

1 Einleitung

Die Hormone der Familie der Corticosteroide, bestehend aus den in der Nebennierenrinde gebildeten Glucocorticoiden (GC), Mineralocorticoiden (MC) und den in den Gonaden und Nebennieren gebildeten Sexualhormonen, haben vielfältige Einflüsse auf Organsysteme und Stoffwechselfunktionen des Menschen.

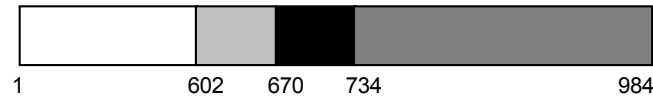
Aldosteron als Mineralocorticoid hat im Zusammenspiel mit seinem zugehörigen Rezeptor, dem Mineralocorticoidrezeptor (MR) eine entscheidende Funktion zur Aufrechterhaltung der Elektrolyt- und Wasserhomöostase.

Diese Arbeit befasst sich mit den Interaktionen der Vertreter der drei Corticosteroidgruppen mit dem Mineralocorticoidrezeptor und den Mechanismen, die eine Selektivität des Mineralocorticoidrezeptors, insbesondere gegenüber Progesteron und seinen Metaboliten, vermitteln.

1.1 Die Rezeptorfamilie der Corticosteroide

Der menschliche Mineralocorticoidrezeptor (hMR) gehört zur Familie der intrazellulär bindenden Hormonrezeptoren[40]. Rezeptoren dieser Familie, zu der neben den Steroidhormonrezeptoren auch die Schilddrüsenhormonrezeptoren und der Calcitriol-Rezeptor gehören, stellen aktivierbare Transkriptionsfaktoren dar, die ihre Hormonwirkung durch die Steuerung der Expression von Genen entfalten.

Der hMR besteht aus vier Domänen, denen spezifische Funktionen und Eigenschaften zugeordnet werden können[40, 146]. Die N-terminale Domäne (NTD) stellt eine konstitutiv aktive Transaktivierungsdomäne dar, gefolgt von der DNA-Bindungsdomäne (DBD), die über zwei Zink-Finger die DNA-Bindung und die Dimerisierung des Rezeptors vermittelt. Die C-terminal-ständige Ligandenbindungsdomäne (LBD) ist über die Hinge-Region mit der DNA-Bindungsdomäne verbunden. Die LBD besitzt eine komplexe Tertiärstruktur, die sich aus α -Helices und β -Faltblatt-Strukturen zusammensetzt und Funktionen wie die Liganden-Bindung, die Bindung an die Hitzeschockproteine (HSP), die Dimerisierung des Rezeptors, die Wanderung in den Zellkern sowie die hormonabhängige Transaktivierung vermittelt[163]. Abbildung 1.1 stellt den Aufbau des hMR schematisch dar.



weiß = N-terminale Domäne (NTD) hellgrau = DNA-Bindungsdomäne (DBD)

schwarz = Hinge-Region

dunkelgrau = Ligandenbindungsdomäne (LBD)

Zahlen = Aminosäure-Positionen

Abbildung 1.1: schematische Darstellung des menschlichen Mineralocorticoidrezeptors

Der hMR liegt in der Zelle im nicht aktivierten Zustand im Cytosol[130, 89] an Hitzeschockproteine (HSP) gebunden vor[29]. Nach Aktivierung des hMR durch die Bindung von Aldosteron in der Ligandenbindungsdomäne (LBD) kommt es zu einer Konformationsänderung[145], die vermutlich das Abdissoziieren der Hitzeschockproteine bewirkt und nach Dimerisierung des Rezeptors und der anschließenden Wanderung in den Zellkern die hormonabhängige Transaktivierung vermittelt, wobei dies durch die Bindung des Rezeptors an cis-ständige DNA-Elemente in der Regulatorregion bestimmter Gene, sogenannter Hormon-responsibler Elemente (HRE) bewirkt wird[88, 86].

Die Charakterisierung der Sequenz und der Funktionen der einzelnen Domänen des hMR basiert auf der hohen Sequenzhomologie unter den Zellkernrezeptoren[7]. Eine Zuordnung der Funktionen zu bestimmten Domänen ist nur eingeschränkt möglich, da die Funktion des Rezeptors anhand von verkürzten Mutanten in Zellmodellen untersucht wurde, die den komplexen Vorgang der Assoziation mit cytosolischen Proteinen nicht oder nur unzureichend erfassen[29] bzw. aus dem 3D-Modell des Progesteronrezeptors abgeleitet wurde[43].

1.2 Lokalisation und Funktion des Mineralocorticoidrezeptors

Die historische Vorstellung, dass der menschliche Mineralocorticoidrezeptor (hMR) nur in Epithelzellen einzelner Organe exprimiert wird, wurde in den vergangenen Jahren stark erweitert. Zwischenzeitlich wurde der hMR in vielen menschlichen Geweben nachgewiesen, wobei die Funktion der Rezeptoren in diesen Geweben zum Großteil noch unklar ist. Tabelle 1.1 stellt die bisher beim Menschen identifizierten Gewebe dar, die den hMR exprimieren.

Table 1.1: Lokalisation des humanen Mineralocorticoidrezeptors (hMR)

Organ	Arbeitsgruppe (Jahr), ggf. Gewebe
Auge	Mirshahi M et al. (2001) [100] Cornea Stokes J et al. (2000) [142] Cornea und Ciliarepithel
Blut	Mirshahi M et al. (2000) [99] Proerythroblasten-Leukämie
Milz	Armanini D et al. (1988) [6] T- und B-Lymphozyten
Gehirn	Seckl JR (1991) [133] Gyrus dentatus, Hippocampus Watzka M et al. (2000) [153] Hippocampus
Magen	Kato K et al. (1999) [72] Parietalzellen des Fundus
Duodenum	Hirasawa G et al. (1997) [63]
Jejunum	Hirasawa G et al. (1997) [63]
Ileum	Fukushima K et al. (1994) [49] Hirasawa G et al. (1997) [63] Rafestin-Oblin ME et al. (1984) [119] terminales Ileum
Colon	Hirasawa G et al. (1997) [63] Fukushima K et al. (1991) [48] Colon ascendens Rafestin-Oblin ME et al. (1984) [119]
Rectum	Epple HJ et al. (1995) [39]
Drüsen	Hirasawa G et al. (1997) [63] Analdrüsen, Ösophageale Drüsen Sasano H et al. (1992) [130] Speicheldrüsen
Pancreas	Sasano H et al. (1992) [130]
Haut	Hirasawa G et al. (1997) [63] Schweißdrüsen Kenouch S et al. (1994) [73] Keratinozyten, Schweißdrüsen, Haarfollikel Sasano H et al. (1992) [130] Schweißdrüsen
Herz	Lombes M et al. (1995) [87] Kardiomyozyten
Knochen	Beavan S et al. (2001) [13] Osteoblasten und Ostoklasten
Leber	Paillard J et al. (1980) [112]
Lunge	Hirasawa G et al. (1997) [63] Alevolarzellen Typ II
Respiratorischer Trakt	Hirasawa G et al. (1997) [63] Sammelrohr der Tracheal- und Bronchialdrüsen und Ciliarepithelzellen
Mamma	Sasano H et al. (1997) [129] Sasano H et al. (1992) [130] duktales Epithelzellen
Niere	Fukushima K et al. (1991) [48] Fuller PJ et al. (1976) [50] Hirasawa G et al. (1997) [63] distaler Tubulus, dicke aufsteigende Henle'sche Schleife, Sammelrohr Matulich DT et al. (1976) [95] Rundle SE et al. (1989) [124] distaler Tubulus, Sammelrohr Sasano H et al. (1992) [130]
Placenta	Hirasawa G et al. (2000) [64] Syncytiotrophoblasten, Cytotrophoblasten

