

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung in das Thema

Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit dem Glukokortikoidmetabolismus des Meerschweinchens. Dieser wird entscheidend durch die 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD) beeinflusst. Hierbei handelt es sich um ein Enzym der "short-chain alcohol dehydrogenase"-Superfamilie, welches die reversible Umwandlung von 11-Hydroxy-Steroiden (z.B. Kortisol) in ihre 11-Keto-Formen (z.B. Kortison) katalysiert (siehe auch Abbildung 2). Da lediglich die 11-Hydroxy-Steroide, nicht aber die Keto-Formen am Rezeptor aktiv sind, trägt die 11 $\beta$ HSD entscheidend zur Spezifität der Steroidhormonwirkung bei [1, 2].

Glukokortikoide (GK) spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase, vor allem in Stresssituationen [72]. Das Hauptglukokortikoid des Meerschweinchens ist wie auch beim Menschen das Kortisol (F), welches unter der Kontrolle von hypothalamisch beziehungsweise hypophysär produziertem corticotropin releasing hormone (CRH) beziehungsweise adrenocorticotropem Hormon (ACTH) aus den Nebennieren sezerniert wird. Beim Menschen sind über 95% des F in der Zirkulation an Proteine, v.a. an das Kortisol-bindende Globulin (CBG) gebunden, wobei lediglich der freie ungebundene Anteil biologisch aktiv ist [3, 4].

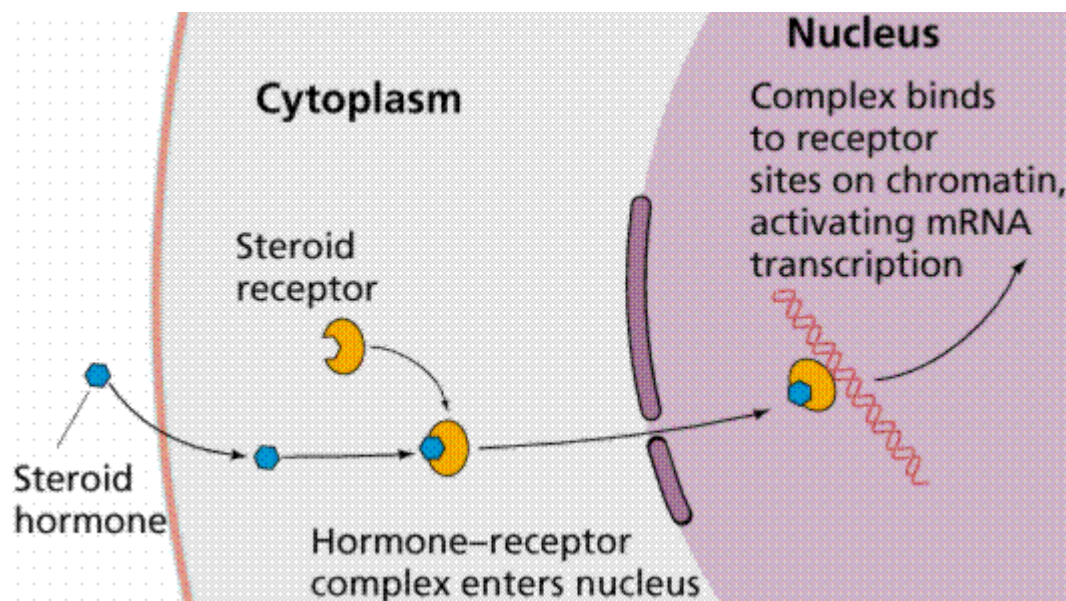
### 1.1.1 Anomalien der hypophysär-adrenalen Achse des Meerschweinchens

Beim Meerschweinchen bestehen hinsichtlich der hypophysär-adrenalen Achse verschiedenste Anomalien im Vergleich zu anderen Spezies [5]. Unter anderem weist das Meerschweinchen sehr hohe Kortisolspiegel im Plasma auf [6, 7] bei gleichzeitig niedriger Affinität von F zum CBG [8]. Dies erhöht den Anteil an freiem F im Plasma zusätzlich, wobei der Anteil an freiem F beim Meerschweinchen bei ungefähr 10 % liegt und damit deutlich höher als beim Menschen. Neben dem CBG übernehmen bei dieser Spezies vielmehr unspezifische Plasmaproteine die Rolle als Trägerproteine, so dass im Gegensatz zum Menschen das CBG des Meerschweinchens nur eine untergeordnete Rolle spielt [7].

