die dadurch entstehenden Dihydro- und Tetrahydrometabolite des Cortisols und des Cortisons (DHF, THF, DHE und THE) werden größtenteils an Glucuronsäure gekoppelt und mit dem Urin ausgeschieden. Etwa 50% der im Urin erscheinenden Cortisolmetabolite entstehen auf diesem Weg. Eine Spaltung der an Ring A reduzierten Metabolite führt zu C19-Steroiden, die etwa 10% der Urinmetabolite des Cortisols ausmachen.

Metabolisierungswege von geringerer Bedeutung sind die Reduktion der Ketogruppe an Position 20 durch die 20 $\alpha$ - und die 20 $\beta$ -HSD. Dabei entstehen  $\alpha$ - oder  $\beta$ - Cortole und Cortolone, die sich vom Cortison ableiten (insgesamt etwa 25% der Urinmetaboliten). Ein Teil dieser Substanzen wird zusätzlich an Position 21 oxidiert. Dabei entstehen Cortol- oder Cortolonsäure (etwa 10 % der Urinmetaboliten). Ein weiterer Abbauweg ist die Hydroxylierung des Kohlenstoffatoms 6 im Steroidgerüst, dadurch entsteht 6 $\beta$ -Hydroxycortisol. Lediglich 1% des zirkulierenden Cortisols erscheint im Urin in unveränderter Form. Es wird als freies Urin-Cortisol bezeichnet (156).

### **1.2. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen**

Seit langem ist bekannt, dass Steroide mit einer Ketogruppe an Position 11 kaum biologisch wirksam sind (17). Die 11 $\beta$ -Oxidation von Cortisol durch Hydroxysteroid-Dehydrogenasen

stellt somit gleichzeitig eine Inaktivierung des Hormons dar. Dieser Mechanismus ist unter anderem wichtig, weil der Mineralocorticoidrezeptor (MR) Cortisol mit fast gleicher Affinität bindet wie das klassische Mineralocorticoid Aldosteron (13). Es wurde postuliert, dass die Ursache der Selektivität des MR für Aldosteron lediglich durch eine effektive 11-Oxidation in den Mineralocorticoid-Zielzellen zustande kommt und durch eine 11 $\beta$ -HSD reguliert wird (68). Das Vorhandensein des Enzyms hat damit eine herausragende Bedeutung für den Salz- und Wasserhaushalt sowie für die Blutdruckregulation, da Cortisol mit einer im Vergleich zu Aldosteron etwa hundertfach höheren Plasmakonzentration andernfalls den MR nahezu vollständig okkupieren würde.



**Abb.1.1.:** Hauptmetabolisierungswege von Cortisol beim Menschen (schematisch).

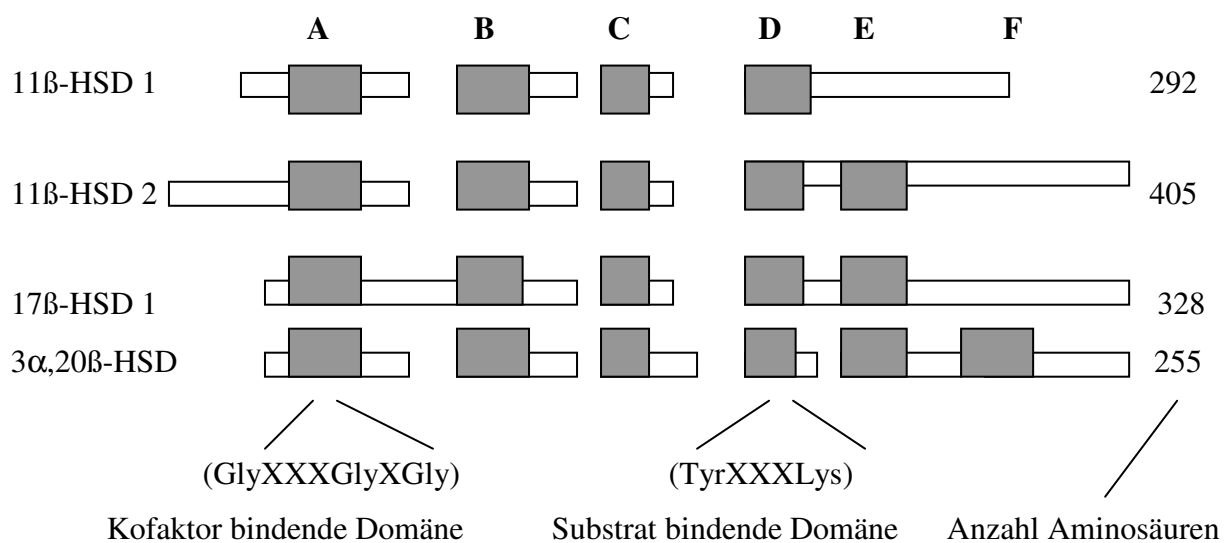
Zunächst wurde angenommen, dass es sich bei der 11 $\beta$ -HSD lediglich um ein einziges Enzym handelt. Die uneinheitliche Datenlage bezüglich Affinität, Kofaktorpräferenz und bevorzugter Reaktionsrichtung ließ jedoch die Existenz mehrere Isoenzyme vermuten. Bisher wurden

beim Menschen und verschiedenen anderen Spezies zwei Isoenzyme kloniert und sequenziert, die als 11 $\beta$ -HSD1 und 11 $\beta$ -HSD2 bezeichnet werden (7;166).

Die 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen gehören funktionell zur Gruppe der „short-chain alcohol dehydrogenase“ (SCAD) Superfamilie und unterscheiden sich in ihrer Sekundärstruktur maßgeblich von anderen Dehydrogenasen wie den Aldo-Keto-Dehydrogenasen oder Zink und Eisen enthaltenden Dehydrogenaseenzymen.

Bisher wurden etwa 120 SCAD-Enzyme dokumentiert, Grundy *et al.* erwarten insgesamt etwa 350 verschiedene Enzyme (75). Eine bis zu 100 Aminosäuren lange hydrophobe Region geht häufig der Kofaktor bindenden Domäne voraus, die aus hochkonservierten Aminosäuresequenzen besteht (Gly-X-X-X-Gly-X-Gly) (97).