Im Gegensatz zu den Glucocorticoiden, die mit vielfältigsten Organwirkungen in Zusammenhang gebracht werden können, scheint die wesentliche Funktion des Aldosterons die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts im Wasser- und Elektrolythaushalt und die damit verbundene Regulation des Blutdrucks zu sein [38], wobei die Verteilung des Rezeptors in einer Vielzahl von Geweben die Beteiligung an anderen Funktionen nahe legt.

Die wesentliche Aldosteronwirkung an der klassischen Zielzelle, den Zellen der Sammelrohre im Mark- und Rindbereich, dem dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife in der Niere und im Colon[90] besteht in einer Steigerung der apikalen Permeabilität für Na^+ -Ionen, wodurch ein Na^+ -Einstrom hervorgerufen wird[54]. Diese Permeabilitätssteigerung wird zum Teil durch die Transkription und Translation zweier Gene, die für zwei Untereinheiten (βENaC und γENaC) des epithelialen Natrium-Kanals (ENaC) kodieren, erreicht[147, 54].

Zur Zeit werden weitere Mechanismen diskutiert, die eine schnellere Aldosteronantwort vermitteln könnten. Neben der gesteigerten Synthese des ENaC wird die Existenz weiterer Aldosteron-induzierter Proteine (AIP) immer wahrscheinlicher. Aldosteroninduzierte Proteine könnten unter anderem durch posttranslationale Modifizierung des Kanals entweder dessen Offenwahrscheinlichkeit steigern oder aber die Anzahl der Kanäle in der Zellmembran durch längere Verweildauer oder durch vermehrten Einbau intrazellulär gespeicherter Kanäle erhöhen. Verschiedene Mechanismen werden diskutiert:

Methylierung

Ein Mechanismus der schnellen Aldosteronantwort könnte die posttranslationale Carboxymethylierung des Kanals durch eine Carboxymethyltransferase, die im Sinne eines aldosteroninduzierten Proteins (AIP) exprimiert wird, darstellen. Bei einem Versuch an Amphibiennierenzellen (A6-Zellen) konnte eine aldosteroninduzierte GTP-abhängige Steigerung der Methylierung von Lipiden und Proteinen nachgewiesen werden[54], wobei der Nachweis einer aldosteroninduzierten Methylierung an Säugetierzellen bisher nicht gelungen ist[46].

Phosphorylierung

Die Phosphorylierung des ENaC stellt eine weitere posttranslationale Modifikation dar, die zu den Mechanismen einer schnellen Aldosteronantwort gezählt wird. Durch das antidiuretische Hormon (ADH) wird cAMP/Proteinkinase A-vermittelt eine Phosphorylierung induziert, die eine gesteigerte Anzahl von ENaC in der Zellmembran zur Folge hat, wobei unklar bleibt, ob dies durch eine Phosphorylierung des ENaC oder des Zytoskeletts vermittelt wird[54].

Serum- und glucocorticoidregulierte Kinase (SGK)

Die Aktivierung des MR (bei Amphibien glucocorticoidvermittelt) führt in Amphibiennierenzellen (A6-Zellen) innerhalb von 15 Minuten zur vermehrten Expression einer Serin-Thyreonin-Kinase, die als Serum- und glucocorticoidregulierte Kinase (SGK)

bezeichnet wird[27]. Auch in Rattennierenzellen konnte eine aldosteronvermittelte Expression der SGK gezeigt werden[27]. Die Aktivierung der SGK erfolgt mittels Phosphorylierung durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase)[113], deren Aktivität durch die 3-Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinasen 1 und 2 gesteuert wird[74]. Dies deutet auf eine mögliche Verbindung zur G-Protein-vermittelten Signaltransduktion der Wachstumsfaktoren hin[122]. Das Substrat der SGK konnte bisher noch nicht eindeutig ausgemacht werden, jedoch bestehen Hinweise auf eine mögliche SGK-vermittelte Phosphorylierung der β ENaC- und γ ENaC-Untereinheiten[136].

Nedd4-2

Nedd4-2 (neuronal precursor cell-expressed, developmentally down regulated) wurde ursprünglich in neuronalen Zellen identifiziert[76]. Nedd4-2 enthält eine kalziumabhängige Ligandenbindungsdomäne (C2/CalB), bis zu vier Protein-Protein-Interaktionsdomänen (WW-Domänen) und eine Ubiquitin-Protein-Ligase-Domäne (HECT)[1, 70]. Nach Bindung der ENaC-Untereinheit durch die WW-Domäne wird durch die Ubiquitin-Protease-Domäne die α - oder γ -Untereinheit des ENaC ubiquitinyliert und dadurch dem proteosomalen Abbau zugeführt[139, 70]. Bei Mutationen der β ENaC-Untereinheit im Bereich der Nedd4-2-Bindungsstelle kann es durch ausbleibende Ubiquitinylierung zu einer längeren Verweildauer in der Zellmembran mit daraus resultierendem Pseudoaldosteronismus kommen (Unterform des Liddle-Syndroms)[152]. Bei hohen extrazellulären Natriumkonzentrationen wird die ENaC-Aktivität vermindert, wobei eine Beteiligung von Nedd4-2 an diesem Prozess beschrieben wurde[36]. Welche Rolle Nedd4-2 im Bezug auf die aldosteronabhängige ENaC-Aktivität unter physiologischen Bedingungen spielt, kann jedoch noch nicht abschließend bewertet werden.

1.3 Cortisol, Progesteron und Aldosteron am Mineralocorticoidrezeptor

In den klassischen Aldosteron-Zielzellen der Niere wird der hMR fast nur durch Aldosteron aktiviert. Dies erscheint zunächst verwunderlich, wenn man die folgenden experimentell bestimmten Eigenschaften von Corticosteroiden am MR betrachtet:

- Cortisol als Hauptvertreter der beim Menschen vorkommenden Glucocorticoide zeigt *in vitro* eine mit Aldosteron vergleichbare hohe Affinität zum in transfizierten Nierenzellen exprimierten hMR[125].
- Cortisol zeigt am in transfizierten Affennierenzellen exprimierten hMR eine hohe agonistische Aktivität[7].
- Cortisol zeigt eine etwa um den Faktor 10 höhere Affinität zum hMR als zu seinem eigenen Rezeptor, dem hGR[125].

