

## 1. Einleitung

### 1.1 Prolog

Die 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD) ist ein Enzym, das die Interkonversion zwischen aktiven und inaktiven endogenen bzw. synthetischen Glucocorticosteroiden katalysiert. Damit übernimmt das Enzym wichtige regulatorische Aufgaben in verschiedenen Organen.

Die Funktion der 11 $\beta$ -HSD im Rahmen der fetalen Lungenreifung ist seit langem bekannt und gut erforscht. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die 11 $\beta$ -HSD bei der Induktion der Surfactant-Synthese, die maßgeblich für die Lungenreife verantwortlich ist, eine wesentliche Rolle spielt. Bei der Synthese des Surfactants werden vor allem Phospholipide und Fettsäuren gebildet.

Eine Reihe von Forschungsergebnissen belegt den Einfluss von Fettsäuren und Phospholipiden auf die Aktivität Steroid-metabolisierender Enzyme.

Ziel unserer Forschungsarbeit war die Klärung der Frage, ob die 11 $\beta$ -HSD einem regulierenden Einfluss durch Bestandteile des Surfactants, im Sinne einer mittelbaren Produkthemmung bzw. -aktivierung, unterworfen ist.

### 1.2 Glucocorticosteroide und Mineralocorticosteroide

Zu der Familie der Steroide gehören neben Cholesterin, Gallensäuren und Vitamin D auch die Gruppe der Steroidhormone. Allen Steroiden liegt, wie der Name bereits andeutet, als strukturelle Analogie das Steran-Gerüst (bestehend aus einem Cyclopentan-Ring und drei vollständig hydrierten Cyclohexan-Ringen) zugrunde. Glucocorticosteroide (GCS) und Mineralocorticosteroide (MCS) bilden zusammen mit Östrogenen, Androgenen und Gestagenen die Gruppe der Steroidhormone. Der Bildungsort der GCS ist die zona fasciculata, MCS werden in der zona glomerulosa der Nebennieren-Rinde synthetisiert.

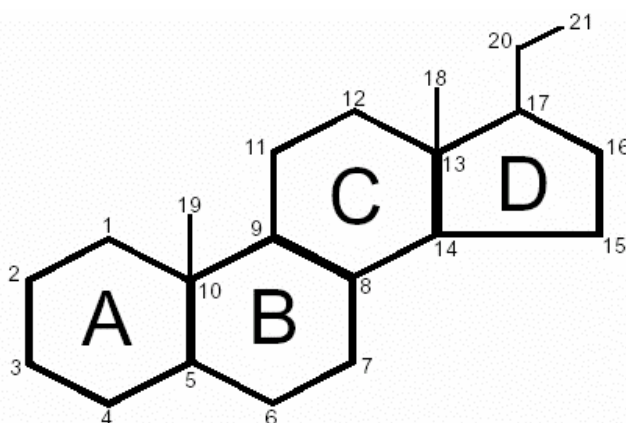


Abb. 1.1: Grundstruktur der Steroidhormone.  
Dargestellt ist die allen Steroidhormonen zugrunde liegende 4-Ringstruktur.  
Die Ringe sind alphabetisch bezeichnet von A-D, die einzelnen Kohlenstoff-Atome sind durchnummeriert. Entsprechend der Anzahl der Kohlenstoff-Atome können verschiedene Hormonklassen unterschieden werden: C18: Östrogene, C19: Androgene, C21: Gestagene, Gluco- und Mineralocorticosteroide

Beim Menschen sind Cortisol und in geringerem Maße auch Corticosteron die wichtigsten physiologischen GCS, das wichtigste MCS ist Aldosteron.

Die durchschnittliche Serumkonzentration von Cortisol beträgt beim gesunden Menschen zwischen 15-75 nmol/l, wovon etwa 75% an das spezifische Transportprotein Transcortin (= cortisol binding globuline, CBG) und weitere 15% an Albumin gebunden ist, nur etwa 10% zirkuliert frei.

Die Serumkonzentration von Aldosteron beträgt ca. 270 pmol/l, wovon etwa 65% an Proteine, vorwiegend Albumin, gebunden ist (55).

### 1.3 Rezeptortheorie

Die Steroid-Rezeptoren gehören zur Familie der intrazellulär bindenden Rezeptoren und liegen nach allgemein gültiger Vorstellung als Multiproteinkomplexe primär im Zytoplasma vor. Nach der Diffusion in die Zelle koppelt das aktive Steroidhormon an den Rezeptor, worauf es zur Dissoziation von Teilen des Multiproteinkomplexes und zur Konformationsänderung des Rezeptors kommt, der dadurch aktiviert wird (41). Der Rezeptor wandert mit dem Hormon als Rezeptor-Ligand-Komplex in den Zellkern ein und bindet an Promotor-Regionen der sogenannten Hormone Response-Elemente der DNA. In Folge kommt es zur gewebsspezifischen Modulation der Transkription zahlreicher Gene (20, 56, 57, 128).

Klassische Aldosteron-Zielzellen mit hohen Konzentrationen des Mineralocorticoid-Rezeptors (MC-R) sind die epithelialen Gewebe von Niere, Darm, Parotis und Pankreas (36, 139, 146).

Der Glucocorticosteroid-Rezeptor (GC-R) liegt ubiquitär vor und wird somit in allen Körperzellen angetroffen (172).

### 1.4 Allgemeine Charakterisierung der 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD)

1953 wurde erstmals von Amelung et al. (10) ein Enzym in der Leber von Ratten beschrieben, das die Konversion von Cortisol und Corticosteron in deren Metabolite Cortison und 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC) katalysiert. Dieses Enzym wurde 1956 von Hübener et al. (71) als „11 $\beta$  Hydroxy Dehydrogenase“ bezeichnet. Seit 1984 lautet die offizielle Bezeichnung gemäß „Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry“: EC 1.1.1.146 (11 $\beta$ -Hydroxysteroid: NADP<sup>+</sup> 11-Oxidoreduktase).

Die 11 $\beta$ -HSD wird der Familie der „short-chain alcohol dehydrogenase superfamily“ (SCAD) zugerechnet (84).

Bei der 11 $\beta$ -HSD handelt es sich um eine Oxido-Reduktase, die am C<sub>11</sub>-Atom von Steroidhormonen eine oxidierende bzw. reduzierende Reaktion katalysiert.

Cortisol und Corticosteron sind im menschlichen Organismus physiologische Substrate der oxidativen 11 $\beta$ -HSD-Aktivität. Reaktionsprodukte sind die jeweiligen Oxo-Formen Cortison bzw. 11-DHC, die nur geringe Affinität zum GC-R aufweisen und biologisch inaktiv sind (16).

Umgekehrt ist eine Aktivierung von Cortison und 11-DHC zu deren biologisch aktiven Hydroxy-Formen Cortisol und Corticosteron durch die reduktive Aktivität

der 11 $\beta$ -HSD möglich. Aus diesem Grund werden Cortison und 11-DHC gelegentlich auch als Prodrugs bezeichnet.

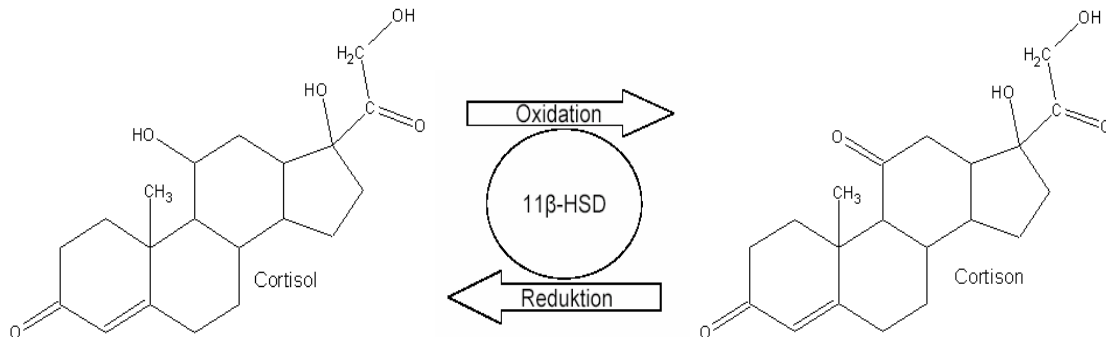


Abb. 1.2: Darstellung der Interkonversion zwischen Cortisol und Cortison durch die 11 $\beta$ -HSD.

Anfänglich war die Existenz nur eines Enzyms angenommen worden. In einer Arbeit von Bernal et al. (28) wurde 1980 erstmals die Existenz von Isoformen vermutet, nachdem beobachtet wurde, dass die *in vitro*-Aktivität in humanen Trophoblasten- bzw. Dezidua-Zellen unterschiedlich auf den Zusatz verschiedener Inhibitoren reagierte und keine Übereinstimmung hinsichtlich der  $K_m$ -Werte und der spezifischen Aktivität bestand (28).

Lakshmi und Monder (89) stellten 1985 in Untersuchungen mit Rattenleber-Gewebe abweichende Wirkung von Phospholipasen, Detergentien und Veränderungen des pH-Milieus auf die Oxidase- bzw. Reduktase-Aktivität fest und interpretierten diese Beobachtungen ebenfalls als Indiz für das Vorliegen von Isoenzymen, die die jeweilige Reaktionsrichtung repräsentieren müssten.