Typischerweise besteht die Kofaktor bindende Domäne aus einer sogenannten Rossmann-Schleife. Diese Schleife entsteht durch eine bestimmte Abfolge von  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen  $[(\beta-\alpha-\beta-\alpha-\beta) \times 2]$ . Das katalytische Zentrum befindet sich in der D-Domäne und damit näher am Karboxylende. Es enthält hochkonservierte Tyrosin-, Lysin- und Serinreste. Dennoch ist gerade am Karboxylende die Sequenzhomologie zwischen den einzelnen Enzymen eher gering. Dadurch erklärt sich auch die große Zahl metabolisierter Substrate (Steroide, Prostaglandine, Antibiotika, Chlorophylle, Zucker, Alkohole Polyole). Die dreidimensionale Struktur der 11 $\beta$ -HSD-Isoenzyme konnte noch nicht aufgeklärt werden. Es ist anzunehmen, dass große Ähnlichkeiten mit den bisher durch Röntgenkristallographie gefundenen Strukturen anderer Enzyme der SCAD - Superfamilie bestehen.



**Abb.1.2.:** Schematische Darstellung der Proteinstruktur verschiedener humaner Enzyme der SCAD-Familie (Konservierte Domänen (A-F) grau unterlegt).

Eine Reihe von Enzymen der SCAD-Superfamilie bilden Di- oder Tetramere (etwa durch Interaktion antiparalleler  $\alpha$ -Helices). Von verschiedenen Autoren wird dies auch für 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen postuliert (110;124).

Im Gegensatz zur Familie der Aldo-Keto-Reduktasen (ca. 60% Sequenzhomologie) sind die Sequenzen der Mitglieder der SCAD Familie nur zu ca. 20-30% konserviert, was auch für die Isoenzyme der 11 $\beta$ -HSD zutrifft (Abb.1.3.). Eine Ausnahme bilden die 11 $\beta$ -HSD2 und die 17 $\beta$ -HSD2, deren Sequenz zu 45% identisch ist (156) (Abb. 1.2.).

## 1.2.1. Charakterisierung der Isoenzyme der 11 $\beta$ -HSD

### 1.2.1.1. Die 11 $\beta$ -HSD1

Das Enzym wurde zunächst aus Rattenleber aufgereinigt und nach Herstellung eines Antiserums und Identifizierung der entsprechenden Aminosäuresequenz kloniert (99;100). In den folgenden Jahren konnten auch die entsprechenden Sequenzen bei anderen Spezies aufgeklärt werden, so bei Schaf, Affe, Meerschweinchen und Maus. *Tannin et al.* veröffentlichten als erste die cDNA-Sequenz der humanen Form (166). Das Gen der 11 $\beta$ -HSD1 befindet sich auf Chromosom 1 und hat eine Länge von 9kb. Sechs Exons kodieren 292 Aminosäuren. Durch verschiedene Spleißvarianten und verschiedene Promotorformen sind drei gewebespezifische Varianten denkbar (11 $\beta$ -HSD1A, -B oder -C), von denen aber nur die -1A Form in das aktive Enzym translatiert wird (Abb.1.3.) (128). Es besteht allgemeiner Konsens darüber, dass die 11 $\beta$ -HSD1 ähnlich wie der Glucocorticoidrezeptor in nahezu allen Geweben exprimiert wird (182).

Die 11 $\beta$ -HSD1 ist vorwiegend mikrosomal lokalisiert und benutzt hauptsächlich NADPH als Kofaktor. Die Enzymaktivität wurde zunächst in zellfreien Systemen untersucht (115), dabei fungierte das Enzym überwiegend als Oxidase. Im Gegensatz zu diesen *in vitro* Untersuchungen fand sich nach Transfektionsexperimenten in COS-7 Zellen und anderen Zelllinien eine nahezu ausschließliche Reduktaseaktivität (34;106;175). *In vivo* Experimente an verschiedenen Geweben bestätigten diese Daten (77;89).

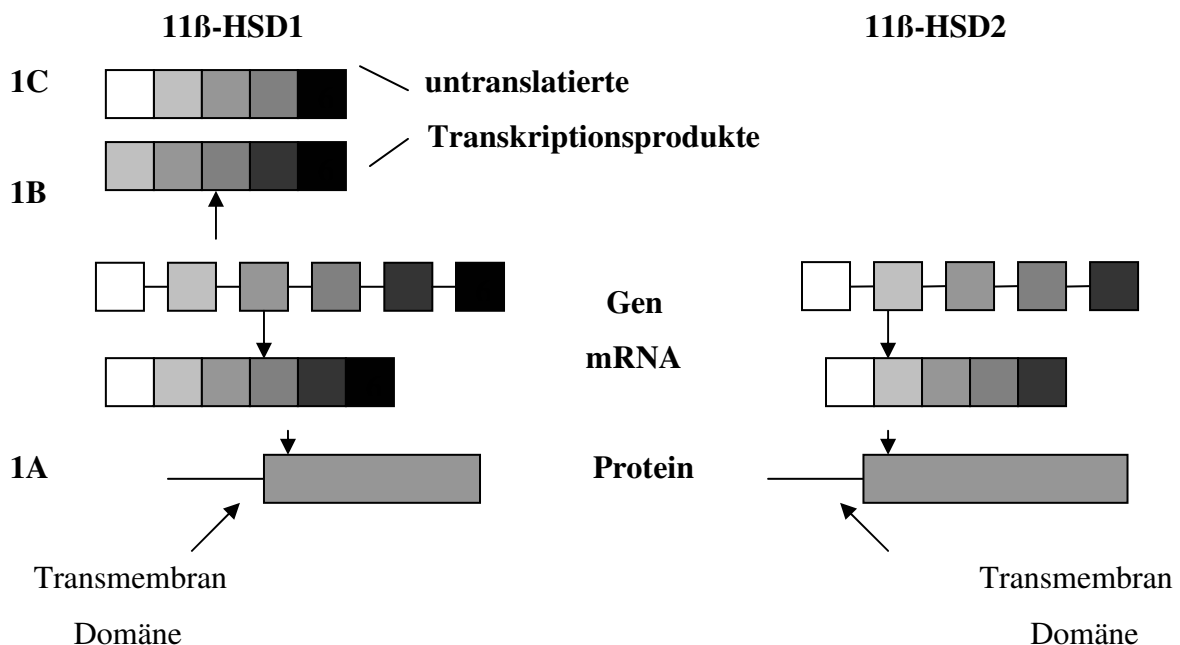
Der  $K_m$ -Wert für die 11 $\beta$ -HSD1 liegt im  $\mu$ molaren Bereich und damit etwa zwei Zehnerpotenzen höher als die Plasmaspiegel von Cortisol (100;157). Neuere Arbeiten postulieren eine dynamische Adaptation des Enzymes an eine relativ große Spanne von

Substratkonzentrationen. Dabei könnte es sich um einen Anpassungsmechanismus an die ausgeprägte zircadiane Rhythmik der Cortisolsekretion handeln (110).