Unter physiologischen Bedingungen liegen die Glucocorticoide im Plasma im Vergleich zu Aldosteron in einer bis etwa 100fach höheren Konzentration vor. Die Plasmakonzentration des freien Cortisols beträgt in etwa 10-50nmol/l, da ca. 90% an Plasmaproteine wie CBG (Cortisol-bindendes Globulin) und Albumin gebunden ist, wohingegen Aldosteron zu 30% ungebunden im Plasma vorliegt und sich Plasmakonzentrationen für freies Aldosteron von 60 - 300pmol/l einstellen. Daher müsste der hMR unter diesen Bedingungen durch Glucocorticoide überschwemmt werden und die durch Aldosteron vermittelte Elektrolyt- und Wasserhomöostase entscheidend gestört werden.

Der Protektionsmechanismus des hMR vor Glucocorticoiden ist inzwischen weitgehend geklärt[51, 35]. Für die Bindung an den hMR und an den hGR ist die 11 β -Hydroxylgruppe im Steroidgerüst von tragender Bedeutung[45]. Im Gegensatz zum Cortisol zeigt das 11-Keto-Produkt Cortison nur eine sehr geringe Affinität zum hMR und hGR[11, 52]. Die Inaktivierung durch 11 β -Oxidation wird von der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11 β -HSD Typ 2) bewerkstelligt[3, 140] wohingegen die 11 β -HSD Typ 1 die Aktivierung[67, 149] durch 11 β -Reduktion vermittelt.

Da die 11 β -HSD Typ 2 in MC-Zielzellen wie Niere, Colon und Speicheldrüsen koexprimiert wird[155], kann durch den hier erfolgenden gezielten lokalen Metabolismus der MR vor Cortisol durch dessen Umwandlung in Cortison geschützt werden (Abbildung 1.2).

Eine Abbau von Aldosteron durch die 11 β -HSD Typ 2 wird durch die Ausbildung eines 11,18- oder 11,20-Hemiacetalrings verhindert.

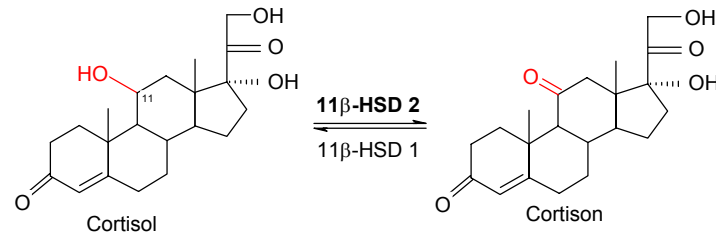


Abbildung 1.2: Inaktivierung von Cortisol zu Cortison durch die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11 β -HSD Typ 2)

Auch die bekannten pharmakologischen Eigenschaften des Progesterons stehen zur beobachteten Selektivität des hMR in einem scheinbaren Widerspruch:

- Zum in Affennierenzellen exprimierten hMR bzw. aus Gewebe isolierten und aufgereinigten hMR zeigt Progesteron eine höhere Affinität als Aldosteron[126, 106].
- Progesteron zeigt im Transfektionsmodell an Affennierenzellen bei einer geringen intrinsischen Aktivität eine hohe antagonistische Potenz am hMR[138].
- Die antagonistische Potenz des Progesterons stellt sich größer dar als die des als Antimineralocorticoid genutzten Spironolactons[151].

Da während der Lutealphase des Menstruationszyklus Progesteronkonzentrationen im Plasma von 30 bis 110 nmol/l beobachtet werden und während der Schwangerschaft die kontinuierlich steigenden Progesteronkonzentrationen im Plasma im dritten Trimenon Werte von 320 bis 700 nmol/l erreichen[69, 123], während die Aldosteronkonzentrationen in dieser Zyklusphase und in der Schwangerschaft nur gering steigen (Aldosteronkonzentration im Plasma 0,6 bzw. 5,8nmol/l)[108], scheint auch hier die fortbestehende Aldosteronfunktion unter diesen Bedingungen paradox. Abbildung 1.3 stellt den dargestellten Sachverhalt schematisch dar.

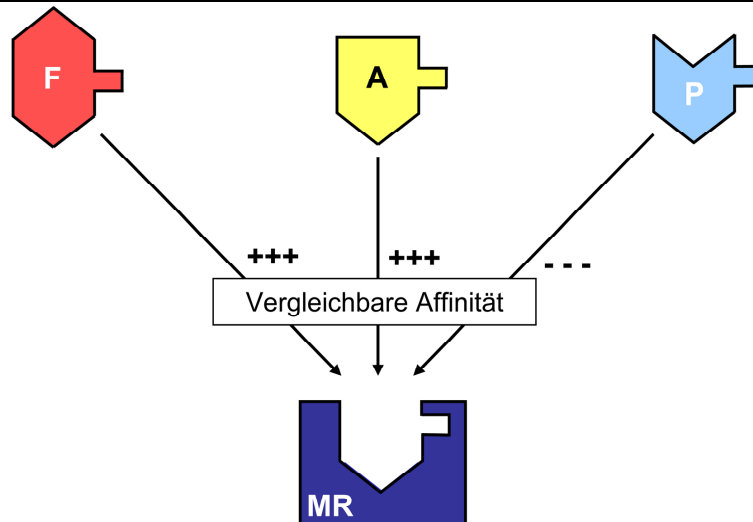


Abbildung 1.3: Affinität von Cortisol (F), Aldosteron (A) und Progesteron (P) zum menschlichen Mineralocorticoidrezeptor (MR)

(Darstellung der intrinsischen Aktivität: +++ = hohe agonistische Aktivität, --- = hohe antagonistische Aktivität)

Der Mechanismus der Protektion des MR vor Progesteron ist bisher nicht abschließend geklärt. Es existieren verschiedene Erklärungsansätze, die eine mehr oder weniger tragende Rolle für das Phänomen der Selektivität des MR haben könnten:

- Progesteron liegt im Plasma nur zu einem sehr geringen Anteil ungebunden vor. Etwa 95 bis 97% des Progesterons liegen an Plasmaproteine gebunden vor, wohingegen Aldosteron zu 37% ungebunden vorliegt und somit in die Zelle diffundieren kann, um hier eine Wirkung zu vermitteln[37].
- Die Halbwertszeit des Aldosteron-MR-Komplexes *in vitro* beträgt etwa 600min, wohingegen die Halbwertszeit des Progesteron-MR-Komplexes mit nur 45min angegeben wird[138].
- Progesteron wird in Aldosteron-Zielzellen zum schwachen Mineralocorticoid 11-Desoxycorticosteron (DOC) umgewandelt. DOC kann im Sinne eines autokrinen bzw. parakrinen Mechanismus die Progesteronwirkung partiell antagonisieren, wobei die Bedeutung dieses Mechanismus von der Konversionsrate abhängig ist[22].
- Die 11 β -HSD Typ 2 inaktiviert Cortisol zu Cortison. Eine Hemmung der 11 β -HSD Typ 2 hat somit eine verminderte Inaktivierung zur Folge, d. h. mehr Cortisol kann an

den MR binden und ihn aktivieren. Eine derartige Hemmung der 11 β -HSD Typ 2 konnte für Progesteron und einige seiner Metabolite *in vitro* gezeigt werden[118].