Inzwischen wurde durch enzymkinetische und molekularbiologische Versuche die Existenz zweier Isoenzyme (11 $\beta$ -HSD Typ I und 11 $\beta$ -HSD Typ II) nachgewiesen, die aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede als eigenständige Formen angesehen werden müssen.

#### 1.4.1 11 $\beta$ -HSD Typ I

Die 11 $\beta$ -HSD Typ I findet sich unter anderem in Leber, Lunge, Kolon, Hoden, Ovar, Hypophyse und Kleinhirn (157).

Das Enzym besteht aus 292 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 34 kDa. Das Gen, bestehend aus 6 Exons von insgesamt 9 kb Länge, ist auf Chromosom 1 lokalisiert (161). Die Homologie zwischen der 11 $\beta$ -HSD Typ I und der 11 $\beta$ -HSD Typ II beträgt nur 14% (5).

Die 11 $\beta$ -HSD Typ I besitzt ein transmembranäres Segment dessen C-terminales Ende mit dem aktiven Zentrum in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums ragt (123, 124).

Die enzymkinetische Charakterisierung der 11 $\beta$ -HSD Typ I zeigte *in vitro* eine bidirektionale (d.h. eine sowohl oxidative, als auch reduzierende) Aktivität, *in vivo* hingegen wurde bei Versuchen mit Leberzellkulturen von Ratte und

Mensch (136, 168) eine fast ausschließlich reduzierende Aktivität nachgewiesen. Es wird daher angenommen, daß die 11 $\beta$ -HSD Typ I *in vivo* ganz überwiegend als Reduktase operiert.

Die 11 $\beta$ -HSD Typ I zeigt im Vergleich zur 11 $\beta$ -HSD Typ II eine geringe Affinität für Cortisol bzw. Corticosteron, die mit einem  $K_m$ -Wert im mikromolaren Bereich gemessen wurde (90, 119). Die 11 $\beta$ -HSD Typ I bevorzugt NADP<sup>+</sup> bzw. NADPH als Co-Substrat (90).

Vermutungen, wonach die Reaktionsrichtung der 11 $\beta$ -HSD in der Leber durch die kontinuierliche Neubildung von NADPH im Pentose-Phosphat-Weg begünstigt werden könnte (120), erhielten durch neuere Untersuchungen keine Bestätigung (4).

Allerdings könnte die unmittelbare Nachbarschaft anderer Enzyme das Mikroklima in Zellkompartimenten z.B. über eine lokale pH-Veränderung beeinflussen und so für die ablaufende Reaktion richtungsgebend sein (77).

Die Funktion der 11 $\beta$ -HSD Typ I, die in allen Geweben vorgefunden wird, in denen auch der GC-R exprimiert wird, besteht nach heutigem Kenntnisstand darin, den Zugang von aktiven GCS zum zytoplasmatischen GC-R zu garantieren und somit deren Wirkung auf die Zielzelle (104, 148).

Die Klonierung und Charakterisierung der 11 $\beta$ -HSD Typ I gelang Tanin erstmals 1991 beim Menschen (161). Dabei wurde zu über 70 % Übereinstimmung in der Basensequenz mit der 11 $\beta$ -HSD Typ I anderen Spezies wie Ratte (1), Schaf (180, 181) und Maus (133) nachgewiesen.

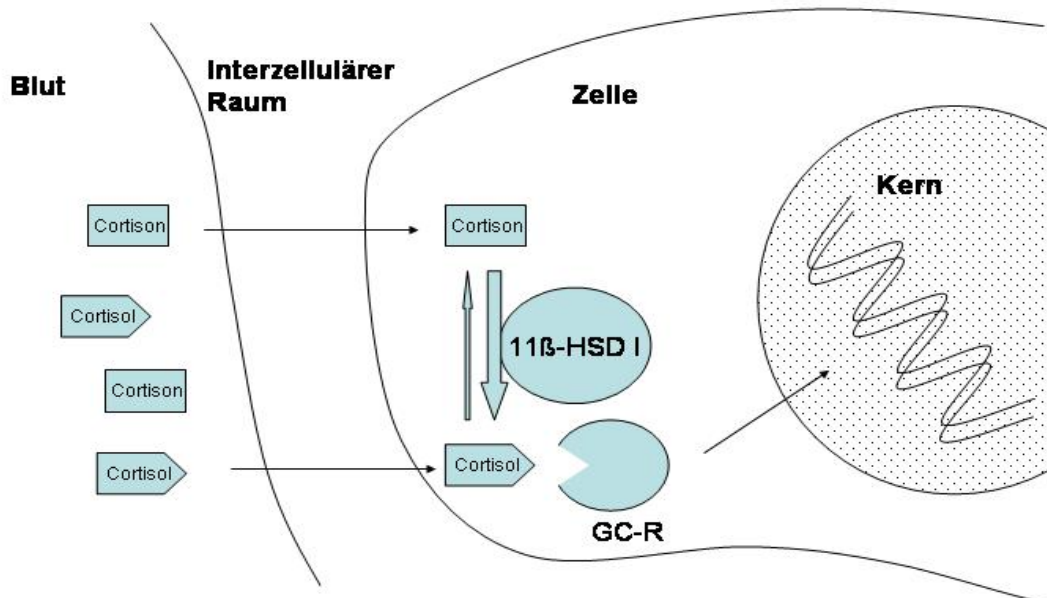


Abb. 1.3: Darstellung der Funktion der 11 $\beta$ -HSD Typ I *in vivo*. Die Aktivität des bidirektionalen Enzyms liegt ganz überwiegend auf der reduktiven Seite. Inaktive GCS (z.B. Cortison-Moleküle) werden aktiviert und können an den Glucocorticoid-Rezeptor (GC-R) binden.

### 1.4.2 11 $\beta$ -HSD Typ II

Die 11 $\beta$ -HSD Typ II wird unter anderem in Niere, Plazenta, Kolon, Pankreas und Speicheldrüsen aufgefunden (5, 58, 85, 119, 174).

Das Enzym setzt sich aus 405 Aminosäuren zusammen und besitzt ein Molekulargewicht von 40 kDa. Das kodierende Gen liegt auf Chromosom 16q22 und besteht aus 5 Exons mit einer Länge von insgesamt 6,2 kb (5).

Es besitzt 3 transmembranäre Segmente, das C-terminale Ende mit dem aktiven Zentrum ist, im Gegensatz zur Ausrichtung der 11 $\beta$ -HSD Typ I, nicht ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums, sondern zytosolwärts gerichtet (123).

Die 11 $\beta$ -HSD Typ II entfaltet *in vivo* und *in vitro* vor allem oxidierende Aktivität und verwendet als Co-Substrat ausschließlich NAD (108, 144).

Das Enzym besitzt eine hohe Substrataffinität zu Cortisol und Corticosteron mit einem  $K_m$ -Wert für diese Substrate, der jeweils im nanomolaren Bereich liegt (5, 155).

Die Klonierung und weitere Charakterisierung der 11 $\beta$ -HSD Typ II des Menschen gelang 1994 der Gruppe um Albiston (5). Auch hier war eine ausgeprägte Homologie zu der 11 $\beta$ -HSD Typ II anderer Spezies wie Ratte (184), Schaf (2, 3), Kaninchen (118) und Schwein feststellbar (96).

Die kodierende Sequenz der menschlichen 11 $\beta$ -HSD Typ II in Niere und Plazenta zeigte zwar Übereinstimmung (34, 35), es gibt jedoch Hinweise darauf, dass in der Plazenta möglicherweise noch eine weitere Isoform der 11 $\beta$ -HSD exprimiert wird (65).

### 1.5 Funktion der 11 $\beta$ -HSD in Niere, Plazenta und Lunge

Die best erforschten Organsysteme hinsichtlich der Funktion der 11 $\beta$ -HSD sind Niere, Plazenta und fetale Lunge. Diesen kommt, soweit bisher bekannt ist, auch die größte physiologische, pathophysiologische und zunehmend auch klinische Relevanz zu.

Im Folgenden soll die Funktion der 11 $\beta$ -HSD in diesen drei Organsystemen dargestellt werden.

#### 1.5.1 Niere

Die Tubuluszellen des kortikalen proximalen Tubulussystems, des dicken aufsteigenden Teils der Henle'schen Schleife und der kortikalen und medullären Sammelrohre exprimieren die 11 $\beta$ -HSD Typ II in hohen Konzentrationen (87).

In diesen Zellen ist ebenfalls der MC-R hochkonzentriert zu finden (69), der über die Renin-Angiotensin-Aldosteron-Achse aktiviert wird und für die Regulierung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Bilanz, des Flüssigkeits- und mittelbar auch des pH-Haushaltes des Körpers essentiell ist.

Überraschenderweise wurde für den MC-R keine Substratspezifität nachgewiesen. So vermögen Cortisol und Corticosteron mit nahezu der gleichen Affinität an den MC-R zu binden wie Aldosteron (13, 86).

Da die durchschnittlichen Plasmakonzentrationen von Cortisol, wie oben dargestellt, mehr als 100-fach und der freie Anteil an Cortisol immer noch etwa 50-fach höher ist als die entsprechenden Konzentrationen von Aldosteron, müsste der MC-R ganz überwiegend von Cortisol besetzt werden. Eine sinnvolle Steuerung des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushaltes durch die Wirkung von Aldosteron wäre so nicht vorstellbar.