Die 11 $\beta$ -HSD1 scheint aufgrund ihrer *in vivo* Aktivität als Reduktase funktionell einen Beitrag zur Aufrechterhaltung adäquater Gewebs- und Plasmaspiegel von aktiven Steroiden zu spielen, wobei der Leber als großes Organ mit hoher 11 $\beta$ -HSD1-Expression eine besondere Bedeutung zukommt. Da Cortisol insulinantagonistisch wirkt, beeinflusst die hepatische Aktivierung von Steroiden auch den Glukosehaushalt. Eine Hemmung der 11 $\beta$ -HSD1 kann daher die Insulinsensitivität verbessern (177). Die pharmakologisch wichtigste Funktion der (hepatischen) 11 $\beta$ -HSD1 ist die „first pass“- Aktivierung von 11-Dehydrosteroiden (Cortison oder Prednison) nach oraler Gabe.

### 1.2.1.2. Die 11 $\beta$ -HSD 2

Die 11 $\beta$ -HSD2 wird hauptsächlich in klassischen Mineralocorticoid-Zielgeweben und im Syncytiotrophoblast der Plazenta exprimiert (8). Das Enzym arbeitet vorwiegend NAD-abhängig. Klonierungen erfolgten für Mensch, Ratte, Maus, Kaninchen, Rind und Meerschweinchen (7;156).



**Abb.1.3.:** Genomische Organisation der humanen 11 $\beta$ -HSD1 und 11 $\beta$ -HSD2. Spleißvarianten ergeben drei Formen der 11 $\beta$ -HSD1 (1A,1B und 1C). Bisher wurden keine Translationsprodukte der Formen 1B- und 1C beschrieben. Von der 11 $\beta$ -HSD2 ist bisher keine Spleißvariante bekannt (128).

Das humane Enzym hat eine Länge von 405 Aminosäuren und eine Masse von ca. 44kDa. Es ist somit größer als die 11 $\beta$ -HSD1. Eine Sequenzhomologie besteht zu etwa 14% (5). Man vermutet, dass es sich bei der 11 $\beta$ -HSD2 um ein Dimer handelt und das hydrophobe Aminoende zur Verankerung in der Zellmembran beiträgt (74;124). Intrazellulär wird für die 11 $\beta$ -HSD2 sowohl eine mikrosomale, mit dem Endoplasmatischen Retikulum assoziierte, als auch eine nukleäre Lokalisation diskutiert (122;131). Der  $K_m$ -Wert der 11 $\beta$ -HSD2 liegt im nmolaren Bereich (7;8;63).

Das Enzym wurde lange Zeit als unidirektionale Oxidase angesehen, da man nur die Oxidation von 11-Hydroxysteroiden, nicht aber die umgekehrte Reaktionsrichtung nachweisen konnte. Dieser offensichtliche Widerspruch zu den Gesetzen der Thermodynamik wurde schließlich durch unsere Arbeitsgruppe widerlegt. So lässt sich für fluoridierte 11-Oxo-Steroide (z.B. Dexamethason, 9 $\alpha$ -Fluorocortisol) und bei Verwendung eines NADH/NADPH regenerierenden Systems auch gegenüber Cortison eine Reduktionsreaktion nachweisen. Für 9 $\alpha$ -Fluorosteroide befindet sich das Equilibrium sogar weit auf Seiten der 11-Hydroxyform (49;51;103). Trotzdem scheint die 11 $\beta$ -HSD2 im Verhalten gegenüber natürlichen Steroiden fast ausschließlich als Oxidase zu fungieren, um die Selektivität des Mineralocorticoidrezeptors (MR) gegenüber Aldosteron zu gewährleisten. Neuerdings wird eine direkte Kollokalisierung des Enzyms zusammen mit dem MR im Endoplasmatischen Retikulum postuliert. Dabei soll die 11 $\beta$ -HSD2 unmittelbar mit dem Rezeptorkomplex interagieren (125).

### **1.2.1.3. Hinweise für die Existenz weiterer Isoenzyme der 11 $\beta$ -HSD**

Die Existenz weiterer Isoformen der 11 $\beta$ -HSD wird diskutiert. In Mikrosomenpräparaten von Schafen (73), in Leydigzellen der Ratte (70) sowie in humanen Granulosa-Lutein-Zellen (112) wird die Aktivität der 11 $\beta$ -HSD als NADPH-abhängig mit einem  $K_m$ -Wert im nmolaren Bereich beschrieben. Andererseits präferiert die "11 $\beta$ -HSD1" in Mikrosomenpräparationen von Meerschweinchenleber NAD als Kofaktor für die 11-Oxidation (bei einem  $K_m$  von 4,3  $\mu$ mol/l)(136). Es ist nicht geklärt, ob es sich hierbei um Varianten der 11 $\beta$ -HSD1 oder um eigenständige Isoenzyme handelt. Da verwandte Hydroxysteroid-Dehydrogenasen, wie zum Beispiel die 17 $\beta$ -HSD, bis zu 6 Isoenzyme besitzen, wäre die Klonierung weiterer 11 $\beta$ -HSDs keine Überraschung (156).

Tabelle 1.1. fasst schematisch die wesentlichen Eigenschaften und Unterschiede der bisher klonierten Isoenzyme der 11 $\beta$ -HSD zusammen.

	<b>11<math>\beta</math>-HSD 1</b>	<b>11<math>\beta</math>-HSD 2</b>
<b>Molekularbiologie</b>	Chromosom 1, Länge 9kb Sechs Exons, 292 AS 34 kDa-Protein 14 % Homologie mit 11 $\beta$ -HSD2	Chromosom 16 ( 16q22), 6,2 kb fünf Exons, 405 AS 44 kDa-Protein 45% Homologie mit 17 $\beta$ -HSD2
<b>Kloniert für:</b>	Ratte, Mensch, Maus, Affe, Schaf ,Meerschweinchen	Ratte, Mensch, Schaf, Kaninchen, Meerschweinchen, Rind, Maus
<b>Posttranslationale Modifizierung</b>	Glykosilierung (ER, Chaperone ?)	Glykosilierung AS 394-96 ?
<b>K<sub>m</sub>-Wert</b>	$\mu$ molarer Bereich	nmolarer Bereich
<b>Kofaktor</b>	NADP(H)	NAD(H)
<b>Bevorzugte Reaktionsrichtung</b>	<i>In vivo</i> vorwiegend Reduktase <i>In vitro</i> Oxidase und Reduktase Reduktase gegenüber Dexamethason	<i>In vivo</i> Oxidase <i>In vitro</i> Oxidase (gering Reduktase) Gegenüber 9 $\alpha$ -Fluorosteroiden vorwiegend Reduktase
<b>Expression</b>	In nahezu allen Geweben, vor allem Leber, Lunge, Gehirn, omentales Fettgewebe	Hauptsächlich Mineralocorticoid- Zielzellen , Plazenta, fetales Gehirn, Gefäßendothel
<b>Intrazelluläre Lokalisation</b>	Mikrosomal, ER assoziiert	Mikrosomal, ER-assoziiert, (nukleär ?)
<b>Hauptfunktion</b>	Aufrechterhaltung adäquater Gewebsspiegel von Steroiden	Selektivität des MR-Rezeptors gegenüber Aldosteron

**Tab.1.1.:** Zusammenfassung der Merkmale der Isoenzyme der 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase nach Stewart et al. (8); ER = Endoplasmatisches Retikulum, AS = Aminosäure, K<sub>m</sub> = Michaelis-Menten-Konstante ; NAD(P) = Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat), kDa = Kilo-Dalton.