Ein weiterer möglicher tragender Mechanismus könnte in Analogie zur Protektion des MR vor Glucocorticoiden die lokale Metabolisierung von Progesteron zu inaktiven Metaboliten sein (Abbildung 1.4). Da sich diese Arbeit mit genau diesem Themenkomplex befasst, werden im folgenden Kapitel 1.4 die hierzu bisher bekannten Fakten ausführlicher dargestellt.

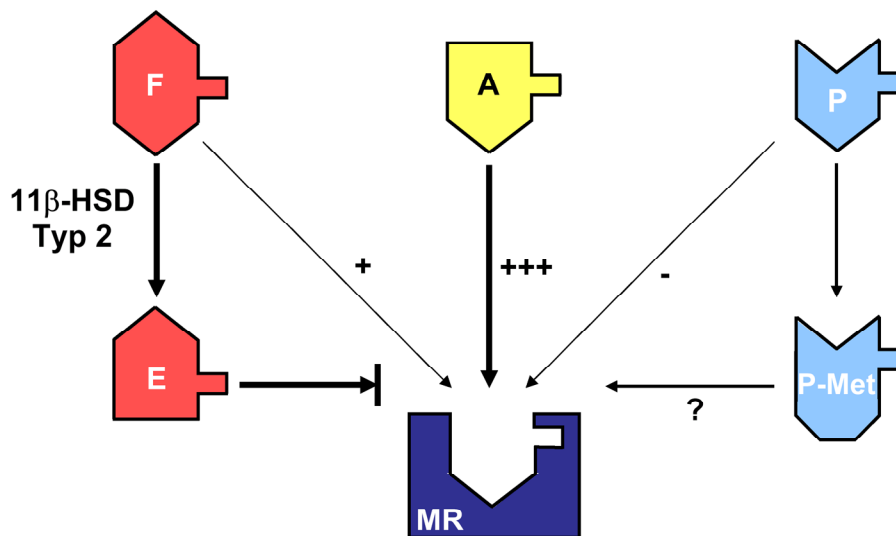


Abbildung 1.4: Mechanismen der Selektivität des menschlichen Mineralocorticoidrezeptors (MR) gegenüber Cortisol (F) und Progesteron (P) durch lokale Metabolisierung.

Darstellung der intrinsischen Aktivität: + = agonistische Aktivität, - = antagonistische Aktivität

1.4 Progesteronmetabolite

1.4.1 Progesteronmetabolismus

Da der Mensch das dem Progesteron zugrunde liegende lipophile Steroidgerüst nicht abbauen kann, wird es durch Hydroxylierung in verschiedensten Positionen und anschließende Konjugation mit Sulfat oder Glykosylierung mit Glucuronsäure metabolisiert. An der Metabolisierung sind neben der Leber auch extrahepatische Gewebe beteiligt. Ein Problem im Rahmen der Analyse des Progesteronmetabolismus ist die im Darm erfolgende Spaltung des Steroidgerüsts durch Darmbakterien. So konnte in Studien, in denen Probanden

[¹⁴C]Progesteron i.m. verabreicht wurde, nur 40% der verabreichten Radioaktivität in Molekülen identifizierbarer Progesteronmetabolite gefunden werden; der überwiegende Anteil von etwa 60% liegt in kleineren Molekülfragmenten vor, die eine Analyse der ursprünglich gebildeten Metabolite unmöglich machen[25].

Im folgenden werden die bisher beschriebenen Wege des Progesteronmetabolismus dargestellt.

1.4.1.1 Hepatischer und extrahepatischer Progesteronmetabolismus

5β-Reduktion von Progesteron

Progesteron wird hepatisch durch 5β-Reduktion und anschließende 3α/β-, sowie 20α-Reduktion zu 5β-Pregnanolonen (= 3α/β,5β-TH-Progesteron, = 5β-Pregnan-3-ol,20-on) und 5β-Pregnandiolen (=3α/β,5β-TH,20α-DH-Progesteron, = 5β-Pregnan-3,20-diol) umgewandelt und anschließend glucuronidiert[91] (Abbildung 1.5). Durch die Konjugation mit Glucuronsäure steigt die Wasserlöslichkeit dieser Metabolite, sie werden daher gut über den Urin ausgeschieden. Der auf dieser Tatsache beruhende Effekt, dass im Urin fast ausschließlich 5β-reduzierte Progesteronmetabolite nachgewiesen werden können, führte zu der falschen Vermutung, dass die 5β-Reduktion den Hauptabbauweg des Progesterons darstellt. Nur etwa 25% des Progesterons unterliegen jedoch der 5β-Reduktion[91].

5α-Reduktion von Progesteron

Sowohl in der Leber als auch in vielen anderen extrahepatischen Geweben wird Progesteron zu 5α-DH-Progesteron und weiter über 3α/β- und 20α-Reduktion zu 5α-Pregnanolonen (= 3α/β,5α-TH-Progesteron, = 5α-Pregnan-3-ol,20-on,) und 5α-Pregnandiolen (=3α/β,5α-TH,20α-DH-Progesteron = 5α-Pregnan-3,20-diol) metabolisiert[91] (Abbildung 1.6). In der Schwangerschaft kann man im Blut hohe Konzentrationen von 5α-DH-Progesteron, 5α-Pregnanolonsulfat (= 3α/β,5α-TH-Progesteronsulfat, = 5α-Pregnan-3-ol,20-onsulfat) und 5α-Pregnandiolsulfat (= 3α/β,5α-TH, 20α-DH-Progesteronsulfat, = 5α-Pregnan, 3,20α-diolsulfat), hingegen nur niedrige von 5β-DH-Progesteronderivaten beobachten[98]. Die 5α-reduzierten sulfurylierten Progesteronmetabolite werden primär biliär eliminiert und intestinal mikrobiell weiter abgebaut[77].