Dies legte die Vermutung nahe, dass ein Schutzmechanismus gegen die Wirkung der GCS vorhanden sein müsste, der die Spezifität des MC-R für Aldosteron garantiert.

Den Spekulationen über die Art und Beschaffenheit dieses Schutzmechanismus kam die Entdeckung einer seltenen Erkrankung zu Hilfe, die familiär gehäuft auftritt und zu einer, bereits im Kindesalter auftretenden, Hypertonie mit hypokalämischer Alkalose führt und mit niedrigen Renin- und Aldosteron-Plasmakonzentrationen vergesellschaftet ist.

Diese Erkrankung wurde von Ulick als „syndrome of apparent mineralocorticoid excess“ (AME-Syndrom) benannt (165), da die gemessenen Sekretionsraten von Cortisol und Corticosteron bzw. ihrer Deoxy-Metabolite, sowie Aldosteron ebenfalls erniedrigt waren und deshalb zunächst angenommen wurde, dass ein unbekanntes Steroid mit mineralocorticoider Wirkung dieses Syndrom verursachen müsse.

Funder (59) und Edwards (52) postulierten 1988 unabhängig voneinander die Existenz einer weiteren Isoform der  $11\beta$ -HSD in den mineralocorticoiden Zielzellen der Niere, welche ihrer Meinung nach für das AME-Syndrom verantwortlich war.

Dieses Enzym müsste beim Gesunden eine hohe Affinität für aktive GCS aufweisen, sodass diese inaktiviert werden könnten, bevor sie an den MC-R binden und eine Aldosteron-ähnliche Wirkung entfalten könnten.

Die vermutete Isoform der  $11\beta$ -HSD, so Funder und Edwards, müsste beim AME-Syndrom vermindert oder defekt sein. Diese Theorie konnte durch biochemische Untersuchungen in den folgenden Jahren bestätigt werden.

1989 wurde von Ulick eine weitere Form des AME-Syndroms beschrieben (164), die sich von der bisher bekannten Form (AME-Syndrom Typ I) durch einen normalen bis leicht erhöhten Quotienten der Cortisol-/Cortison-Metabolite und eine verminderte Konversion von Cortisol zu Cortison unterscheidet.

Inzwischen sind mehrere Gendefekte der  $11\beta$ -HSD Typ II als Ursache des AME-Syndroms bekannt, die zur Fehlbildung dieses Enzyms führen und eine erhebliche Verminderung der Substrataffinität für GCS zur Folge haben (122).

Bezeichnenderweise wird die  $11\beta$ -HSD Typ II in den klassischen Aldosteron-Zielgeweben der Niere von Mensch und Säugetieren in hoher Konzentration exprimiert (80, 85, 87, 102). Neuere Untersuchungen zeigen gar, mit Ausnahme des plazentaren Gewebes, eine strikte Co-Lokalisation von  $11\beta$ -HSD Typ II und MC-R in menschlichen Geweben (69).

Heute gilt als gesichert, daß die Funktion der  $11\beta$ -HSD Typ II darin besteht, die intrazellulären aktiven GCS, noch bevor diese an den MC-R binden können, in ihre jeweiligen Oxo-Formen zu überführen. Diese haben zum MC-R (52, 59) wie auch zum GC-R (4) nur geringe Affinität und sind biologisch inert.

So reguliert die 11 $\beta$ -HSD einerseits die intrazelluläre Konzentration aktiver GCS und gewährt andererseits die Spezifität des MC-R für die Wirkung von Aldosteron, welches selbst kein Substrat der 11 $\beta$ -HSD ist, da dessen C11-Atom aufgrund einer hochreagiblen Aldehydgruppe an C18 in wässriger Lösung in einen 11,18- bzw. 11,18, 20-Hemiactal-Ring eingebunden ist (60).

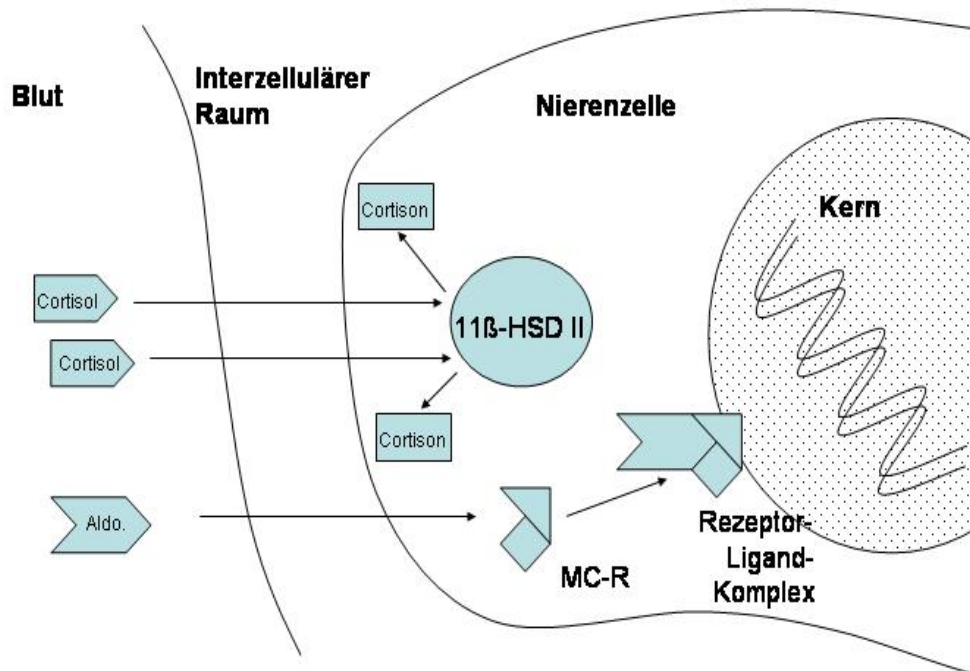


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Regulationsmechanismus der 11 $\beta$ -HSD in den Zellen des aufsteigenden Anteils der Henle'schen Schleife und des distalen Tubulus, sowie der Sammelrohre der Niere. (MC-R = Mineralcorticoid-Rezeptor, Aldo. = Aldosteron)

### 1.5.2 Plazenta

Immunhistologische Untersuchungen der Plazenta wiesen in den Dezidua-Zellen 11 $\beta$ -HSD Typ I und im Synzytiotrophoblasten 11 $\beta$ -HSD Typ II nach (12, 85). In der Dezidua könnte die 11 $\beta$ -HSD Typ I durch die Gewährleistung ausreichender Konzentrationen an aktiven GCS dazu beitragen, das mütterliche Immunsystem lokal zu dämpfen und somit die Implantation des Blasten und die weitere Integrität des Fetus zu sichern (8, 14, 116).

Die Aktivität der 11 $\beta$ -HSD Typ II in den Synzytiotrophoblasten hingegen schützt nach gängiger Meinung den Feten vor den 2- bis 10-fach höheren maternalen Serumkonzentrationen aktiver GCS (22, 48, 51, 117).

Bemerkenswert ist der Umstand, dass die 11 $\beta$ -HSD-Aktivität in der humanen Plazenta im dritten Trimenon der Schwangerschaft deutlich zunimmt, also zu einer Zeit in der auch die maternale GCS-Konzentration ansteigt (149).

Im Tierversuch (25, 135) und beim Menschen (135, 156) konnte nachgewiesen werden, dass die Verabreichung synthetischer GCS wie Dexamethason, die nur geringe Affinität zur 11 $\beta$ -HSD Typ II aufweisen und aus diesem Grund in weit geringerem Maße als die physiologischen GCS inaktiviert werden können (5, 34, 54), eine Verminderung des Geburtsgewichts, bei gleichzeitiger Erhöhung des Plazentargewichts, sowie die Entwicklung arterieller Hypertonie im Erwachsenenalter zur Folge haben.

Retrospektive Untersuchungen untermauern die Hypothese, dass eine Korrelation zwischen Geburtsgewicht, Plazentargewicht und der späteren Entwicklung einer arteriellen Hypertonie auch beim Menschen besteht (21).

Benediktsson et al. (24) wiesen schließlich in perfundierten humanen Plazenten *ex vivo* die alleinige Inaktivierung aktiver GCS durch die 11 $\beta$ -HSD Typ II nach und schlossen ein Mitwirken anderer GCS-metabolisierender Enzyme (20 $\alpha$ / $\beta$ -HSD, 5 $\beta$ -HSD) in der Plazenta aus.

Neugeborene, die am AME-Syndrom leiden, d.h. die mit einem Defekt der 11 $\beta$ -HSD Typ II zur Welt kommen, weisen eine intrauterine Wachstumsretardierung auf (82). Diese Beobachtung könnte ebenfalls auf die verminderte 11 $\beta$ -HSD-Aktivität in der Plazenta und/oder dem kindlichen Gewebe zurückzuführen sein und liefert einen weiteren Hinweis auf den erwähnten Zusammenhang von Geburtsgewicht und intrauteriner GCS-Exposition.

Die Konzentration aktiver GCS, denen der Fetus ausgesetzt ist, wird vor allem von der adrenalen Produktion des Feten, der Konzentration des CBG, des intrazellulären fetalen Metabolismus und des transplazentaren Transfers maternaler GCS bestimmt (129).