Diesen erhöhten Kortisolwerten liegen nicht etwa erhöhte ACTH-Spiegel zu Grunde, sondern eine durch Punktmutation mit Austausch einer einzigen Aminosäure ausgelöste erhöhte Bioaktivität des ACTH-Moleküls ("Superagonist") [9,10]. Dies ist vermutlich die grundlegende Veränderung in der hypophysär-adrenalen Achse des Meerschweinchens.

Schließlich besitzt der bereits geklonte [11] Glukokortikoidrezeptor (GK-R) des Meerschweinchens eine stark veränderte Affinität zu seinem Liganden. Im Vergleich zur Maus zeigt der GK-R des Meerschweinchens eine ungefähr 20-fach verminderte Affinität zu Dexamethason, im Vergleich zum menschlichen GK-R ist die Affinität sogar ungefähr 40-fach vermindert [12]. Dieses Verhältnis ist auch beim physiologischen Liganden F ähnlich, was dazu führte, das Meerschweinchen als eine kortisolresistente Spezies zu bezeichnen [11].

### 1.1.2 Wirkungsmechanismus der Glukokortikoide



**Abbildung 1.** Genomische Wirkung der Steroidhormone. (Quelle: World Wide Web [13])

Die klassische (=genomische) Wirkung der Steroidhormone wird über intrazellulär bindende Hormonrezeptoren im Zytoplasma der Zielzelle vermittelt (Abbildung 1). GK-R finden sich in nahezu allen Geweben des Säugetierorganismus [72]. Der inaktive GK-R ist an einen Eiweißkomplex ("heat-shock-Proteine") gebunden und löst sich nach Bindung des Hormons an den Rezeptor ab. Diese Dissoziation des Eiweißkomplexes führt zu einer Translokation in das nukleäre Kompartiment. Dort kann der nun aktive GK-R als Transkriptionsfaktor mit

DNA-Sequenzen innerhalb der regulatorischen Bereiche von bestimmten Genen interagieren. Diese Interaktion verändert die Transkriptionsrate und führt somit zu einer Induktion oder Repression von glukokortikoid-responsiblen Genen und deren Genprodukten [14].

Die Empfindlichkeit von Zellen und Geweben für GK wird durch eine Reihe von Faktoren bestimmt [15]. Wie viel "hormonelle Aktivität" durch GK auf die Rezeptoren einer Zelle übermittelt wird, hängt vor allem davon ab, wie viele Hormon-Rezeptor-Komplexe sich in der Zelle bilden. Dies kann prinzipiell durch drei verschiedene Veränderungen reguliert werden.

Erstens und das ist seit langem bekannt, kommt es durch bestimmte Reize zu einer vermehrten Ausschüttung des Hormons aus dem hormonproduzierenden Gewebe, der endokrinen Drüse und damit zu einer Erhöhung der Hormonkonzentration im Blut.

