

4. Diskussion

Auf den folgenden Seiten werden die Ergebnisse der eigenen Forschungsarbeiten dargestellt und diskutiert. Zuerst wird auf die Arbeiten, die sich thematisch mit den 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenasen (11 β -HSD) befassen, eingegangen, dann der Progesteronmetabolismus in der Niere diskutiert und schliesslich die Androgensynthese in der Niere erörtert und die möglichen Einflüsse auf den Blutdruck dargestellt.

4.1 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (11 β -HSD)

4.1.1 11 β -HSD Isoenzyme beim Meerschweinchen

Ähnlich dem Menschen hat das Meerschweinchen Kortisol als Haupt-Glukokortikoid, im Gegensatz zu vielen Nagern, wie Ratten und Mäusen, die Kortikosteron als Haupt-Glukokortikoid haben. Daher wählten wir das Meerschweinchen als Tiermodell für Untersuchungen der ACTH-Wirkung *in vivo* und *in vitro* auf die 11 β -HSD Enzyme beim Meerschweinchen (143).

Wir charakterisierten durch enzymkinetische Untersuchungen in Leber- und Nieren-Mikrosomen die bis dahin nicht beschriebenen 11 β -HSD-Isoenzyme beim Meerschweinchen. Im Gegensatz zur menschlichen Niere findet man in der Niere des Meerschweinchen, sowohl eine Oxidation von Kortisol zu Kortison als auch eine Reduktion von Kortison zu Kortisol. Dies deutet neben der Existenz der 11 β -HSD2 (niedriger, im nmol-Bereich liegender K_m -Wert und Kofaktor-Präferenz für NAD⁺) auf das Vorhandensein der 11 β -HSD1 (hoher, im μ mol-Bereich liegender K_m -Wert und Kofaktor-Präferenz für NADPH) in der Niere des Meerschweinchen hin (143). Auch bei anderen Nagern findet sich das 11 β -HSD1 Enzym in der Niere (144;145); beim Menschen jedoch findet sich unter normalen Bedingungen nur das 11 β -HSD2 Isoenzym (71;146). Die Gründe für diese Unterschiede zwischen Nagern und Menschen sind bis heute noch nicht aufgeklärt.

In der Leber konnten wir neben der charakteristischen 11 β -HSD1-Aktivität, die der der Maus sehr ähnlich ist (147), zusätzlich eine NAD⁺-abhängige Oxidation von Kortisol mit

einem K_m -Wert im μ molarem Bereich nachweisen (148-150). Auch von einigen anderen Arbeitsgruppen wurde durch enzymkinetische Untersuchungen Anhalt für die Existenz eines dritten 11β -HSD-Isoenzym geliefert (151;152); jedoch konnte bisher ein solches nicht eindeutig identifiziert und kloniert werden. Jedoch könnte ein drittes 11β -HSD Isoenzym beim Meerschweinchen eine physiologische Erklärung für das Fehlen vieler anderer Kortisol-metabolisierender Enzyme in der Leber des Meerschweinchens sein (153-155).

Kürzlich wurde die 11β -HSD1 in der Meerschweinchenleber kloniert (156), und bestätigte unsere vorausgegangenen enzymkinetischen Untersuchungen.

4.1.2 Regulation der 11β -HSD durch Stress

Es gibt zahlreiche Studien, die die Regulation der 11β -HSD Isoenzyme untersuchten. Generell erhöhen Glukokortikoide, C/EBP, peroxisome proliferator-activated receptor- (PPAR) Agonisten, und einige proinflammatorische Zytokine ($TNF\alpha$, IL-1) die 11β -HSD1 Expression. Wachstumshormon (GH), das über IGF-I wirkt, und Leber X Rezeptor Agonisten hemmen die Expression. Der Effekt anderer Faktoren wie Sexualsteroiden, Insulin und Schilddrüsenhormon variiert stark zwischen den Spezies und zwischen den jeweiligen Geweben (143).

Es gibt relativ wenige Untersuchungen über die Regulation der 11β -HSD Isoenzyme in Stresssituationen. Unter Stress erfolgt eine Aktivierung der Hypophysen-Nebennieren-Achse mit einem Anstieg von ACTH. Daher untersuchten wir die Wirkung von ACTH auf die 11β -HSD Isoenzyme in Leber und Niere.

Zur Beurteilung der Regulation der 11β -HSD unter Stressbedingungen wurden jeweils 6 Meerschweinchen durch subkutane Injektionen mit ACTH (10 IU Depot-ACTH₁₋₂₄ zweimal täglich über 3 Tage) oder mit Placebo (0,9 %ige Kochsalzlösung) behandelt (156). *In vivo* wurden im Serum und im Urin Kortisol, Kortison und ihre Metabolite bestimmt. Nach Tötung der Tiere wurde mit Hilfe von radioaktiv-markiertem Kortisol und Kortison die Oxidation und Reduktion in Gewebeschnitten untersucht. Gewebeschnitte spiegeln am ehesten die *in vivo* Gewebesituation wider. In dieser Versuchsreihe zeigte sich eine beeindruckende signifikante Erhöhung der hepatischen Reduktion von