Die Funktion der plazentaren 11 $\beta$ -HSD Typ II, so die übereinstimmende Fachmeinung, besteht darin, den Feten vor der hohen maternalen Konzentration an aktiven GCS zu schützen. Die in der Plazenta inaktivierten mütterlichen GCS können schliesslich im Fetus als prodrug für die gezielte, gewebsspezifische Aktivierung durch die 11 $\beta$ -HSD Typ I verwendet werden.

Somit ist der fetale Organismus im Wechselspiel der Isoenzyme der 11 $\beta$ -HSD in der Lage, das intrazelluläre Milieu an aktiven GCS und somit die Besetzung des GC-R gewebsspezifisch zu regulieren.

### 1.5.3 Lunge

Im Zusammenhang mit der fetalen Lungenreifung kommt der 11 $\beta$ -HSD eine zentrale Bedeutung zu.

Die fetale Lungenreifung ist, abgesehen von der notwendigen morphologischen Differenzierung des Bronchial- und Lungengewebes, vor allem von der ausreichenden Synthese von Surfactant (**Surface active agent**) in den Pneumozysten Typ II der fetalen Lunge abhängig.

Die Funktion des Surfactants besteht in der Herabsetzung der Oberflächenspannung an der flüssig-gasförmigen Grenzschicht der Lungenalveolen.



Dadurch wird die physikalisch bedingte Tendenz verringert, dass kleinere Alveolen zugunsten von größeren Alveolen kollabieren.

Surfactant setzt sich zu  $\approx 90\%$  aus Lipiden, zu  $\approx 8\%$  aus Proteinen und zu  $\approx 2\%$  aus Kohlenhydraten zusammen (81). Phospholipide machen mit etwa 80-90% den größten Anteil der Lipidfraktion aus. Die restlichen 10% bestehen aus Cholesterol, Triacylglycerol und freien Fettsäuren.

Zu den oberflächenaktiven Eigenschaften des Surfactants trägt vor allem Phosphatidylcholin (PC) bei (175), das auch quantitativ, mit etwa 48% der Gesamtlipide, den größten Anteil der Phospholipiden beiträgt, wobei über 50% der PC-Moleküle mit zwei gesättigten Fettsäure-Resten verestert sind, überwiegend mit Palmitinsäure (142).

Die Synthese des Surfactants wird u.a. von der intrazellulären Konzentration aktiver GCS gesteuert. Diese ist einerseits von der fetalen Produktion aktiver GCS in der Nebennierenrinde abhängig, andererseits können inaktive fetale GCS und maternale GCS, die bei der Passage durch die Plazenta von der  $11\beta$ -HSD Typ II inaktiviert wurden, von der  $11\beta$ -HSD Typ I in den fetalen Pneumozyten reaktiviert werden.

Im Tiermodell wurde gezeigt, dass physiologischerweise während der Spätschwangerschaft eine sukzessive Reifung und Aktivitätszunahme der  $11\beta$ -HSD Typ I in den Pneumozyten des Feten erfolgt (73). Dadurch wird vermehrt Cortison zu Cortisol reduziert und so unter anderem die Induktion der Fettsäure-Synthese, dem Schlüsselenzym der *de novo*-Synthese von Fettsäuren, bewirkt. Erst durch das vermehrte intrazelluläre Angebot von Fettsäuren kommt es zu einer Aktivitätszunahme von Enzymen, die für die Synthese verschiedener Lipidbestandteile des Surfactant verantwortlich sind. Die Fettsäuren dienen als Substrat für die Inkorporation in Surfactant-Phospholipide, darüber hinaus bewirken sie aber auch eine direkte Aktivitätszunahme von Enzymen, wie z.B. der Cholinphosphat-Cytidyltransferase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der PC-Synthese (140).

In kürzlich von unserer Forschungsgruppe publizierten Arbeiten konnte der enge Zusammenhang zwischen der  $11\beta$ -HSD Typ I-gesteuerten pulmonalen Synthese aktiver GCS und der Surfactant-Biosynthese tierexperimentell untermauert werden (75, 76). Dabei wurde durch Untersuchungen mit  $11\beta$ -HSD Typ I-knock-out-Mäusen und trächtigen Ratten, die mit Glyzyrrhetinsäure, dem biologisch potentesten Inhibitor der  $11\beta$ -HSD, gefüttert worden waren, biochemisch und histologisch eine deutliche Beeinträchtigung der fetalen Lungenreifung nachgewiesen.

Der Zusammenhang zwischen intrazellulärer GCS-Konzentration und Surfactant-Synthese wird in der Gynäkologie seit langem bei der Prävention des neonatalen Atemnotsyndroms therapeutisch genutzt.

Von klinischer Relevanz sind die synthetischen GCS Dexamethason und Beta-methason, die bei drohender Frühgeburt ab der 24. Schwangerschaftswoche eingesetzt werden, um die Lungenreifung des Feten einzuleiten.

Der Erfolg der Therapie mit GCS wurde in verschiedenen Studien durch eine signifikante Senkung der Inzidenz des Atemnotsyndroms bei Frühgeburtlichkeit nachgewiesen (47).

Die synthetischen GCS werden der Mutter appliziert und erreichen über die Plazenta den Fetus. Dabei passieren Dexamethason bzw. Betamethason die plazentare Schranke für GCS relativ unbeeinträchtigt (siehe Kapitel 1.5.2), da aufgrund der veränderten chemische Struktur dieser GCS eine Metabolisierung durch die 11 $\beta$ -HSD nur in geringem Maße stattfindet (5, 34, 54).

Eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von GCS induziert ihrerseits die Expression der 11 $\beta$ -HSD (77, 101), sodass ein bedarfsorientierter, positiver feedback-Mechanismus besteht.

## 1.6 Modulatoren der Aktivität / Expression der 11 $\beta$ -HSD

Zu den untersuchten Substanzen, die einen Einfluss auf die Aktivität bzw. die Expression der 11 $\beta$ -HSD aufweisen, gehören u.a. die natürlichen Substrate der 11 $\beta$ -HSD, endogene Hormone, synthetische Steroide, Medikamente und Pflanzenextrakte.

### 1.6.1 Glycyrrhetinsäure, Glycyrrhizin, Carbenoxolon

Klassische Referenzsubstanz bei der Hemmung der 11 $\beta$ -HSD ist die Glycyrrhetinsäure, ein Extrakt der Süßholzwurzel *glycyrrhizia glabra* und Bestandteil der aus dieser Wurzel gewonnenen Lakrize.

Die Glycyrrhetinsäure ist, ebenso wie deren Derivate Glycyrrhizin und Carbenoxolon, ein kompetitiver Hemmstoff der 11 $\beta$ -HSD, wobei die Hemmwirkung von Glycyrrhetinsäure die ihrer Derivate übersteigt (Glycyrrhetinsäure > Carbenoxolon > Glycyrrhizin) (111).

Glycyrrhetinsäure besitzt eine größere Hemmwirkung auf die 11 $\beta$ -HSD Typ II als auf die 11 $\beta$ -HSD Typ I. Dies gilt für intakte Zellen, für Gewebshomogenate und Mikrosomen. Aufgrund der Diffusionsbarriere, die die Zellmembran darstellt, ist die Hemmung der 11 $\beta$ -HSD in intakten Zellen allerdings deutlich geringer (111, 113).

Die IC<sub>50</sub>-Konzentration, d.h. die Konzentration, bei der sich die Umsatzgeschwindigkeit des zu hemmenden Enzyms um 50% verringert, beträgt bei der  $\beta$ -Glycyrrhetinsäure für beide Isoenzyme der 11 $\beta$ -HSD Werte, die im nanomolaren Bereich liegen (für die Oxidase 2,9 nmol/l, für die Reduktase 10 nmol/l). Die entsprechenden Werte der  $\alpha$ -Glycyrrhetinsäure betragen 14 nmol/l für die Oxidase und 42 nmol/l für die Reduktase (39).

### 1.6.2 Gallensäuren

In Arbeiten von Bühler et al. (38, 39, 130) wurde für verschiedene Gallensäuren und deren Vorstufen eine hemmende Potenz auf die 11 $\beta$ -HSD nachgewiesen. Chenodesoxycholsäure weist, ebenso wie einige der unten aufgeführten Steroide, die ebenfalls eine Hemmung der 11 $\beta$ -HSD entfalten, eine 3 $\alpha$ -5 $\beta$ -reduzierte Ring-A-Konfiguration auf (93). Neben Cholsäure, Deoxycholsäure (DCA), Ursodeoxycholsäure und Lithocholsäure sind vor allem Lithocholsäure und Chenodesoxycholsäure (CDCA) die potentesten Hemmstoffe bei *in vitro*-Versuchen mit Mikrosomen von Mensch und Ratte (38,130).

Klinische Studien wiesen im Urin cholestatischer Patienten CDCA und DCA in Konzentrationen nach, die über den *in vitro* ermittelten IC<sub>50</sub>-Konzentrationen lagen (154).