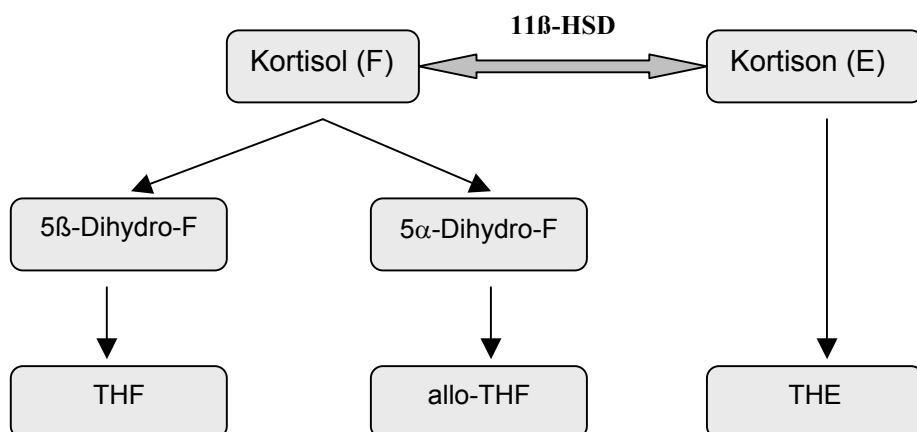
Zweitens kann der Rezeptor im Zielgewebe quantitativ oder in seiner "Aktivität" verändert werden. In nahezu allen Zellen lässt sich der GK-R nachweisen, obgleich die Zahl der Rezeptoren in den verschiedenen Geweben variiert. Hierzu gibt es Hinweise im Rattenversuch, wo gezeigt werden konnten, dass es nach länger dauernder experimenteller Stresssituation zu einem Anstieg des GK-R im Zytosol der Leber kommt. [16] Andere Befunde sprechen dafür, dass der Rezeptor offenbar auch einer Down-Regulation durch GK selber ausgesetzt ist [17]. Die Down-Regulation der GK-R Expression, Aktivität und Halbwertszeit wird vermutlich durch Phosphorylierung reguliert [18, 19]. Dies stellt zweifelsohne einen wichtigen Mechanismus in der Wirkung der GK auf die Zielzelle dar.

Drittens, und das ist wesentlicher Teil dieser Untersuchung, kommt es zu einer Modulation des Angebots an aktivem Hormon am Wirkort, d.h. dem Rezeptor. Dies geschieht entweder durch verminderte Inaktivierung von F oder vermehrte Aktivierung von E, dem inaktiven GK. Wie entscheidend diese "Enzymebene" ist, wurde in Knock-out-Versuchen deutlich. Diese zeigten, dass es ohne aktivierendes Enzym (=11 $\beta$ HSD1) praktisch zu einer Aufhebung der metabolischen GK-Wirkung kommt, trotz kompensatorischen Hyperplasie der Nebennieren [42]. Insofern ist eine Veränderung der 11 $\beta$ HSD Aktivität ein physiologisch äußerst bedeutsamer Regulationsmechanismus und macht deutlich, dass man trotz hoher Serumspiegel eines Hormons keinen Rückschluss auf den wirklichen Effekt an der Zielzelle ziehen darf.

Neben der oben beschriebenen klassischen genomischen Wirkung der Steroidhormone hat sich in den letzten 15 Jahre allmählich herausgestellt, dass es auch noch eine nicht-

genomische Wirkung, vor allem innerhalb des Nervengewebes gibt [20,21,22]. Diese Effekte werden durch membranständige Rezeptoren, hauptsächlich den GABA Typ A -Rezeptor vermittelt [23]. Liganden hierfür sind vor allem 3-hydroxy- $\Delta^5$ -Steroide, aber auch Progesteron und seine Metabolite [24]. Neben den durch den GABA-Rezeptor vermittelten psychischen Effekten scheinen auch endokrine regulatorische Effekte zu resultieren [25,26], obgleich noch nicht abzuschätzen ist, ob diese Erkenntnisse auch eine physiologische Bedeutung für die Wirkung der GK haben.

### 1.1.3 Metabolismus der Glukokortikoide



**Abbildung 2.** Metabolismus von Kortisol durch 11 $\beta$ -HSD. Umwandlung von Kortisol und Kortison durch 11 $\beta$ -Dehydrogenase/11-Oxoreduktase Aktivität. Reduktion des A-Ring von Kortisol durch 5 $\alpha$ -Reduktase oder 5 $\beta$ -Reduktase führt zum 5 $\alpha$ - bzw. 5 $\beta$ -Dihydrokortisol. Reduktion an Position 3 durch die 3 $\alpha$ -HSD führt zum THF bzw. allo-THF. Reduktion des A-Rings an Position 5 und 3 von Kortison führt zum Tetrahydrokortison (Modifiziert nach [3]). THF = 5 $\beta$ -Tetrahydrokortisol; allo-THF = 5 $\alpha$ -Tetrahydrokortisol; THE = 5 $\beta$ -Tetrahydrokortison