## **1.2.2. Expression und Funktion der 11 $\beta$ -HSD Enzyme in einzelnen Organen**

### **1.2.2.1 Expression der 11 $\beta$ -HSD2**

Der 11 $\beta$ -HSD2 der Niere kommt aufgrund der Unselektivität des Mineralocorticoidrezeptors eine Schlüsselrolle in der Regulation der Mineralocorticoid-Wirkung zu (s.o.). Das Enzym ist vor allem in den sog. „principal cells“ des Sammelrohres und im distalen Tubulus stark exprimiert und intrazellulär wahrscheinlich direkt mit dem MR assoziiert (125;183). Geringe Mengen finden sich im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife sowie in den sogenannten „intercalated cells“ des Sammelrohres, die für den H<sup>+</sup>-und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Transport verantwortlich sind (173). Neben der Expression in der Niere findet sich die HSD2 auch in verschiedenen anderen epithelialen Geweben des menschlichen Körpers, so in Drüsenendstücken von Kolon (184), Speichel- und Schweißdrüsen (94), im Ziliarepithel des Auges (162) sowie in Epithelien von Lunge (163) und Mamma (145). Erwähnenswert ist zudem die Expression des Enzyms im Syncytiotrophoblasten der Placenta, wo die 11-Oxidation maternaler Steroide den Fetus vor deren Einflüssen schützt (159).

### **1.2.2.2. Expression der 11 $\beta$ -HSD1**

Die 11 $\beta$ -HSD1 funktioniert als aktivierendes Prärezeptor-System für den nahezu ubiquitär vorkommenden Glucocorticoid-Rezeptor (GR) (182). Als klassisches Organ mit hoher Expression der 11 $\beta$ -HSD1 gilt die Leber. Dort lässt sich das Enzym zentripetal mit einer maximalen Expression um die V. centralis nachweisen (140). Aufgrund der bevorzugten Reaktionsrichtung der 11 $\beta$ -HSD1 und der Größe des Organs wird ein erheblicher Einfluss des Enzyms auf den Glucosestoffwechsel vermutet. Die Bereitstellung von 11-OH-Steroiden induziert Schlüsselenzyme der Gluconeogenese wie die Glucose-6-Phosphatase oder die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (96). Insulin und IGF-1 hemmen die Aktivität der 11 $\beta$ -HSD1 in Leberzellen (175). Die Zusammenhänge zwischen 11 $\beta$ -HSD1-Aktivität und Insulinwirkung sind Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten und von großem pharmakologischem Interesse (Kap.1.5.). Eine weitere klinisch relevante Funktion der 11 $\beta$ -HSD1 der Leber ist die Reduktion und damit Aktivierung von oral verabreichten Prodrugs wie Cortison oder Prednison zu deren wirksamen 11-OH-Metaboliten (47).

Eine Übersicht über Expression und Funktion der 11 $\beta$ -HSD Isoenzyme in weiteren Organen gibt Tabelle 1.2:

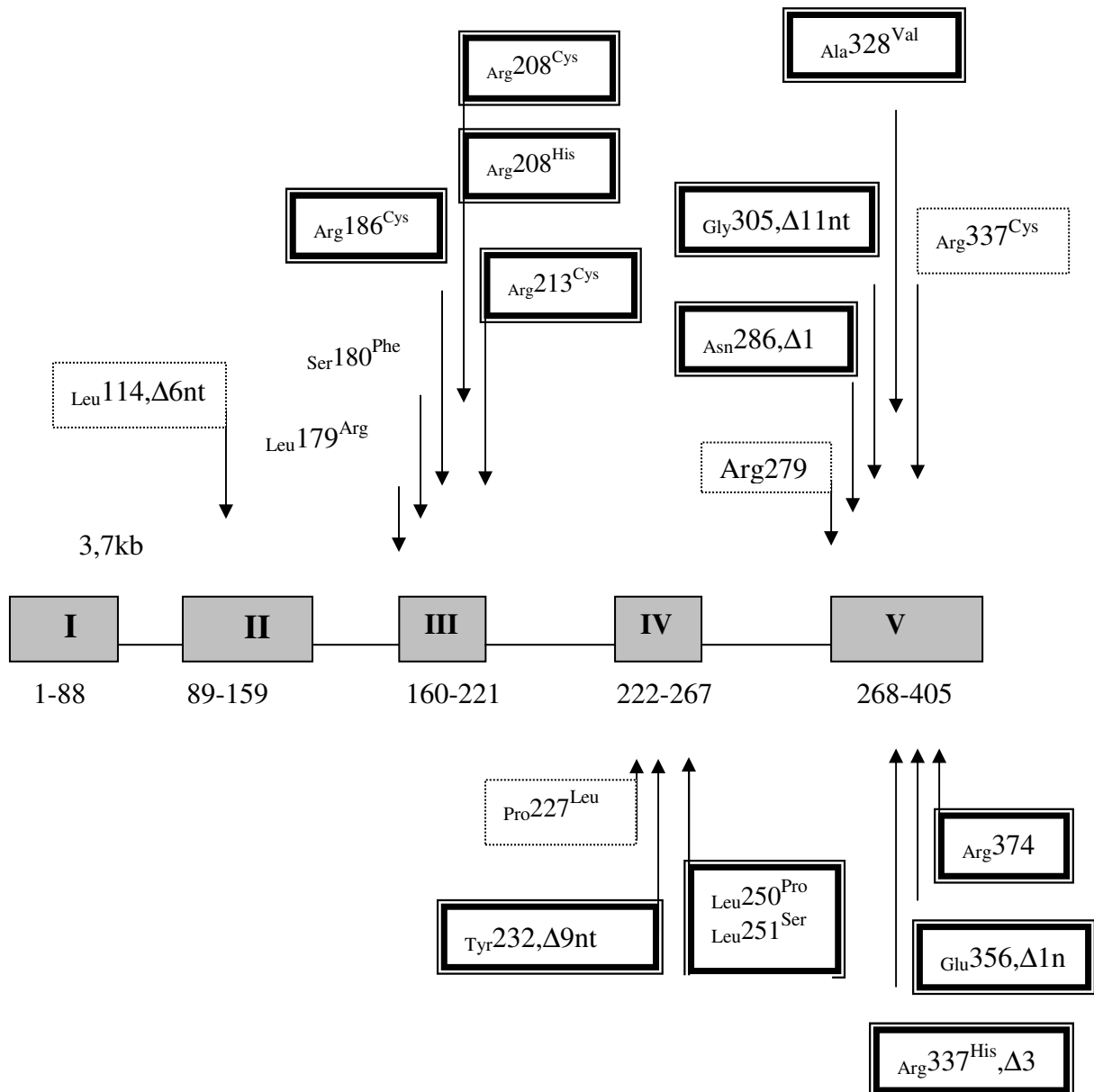
<b>Gewebe</b>	<b>Expression der Isoenzyme der 11<math>\beta</math>-HSD und funktionelle Aspekte</b>
<b>Fetale Gewebe, Placenta, Endometrium</b>	-11 $\beta$ -HSD2 im Syncytiotrophoblast und anderen fetalen Geweben schützt den Feten vor maternalen Glucocorticoiden (38;159) -11 $\beta$ -HSD1 Induktion durch Östrogene und Progesteron im endometrialen Stroma beeinflusst Decidualisation (11)
<b>Hoden</b>	-11 $\beta$ -HSD1 der Leydig-Zellen (als NADP- abhängige Dehydrogenase) schützt die Testosteronproduktion vor inhibierenden Steroiden (114)
<b>ZNS</b>	-11 $\beta$ -HSD1-Expression in weiten Teilen des Groß- und Kleinhirns und in der Hypophyse (in Zellen des Hippocampus Potenzierung neurotoxischer Steroideffekte) (107;139;156) -11 $\beta$ -HSD2 im Nucleus tractus solitarius und im Hypothalamus beeinflusst die Blutdruckregulation (hier ohne Koexpression mit MR) (143)
<b>Kardiovaskuläres System</b>	-11 $\beta$ -HSD(2 ?) niedrig coexprimiert mit dem MR im Herzmuskel (153) -11 $\beta$ -HSD2 im Endothel der Aorta schützt die Gefäße vor vasokonstriktorisches Effekten von Steroiden (154)
<b>Nebenniere</b>	-11 $\beta$ -HSD1 in Zona reticularis und am Übergang zur Markzone beeinflusst die Konzentration von Steroiden, die für die Biosynthese von Katecholaminen wichtig sind (140;150)
<b>Mamma</b>	-11 $\beta$ -HSD2 Expression in duktalem und lobulären epithelialen Zellen (145)
<b>Lunge</b>	-11 $\beta$ -HSD2 in Drüsenendstücken, Pneumozyten Typ 2 und im Ziliarepithel (81) -11 $\beta$ -HSD1 in fetaler Lunge begünstigt die Lungenreifung (84)
<b>Omentales Fettgewebe</b>	-ausschließlich Expression der 11 $\beta$ -HSD1; Beitrag zur zentralen Fettsucht und zur Insulinresistenz (36;93;111)

**Tab.1.2.:** Funktionelle Aspekte der Expression der Isoenzyme der 11 $\beta$ -HSD in verschiedenen Geweben und Organen, modifiziert nach *Stewart und Krozowski* (156), NNR = Nebennierenrinde, MR = Mineralocorticoid Rezeptor, NADP(H) = Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (Phosphat).

### 1.3. Klinische Bedeutung der 11 $\beta$ -HSD Enzyme

#### 1.3.1. Apparenter Mineralocorticoid Excess (AME)

Mehrere Autoren beschrieben in den siebziger Jahren bei Kindern ein von Hypertonie, Salzretention und hypokaliämischer Alkalose bei gleichzeitiger Suppression des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems geprägtes Krankheitsbild (123;149;169).



**Abb.1.4.:** Mutationen im Gen der 11 $\beta$ -HSD2 bei Patienten mit Apparentem Mineralocorticoid Excess; Mutanten mit <5% Konversion von F zu E in Kästchen mit durchgezogener Linie; Mutanten mit 5–70 % Konversion von F zu E in Kästchen mit gestrichelter Linie. die Nummer gibt das jeweilige Kodon an, Aminosäuren werden mit drei Buchstaben kodiert;  $\Delta$  x nt = Deletion von Nukleotiden, x = Anzahl der deletierten Nukleotide.

Die Autoren vermuteten zunächst die Sekretion eines bis dahin unbekanntes Steroids mit überwiegend mineralocorticoider Wirkung (156). Auffällig war ein stark erhöhter F/E und THF/THE-Quotient im Urin der Patienten sowie eine wesentlich verlängerte Halbwertszeit von mit Tritium markiertem Cortisol (57;180). Da sich im Urin der Patienten eine vergleichsweise geringe Menge an 5 $\beta$ -Metaboliten des Cortisols nachweisen ließ, wurde zusätzlich ein Defekt der 5 $\beta$ -Reduktase vermutet.

Als Ursache dieses später als **AME-Typ I** bezeichneten Syndroms werden Mutationen im Gen der 11 $\beta$ -HSD2 (Chromosom 16q22) verantwortlich gemacht. Dabei handelt es sich meist um Punktmutationen oder kleinere Deletionen, wodurch die Enzymaktivität stark herabgesetzt wird (120). Untersuchungen an mit bekannten Mutanten der HSD2 transfizierten Zellen zeigten auf 1-5% verringerte Enzymaktivitäten verglichen mit der unveränderten Aminosäuresequenz (Abb.1.4.)(109;181).

Im Jahre 1989 beschrieben *Ulick et al.* eine neue Form des AME (**AME-Typ II**).

Diese Variante zeichnet sich durch einen etwas mildereren Phänotyp sowie einen späteren Krankheitsbeginn aus (168). Genetische Defekte konnten hier bisher nur im Fall einer sardinischen Familie gefunden werden, wobei 13 Familienmitglieder heterozygot und 4 homozygot für eine Punktmutation im Codon 945 (T statt C) der 11 $\beta$ -HSD2 waren (186).