inaktiven Kortison in aktives Kortisol durch die ACTH-Behandlung. Dies spricht eindeutig für eine Stimulation der 11 β -HSD1. Die gleichzeitige Abnahme der Oxidationsreaktion (Kortisol zu Kortison) in der Leber verschob das Gleichgewicht noch weiter auf die Seite des aktiven Glukokortikoids Kortisol. Da Lebergewebeschnitte bei Kurzinkubationen mit ACTH keine Aktivitätsveränderung zeigten (92), sind die beobachteten Veränderungen sehr wahrscheinlich auf eine 11 β -HSD1-Induktion durch vermehrt sezernierte adrenalen Glukokortikoide, wie z.B. Kortisol, zurückzuführen. Im Urin der Tiere konnten wir einen erhöhten Quotienten (Tetrahydro-Kortisol + Allo-Tetrahydro-Kortisol) / Tetrahydro-Kortison unter ACTH Behandlung nachweisen, der als Parameter für die *in vivo* Abschätzung der 11 β -HSD1 Aktivität verwendet wird (92). Der Urinquotient freies Kortisol/freies Kortison wird als Parameter für die renale 11 β -HSD2 verwendet (80). Er zeigte keine signifikante Veränderung durch die ACTH Behandlung (156). Daher interpretierten wir die ebenfalls in der Niere beobachtete Verschiebung in Richtung aktives Kortisol nicht als eine Hemmung der 11 β -HSD2, sondern als eine verstärkte Aktivierung der in der Niere vorhandenen 11 β -HSD1. Dies scheint auf den ersten Blick ein Widerspruch zu den ACTH Versuchen beim Menschen zu sein. Jedoch muss man beachten, dass die 11 β -HSD2 des Meerschweinchens sehr viel potenter ist. Diese Beobachtung ist auch schlüssig in Anbetracht der sowieso schon sehr hohen normalen Kortisolkonzentrationen des Meerschweinchens (157;158).

Somit scheint es unter ACTH-Stimulation, neben der adrenalen de novo Kortisol-Synthese in Stresssituationen, zu einer vermehrten hepatischen Umwandlung von Kortison in Kortisol zu kommen. Dies würde zu einer physiologisch sinnvollen Anhebung des Gesamt-Kortisolspiegels in Stresssituationen führen. Neben der endokrinen Wirkung auf den Gesamtorganismus, kann die hepatische Kortisol-Mehrproduktion auch intra- und parakrin auf die Leberzellen direkt wirken und so Enzyme der Glukoneogenese stimulieren (83;159). Eine pathologische Erhöhung der 11 β -HSD1 ausserhalb von Stresssituationen könnte wiederum ein möglicher Pathomechanismus für eine gestörte Glukosetoleranz und Insulinresistenz sein (78).

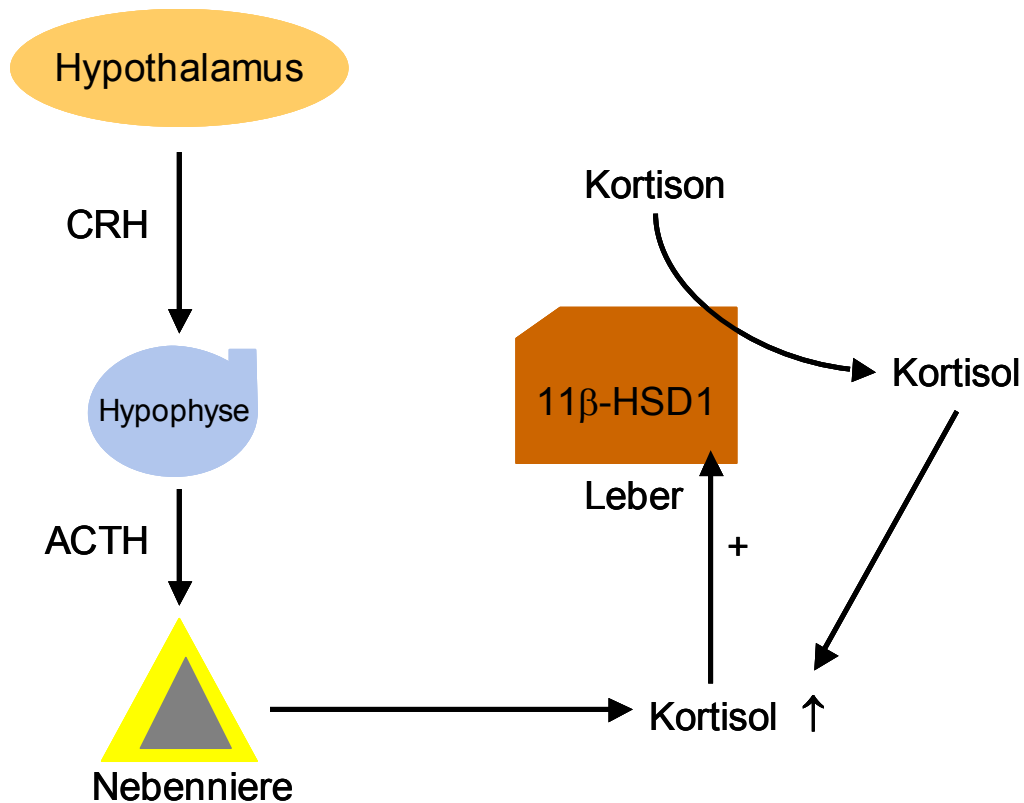


Abb. 9.: In Stresssituationen erfolgt eine Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse mit einer verstärkten Kortisolproduktion und -sekretion. Eine verstärkte 11 β -HSD1 Aktivität unterstützt die erhöhten Kortisolkonzentrationen durch eine vermehrte Aktivierung von Kortison zu Kortisol.