### 1.6.3 Steroidhormone und deren Metabolite

Hemmsubstanz	IC <sub>50</sub> 11β-HSD I	IC <sub>50</sub> 11β-HSD II	Studie
Corticosteron		10 - 18 nmol/l	54, 157
5α-Dihydro-Corticosteron	7,5 μmol/l	150 nmol/l	93
3α-5α-Tetrahydro-Corticosteron	8 μmol/l	260 nmol/l	93
11β-Dehydro-Corticosteron	3 μmol/l *	45 - 80 nmol/l	34, 113, 157
3α-5α-Tetrahydro-11β-Dehydro-Corticosteron	29 μmol/l	800 nmol/l	93
21-Desoxy-Cortisol	100 μmol/l	350 nmol/l	93
5α-Dihydro-Cortisol	40 μmol/l	3,1 μmol/l	93
Cortison		0,24 - 1 μmol/l	35, 157
3α-5α-Tetrahydro-Cortison	240 μmol/l	5,5 μmol/l	93
Desoxycorticosteron	31 μmol/l	0,21 - 1 μmol/l	93, 157
3α-5β-Tetrahydro-Desoxycorticosteron	3 μmol/l		93, 115
Progesteron	48 nmol/l - 15 μmol/l *	6 nmol/l - 1,1 μmol/l	34, 54, 65, 93, 132, 157
11α-Hydroxy-Progesteron	0,7 - 1 μmol/l 10 μmol/l *	0,9 - 140 nmol/l	93, 113, 153, 157
11β-Hydroxy-Progesteron	11 μmol/l	10 - 320 nmol/l	93, 113, 153, 157
11-Keto-Progesteron	190 μmol/l	400 nmol/l	93
5β-Dihydro-Progesteron		> 1 μmol/l	65
5α-Dihydro-Progesteron		240 nmol/l - ca. 1 μmol/l	65, 132
3α-5β-Tetrahydro-Progesteron	12 μmol/l		92, 115
11α-OH-5α-Dihydro-Progesteron	2,7 μmol/l	350 nmol/l	93

11 $\beta$ -OH-3 $\alpha$ -5 $\alpha$ -Tetrahydro-Progesteron	16 $\mu$ mol/l	120 nmol/l	93
11 $\beta$ -OH-Pregnenolon	9,5 $\mu$ mol/l	100 nmol/l	93
5 $\alpha$ -Pregnandion		100 nmol/l	113
5 $\beta$ -Pregnandion		500 nmol/l	113
11 $\beta$ -OH-Androstendion		8,3 $\mu$ mol/l	157
20 $\alpha$ -Dihydro-Progesteron		770 nmol/l	132
3 $\beta$ -5 $\alpha$ -Tetrahydro-Progesteron		800 nmol/l	132
17 $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron		900 nmol/l	132
20 $\alpha$ -Dihydro-5 $\alpha$ -Dihydro-Progesteron		1,3 mmol/l	132
17 $\alpha$ -OH-20 $\alpha$ -Dihydro-Progesteron		$> 10E^{-5}$	132
DHEA, DHEAS, Testosteron, 20 $\alpha$ -Pregnandiol, 17 $\alpha$ -20 $\alpha$ -Dihydroxy-Progesteron, 17 $\alpha$ -20 $\beta$ -Dihydroxy-Progesteron	Hemmwirkung erst in unphysiologisch hohen Konzentrationen		27, 28, 34, 93, 115

Tab. 1.1: Übersicht über Steroide mit hemmender Wirkung auf die 11 $\beta$ -HSD. (\*) Reduktase-Reaktion der 11 $\beta$ -HSD Typ I.

Als physiologisch relevante Hemm-Mechanismen kommen wahrscheinlich Endprodukthemmung (Cortison, 11-DHC), kompetitive Hemmung und Substrat-sättigung durch natürliche Substrate der 11 $\beta$ -HSD in Frage.

Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist allerdings nur bedingt möglich, da die verschiedenen Arbeitsgruppen die Untersuchungen

- mit menschlichen und tierischen Geweben, sowie mit transfizierten Zell-Linien durchführten,
- Homogenate, Mikrosomen oder intakte Zellen verwendet wurden,
- bei den Hemmunterforschungen unterschiedliche Substratkonzentrationen eingesetzt wurden,

Der IC<sub>50</sub>-Wert für Progesteron wurde in Versuchen mit rekombinanter 11 $\beta$ -HSD Typ II der menschlichen Plazenta bei 800 nmol/l gemessen (34). Progesteron und seine Metaboliten könnten als endogene Inhibitoren der 11 $\beta$ -HSD klinische Relevanz zukommen, angesichts maternaler Plasmakonzentrationen in der Spätschwangerschaft von 300-500 nmol/l, Progesteron-Konzentrationen im

fetalen Plasma, die über 1  $\mu\text{mol/l}$  betragen können (8, 78), sowie Plasmakonzentrationen von 30-110  $\text{nmol/l}$  in der Lutealphase des Menstruationszyklus. Die 11-Desoxy-Steroide Desoxycorticosteron und Progesteron sind aufgrund ihrer chemischen Struktur zwar kein Substrat der 11 $\beta$ -HSD, sie entfalten jedoch inhibitorische Wirkung auf die 11 $\beta$ -HSD Typ I und Typ II (93).

Die inhibitorische Potenz von Progesteron-Metaboliten steigt bei Einführung einer Hydroxyl-Gruppe in 11 $\alpha$ - oder 11 $\beta$ -Position. Der sehr potente Hemmstoff 11 $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron ist kein endogener Metabolit beim Menschen und deshalb ohne klinische Relevanz. 11 $\beta$ -Progesteron und 11 $\beta$ -OH-3 $\alpha$ -5 $\alpha$ -Tetrahydro-Progesteron sind jedoch endogene Metabolite mit guter Hemmwirkung auf die 11 $\beta$ -HSD.

Auch die 5 $\alpha$ -Metabolite von Cortisol, Cortison, Corticosteron, 11-DHC und Progesteron zeigen einen starken inhibitorischen Effekt auf die 11 $\beta$ -HSD, mit deutlichem Überwiegen der Hemmwirkung auf die 11 $\beta$ -HSD Typ II.

Die übrigen untersuchten Steroide und deren Metabolite spielen *in vivo* wahrscheinlich keine Rolle, da eine Hemmwirkung auf die 11 $\beta$ -HSD erst in Konzentrationen festgestellt wurde, die deutlich über physiologischen Konzentrationen liegen.

#### 1.6.4 Synthetische GCS

Dexamethason bewirkte bei Versuchen mit Lebergewebe der Ratte (77, 101) sowohl eine Erhöhung der Aktivität, als auch der Expression der 11 $\beta$ -HSD Typ I. Entsprechend konnte in co-transfizierten Zell-Linien der Rattenleber GCS-Response-Elemente am Startpunkt der kodierenden Sequenz der 11 $\beta$ -HSD Typ I nachgewiesen werden (168).

Auch in anderen Geweben hat die Verabreichung von GCS eine Steigerung der 11 $\beta$ -HSD Typ I-Aktivität zur Folge (40, 67, 77, 101, 127).

Die Aktivität der 11 $\beta$ -HSD Typ II in der Niere wird von Dexamethason ebenfalls positiv beeinflusst, dies allerdings bei gleichzeitig verminderter mRNA-Expression des Enzyms (98).

#### 1.6.5 Weitere Hormone

Für einige endogene Hormone wurde eine modulierende Wirkung auf die Aktivität der 11 $\beta$ -HSD beschrieben. Neben dosisabhängigen Effekten sind geschlechtsspezifische und zeitabhängige Phänomene bei deren Wirkung auffällig. Diese Zusammenhänge werden im Folgenden exemplarisch anhand der Forschungsergebnisse mit Wachstumshormon dargestellt.

### 1.6.5.1 Wachstumshormon (growth hormone, GH)

Ein geschlechtsspezifischer Dimorphismus von Leberproteinen bei Nagetieren, der durch das geschlechtsabhängige Sekretionsmuster von GH vermittelt wird, ist seit langem bekannt (66).

Die Wirkung von GH auf die 11 $\beta$ -HSD scheint dabei stark vom zeitlichen Einwirken und der Konzentration des GH abzuhängen.

Werden tägliche Dosen von GH hypophysektomierten Ratten oder speziell gezüchteter Ratten mit chronisch niedrigen GH-Konzentrationen pulsatil bzw. kontinuierlich verabreicht, zeigen sich bei der pulsatilen Gabe keine Veränderung der 11 $\beta$ -HSD-Aktivität, während die kontinuierliche Gabe eine deutlich Hemmung der hepatischen 11 $\beta$ -HSD Typ I-Aktivität zur Folge hat (105). Bei weiblichen Tieren erfolgt die GH-Ausschüttung kontinuierlich und in geringen Konzentrationen. Bei männlichen Tieren hingegen findet eine pulsatile Sekretion mit hohen, kurz währenden Konzentrationen statt. Entsprechend ist die 11 $\beta$ -HSD-Aktivität und mRNA-Expression in Hepatozyten der weiblichen Ratten um 50% bzw. 72% niedriger als bei männlichen Ratten (105).

Bei Zwerg-Ratten mit niedriger GH-Konzentration sind diese Unterschiede aufgehoben, beide Geschlechter weisen eine 11 $\beta$ -HSD-Aktivität auf, die gesunden männlichen Versuchstieren entspricht.

Die pulsatile Verabreichung von GH bei weiblichen Zwerg-Ratten hatte keinen Einfluss auf die 11 $\beta$ -HSD-Aktivität. Die kontinuierliche Gabe von GH an männliche Ratten hingegen senkte die 11 $\beta$ -HSD-Aktivität in der Leber um 30% und die mRNA-Expression um 77% (105).