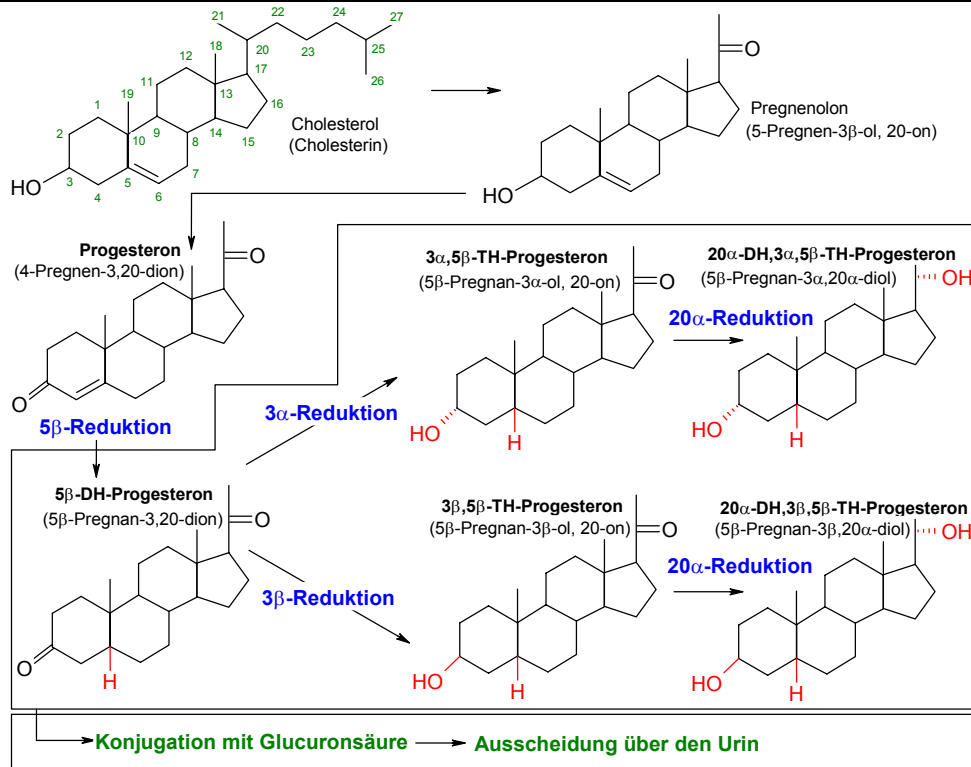


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der überwiegend hepatischen 5β-Reduktion

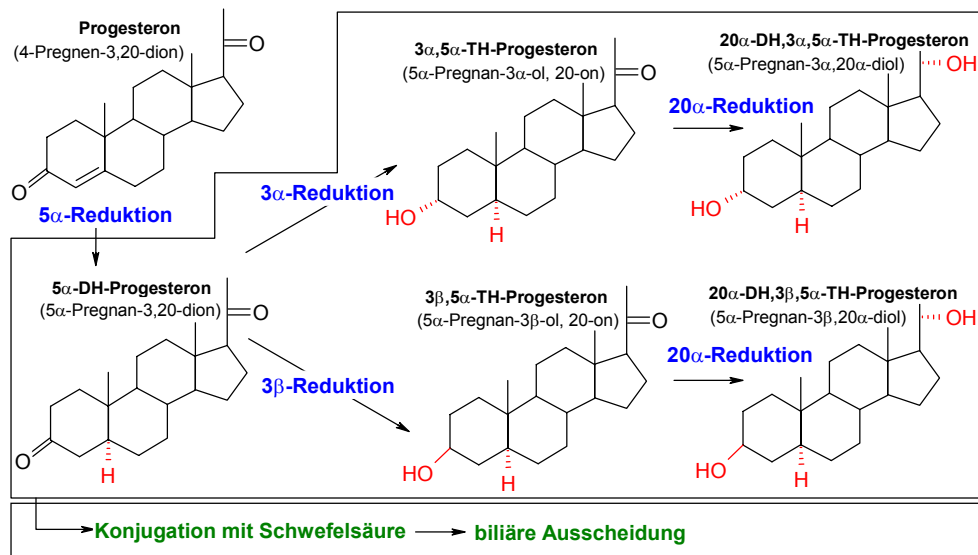


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der überwiegend extrahepatischen 5α-Reduktion

Im extrahepatischen Gewebe stellt die 5α- und die 20α-Reduktion den Hauptabbauweg dar. Etwa 65% des Progesterons unterliegen einer 5α-Reduktion[10, 5].

Weitere Metabolismuswege

Bisher wurden in der menschlichen Leber neben der oben beschriebenen 3α -Reduktion[16, 92, 148, 157], 3β -Reduktion[128], 5α -Reduktion[127], 5β -Reduktion[16, 58, 92, 148, 157], 20α -Reduktion[16, 58, 92, 128, 148, 157], 20β -Reduktion[58] und 21 -Reduktion[143] Dehydrogenaseaktivitäten für 2β -Reduktion[143], 6β -Reduktion[58, 143], 15α -Reduktion[143], 16α -Reduktion[58, 85, 92, 128, 143] und 17α -Reduktion[92, 128, 143] von Progesteron und –metaboliten nachgewiesen.

Quantitativ scheinen neben der $5\alpha/5\beta$ -Reduktion, $3\alpha/\beta$ -Reduktion, $20\alpha/20\beta$ -Reduktion die 6β -Reduktion und die 16α -Reduktion von geringerer Bedeutung zu sein [91].

21-Hydroxylierung von Progesteron

Die 21-Hydroxylierung stellt keine Metabolisierung im klassischen Sinn dar, da sie ein Syntheseschritt im Rahmen der Bildung von Cortisol und Aldosteron darstellt (Abbildung 1.7). In der Schwangerschaft treten im Blut der Mutter ($500\text{-}3.500\text{ng/l} = 1,51 - 10,6\text{nmol/l}$) und im Blut des Fetus ($1.500\text{-}6.000\text{ng/l} = 4,5 - 18,2 \text{ nmol/l}$) Desoxycorticosteronkonzentrationen (DOC) auf[108, 17], die 20 bis 100fach höher sind als bei Männern oder Frauen in der ersten Zyklushälfte ($25\text{-}50\text{ng/l} = 0,08 - 0,15 \text{ nmol/l}$)[114]. Gegen die Annahme, dass das gebildete DOC ACTH-abhängig in der Nebennierenrinde gebildet wird, spricht die Tatsache, dass andere ACTH-abhängige Nebennierenrindenprodukte wie Cortisol im Blut nicht erhöht sind[33] und sich die DOC-Konzentration nicht durch Gabe von Dexamethason (im Sinne eines Hemmtestes) supprimieren lassen[108]. Inzwischen wurde gezeigt, dass DOC extraadrenal durch 21-Hydroxylierung aus Progesteron entsteht, wobei die Reaktion nicht durch die adrenale 21-Hydroxylase katalysiert wird und der Ort der Umwandlung bei der Mutter als die Mineralocorticoid-Zielgewebe ausgemacht wurde[159]. Die hohen DOC-Konzentrationen im Nabelschnurblut des Fetus lassen sich durch adrenale und extraadrenale 21-Hydroxylaseaktivität in Haut, Niere und Harnblase sowie in geringerer Stärke auch in Pankreas, Thymus, Milz und Gonaden erklären[24]. Da DOC mineralocorticoide Eigenschaften zeigt, ist diese Tatsache im Hinblick auf eine mögliche Antagonisierung der antimineralocorticoiden Effekte des Progesterons von besonderem Interesse. Die Konversionsrate scheint jedoch großen interindividuellen Schwankungen zu unterliegen[160]. Der Anteil am Gesamtprogesteronmetabolismus wird mit $0,1 - 3\%$ beschrieben[91].