4.1.3 Inhibitoren der 11 β -HSD

Die 11 β -HSD1 wird im menschlichen Fettgewebe in besonders hohe Aktivität vorgefunden, vor allem im omentalen Fett (85;160;161). Dabei herrscht die Reduktion von Kortison zu Kortisol vor, und kann durch Glukokortikoide und Zytokine induziert werden (162). Es wurde postuliert, dass die verstärkte Umwandlung von Kortison zu Kortisol im omentalen Fettgewebe eine Rolle in der pathogenetischen Entwicklung der stammbetonten Adipositas spielt. Mäuse, die eine verstärkte 11 β -HSD1 Expression aufwiesen, zeigten eine verstärkte Adipozytendifferenzierung und eine vermehrte abdominelle Fettmasse (163).

Aufgrund dieser Beobachtungen liegt der Schluss nahe, dass eine Hemmung der 11 β -HSD1 eine Verbesserung der Glukosetoleranz, der Insulinsensitivität und eine Verminderung der omentalen Fettmasse bewirken könnte. Mehrere Gruppen begannen daraufhin, nach selektiven 11 β -HSD1 Inhibitoren zu suchen. Eine Hemmung der 11 β -HSD2 sollte zur Vermeidung der Hypertonieentstehung vermieden werden. Auch wir machten mehrere Versuchsreihen, um einen möglichst selektiven 11 β -HSD1 Inhibitor zu finden. Dafür verwendeten wir menschliche Leber- und Nierenmikrosomen. Die Hemmsubstanz, die diesen Eigenschaften am nächsten kam, war die Gallensäure Chenodeoxycholsäure (CDCA), die die Konversion vom inaktiven Kortison zum aktiven Kortisol in der Leber hemmte (87;88;164). Jedoch waren die benötigten Konzentrationen hoch. CDCA wird z.B. in der Therapie von Gallensteinen eingesetzt. Nach Einnahme von 250mg oder 750mg CDCA werden Serumkonzentrationen von 10 μ mol/l oder >20 μ mol/l erreicht (165).

Als sehr potente Inhibitoren beider 11 β -HSD Isoenzyme stellten sich 11 α - und 11 β -Hydroxy-Progesteron in unseren Studien heraus, und bestätigten bisherige Berichte (166;167). Ob diese Substanzen jedoch wirklich *in vivo* vorkommen und ob ihre Konzentrationen dann für eine relevante Hemmung ausreichen, ist nicht bekannt. Weiterhin fanden wir heraus, dass das Antimykotikum Ketoconazol ein relativ selektiver Inhibitor der 11 β -HSD2 ist. Dies könnte die zusätzliche immunsuppressive Wirkung von Ketoconazol erklären, wenn es in Kombination mit Prednisolon gegeben wird.

4.1.4 AME Syndrom

Die 11 β -HSD2 stellt einen für den MR notwendigen Schutzmechanismus dar, der die hohen Kortisolkonzentrationen vom MR fernhält. Ist dieses Enzym nicht funktionsfähig, z.B durch eine Mutation im HSD11B2 Gen, so kann Kortisol ungehindert an den MR binden und ihn aktivieren. Diese Mutationen verursachen das AME Syndrom.

Wir erhielten von neun Patienten aus dem Oman mit dem klinischen Verdacht eines AME Syndroms DNA zur genetischen Analyse. Alle Patienten erkrankten innerhalb ihrer ersten vier Lebensjahre an bedrohlicher Hypokaliämie und ausgeprägter

Hypertonie. Mittels PCR amplifizierten wir überlappende Fragmente des HSD11B2 Gens, einschließlich von Intron 1. Die amplifizierten DNA Produkte wurden mit Gelelektrophorese aufgetrennt und sequenziert. Wir fanden die erste Mutation in Exon 1 (R74G) beim AME Syndrom. Diese trat zusammen mit einer Mutation (P75 Δ 1nt) auf, und verursachte einen Shift im Leserahmen (168). Wir fanden auch die schon vorher beschriebene Mutation L114 Δ 6nt (90) in Exon 2 eines Patienten. Weiterhin entdeckten wir eine A221V Mutation in Exon 3 und eine V322ins9int Mutation in Exon 5 (90). Die von uns gefundenen Mutationen verursachen einen totalen Verlust oder eine starke Einschränkung der 11 β -HSD2 Aktivität. Mit den von uns beschriebenen Mutationen sind jetzt in allen Exons und in zwei Introns des HSD11B2 Gens Mutationen beschrieben worden. Unsere Studie zeigte ebenfalls, dass das AME Syndrom bei Patienten aus Stammes-Gesellschaften vermutet und abgeklärt werden sollte, die durch ein geringes Geburtsgewicht, Gedeihstörung, Polyurie und Polydipsie, Hypokaliämie und Hypertonie auffallen (90).

4.1.5 Ektopes ACTH-Syndrom

Das ektope ACTH-Syndrom weist sehr viel häufiger eine hypokaliämische Hypertonie auf als das hypophysäre oder adrenale Cushing-Syndrom (111;169). In klinischen Untersuchungen konnte ferner gezeigt werden, dass eine ACTH-Infusion deutlich mehr mineralokortikoide Effekte in Form von Hypokaliämie, Alkalose und Hypertonie aufweist, als eine Kortisolinfusion (112;114). Es entwickelten sich zwei Hypothesen; die eine sah ACTH selbst als den verantwortlichen Faktor an, die andere vermutete eine Substratüberladung durch adrenale Steroide (112;113).