Bei Versuchen mit Hepatozytenkulturen männlicher Ratten wurde eine direkte hemmende Potenz von Wachstumshormon auf die 11 $\beta$ -HSD nachgewiesen, die einen deutlichen zeitabhängigen Charakter aufwies (Inkubation über 8 Stunden ohne Wirkung, Inkubation über 18-24 Stunden mit hochsignifikanter Hemmung) (101).

Andere Arbeitsgruppen konnten diese Ergebnisse in eigenen Untersuchungen nicht bestätigen (77), es muss allerdings angemerkt werden, dass es bereits durch das Kultivieren von Rattenhepatozyten zu zeitabhängigen Veränderungen kommt. So wurde beobachtet, dass es während der Kultivierung zu einem sukzessiven Verlust differenzierter Funktion kommt (45, 46), insbesondere zu einem Abfall von mRNA-Expression und Enzymaktivität der 11 $\beta$ -HSD Typ I (77). Dieses Verhalten scheint die Reaktion der Zelle auf die Herauslösung aus dem Zellverband zu sein, die zu einem Einstellen vormals vorhandener bzw. nicht mehr benötigter Funktionen führt (112).

### 1.6.5.2 Östrogene

In frühen Studien wurde eine völlige Suppression der hepatischen 11 $\beta$ -HSD-Aktivität nach Verabreichung von Östradiol in männlichen und weiblichen Ratten festgestellt (94).

Die 11 $\beta$ -HSD-Aktivität in der Leber weiblicher Ratten ist, wahrscheinlich aufgrund der repressiven Wirkung von Östrogen auf die Gen-Transkriptionsrate der 11 $\beta$ -HSD Typ I, im Vergleich zu männlichen Ratten vermindert (133).

Bei männlichen, kastrierten Ratten, denen Östradiol verabreicht wurde, konnte ein starker Abfall der hepatischen 11 $\beta$ -HSD-Aktivität (-69%) und mRNA-Expression (-97%) nachgewiesen werden. Kastrierte und Testosteron-substituierte Ratten zeigten hingegen keine Änderung der 11 $\beta$ -HSD-Aktivität. Weibliche Ratten wiesen nach Entfernung der Gonaden einen deutlichen Anstieg der 11 $\beta$ -HSD-Aktivität auf, der sich nach der Substitution mit Östradiol als reversibel herausstellte. Kastrierte männliche Ratten, die mit Östrogenen behandelt wurden, weisen einen Anstieg der 11 $\beta$ -HSD-Aktivität der Niere auf, wohingegen die mRNA-Expression fast vollständig unterdrückt war (103). Ähnliche Phänomene im Zusammenhang mit GCS-Experimenten wurden mit einer Freisetzung der 11 $\beta$ -HSD aus möglichen intrazellulären Speichern zu erklären versucht (98).

Die mRNA-Expression der 11 $\beta$ -HSD Typ I in Niere, Leber und Uterus der weiblichen Ratte korrelierte negativ mit den variierenden Östrogenkonzentrationen im Verlauf des Östrogenzyklus (6, 7). In der Plazenta gravidier Paviane hingegen besteht eine positive Korrelation der oxidativen Aktivität der 11 $\beta$ -HSD mit der zunehmenden Östrogenkonzentration im Verlauf der Trächtigkeit bzw. nach Verabreichung des Östrogen-Vorläufers Androstendion (14, 15).

Die Arbeitsgruppe um Funder (151) stellte keine Hemmwirkung von Östrogenen auf die 11 $\beta$ -HSD Typ II der Rattenniere fest, im Gegenteil, es wurde eine Aktivitätszunahme in den Nieren männlichen Ratten nach Gabe von Östrogenen ermittelt.

Die Heterogenität der Ergebnisse weist auf erhebliche geschlechts- und artenspezifische Unterschiede, sowie auf dosis- und zeitabhängige Phänomene hin.

#### 1.6.5.3 Schilddrüsenhormone

Die Verabreichung von Schilddrüsenhormonen provozierte im Tiermodell mit männlichen Ratten eine Verminderung der Aktivität und mRNA-Expression der 11 $\beta$ -HSD in der Leber. Entsprechende Befunde konnten mit Hypophysengewebe *in vivo*, nicht aber *in vitro* festgestellt werden (174). Auch für die Wirkung von Schilddrüsenhormonen war ein geschlechtsspezifischer Dimorphismus der Leber erkennbar. Nach Thyreoidektomie stieg die 11 $\beta$ -HSD-Aktivität der Leber in weiblichen Ratten, fiel aber bei männlichen Ratten (95). Innerhalb der Gen-Promotorregion der 11 $\beta$ -HSD wurden Sequenzen gefunden, die Östrogen- bzw. Thyroidhormon-Response-Elementen ähnlich waren (110). Andere Arbeitsgruppen stellten bei Versuchen *in vitro* keinen Einfluss von Schilddrüsenhormonen auf die 11 $\beta$ -HSD-Aktivität fest (77, 127, 151).

#### 1.6.5.4 Insulin

Eine Vielzahl von Arbeiten beschreiben im Tiermodell *in vivo* und *in vitro* eine zeit- und dosisabhängige Hemmung der 11 $\beta$ -HSD durch Insulin (67, 101, 137, 168). Diese Ergebnisse sind konsistent mit der Beobachtung, dass die Zufuhr von Kohlenhydraten zu einem anti-natriuretischen Effekt führt, der wahrscheinlich auf einer direkten Hemmung von Insulin auf die 11 $\beta$ -HSD Typ II beruht (137). Versuche mit kultivierten Rattenhepatozyten zeigten eine Insulin-

induzierte Verminderung der 11 $\beta$ -HSD Typ I-Expression, bei allerdings nahezu unveränderter Aktivität (77).

#### 1.6.6 Angiotensin II

Im Tierversuch an Ratten wurde nach Verabreichung von Angiotensin II eine Verringerung der 11 $\beta$ -HSD-Aktivität in der Niere beobachtet (138).

#### 1.6.7 Retinolsäuren

In Versuchen mit einer humanen Chorionkarzinom-Zell-Linie (JEG-3 Zell-Linie) wurde eine dosisabhängige Aktivitätserhöhung und vermehrte Transkription der 11 $\beta$ -HSD Typ II festgestellt, wenn diese mit den Vitamin A-Metaboliten all-trans Retinolsäure und 9-cis Retinolsäure in physiologischen Konzentrationen inkubiert wurden (164).

#### 1.6.8 Eicosanoide

Bei neueren Untersuchungen mit der JEG-3 Zell-Linie zeigte sich eine dosisabhängige Hemmung der 11 $\beta$ -HSD Typ II durch Prostaglandin-E<sub>2</sub>, Prostaglandin-F<sub>2a</sub> und Leukotrien B<sub>4</sub> (68).

Hingegen wurde in kultivierten Choriontrophoblasten eine dosisabhängige Aktivierung der reduktiven 11 $\beta$ -HSD Typ I-Aktivität unter dem Einfluss von Prostaglandin-F<sub>2a</sub> festgestellt (9).

#### 1.6.9 NO-System

Nitroxide bewirken in Versuchen mit humanem Plazenta-Kulturen eine verminderte Aktivität und mRNA-Expression der 11 $\beta$ -HSD Typ II in Trophoblasten-Kulturen. Auf die Aktivität der 11 $\beta$ -HSD Typ I in Chorion-Zellkulturen hatten Nitroxide keinen Einfluss (159).

#### 1.6.10 Zyklische Nukleotide

Die Aktivierung der Adenylatzyklase durch Forskolin hat in humanen Chorion-Zellkulturen ebenfalls eine Aktivierung der 11 $\beta$ -HSD Typ II und eine vermehrte mRNA-Expression zur Folge (159). Auch für den cGMP-Pfad gibt es Hinweise auf eine aktivierende Wirkung auf die 11 $\beta$ -HSD Typ II in Chorion-Zellkulturen (158).



### 1.6.11 Medikamente

Über das nicht-steroidale Antiphlogistikum Toradol (137) liegen Untersuchungen vor, die Hinweise für einen inhibitorischen Effekt auf die 11 $\beta$ -HSD liefern, ebenso wie für den Hemmstoff der Steroid-Biosynthese Metyrapon (134).

Weiterhin zeigt Furosemid in therapeutischen Serum-Konzentrationen zwischen 10-60 mmol/l eine nachweisliche Hemmwirkung auf die 11 $\beta$ -HSD (53, 183), wohingegen Bumetanid, ein anderes Schleifendiuretikum, keine Wirkung auf die 11 $\beta$ -HSD zeigt. Die Hemmung der 11 $\beta$ -HSD Typ II könnte ein zusätzlicher Mechanismus sein, der zu einer, im Vergleich zu Bumetanid, erhöhten K<sup>+</sup>-Depletion bei der Behandlung mit Furosemid führt.

Die Ergebnisse mit Toradol, Insulin und Ethanol sind konsistent mit der Hypothese, dass die anti-natriuretischen Effekte mit entsprechenden Volumenretentionen bei Gabe dieser Substanzen zumindest zum Teil in der Hemmung der 11 $\beta$ -HSD Typ II der Niere begründet sind (137).