### **1.3.2. Cortison-Reduktase-Mangel**

Eine insuffiziente Umwandlung von E zu F wurde bisher bei acht Patienten beschrieben, sieben der Patienten waren weiblichen Geschlechts (156). Nach oraler Gabe von Cortison ist der Anstieg des Plasmacortisols vermindert (Defekt der 11 $\beta$ -HSD1). Im Urin lassen sich fast ausschließlich 11-Oxo-Metabolite nachweisen (132). Aufgrund der mangelnden Bereitstellung von Cortisol kommt es bei den Patienten zu einer kompensatorischen Erhöhung der ACTH-Sekretion und in der Folge zu einer Nebennierenrindenhypertrophie mit erhöhter Androgenausschüttung. Genetische Defekte der 11 $\beta$ -HSD1 konnten bisher nur vereinzelt nachgewiesen werden (55). Denkbar sind aber auch Mutationen ausserhalb der Exons in der Promotorregion sowie eine veränderte posttranslationale Glykosylierung des Enzyms .

Tabelle 1.3. fasst die wesentlichen Aspekte der bisher beschriebenen klinischen Symptome nochmals zusammen.

	AME-Typ I	AME-Typ II	11 $\beta$ -HSD1 Mangel
<b>Klinik</b>	- Gedeihstörungen im Kindesalter, Polydipsie, Polyurie, Hypertension bei Hypokaliämie, RAA-System $\downarrow$ , Herzversagen, Apoplex		- Oligomenorrhoe, Hirsutismus, Akne - Glukoneogenese $\downarrow$
<b>Laborparameter</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\frac{(THF+aTHF)}{THE} \uparrow\uparrow</math></li> <li>• 5<math>\beta</math>-Reduktase <math>\downarrow</math></li> <li>• UFF/UFE <math>\uparrow\uparrow</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\frac{(THF+aTHF)}{THE} \uparrow(N)</math></li> <li>• 5<math>\beta</math>-Reduktase N (<math>\downarrow</math>)</li> <li>• UFF/UFE <math>\downarrow</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\frac{(THF+aTHF)}{THE} \downarrow</math></li> <li>• 5<math>\beta</math>-Reduktase <math>\uparrow</math></li> <li>• UFF/UFE normal</li> </ul>
<b>Beschriebene Fälle</b>	• < 100	• 4	• 8
<b>Therapie</b>	• Dexamethason , Spironolacton u.a. Antihypertensiva		• Dexamethason

**Tab.1.3.:** Klinische Symptome der Insuffizienz von Isoenzymen der 11 $\beta$ -HSD;

RAA = Renin-Angiotensin-Aldosteron; THF = Tetrahydrocortisol; THE = Tetrahydrocortison; UFF = Freies Cortisol im Urin; UFE = Freies Cortison im Urin.

### 1.3.3. Lakritzabusus

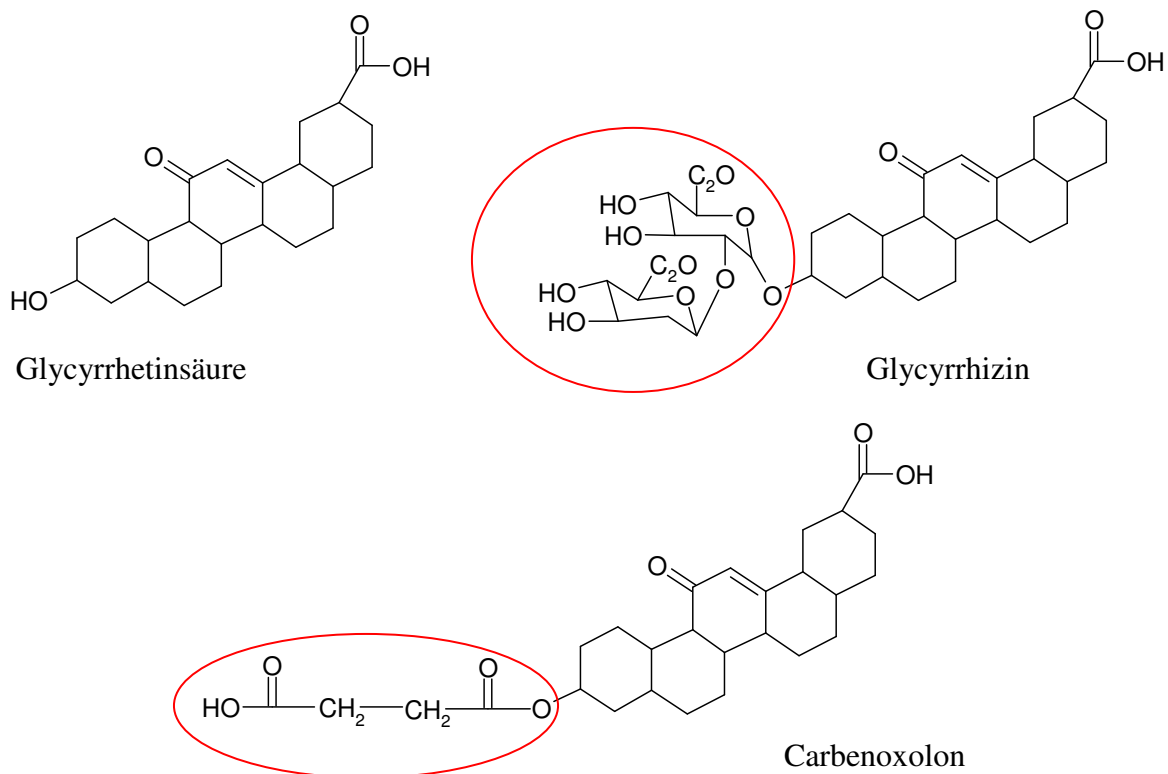
Lakritze wurde neben seinem Gebrauch als Genussmittel auch zur Therapie des Ulkus pepticum eingesetzt. Ende der 40er Jahre berichteten mehrere Autoren erstmals über Ödeme, Natriumretention und Hypertonie als Nebenwirkung dieser Therapie (46).

Einer der Hauptinhaltsstoffe der Lakritze ist *Glycyrrhizin*, ein glykosyliertes Saponin der Lakritzwurzel. Nach oraler Aufnahme wird der Zuckerrest von den Darmbakterien abgespalten. Das entstehende Aglykon, die *Glycyrrhetinsäure*, wird resorbiert und gelangt über die Pfortader in den großen Kreislauf.

Für die mineralocorticoide Wirkung der *Glycyrrhetinsäure* wurde zunächst eine agonistische Wirkung am MR postuliert (12). Parallelen zur Symptomatik des Apparenten Mineralocorticoid Exzesses (AME) ließen schließlich eine Hemmung der 11 $\beta$ -HSD vermuten. Eine Vielzahl von Studien konnte dies inzwischen bestätigen (116;118).