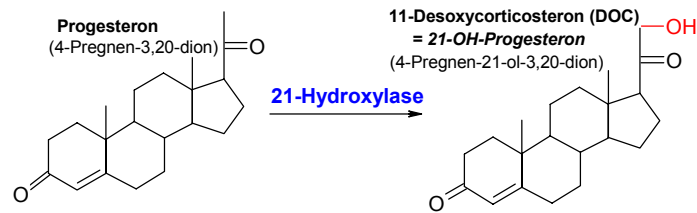


Abbildung 1.7: Bildung von 11-Desoxycorticosteron (DOC) aus Progesteron

1.4.1.2 Renaler Progesteronmetabolismus

Angeichts der Tatsache, dass Progesteron die unter 1.3 beschriebene hohe Affinität zum MR aufweist, ist der Metabolismus von Progesteron in der Niere als klassisches MC-Zielgewebe von besonderem Interesse.

Bei in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten *in vitro* Inkubationen von aus Nierengewebe gewonnenen subzellulären Fraktionen (Mikrosomen, Cytosol, Mitochondrien, Kernfraktion) bzw. Nierenzellhomogenaten mit [^{14}C]Progesteron und Cosubstraten konnte eine lokale Metabolisierung unter den gegebenen experimentellen Bedingungen von Progesteron bis zu >50% gezeigt werden.

In der männlichen und postmenopausalen weiblichen Niere konnten als Hauptmetabolite in der Cytosolfraktion 20α -DH-Progesteron sowie in der Mikrosomenfraktion 17α -OH-Progesteron und 17α -OH, 20α -DH-Progesteron nachgewiesen werden. In geringerem Ausmaß konnte Ring-A-Reduktion (5α -Reduktion und 3β -Reduktion) dargestellt werden. Im Nierenzellhomogenat einer weiblichen prämenopausalen Frau stellte sich die 20α -Reduktion als Hauptabbauweg dar, gefolgt von 5α -Reduktion und in geringen Mengen von 5β - und 3α -Reduktion[118, 117].

Zur weiteren Charakterisierung des renalen Progesteronmetabolismus erfolgte in unserer Arbeitsgruppe der Nachweis möglicher steroidmetabolisierender Enzyme auf transkriptionaler und translationaler Ebene. Ein Nachweis der mRNA-Expression von Genprodukten mit sehr hoher Homologie zu den veröffentlichten Sequenzen bzw. identischer Sequenz erfolgte für die 17α -Hydroxylase/17,20-Lyase (P450c17), die Aldoketoreduktase (AKR) 1C1 (= 20α -HSD), die AKR1C2 (3α -HSD Typ 3), die AKR1C3 (17β -HSD Typ 5, 3α -HSD-Typ 2), die 3β -HSD Typ 2, die 5α -Reduktase Typ 1 und die 5β -Reduktase[18]. Abbildung 1.8 stellt zusammenfassend den hier beschriebenen Metabolismus von Progesteron in der menschlichen Niere dar.

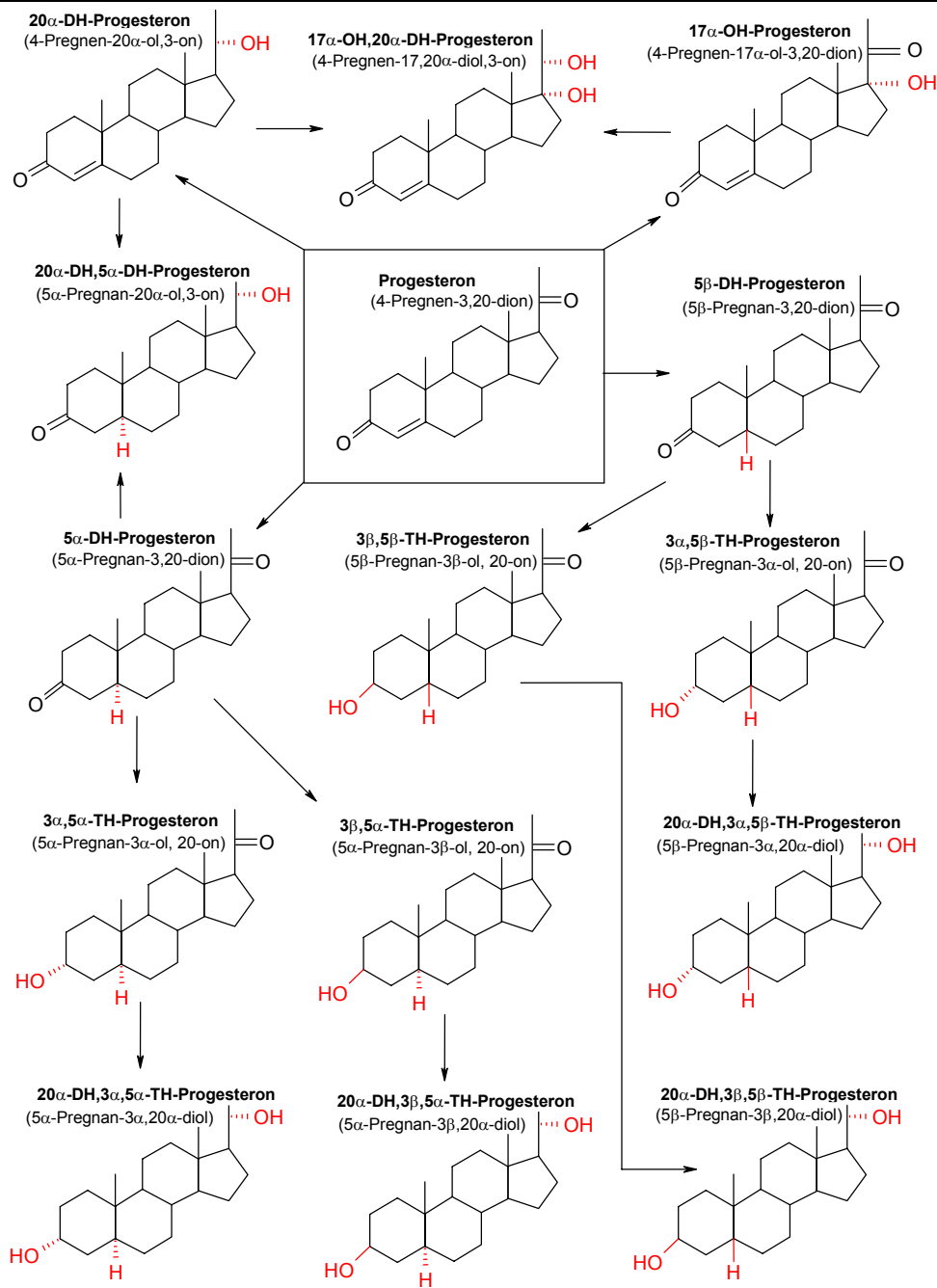


Abbildung 1.8: Progesteronmetabolismus in der menschlichen Niere

Neben den hier dargestellten Hauptmetabolismuswegen des Progesterons wurde bisher außerdem in der Literatur eine geringe 6β-Dehydrogenaseaktivität in der adulten menschlichen Nierenrinde[2] sowie 6β-Reduktion und 16α-Reduktion in fetalem Nierengewebe [16] beschrieben.