Im Tierversuch mit Ratten kam es zu einer Aktivitätszunahme der renalen 11 $\beta$ -HSD nach Verabreichung der ACE-Hemmer Captopril und Ramipril (138).

### 1.6.12 Ethanol

Die Ergebnisse über den Einfluss von Ethanol auf die 11 $\beta$ -HSD sind uneinheitlich. Valentino et al. (166) berichten von einer Hemmung beider Isoenzyme der 11 $\beta$ -HSD *in vivo* und *in vitro* bei Versuchen mit Ratten, wobei die Hemmung der renalen 11 $\beta$ -HSD Typ II zu z.T. klinischen Konsequenzen führte (erhöhte Corticosteron-Plasmakonzentration, verringertes Urin/Zeit-Volumen bei verminderter Plasma-Aldosteronkonzentration und geringerer Flüssigkeitsaufnahme der Tiere).

Der vermutete Hemm-Mechanismus besteht in einer mittelbaren Hemmung der 11 $\beta$ -HSD durch die Verschiebung des Redox-Potentials und einem resultierenden, verminderten NADPH/NADP-Verhältnis in den Leberzellen.

Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* mit Nierengewebe der Ratte bestätigen die Hemmung der 11 $\beta$ -HSD Typ II (137). Andere Untersuchungen konnten keinen nachweislichen Effekt von Ethylalkohol auf die 11 $\beta$ -HSD feststellen (26).

### 1.6.13 Pflanzenextrakte

Es sind einige Flavonoiden mit hemmender Wirkung auf die Aktivität der 11 $\beta$ -HSD beschrieben. So hemmt das Flavonoid Naringenin, das in Grapefruitsaft enthalten ist, die 11 $\beta$ -HSD in Nieren-Mikrosomen des Meerschweinchens (183), Leber-Mikrosomen der Ratte (97) und in humanen Nieren-Mikrosomen (152).

Gossypol ist Bestandteil des in Asien zum Kochen verwendeten Baumwoll-Öls. Aus klinischen Studien ist bekannt, dass diese Substanz bei Männern zur Sterilität mit gleichzeitigem Auftreten von schweren Hypokaliämien führt. Diese Effekte sind in einer nachgewiesenen Hemmung der 11 $\beta$ -HSD begründet (131, 145, 152).

Für das chinesische Phytotherapeutikum Saibuku-To wurde ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die 11 $\beta$ -HSD festgestellt (70). Dabei konnte von den 5

in Saibuku-To enthaltenen Pflanzenextrakten mit Wirkung auf die 11 $\beta$ -HSD, neben der bekannten Glycyrrhetinsäure (siehe Kapitel 1.6.1), die Substanz Magnolol aus der *Magnolia officinalis* identifiziert werden. Magnolol wies, abgesehen von Glycyrrhetinsäure, die stärkste Hemmpotenz, mit einer IC<sub>50</sub>-Konzentration von  $1,8 \cdot 10^{-4}$  mol/l für die 11 $\beta$ -HSD Typ I in Versuchen mit Homogenaten der Rattenleber, auf.

#### 1.6.14 Glycyrrhetic acid-like factors (GALFs)

Morris et al. (114) gelang es aus dem Urin schwangerer Frauen Substanzen zu isolieren, die bei *in vitro*-Versuchen eine hemmende Wirkung auf die 11 $\beta$ -HSD und 5 $\beta$ -HSD zeigten.

Diese Substanzen, die bei ihrer Entdeckung chemisch nicht identifiziert werden konnten, wurden als **glycyrrhetic acid-like factors** (GALFs) bezeichnet.

Die zunächst angenommene physiologische Relevanz dieser Substanzen als endogene Hemmstoffe der 11 $\beta$ -HSD im Zusammenhang mit der Schwangerschaftshypertonie, der essentiellen Hypertonie oder dem ektopen ACTH-Syndrom bestätigte sich bei weiteren Untersuchungen aber nicht (170).

#### 1.7 Darstellung von Reaktionshemmungen durch die Auftragung nach Lineweaver-Burk

Die Geschwindigkeit (bio-)chemischer Reaktionen wird durch die Enzymkinetik beschrieben. Diese wissenschaftliche Disziplin wurde 1913 begründet, als Michaelis und Menten erstmals eine allgemeine Theorie entwickelten, die Geschwindigkeit, Reaktionskonstante und Konzentrationen der beteiligten Reaktionspartner in Bezug zueinander setzten.

Bei der Beschreibung chemischer Reaktionen sind die maximale Geschwindigkeit ( $V_{max}$ ) und die Michaelis-Konstante ( $K_m$ ) bedeutsam.  $V_{max}$  beschreibt die Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms, wenn Substratsättigung vorliegt, d.h., wenn die Substratkonzentration so hoch gewählt wurde, dass das Enzym vollständig als Enzym-Substrat-Komplex vorliegt.

Da sich die Substratkonzentration asymptotisch einem Wert nähert, bei dem die maximale Reaktionsgeschwindigkeit vorliegt und deshalb nur schwer zu bestimmen ist, wird diejenige Konzentration ermittelt, bei der das Enzym nur zur Hälfte substratgesättigt ist und mit halbmaximaler Geschwindigkeit umgesetzt. Mit Hilfe dieser Substratkonzentration, Michaelis-Konstante genannt, können wichtige Aussagen über die Substrataffinität des Enzyms gemacht werden: Bei hoher Affinität des Enzyms ist die Substratkonzentration, die zur Halbsättigung des Enzyms benötigt wird, entsprechend klein, d.h. ein niedriger  $K_m$ -Wert ist Ausdruck einer hohen Affinität für das jeweilige Substrat.

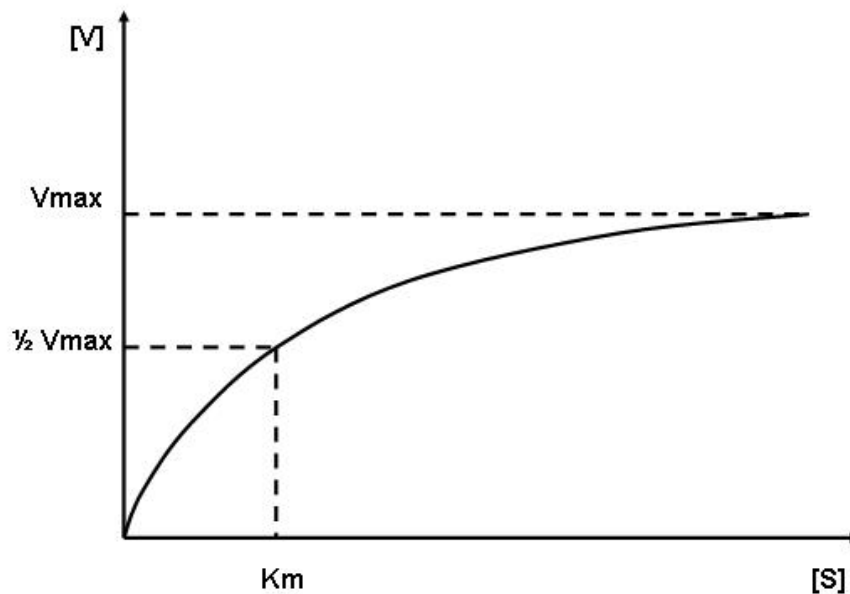


Abb. 1.5: Darstellung einer Michaelis-Menten-Kurve. Bei steigenden Substratkonzentrationen [S] kommt es zu einem Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit [V] mit der asymptotischen Näherung an die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ). Eingetragen ist die Michaelis-Konstante ( $K_m$ ), die einer Substratkonzentration entspricht, bei der das Enzym halbesättigt ist und eine halb-maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $\frac{1}{2} V_{max}$ ) vorliegt.

Die Bestimmung von  $V_{max}$  und  $K_m$  wird wesentlich erleichtert durch die Darstellung nach Lineweaver-Burk, der eine Umformung der Gleichung von Michaelis-Menten zugrunde liegt.

Bei der reziproken Auftragung von Reaktionsgeschwindigkeit ( $1/V$ ) gegen die Substratkonzentration ( $1/S$ ) erhält man eine Gerade, die die Ordinate im Punkt  $1/V_{max}$  und die Abzisse im Punkt  $-1/K_m$  schneidet.

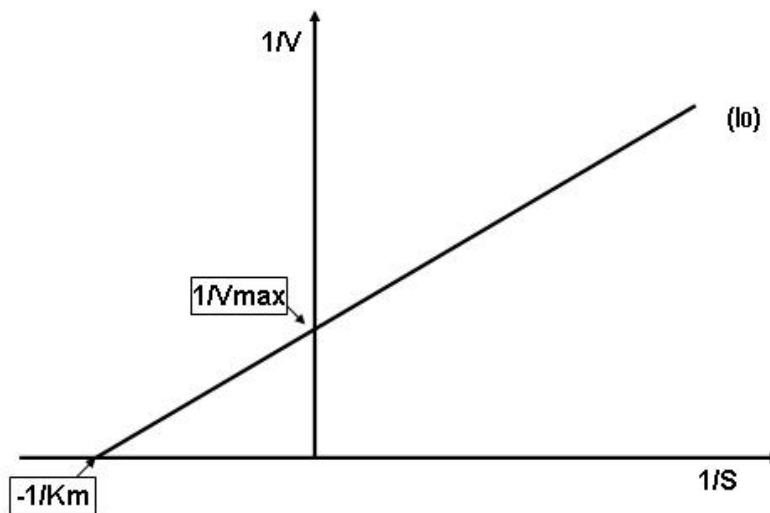


Abb. 1.6: Darstellung einer chemischen Reaktion nach Lineweaver-Burk. Die Substratkonzentration (Abzisse) und die Reaktionsgeschwindigkeit (Ordinate) sind reziprok aufgetragen. Die Reaktionsgerade ermittelt  $1/V_{\max}$  bei ihrem Durchgang durch die Ordinate und  $-1/K_m$  bei ihrem Auftreffen auf der Abzisse.