Die Glycyrrhetinsäure gilt als klassischer kompetitiver Inhibitor der 11 $\beta$ -HSD und wird mit einer  $K_i$  von etwa 5-10nm vor allem für Inhibitionsexperimente an diesem Enzym verwendet (7;158).

**Carbenoxolon**, Succinateester der Glycyrrhetinsäure, wurde früher ebenfalls zur Therapie des *Ulcus ventriculi* verwendet. Wie die Glycyrrhetinsäure hemmt die Substanz beide Isoenzyme der 11 $\beta$ -HSD und führt bei Überdosierung zu ähnlichen Symptomen wie chronischer Lakritzabusus (133). Aufgrund einer im Vergleich zu Glycyrrhetinsäure stärkeren Hemmung der 11 $\beta$ -HSD1 kommt es jedoch kaum zu einer Veränderung der Urinquotienten von (THF+aTHF)/THE (160;171).



**Abb.1.5.:** Strukturformeln von Glycyrrhizin, Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon.

### 1.3.4. Essentielle Hypertonie

Typische Symptome des Mineralocorticoidexzesses, wie sie etwa beim AME vorkommen, finden sich bei der Essentiellen Hypertonie normalerweise nicht. Dennoch korrelieren bei einigen Patienten die Blutdruckwerte positiv mit dem Serum-Natrium und negativ mit dem Serum-Kalium. Andere zeigen ein niedrig normales Plasma-Renin, was für einen Einfluß von Mineralocorticoiden spricht (23). Bezüglich der Bedeutung der 11 $\beta$ -HSD2 für die Pathogenese der Essentiellen Hypertonie zeigt die jetzige Studienlage ein recht heterogenes Bild und erlaubt keine generelle Aussage.

Verschiedene Arbeiten konnten zwar eine verlängerte Halbwertszeit von Cortisol bei einigen Patienten mit Essentieller Hypertonie zeigen, ebenso eine erhöhte Ausscheidung von Cortisolmetaboliten sowie eine Verstärkung vasokonstriktorischer Einflüsse (176;178). Andere Untersuchungen konnten einen Zusammenhang zwischen Hypertonie und eingeschränkter 11 $\beta$ -HSD2 Aktivität jedoch nicht belegen (62;86).

In letzter Zeit wird zunehmend nach Polymorphismen im Gen der 11 $\beta$ -HSD2, insbesondere für die Subgruppe der salzsensitiven Hypertoniker, geforscht. *Ferrari et al.* fanden zwar mit Hilfe eines polymorphen Mikrosatelliten-Markers Assoziationen zwischen 11 $\beta$ -HSD2-Polymorphismen und salzsensitivem Hypertonus, konnten dies jedoch nicht für unselektierte Patienten mit Essentieller Hypertonie zeigen (105). Ebenso wurden Untersuchungen an Afro-Karibiern durchgeführt, einem Volksstamm, der besonders zu einer Niedrig-Renin-Hypertonie neigt. Hier fanden *Watson et al.* eine genetische Assoziation zwischen einem 11 $\beta$ -HSD2-B2-flankierenden Mikrosatelliten-Marker und Hypertension (179). Diese Ergebnisse konnten von anderen Autoren nur teilweise bestätigt werden (156; 29).

Zusammenfassend scheint bei einem Teil der Patienten mit Essentieller Hypertonie eine genetisch determinierte Aktivitätsminderung der 11 $\beta$ -HSD2 eine Rolle zu spielen. Die Prävalenz von Mutationen im Gen der 11 $\beta$ -HSD2 ist bisher unbekannt. Es ist denkbar, dass sich unter den etwa 40% der Hypertoniker, bei denen das Plasma-Renin erniedrigt ist, einige Patienten mit einer milden Form des AME finden lassen. Da es sich bei der Essentiellen Hypertonie jedoch insgesamt um eine polygenetische Erkrankung handelt, spielt die Assoziation des Leidens mit Polymorphismen im Gen der 11 $\beta$ -HSD klinisch vermutlich nur eine untergeordnete Rolle.

### **1.3.5. Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2 und Insulinresistenz**

Tierexperimentelle Befunde weisen darauf hin, dass eine Überaktivität der 11 $\beta$ -HSD1 im Fettgewebe für die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 und des Metabolischen Syndroms von Bedeutung sein könnte (111). Passend zu dieser Hypothese lässt sich beobachten, dass eine Inhibierung des Enzyms beim Menschen ebenso wie ein 11 $\beta$ -HSD1-Knockout bei der Maus zu einer verbesserten Insulinsensitivität führt (96;177).

Aufgrund dieser Zusammenhänge wird die 11 $\beta$ -HSD1 zur Zeit als eines der Hauptkandidatengene des Diabetes mellitus Typ 2 gehandelt. Die pathophysiologische Rolle der 11 $\beta$ -HSD1 für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 ist jedoch noch keineswegs geklärt. Die Hemmung der 11 $\beta$ -HSD1-Aktivität durch Agonisten des PPAR $\gamma$ -Rezeptors (Peroxisome Proliferator Activator Receptor  $\gamma$ ) findet zunehmend wissenschaftliches Interesse (24). Das Zusammenspiel von intrazellulärem Cortisol, PPAR $\gamma$ , der 11 $\beta$ -HSD1 und dem kürzlich im Fettgewebe entdeckten Hormon Resistin könnte pathogenetisch für die Genese von Insulinresistenz, Diabetes mellitus bei Patienten mit Adipositas von Bedeutung sein (155).

#### 1.4. Beeinflussung der 11 $\beta$ -HSD–Aktivität durch Hormone, Zytokine und andere Mediatoren

Tabelle 1.4. fasst schematisch die wichtigsten hormonellen Einflußfaktoren auf die Aktivität der 11 $\beta$ -HSD-Isoformen zusammen.

Hormon/Zytokin Transkriptionsfaktor	Beeinflussung der HSD-Aktivität
<b>Insulin</b>	- $\downarrow$ 11 $\beta$ -HSD1 (Stromazellen des Fettgewebes)(104)
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	- $\downarrow$ 11 $\beta$ -HSD1 (Stromazellen des Fettgewebes)(78)
<b>Progesteron</b>	- $\downarrow$ 11 $\beta$ -HSD2 (humanes Nierengewebe) (64;135)
<b>PPAR<math>\alpha</math>/PPAR<math>\gamma</math></b>	- $\downarrow$ 11 $\beta$ -HSD1 in Hepato- und murinen Adipozyten (24)
<b>Corticosteroide/Dexamethason ACTH (via F-Stimulation)</b>	- $\uparrow$ 11 $\beta$ -HSD1 (Fettgewebe; Hepatozyten) (90;175) - $\downarrow$ 11 $\beta$ -HSD2 (Endometriumzellen) (45) - $\uparrow$ 11 $\beta$ -HSD1 (Leber) (138)
<b>STH / IGF 1</b>	- $\downarrow$ 11 $\beta$ -HSD1 (Stromazellen des Fettgewebe)(175)

**Tab.1.4.:** Einflüsse verschiedener Hormone auf die Aktivität der Isoenzyme der 11 $\beta$ -HSD

TNF $\alpha$  = Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ; EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor; cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat; STH = Somatotropes Hormon; IGF1 = Insuline like growth factor PPAR = Peroxisome Proliferator Activator Receptor. Tabelle modifiziert nach (16).