1.4.2 Biologische Aktivität der Progesteronmetabolite

Die Entdeckung, dass Testosteron im Androgen-Zielgewebe durch die 5α -Reduktase in die wirksamere Form des 5α -DH-Testosterons überführt wird[156], führte dazu, die klassische Vorstellung von der Metabolisierung im Sinne einer (ausschließlichen) Inaktivierung zu überdenken.

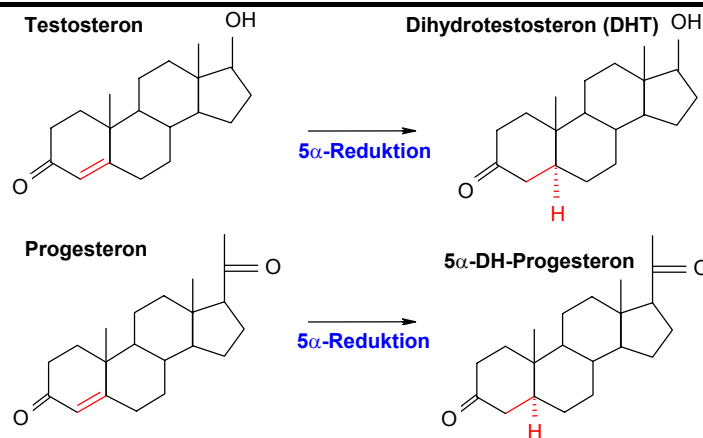


Abbildung 1.9: 5α -Reduktion von Testosteron und Progesteron

Die zunächst naheliegende Vermutung, dass in Analogie zum Testosteron die 5α -reduzierte Form des Progesterons, das 5α -DH-Progesteron (Abbildung 1.9) die eigentlich aktive Substanz am Progesteronrezeptor darstellt, hat sich nicht bewahrheitet. 5α -DH-Progesteron bindet mit wesentlich geringerer Affinität als Progesteron an den Progesteronrezeptor[66].

Jedoch werden einigen Progesteronmetaboliten Wirkungen zugeschrieben, die nicht über den Progesteronrezeptor (PR) vermittelt werden. Diese werden im folgenden Kapitel 1.4.2.1 dargestellt. Im Anschluss daran werden im Kapitel 1.4.2.2 gesondert im Bezug auf die Fragestellung dieser Arbeit die bisherigen Erkenntnisse über das Bindungsverhalten von Progesteronmetaboliten am Mineralocorticoidrezeptor zusammengefasst.

1.4.2.1 PR-unabhängige biologische Aktivität von Progesteronmetaboliten

Bereits vor über 50 Jahren wurden Wirkungen auf verabreichtes Progesteron bei Versuchstieren und beim Menschen beobachtet, die zunächst unerklärbar schienen[135]. Inzwischen wird deutlich, dass unter anderem gebildete Progesteronmetabolite über verschiedene PR-unabhängige Mechanismen diese Effekte vermitteln.

- Eine der ersten Beobachtungen bereits im Jahr 1941 war die, dass Progesteronmetabolite (und andere Steroidhormonmetabolite) nach parenteraler Gabe beim Menschen eine **anästhetische Wirkung** entfalten[135]. Inzwischen sind einige Progesteronmetabolite bzw. dem Progesteron verwandte Substanzen bekannt, die hypnotisch wirken. Neben dem $3\alpha,5\beta$ -TH-Progesteron sind dies außerdem 21-Hydroxy, 5β -DH-Progesteron (=21-Hydroxy- 5β -pregnan-3,20-dion, als Viadril um 1955 als Hypnotikum beim Menschen in Verwendung) und 5α -Pregnan, 3α -ol, $11,20$ -dion (= Alphaxalone, wirksame Substanz des gegen 1971 eingeführten Anästhetikums Althesin)[65]. Auf Grund anaphylaktischer Reaktionen auf den Lösungsvermittler Cremophor sind beide Präparate nicht mehr auf dem Markt. Alle drei Substanzen weisen eine starke hypnotische Wirkung beim Menschen auf, für $3\alpha,5\beta$ -TH-Progesteron konnte bei Mäusen eine etwa 3fach stärkere anästhetische Wirkung als für Thiopental gezeigt werden[65].
- Eine **anxiolytische Wirkung** konnte im Tierversuch an Mäusen für $3\alpha,5\alpha$ -TH-DOC (= $3\alpha,21$ -dihydroxy- 5α -pregnan-20-one)[32] und weitere 5α -Pregnanerivate des Progesterons[93] gezeigt werden.
- Im Hinblick auf die Krampfbereitschaft wurden sowohl **antikonvulsiv** wirkende Progesteronmetabolite, wie das $3\alpha,5\alpha$ -TH-Progesteron bei der Maus ausgemacht[14], als auch verstärkte Krampfbereitschaft durch die Verabreichung anderer Pregnanerivate des Progesterons bei der Ratte beobachtet[107].
- Für einige Progesteronmetabolite konnte gezeigt werden, dass sie die **Gonadotropin-** und die **Dopaminsekretion** der Ratte beeinflussen[164, 120].
- Weitere Arbeiten stellten den Einfluss einiger 5β -Pregnanerivate auf die **uterine Relaxation** der Ratte dar[59].
- 5α -DH-Progesteron scheint beim Menschen eine **Refraktärität gegenüber Angiotensin II** in der Schwangerschaft zu vermitteln[41].
- Für einige 5β -DH-Progesteronderivate konnte beim Menschen eine **pyrogene Wirkung** ermittelt werden, die stärkste Antwort ruft $3\alpha,5\beta$ -TH-Progesteron hervor[71].
- 5β -DH-Progesteronmetabolite steigern in Kulturen menschlicher Leberzellen und menschlichen Knochenmarks die **Häm-Synthese** [57, 101].