Zur Überprüfung dieser Hypothesen benutzten wir ein *in vitro* Modell mit menschlichen Nierenschnitten. In diesen Untersuchungen konnten wir weder mit endogenem ACTH₁₋₃₉ noch mit synthetischem ACTH₁₋₂₄ (Synacthen[®]) im getesteten Konzentrationsbereich (10^{-12} - 10^{-9} mol/l) einen direkten Effekt auf die renale Oxidation von Kortisol durch die 11 β -HSD2 finden. In weiteren Experimenten wurden von uns 12 ACTH-abhängige Steroide hinsichtlich eines möglichen hemmenden Effektes auf die renale 11 β -HSD2 untersucht (170-173). Ebenso wie bei den Inkubationen mit ACTH

wurden auch bei diesen Untersuchungen nur klinisch relevante Konzentrationen der jeweiligen Steroide eingesetzt (10^{-9} - 10^{-6} mol/l), d.h. der gewählte Konzentrationsbereich entsprach Plasmakonzentrationen, wie sie physiologisch bzw. pathophysiologisch beim ACTH-Exzeß *in vivo* auch meßbar sind (174). Von den 12 getesteten Steroiden hatten 3 Substanzen einen signifikanten hemmenden Effekt auf die renale 11β -Oxidation. Dies waren Kortikosteron, 18-Hydroxy-Kortikosteron und 11-Hydroxy-Androstendion. Diese Substanzen sind alle Substrate der 11β -HSD2 (69;70), so dass es sich hierbei um eine Substrat-Kompetition handelt. Dabei spielt Kortikosteron wahrscheinlich die größte Rolle, da es einen niedrigeren K_m -Wert für die 11β -HSD2 aufweist als Kortisol (10 gegenüber 55 nmol/l) (170-172;175), unter ACTH-Stimulation auf Plasmakonzentrationen zwischen 10^{-7} und 10^{-6} mol/l ansteigt (176;177), und über einen prozentual größeren freien Plasmaprotein-ungebundenen Anteil als Kortisol verfügt.

In Experimenten mit hohen Kortisolkonzentrationen, wie sie unter endogener und exogener ACTH-Stimulation beobachtet werden (115), fanden wir eine abnehmende prozentuale Konversions-Rate und damit die Kinetik einer Substratsättigung des Enzyms (178).

Damit konnten wir zeigen, dass der „hypermineralokortikoide“ Zustand des ektopten Cushing-Syndroms mit Hemmung der 11β -HSD Typ 2 nicht durch ACTH selbst, sondern durch eine Überladung des 11β -HSD Typ 2 Enzyms mit Kortisol bedingt ist (69). Während beim adrenalen Cushing-Syndrom die 11β -HSD2 nur das übermäßig gebildete Kortisol inaktivieren muss, werden beim ACTH-abhängigen Cushing-Syndrom zusätzliche Substrate der 11β -HSD2, insbesondere Kortikosteron, vermehrt gebildet, die zusätzlich zu einer Substratüberladung der 11β -HSD2 führen (179;180). Der erhöhte Quotient Kortisol/Kortison unter ACTH-Infusionen (112;114), der eine Hemmung der 11β -HSD2 vermuten lässt, kommt somit nicht durch ACTH direkt, sondern durch eine Substratüberladung durch ACTH-abhängige Steroide zustande, wie es Ulick et al. bereits vermutete (113).

4.2 Progesteronmetabolismus in der Niere

Unsere Hypothese war, dass es einen ähnlichen Metabolismus von Progesteron zum Schutz des MR in der Niere geben könnte wie von Kortisol durch die 11 β -HSD2. Bisher gab es nur wenige Studien, die den Progesteron-Abbau in extrahepatischen und extragonadalen Geweben untersucht haben. Nienstedt et al. (181) beschrieb eine Metabolisierung von Progesteron in Ring-A-reduzierte und in an Position 20 reduzierte Progesteron-Metabolite im Dünndarm des Menschen. Andere Studien zeigten ähnliche Progesteron Abbauprodukte mit 20 α -Hydroxy-Progesteron und 5 α -Dihydro-Progesteron als Hauptabbauprodukte in den menschlichen Speicheldrüsen und im Zahnfleisch (182;183). Nur eine sehr frühe Arbeit zeigte einen Progesteronabbau in der menschlichen fetalen Niere (184).

Daher untersuchten wir die Fähigkeit der menschlichen erwachsenen Niere, Progesteron abzubauen. Makroskopisch gesunde Nierengewebeschnitte als auch Zellfraktionen (Zytosol, Mikrosomen und Zellkernfraktion) von männlichen und weiblichen Patienten, die eine Nephrektomie wegen Nierentumor erhielten, wurden mit C¹⁴-markierten Progesteron inkubiert. Mit einer speziell entwickelten zweidimensionalen Dünnschicht-Chromatographie konnten 16 verschiedene Progesteronmetabolite aufgetrennt und identifiziert werden. Wir konnten einen deutlichen und umfangreichen Metabolismus von Progesteron in 20 α -Dihydro-Progesteron im Zytosol der Zellen nachweisen. Die Mikrosomenpräparationen zeigten eine grössere Bandbreite im Abbau von Progesteron: neben 17 α -Hydroxy-Progesteron und 17 α -Hydroxy,20 α -Dihydro-Progesteron fanden sich auch 5 α -Dihydro-Progesteron und andere Ring-A reduzierte Metaboliten (z.B. 3 β ,5 α -Tetrahydro-Progesteron). Dieses Enzymsystem stellte sich als sehr potent heraus, da es auch bei sehr hohen Progesteronkonzentrationen (1 μ mol/l) immer noch mehr als 40% der gesamten Progesteronmenge umsetzen konnte. Damit konnten wir zeigen, dass die Niere fähig ist, Progesteron zu metabolisieren und so vom MR fernzuhalten. Welcher Nephronabschnitt den Hauptanteil am Progesteronmetabolismus hat, kann durch die durchgeführten Studien nicht beantwortet werden.