Der Metabolismus von F ist in Abbildung 2 dargestellt. Hervorgehoben ist die Stellung der 11 $\beta$ -HSD als Katalysator für die Umwandlung von F in das am GK-R inaktive Kortison (E) und umgekehrt. Die Reduktion der C4-C5 Doppelbindung von F kann entweder durch die 5 $\beta$ -Reduktase oder die 5 $\alpha$ -Reduktase durchgeführt werden, woraus dann 5 $\beta$ -Dihydro-F bzw. 5 $\alpha$ -Dihydro-F entsteht [27]. Normalerweise überwiegen die 5 $\beta$ -Metabolite (5 $\beta$ :5 $\alpha$  = 2:1). Der

Metabolismus des E geschieht ausschließlich durch die 5 $\beta$ -Reduktase [85]. Anschließend entstehen durch Reduktion an Position 3 durch die 3 $\alpha$ -HSD 5 $\beta$ -Tetrahydrokortisol (THF), 5 $\alpha$ -Tetrahydrokortisol (alloTHF) und 5 $\beta$ -Tetrahydrokortison (THE), die rasch an Glukuronsäure konjugiert und mit dem Urin ausgeschieden werden [28].

Ungefähr 50% des sezernierten F beim Menschen erscheint im Urin als THF/alloTHF und THE, ca. 25% als Kortol und Kortolon (entsteht durch Reduktion von THF/alloTHF bzw. THE an Position 20 durch die 20-HSD), ca. 10% als cortolic und cortolonic acid (durch Oxidation von Kortol/Kortolon an Position 21), ca. 10% als C17 Keto-Steroide (durch die 17-20 Desmolase) und nur circa 5% als freie, unkonjugiertes Steroide, davon ungefähr 0,5% als freies F [29].

#### **1.1.4 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 (11 $\beta$ -HSD1)**

Bislang wurden zwei Isoformen der 11 $\beta$ -HSD charakterisiert, die sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften stark unterscheiden und daher als zwei verschiedene Enzyme betrachtet werden können.

Die 11 $\beta$ -HSD1 ist *in vitro* eine NADP(H)-abhängige funktionelle Oxidoreduktase mit geringerer Affinität zu GK bei einem  $K_m$ -Wert im mikromolaren Bereich [33,30]. Dieses Isoenzym ist bereits bei verschiedenen Spezies kloniert worden, darunter auch beim Menschen [31, 32] und kürzlich beim Meerschweinchen [33]. Bei Letzterem zeigte sich dabei eine 71-74%ige Sequenzhomologie im Vergleich mit dem Enzym anderer Säugetiere. Die mRNA der 11 $\beta$ -HSD1 ließ sich in allen untersuchten Geweben des Meerschweinchens nachweisen, allerdings fanden sich größere Mengen von mRNA nur in Leber, Niere und den Nebennieren.

Im Gegensatz zur bidirektionalen Aktivität dieses Enzyms in Gewebehomogenaten und Mikrosomenfraktionen der Leber [34] zeigt sich bei intakten Zellen verschiedener Gewebe und bei Versuchen mit intakter perfundierter Leber vorwiegend eine 11 $\beta$ -Reduktion [35,36,37,38], so dass man *in vivo* von einer ausschließlichen Reduktaseaktivität der 11 $\beta$ -HSD1 ausgeht [39].