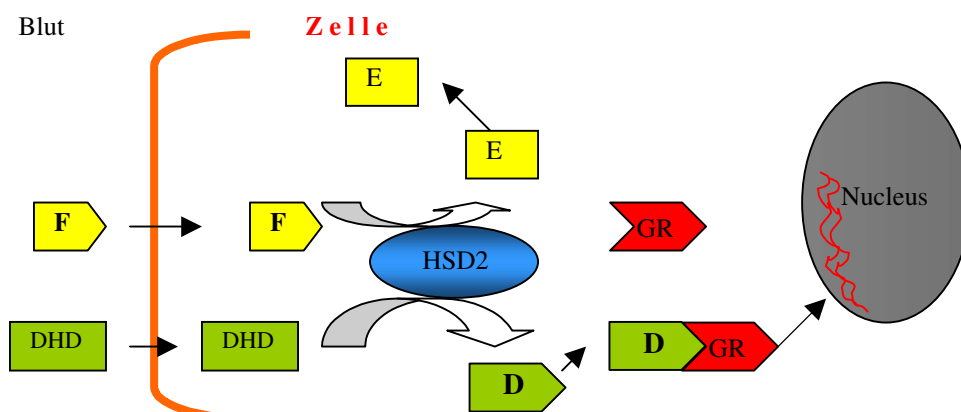
## 1.5. 11 $\beta$ -HSD und Pharmakotherapie

Die biologischen Effekte der meisten Pharmaka können durch dessen Plasmakonzentration als eine Funktion der im Körper befindlichen Menge des Stoffes abgeschätzt werden. Jedoch wird die biologische Wirkung in einzelnen Organen oder Geweben letztlich durch eine Fülle von Einflussfaktoren bestimmt. Lokale Transport- und Biotransformationssysteme spielen ebenso eine Rolle wie Blutzirkulation, Rezeptorbesatz und andere Parameter. Ein entscheidender Faktor für die Steroidwirkung ist die organspezifische Expression der Isoenzyme der 11 $\beta$ -HSD.

### 1.5.1. Die Aktivierung von 9 $\alpha$ -Fluorosteroiden durch die 11 $\beta$ -HSD2

Versuche an Gewebeschnitten der Niere belegen eine Bidirektionalität der 11 $\beta$ -HSD2 für 9 $\alpha$ -Fluorocortisol und Dexamethason (25;51;126). In Studien mit der 11 $\beta$ -HSD2 der Ratte sowie dem klonierten humanen Enzym zeigte es sich, dass sich unter Einsatz von Dehydrodexamethason als Substrat der 11 $\beta$ -HSD2 das Equilibrium weit auf Seiten der 11-Hydroxy-Substanz einstellt (Abb.1.6.) (103).

Die hohe mineralocorticoide Potenz von 9 $\alpha$ -Fluorocortisol (9 $\alpha$ FF) resultiert daher eher aus einer Verlagerung des thermodynamischen Gleichgewichtes (geringe 11-Oxidation, starke 11-Reduktion) als aus einer höheren Affinität zum Mineralocorticoidrezeptor im Vergleich zu Hydrocortison (126).



**Abb.1.6.:** Aktivierung fluoriertester Steroide durch die 11 $\beta$ -HSD2; während Cortisol (F) durch die HSD2 zu Cortison (E) oxidiert wird, reduziert die HSD2 Dehydrodexamethason (DHD) zu Dexamethason (D), das den Glucocorticoidrezeptor (GR) aktivieren kann.

Das ungewöhnliche Verhalten der 11 $\beta$ -HSD2 gegenüber 9 $\alpha$ -Fluorosteroiden bietet theoretisch die Option einer selektiven Immunsuppression für Organe mit hoher HSD2-Expression. Geringe Mengen von 11-Oxo-9 $\alpha$ -Fluorosteroiden könnten eventuell an der niedrig affinen 11 $\beta$ -HSD1 der Leber vorbeigeschleust und erst durch die 11 $\beta$ -HSD2 am Wirkort aktiviert werden (Abb.1.6.) (13;142).

Zudem könnte durch geeignete Substituenten im Steroidgerüst selektiv die 11-Reduktion durch die 11 $\beta$ -HSD1 unterbunden oder zumindest vermindert werden. So ist zum Beispiel bekannt, dass der Einbau einer 2 $\alpha$ -Methylgruppe die hepatische 11 $\beta$ -Reduktion stark abschwächt (41).

### **1.5.2. Selektive Inhibitoren der 11 $\beta$ -HSD1**

Knockout-Mäuse, denen das Gen für die 11 $\beta$ -HSD1 fehlt, zeigen eine verbesserte Insulinsensitivität und ein günstigeres Lipidprofil (82;96). Umgekehrt begünstigt eine Überexpression der 11 $\beta$ -HSD1 bei Mäusen Hyperphagie, Metabolisches Syndrom und die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 (111).

Die Entwicklung selektiver Inhibitoren der 11 $\beta$ -HSD1 ist vor allem mit dem Ziel einer Verbesserung der Insulinsensitivität von großem wissenschaftlichem Interesse. *Walker et al.* konnten durch Gabe von Carbenoxolon bei gesunden Probanden eine Verbesserung der Gesamtkörperinsulinsensitivität erreichen (177). Carbenoxolon gilt bezüglich der Hemmung der 11 $\beta$ -HSD jedoch als nur gering selektiv. *Diederich et al.* konnten zeigen, dass die Chenodesoxycholsäure mit einer Hemmkonstante (IC<sub>50</sub>) von  $2,8 \times 10^{-6}$  mol/l selektiv die 11 $\beta$ -HSD1 hemmt (48). Bisher liegen noch keine *in vivo* Daten über Effekte beim Menschen vor.

Neuere Untersuchungen weisen auf eventuelle Vorteile einer Hemmung der 11 $\beta$ -HSD1 für die Aufrechterhaltung verschiedener kognitiver Funktionen im Alter hin (187). Auch unter diesem Aspekt wäre die Entwicklung hochselektiver Inhibitoren der 11 $\beta$ -HSD1 interessant.