4.2.1 Bindung und Transaktivierung von Progesteron und seinen Metaboliten am Mineralokortikoidrezeptor

Voraussetzung für einen wirksamen Schutzmechanismus des MR ist, dass die gebildeten Metaboliten am MR keine agonistischen oder antagonistischen Eigenschaften zeigen. Daher testeten wir auch, wie sich Progesteron und seine Metabolite bezüglich ihrer Bindungsaffinität, der Transaktivierung und der Hemmpotenz am MR verhalten (134). Für Bindungsstudien am MR verwendeten wir Plasmide, die die menschliche MR cDNA und ein T7-Promoter enthielten, und ein Kaninchen-Retikulozyten-Lysat-System. In unserem Assay zeigte Progesteron eine deutlich höhere Bindungsaffinität am MR als Aldosteron oder Kortisol. Dies bestätigt die Befunde bisheriger Arbeiten (185;186). 17α -Hydroxy-Progesteron, 20α -Dihydro-Progesteron und 5α -Dihydro-Progesteron zeigten schwächere Bindungsaffinitäten (zwischen 10 und 20 nmol/l) zum MR. Während der Schwangerschaft steigen 17α -Hydroxy-Progesteron Plasmakonzentrationen auf Werte bis zu 30 nmol/l an (187), und 17α -Hydroxy-Progesteron könnte daher eine Rolle in der Besetzung des MR spielen. Dabei ist 17α -Hydroxy-Progesteron ein MR Antagonist, da die Transaktivierung des MR durch 17α -Hydroxy-Progesteron sehr gering ist. Ein weiterer Abbau zu 17α -Hydroxy, 20α -Dihydro-Progesteron vermindert erheblich die Bindungsaffinität am MR und dieser Metabolit dürfte keine Rolle mehr bei der MR Besetzung spielen.

Um die Transaktivierung und die Hemmpotenz zu bestimmen, transfizierten wir CV-1 Zellen (Nierenzellen der grünen Meerkatze) mit dem Vektor pRShMR, dem Vektor pMSG-Luc und dem SV-40 gesteuerten Renilla-Luciferase Gen pRL-SV40. Die Transaktivierung wurde als Ratio der Firefly und Renilla Luciferase Aktivität nach Inkubation der transfizierten Zellen mit dem Steroid berechnet. Progesteron zeigte eine nachweisbare Transaktivierung des MR, die jedoch recht schwach ausgeprägt war; ca. 25% der Wirkung von Aldosteron bei 1 μ mol/l Progesteron. Alle Progesteronmetaboliten zeigten eine noch schwächere oder gar keine Aktivierung des MR. Die Potenz von Progesteron eine Aldosteron-induzierte Wirkung am MR zu antagonisieren war mit einer IC_{50} von 11 nmol/l sehr hoch. Dagegen zeigten alle Progesteronmetaboliten eine deutlich schwächere Hemmpotenz gegenüber Aldosteron. Neben 17α -Hydroxy-Progesteron spielen möglicherweise noch 5α -Dihydro-Progesteron und 20α -Dihydro-

Progesteron eine relevante Rolle, da die Plasmakonzentrationen dieser beiden Steroide während der Schwangerschaft in Bereiche steigen, die für eine Bindung am MR wichtig sind (29 nmol/l, bzw. 90 nmol/l) (187;188). Interessanterweise zeigten 5 β -reduzierte Progesteronmetabolite eine deutlich schwächere Bindungsaffinität am MR als 5 α -reduzierte Metabolite. Dies verdeutlicht, dass die Faltung des Steroidgerüsts zwischen den Ringen auch ein wichtiger Faktor bei der Bindung am MR spielt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in der Niere gebildeten Abbauprodukte von Progesteron am MR eine deutlich geringere Wirkung besitzen als Progesteron (138-142;189).

4.2.2 Wirkung von Progesteron *in vivo*

Der natriuretische Effekt von Progesteron wurde schon vor über 40 Jahren beschrieben (134). In den meisten damals durchgeführten Studien erhielten die Patienten große Mengen Progesteron intramuskulär über mehrere Tage. Anschließend wurde das Urinnatrium und die Aldosteronausscheidung gemessen, jedoch nie die Plasmakonzentration von Progesteron. Daher ist der genaue antimineralokortikoide Effekt von Progesteron *in vivo* nicht bekannt.

Dies war der Ausgangspunkt unserer klinischen Studie, die die antimineralokortikoide Wirkung von Progesteron *in vivo* untersuchte. Die Studie wurde bei Patienten mit Nebennierenrinden-Insuffizienz durchgeführt, da diese kein endogenes Aldosteron produzieren. Außerdem wählten wir nur Männer und postmenopausale Frauen aus, um eine endogene Progesteronproduktion durch die Ovarien auszuschließen. Die Patienten pausierten ihre Mineralokortikoidsubstitution mit 9 α -Fluorokortisol vier Tage vor Beginn der Studie und kamen so in einen leichten hypomineralokortikoiden Zustand. Am Testtag erhielten die Patienten eine Aldosteroninfusion i.v. über 8h. Nach 4h wurde eine Progesteroninfusion i.v. gestartet und die Progesteronkonzentration in zwei Schritten erhöht (0,15 mg/kg/h für 90 min, dann 0,65 mg/kg/h für 180 min).