Das Enzym ist im Organismus weit verbreitet [31] und man nimmt an, dass die 11 $\beta$ -HSD1 die aktive Glukokortikoidkonzentration in den Zielzellen reguliert. Diese Hypothese wurde durch

die Koexpression von GK-R und 11 $\beta$ -HSD1 noch untermauert [40]. Da es durch eine gesteigerte 11 $\beta$ -HSD1-Aktivität zu erhöhten Konzentrationen des aktiven Glukokortikoids in den Geweben kommt, werden dem Enzym regulatorische Einflüsse zugeschrieben, die in Tabelle 1 aufgeführt sind. Außerdem ist das Enzym auch am Metabolismus von nicht-steroidalen Substanzen beteiligt (Leber, Lunge; Tabelle 1).

**Tabelle 1.** Biologische Wirkungen der 11 $\beta$ -HSD1 Aktivität [modifiziert nach 41]

<b>Gewebe</b>	<b>Biologische Wirkung</b>	<b>Literatur</b>
Leber	Hauptort der GK-Bildung aus 11-Keto-Metaboliten.	[42]
	Stimuliert Enzyme der Glukoneogenese Detoxifikation von nicht-steroidalen Xenobiotika	[43]
Omentales Fettgewebe	Verstärkte Differenzierung der Adipozyten in omentalem Fettgewebe	[35]
Gehirn	Hemmt den Glukoseverbrauch	[44]
Testis	Schützt Testosteronproduktion in Leydig-Zellen vor hemmender Wirkung aktiver GK (Oxidaseaktivität)	[45, 46]
Lunge	Entgiftung von tabakspezifischen Nitrosaminen	[47]
Ovarien	Verhindert die in-vitro Fertilisation und den Embryotransfer	[48]
Gefäßsystem	Hemmt Prostacyclinbildung in aortalen Endothelzellen. Verstärkt den Effekt von Adrenalin	[49,50]
Betazellen des Pankreas	Hemmt die Insulinsekretion	[51]

### 1.1.5 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11 $\beta$ -HSD2)

Die 11 $\beta$ -HSD2 findet sich in der Plazenta und in Zellen, die den Mineralokortikoidrezeptor (MK-R) exprimieren: Tubuli und Sammelrohre der Niere, Kolonepithel und in den Gängen der Speicheldrüsen [52]. Mit endogenen GK als Substrat arbeitet die 11 $\beta$ -HSD2 ausschließlich als Dehydrogenase mit einem  $K_m$ -Wert im nanomolaren Bereich, wohingegen mit 9 $\alpha$ -fluorierten Steroiden als Substrat das Enzym hauptsächlich eine Reduktase ist [53,54, 55]. Weitere Charakteristika der 11 $\beta$ -HSD2 sind die Präferenz für NAD(H) als Kosubstrat, die starke Endprodukthemmung durch 11-Dehydro-GK [56] und die Fähigkeit, Dexamethason zu oxidieren [57, 55]. Die Hauptfunktion der 11 $\beta$ -HSD2 ist die Protektion des unselektiven MK-R, der *in vitro* gleichstarke Affinitäten zu F und Aldosteron aufweist [58]. Da dieses Isoenzym im MK-Zielorgan große Mengen des aktiven F in das inaktive E umwandelt, wohingegen es Aldosteron nicht metabolisieren kann, erlaubt es die Bindung des wesentlich niedriger konzentrierten Aldosteron an den MK-R und vermittelt somit die Aldosteronselektivität [59, 60].

## **1.2 Zielsetzung der Arbeit**

Nach Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe ergaben sich Hinweise, dass die Leber unter Stressbedingungen vermehrt inaktives E zu F reduziert, vermittelt durch eine Aktivitätszunahme der 11 $\beta$ HSD1. Diese Hypothese, gestützt von der Vorstellung, dass dieses Enzym eine Regulationsfunktion für die GK-Wirkung ausübt, sollte durch Untersuchungen an Gewebeschnitten von Meerschweinchen nach ACTH-Injektion geprüft werden. Wir konzentrierten uns dabei auf die zwei Organe mit der höchsten Expression von 11 $\beta$ -HSD1: Leber und Niere.

Zudem wurde in verschiedenen Geweben des Meerschweinchens mittels Homogenaten eine Charakterisierung hinsichtlich des 11 $\beta$ HSD-Enzymmusters und des Kortisolmetabolismus durchgeführt.