Bei der Hemmung enzymatischer Reaktionen wird grundsätzlich zwischen dem reversiblen und irreversiblen Hemmtyp unterschieden. Irreversible Hemmungen findet man häufig bei Vergiftung.

Eine wesentliche Rolle spielen die reversiblen Hemmungen, die im Folgenden dargestellt werden.

- **Kompetitive Inhibition:** Der Hemmstoff ist aufgrund seiner Struktur dem Substrat ähnlich und bindet daher, wie das Substrat, reversibel an das katalytische oder „aktive Zentrum“ des Enzyms.

Der Hemmstoff kann nicht oder langsamer umgesetzt werden und blockiert das aktive Zentrum für das eigentliche Substrat. Substrat und Hemmstoff konkurrieren um das aktive Zentrum durch die Verdrängung des jeweilig Anderen, daher der Ausdruck „kompetitive Hemmung“.

Durch Zugabe von mehr Substrat kann die Reaktionsgeschwindigkeit wieder bis zur maximalen Geschwindigkeit erhöht werden.

Daher bleibt  $V_{\max}$  für die gehemmte und ungehemmte Reaktion gleich, während die Michaelis-Konstante der gehemmten Reaktion vermindert ist. Bei der Auftragung nach Lineweaver-Burk sind diese Charakteristika direkt der Grafik zu entnehmen.

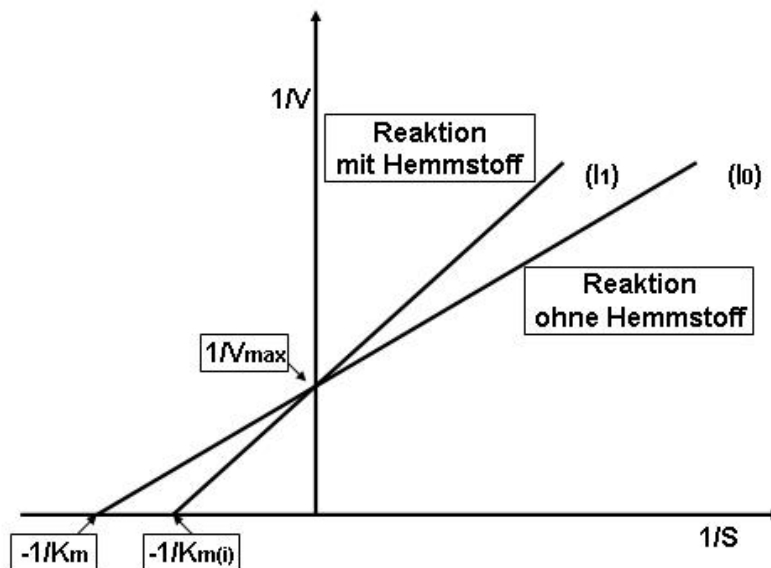


Abb. 1.7: Kompetitiver Hemmtyp bei Auftragung nach Lineweaver-Burk.  
 Abzisse: reziproke Auftragung der Substratkonzentration ( $1/S$ ).  
 Ordinate: reziproke Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit ( $1/V$ ).  
 Der gemeinsame Abzissen-Durchgang markiert den  $1/V_{\max}$ -Wert, der Ordinaten-Durchgang entspricht dem jeweiligen  $-1/K_m$ -Wert.

- Nicht-kompetitive oder allosterische Hemmung: Der Hemmstoff bindet ausserhalb des aktiven Zentrums an das Enzym, dem sogenannten "allosterischen Zentrum". Dies bewirkt eine Veränderung der Enzymstruktur und damit seiner enzymatischen Eigenschaften.  
 Neben allosterisch wirkenden Hemmstoffen gibt es auch Aktivatoren, die nach dem allosterischen Prinzip förderlich auf die Reaktionsgeschwindigkeit wirken.  
 Bei der allosterischen Hemmung bleibt der  $K_m$ -Wert der gehemmten Reaktion gleich, während  $V_{\max}$  vermindert ist. Wieder sind bei der Auftragung nach Lineweaver-Burk diese Werte direkt aus der Grafik abzulesen.

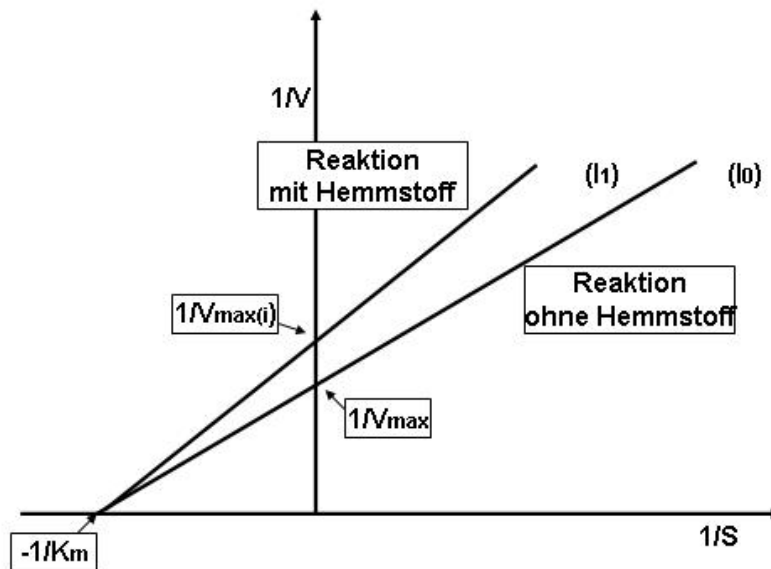


Abb. 1.8: Nicht-kompetitiver Hemmtyp bei Auftragung nach Lineweaver-Burk.  
 Abzisse: reziproke Auftragung der Substratkonzentration ( $1/S$ )  
 Ordinate: reziproke Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit ( $1/V$ )  
 Der Ordinaten-Durchgang markiert den jeweiligen  $1/V_{\max}$ -Wert, der gemeinsame Abzissen-Durchgang entspricht dem gemeinsamen  $-1/K_m$ -Wert.

- Unkompetitive Hemmung: Bei diesem Hemmtyp bindet der Hemmstoff nur an den Enzym-Substrat-Komplex und nicht an das freie Enzym. Dabei wird der Enzym-Substrat-Komplex nicht oder nur langsam umgesetzt. Typischerweise sind sowohl  $K_m$  wie auch  $V_{\max}$  der gehemmten Reaktion vermindert. Bei der Auftragung nach Lineweaver-Burk stellt sich die gehemmte Reaktion als Parallele zur ungehemmten Reaktion dar.

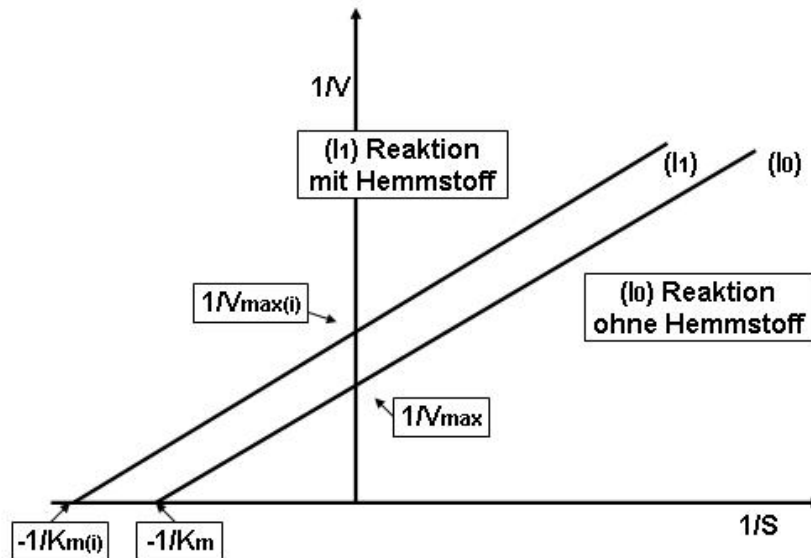


Abb. 1.9: Unkompetitiver Hemmtyp bei Auftragung nach Lineweaver-Burk.  
 Abzisse: reziproke Auftragung der Substratkonzentration ( $1/S$ )  
 Ordinate: reziproke Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit ( $1/V$ )  
 Der Ordinaten-Durchgang markiert den jeweiligen  $1/V_{\max}$ -Wert, der Abzissen-Durchgang entspricht dem jeweiligen  $-1/K_m$ -Wert.

- Darüber hinaus finden sich Reaktionshemmungen, die keinem der drei dargestellten Hemmtypen zuzuordnen ist und wahrscheinlich Mischformen darstellen.