Die Aldosteroninfusion bewirkte bei den Patienten mit Nebennierenrinden-Insuffizienz eine konstante Plasma-Aldosteronkonzentration von 0,7 nmol/l. Dies entspricht einer hoch-normalen Aldosteronkonzentration bei Gesunden. Die Plasma-Progesteronkonzentration stieg stetig unter der Progesteroninfusion an und erreichte

Konzentrationen (700 nmol/l), die denen im dritten Trimenon der Schwangerschaft entsprechen. Wir bestimmten 17α -Hydroxy-Progesteron in Plasma- und Urin der Patienten und fanden einen signifikanten Anstieg dieses Progesteronmetaboliten als Hinweis auf einen extra-adrenalen Abbau von Progesteron durch das Enzym P450c17 (134). Der Natrium-/Kaliumquotient im Urin wurde als Marker für die MR Aktivität *in vivo* verwendet und war zu Beginn der Studie hoch. Dies deutet auf einen hypomineralokortikoiden Zustand mit verstärkter Natriumausscheidung im Urin der Patienten hin. Wie erwartet sank der Urinquotient durch die Aldosteroninfusion ab, gleichbedeutend mit einer verstärkten Natriumresorption und vermehrten Kaliumausscheidung. Erstaunlicherweise stieg der Quotient durch die Progesteroninfusion jedoch nur geringfügig an, obwohl die Plasmakonzentrationen von Progesteron um einen Faktor 1000 über der von Aldosteron lagen. Dies spricht für einen Progesteronabbau in der Niere, als Schutzmechanismus für den unspezifischen MR dienen könnte.

Neben den Hinweisen auf einen Progesteronmetabolismus *in vivo* gibt es noch weitere mögliche Mechanismen, die die antagonistische Wirkung von Progesteron reduzieren können. Wir fanden einen Anstieg von Deoxykortikosteron unter der Progesteroninfusion. Deoxykortikosteron ist selbst ein schwaches Mineralokortikoid (190). Diese Umwandlung von Progesteron zu Deoxykortikosteron weist auf eine extra-adrenale 21-Hydroxylierung hin, die z.B. in der Niere lokalisiert sein kann. Unsere Befunde unterstützen frühe Studien, bei denen gezeigt werden konnte, dass Nieren von Schwangeren Progesteron in Deoxykortikosteron umwandeln können (191-193). Dies würde einer lokalen Synthese eines Mineralokortikoids in der Niere entsprechen und könnte ein Schutzmechanismus gegenüber Progesteron in der Schwangerschaft sein (194). In unseren Versuchen, die den Progesteronmetabolismus in erwachsenen Nieren untersuchten (194;195), konnten wir keine Umwandlung von Progesteron in Deoxykortikosteron nachweisen. Dies könnte daran liegen, dass dieser Weg nur in bestimmten Situationen, wie z.B. der Schwangerschaft, auftritt und auch interindividuell sehr variieren kann.

Neben Progesteronmetabolismus und Deoxykortikosteron-Bildung vermuten wir einen weiteren Mechanismus, der den MR schützen könnte: das Glukokortikoid Kortisol, das ein MR-Agonist ist, könnte die Wirkung von Progesteron antagonisieren. Die

Patienten erhielten zur Vermeidung einer Addisonkrise anstatt Hydrokortison das Glukokortikoid Prednisolon. Wir haben den Quotienten Prednisolon/Prednison im Urin als Aktivitätsmarker der renalen 11 β -HSD2 gemessen. Unter der Progesteroninfusion zeigte sich ein deutlicher signifikanter Anstieg des Urinquotienten, was auf eine Hemmung der 11 β -HSD2 hinweist. Diese Beobachtung wird durch früher durchgeführte *in vitro* Experimente unterstützt, in denen wir zeigen konnten, dass Progesteron in Nierenmikrosomen ein potenter Hemmstoff der 11 β -HSD2 ist (194). In diesen Versuchen untersuchten wir die Hemmpotenz von Progesteron und seinen Metaboliten auf die menschliche 11 β -HSD2. Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon wurden als Kontrollinhibitoren verwendet (Konzentration der halbmaximalen Hemmung = IC₅₀-Werte: 8,0 x 10⁻⁹ und 8,4 x 10⁻⁹ mol/l). Progesteron zeigte eine starke Hemmwirkung auf die 11 β -HSD2 (IC₅₀: 4,8 x 10⁻⁸ mol/l), dagegen zeigten seine Abbauprodukte wie 5 α -Dihydro-Progesteron, 20 α -Dihydro-Progesteron, 3 β ,5 α -Tetrahydro-Progesteron, 17 α -Hydroxy-Progesteron, 20 α -Dihydro,17 α -Hydroxy-Progesteron (IC₅₀ (mol/l) jeweils: 2,4 x 10⁻⁷; 7,7 x 10⁻⁷; 8,0 x 10⁻⁷ 9,0 x 10⁻⁷; > 10⁻⁵) eine deutlich geringere Hemmwirkung auf die 11 β -HSD2 (135).

Diese Hemmung der 11 β -HSD2 durch Progesteron könnte zu einer verminderten intrazellulären Inaktivierung von Kortisol zu Kortison führen und höhere intrazelluläre Kortisolkonzentrationen zur Folge haben. Damit könnte Kortisol an den MR binden und die antimineralokortikoide Wirkung von Progesteron antagonisieren. Die gefundenen IC₅₀-Werte sind im Bereich von in der Schwangerschaft erreichten Plasmakonzentrationen, so dass die Hemmung der 11 β -HSD2 durch Progesteron und seine Metabolite von physiologischer Bedeutung sein dürfte.