Eine vollständige Klärung, über welche Mechanismen die oben aufgeführten Effekte der Progesteronmetabolite vermittelt werden, ist bisher nicht erfolgt. Für die hypnotische, anxiolytische und antikonvulsive Komponente scheinen die Effekte über den GABA_A-Rezeptor vermittelt zu werden[93]. Als eine Möglichkeit für andere Effekte wird diskutiert, dass diese über andere bekannte oder bisher nicht identifizierte Rezeptoren der Steroidrezeptorgen-Superfamilie vermittelt werden[34].

1.4.2.2 Bindung von Progesteronmetaboliten am Mineralocorticoidrezeptor

Bereits im Jahr 1958 beobachteten Landau et al., dass bei einer Patientin mit Morbus Addison unter Substitution mit Desoxycorticosteronacetat und Cortisonacetat bei zusätzlicher Gabe von 50mg/d Progesteron eine ausgeprägte Natriurese auftrat. Die Tatsache, dass die Natriumausscheidung im Urin durch Progesterongabe bei fehlender Substitution nicht weiter zu steigern war, führte zu der Erkenntnis, dass Progesteron Aldosteron-antagonistische Effekte aufweist[79].

Einen weiteren Hinweis auf die antimineralocorticoide Wirkung des Progesterons wurde von Laidlaw et al. 1962 beschrieben. Ein hypertensiver Patient mit primärem Hyperaldosteronismus reagierte auf die präoperative Gabe von 200mg Progesteron i.m. mit einer Normalisierung des Blutdrucks und einem Anstieg des Serum-Kaliums[78].

Auch im Rahmen der congenitalen adrenalen Hyperplasie (CAH) scheint der antimineralocorticoiden Wirkung des Progesterons und seiner Metabolite eine Rolle zuzukommen. Über 90% der Patienten mit CAH weisen einen autosomal-rezessiv vererbten Mangel bzw. vollständigen Ausfall der 21-Hydroxylase auf (Abbildung 1.10). Hierdurch wird die Synthese von Cortisol und meistens auch von Aldosteron auf einer frühen Ebene gestört[154]. Die durch den Cortisolmangel verursachte ACTH-Ausschüttung führt über eine verstärkte Synthese von Pregnenolon und Progesteron zu einer verstärkten Androgensynthese, welche die Virilisierung verursacht. Je nach klinischem Erscheinungsbild wird die CAH unterteilt in die CAH mit Salzverlust und die einfache virilisierende Form. Während bei der CAH mit Salzverlust verminderte DOC und Aldosteronkonzentrationen beobachtet werden, stellt sich bei der einfachen virilisierenden Form ein Hyperaldosteronismus ein[75, 12], wobei dieser eine gegenregulatorische Antwort auf die antimineralocorticoiden Effekte von Progesteron und möglicherweise weiterer antimineralocorticoid wirkender bisher nicht ausgemachter Progesteronmetabolite hinweist[154].

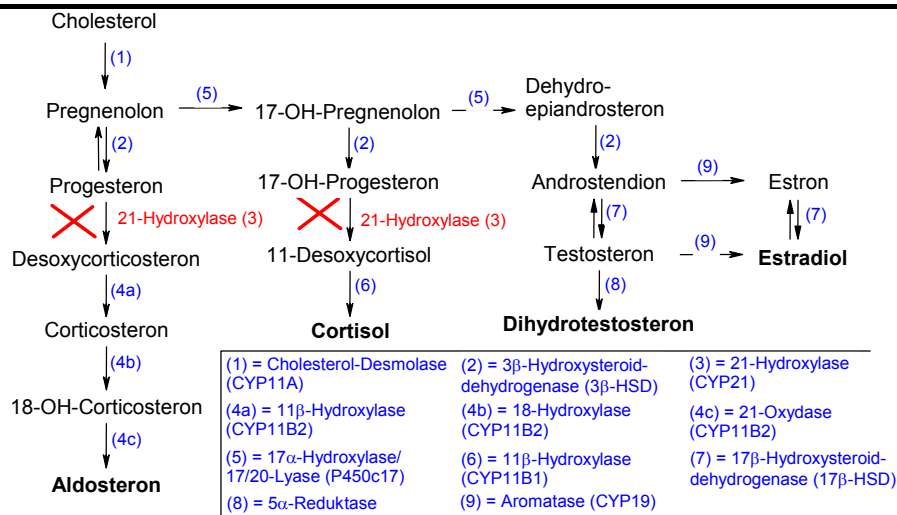


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der gestörten Steroidbiosynthese im Rahmen der congenitalen adrenalen Hyperplasie (CAH) durch 21-Hydroxylasemangel (CYP = Cytochrom P)

Erst wenige Arbeitsgruppen haben sich bisher mit der Untersuchung des Bindungsverhaltens und der intrinsischen Aktivität von Progesteronmetaboliten am MR befasst. Einschränkend kommt hinzu, dass Ergebnisse, die in Tierversuchen gewonnen wurden, auf Grund der starken Variation im Bindungsverhalten zwischen den einzelnen Spezies und dem Menschen nur sehr eingeschränkt mit dem Menschen vergleichbar sind[126]. Im folgenden sind die bisher bekannten Fakten dargestellt.

17α-OH-Progesteron , 17αOH,20α-DH-Progesteron, 20α-DH-Progesteron

17-hydroxylierte Progesteronmetabolite zeigen keine oder eine geringe Bindungsaffinität zum MR der Ratte und des Schafs[75, 150, 21, 97, 134]. In einer kürzlich durchgeführten Untersuchung zeigte 17α-Hydroxy-Progesteron eine geringe intrinsische Aktivität am hMR (weniger als 10% der durch Aldosteron erreichbaren Transaktivierung)[55].

Butkus et al. konnten zeigen, dass sich die Affinität von 17α-OH, 20α-DH-Progesteron zum aus Schafnierzellhomogenat gewonnenen MR im Vergleich zu Progesteron als stark vermindert darstellt[21]. Über das Bindungsverhalten von 20α-DH-Progesteron liegen bisher keine Daten vor. Myles et al. ziehen jedoch eine mögliche Inaktivierung von Progesteron durch C20-Reduktion in Betracht[106].

5 α -DH-Progesteron, 5 β -DH-Progesteron und 3 α ,5 α -TH-Progesteron

Vorraussetzung für eine starke Bindung an den MR scheint eine flache Konformation des Rings A zu sein[53]. Das ebene Molekül 5 α -DH-Progesteron bindet besser an den MR der Ratte als sein unebenes Isomer 5 β -DH-Progesteron[53]. Im Bezug auf die Natriumretention adrenaletomierter Ratten *in vivo* zeigen beide Isomere eine annähernd gleiche (geringe) Aktivität[19].

Der bisher einzige Ring-A-reduzierte Progesteronmetabolit, der auf sein Verhalten am hMR untersucht wurde, ist 3 α ,5 α -TH-Progesteron. 3 α ,5 α -TH-Progesteron zeigt eine geringe Potenz, Aldosteron aus seiner Bindung an den hMR zu verdrängen [126].