Weitere Mechanismen, die die antimineralokortikoide Wirkung von Progesteron vermindern könnten und in der Literatur beschrieben wurden, könnten sein:

- Eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) durch eine Östrogen vermittelte vermehrte Expression von Angiotensinogen in der Leber (196).
- Progesteron besitzt eine höhere Plasmaproteinbindung als Aldosteron. Nur ca. 3% des Progesterons liegen ungebunden und damit verfügbar für einen Übertritt in die Zelle vor, 80% sind schwach an Albumin gebunden und 17% an das

Corticosteroid bindende Protein (CBG). Im Gegensatz dazu sind 37% des Aldosterons ungebunden und stehen für intrazelluläre Reaktionen zur Verfügung (9).

- Der Aldosteron-MR Komplex erscheint stabiler und langlebiger zu sein als der Progesteron-MR Komplex (Halbwertszeit 600 Min gegenüber 45 Min) (197). Aldosteron könnte daher so länger die Rezeptoren besetzen und eine Signaltransduktion bewirken.

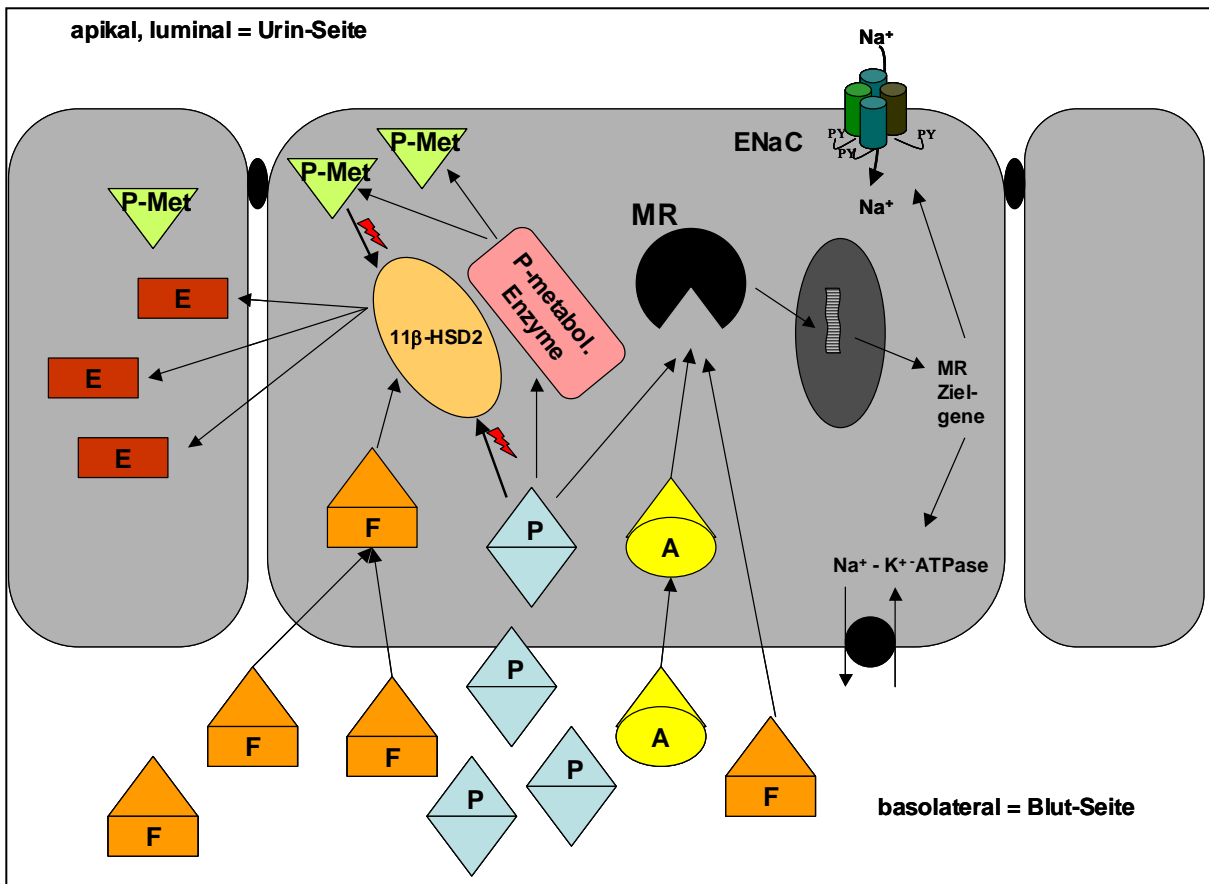


Abb. 10: Kortisol (F) wird durch die 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 2 (11 β -HSD2) in Kortison (E) umgewandelt, das nicht an den Mineralokortikoidrezeptor (MR) binden kann. Damit kann Aldosteron (A) ungehindert an den MR binden und Zielgene, wie den epithelialen Natriumkanal (ENaC) und die Natrium-Kalium-ATPase, regulieren. Progesteron (P) wird durch verschiedene Enzyme zu Progesteron-Metaboliten (P-Met) umgewandelt. P und P-Met können die 11 β -HSD2 hemmen und weniger F wird zu E inaktiviert. Dadurch kann F am MR gegen die antagonistische Wirkung von P wirken.

4.2.3 Identifizierung der Progesteron metabolisierenden Enzyme

Die nächste Frage, die sich uns stellte war, welche Enzyme in der Niere für diesen effizienten Progesteronmetabolismus verantwortlich sind. Mittels RT-PCR, Sequenzierung der PCR Produkte und Testung der Substratspezifität konnten wir die folgenden Enzyme in der menschlichen Niere identifizieren: 3 β -HSD Typ 2, 5 α -Reduktase Typ 1, drei Mitglieder der Aldo-Keto-Reduktase Familie (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3), 5 β -Reduktase und erstaunlicherweise die P450c17, die eigentlich ein typisches Enzym der Steroidogenese in der Nebenniere und den Gonaden ist. Im folgenden werden diese Enzyme näher beschrieben.

Enzym	Lokalisation der Primer	Länge des PCR Produkts	Expression in der menschlichen Niere
17 α -Hydroxylase (CYP17)	Exon 1-3	527 bp	ja
3 β -HSD Typ 1	Exon 3-4	296bp	nein
3 β -HSD Typ 2	Exon 2-4	382bp	ja
5 α -Reduktase Typ 1	Exon 2-4	239bp	ja
5 α -Reduktase Typ 2	Exon 1-2	244bp	nein
AKR1C1	Exon 6-9	416bp	ja
AKR1C3	Exon 1-5	476bp	ja
	Exon 4-7	335bp	ja
	Exon 6-9	469bp	ja
AKR1C2	Exon 2-3	191bp	ja

Abb. 11: Übersicht der in der Niere nachgewiesenen Progesteron abbauenden Enzyme.

3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (3 β -HSD)

Der initiale Schritt der Steroidhormon-Biosynthese ist die Umwandlung von Cholesterol in Pregnenolon durch das Enzym P450scc (198;199). Pregnenolon kann durch die 3 β -HSD in Progesteron umgewandelt werden. Letzteres kann weiter über

Deoxykortikosteron zum Mineralokortikoid Aldosteron, oder über 17α -Hydroxy-Progesteron und 11-Deoxykortisol zum Glukokortikoid Kortisol umgewandelt werden. Damit ist die 3β -HSD Aktivität ein wichtiger Schritt in der Biosynthese der Gluko- und Mineralokortikoide und Sexualsteroiden. Beim Menschen sind zwei 3β -HSD Isoenzyme beschrieben (200;201). Die 3β -HSD1 wird überwiegend in der Plazenta, Prostata, Brust und Haut exprimiert (202;203), die 3β -HSD2 dagegen vor allem in den Nebennieren, Gonaden, aber auch im Herz und in der Aorta (204;205). Mutationen im Gen, das für die 3β -HSD2 kodiert, führen zum Adrenogenitalen Syndrom (AGS) (206;207). Die 3β -HSD hat aber auch eine zentrale Funktion im Abbau von Steroidhormonen, vor allem in extra-adrenalen und –gonadalen Geweben (182;208;209). Sie ist an der Umwandlung von Ring A des Steroidgerüsts beteiligt, bevorzugt 5α -reduzierte Metabolite und wandelt sie in $3\beta,5\alpha$ -Tetrahydro-Metabolite um.

17 α -Hydroxylase (CYP17; P450c17)

Pregnenolon wird im Rahmen der Sexualsteroidhormon Synthese zu Dehydroepiandrosterone (DHEA) umgewandelt. Das entscheidende Enzym für die Biosynthese von DHEA ist die P450c17, ein mikrosomales Enzym mit zwei unterschiedlichen Aktivitäten: durch 17α -Hydroxylierung wird Pregnenolon in 17α -Hydroxy-Pregnenolon (und Progesteron zu 17α -Hydroxy-Progesteron) umgewandelt. Die 17,20-Lyase-Aktivität katalysiert die Konversion von 17α -Hydroxy-Pregnenolon zu DHEA (bzw. 17α -Hydroxy-Progesteron zu Androstendion, wobei diese Reaktion bei Nagern auftritt und beim Menschen unter normalen Bedingungen nicht vorhanden ist) (2). DHEA, bzw. sein Sulfat DHEAS, dient als periphere Steroid-Reserve. So entstehen bei der praemenopausalen Frau 50% des Testosterons und bei der postmenopausalen Frau fast 100% der Östrogene durch Metabolisierung von Steroidvorstufen, z.B. DHEA/DHEAS, in peripheren Zellen (210-217). Diese periphere Sexualsteroid-Synthese erfolgt über die Umwandlung von DHEAS zu DHEA durch die zytosolische Sulfotase, nachfolgend durch 17β -HSD, 3β -HSD und/oder 5α -Reduktase zu Testosteron, bzw. durch Aromatasen zu Östrogenen. Die Expression der hierfür notwendigen Enzyme des Steroid-Metabolismus ist bereits in zahlreichen peripheren Zielzellen des Menschen

(Prostata, Endothelzellen und glatte Muskelzellen der großen Gefäße) beschrieben (218;219).

Die P450c17 wird vor allem in steroidbildenden Geweben, wie der Zona fasciculata und reticularis der Nebennierenrinde, den Leydigzellen des Hodens und den Thekazellen des Ovars exprimiert. 17α -Hydroxylase Aktivität, vermutlich durch die P450c17, wurde in zahlreichen anderen Geweben wie Astrozyten, Magenzellen, Leber, Speicheldrüsen und Duodenum beschrieben (199;220-223). Die P450c17 besitzt neben 17α -Hydroxylase und $17,20$ -Lyase Aktivität auch 16α -Hydroxylase und sehr gering 21 -Hydroxylase Aktivität (224). Die 21 -Hydroxylase Aktivität ist energetisch ungünstig, aber die 16α -Hydroxylierung ist bei Verwendung von Progesteron als Substrat zu beobachten (225;226). Wir konnten in unserem Nierengewebe auch eine Konversion von Progesteron zu 16α -Hydroxy-Progesteron beobachten. Dies ist ein weiterer Hinweis für die Existenz der P450c17 in der menschlichen Niere. Die P450c17 benötigt ferner einen Elektronendonator für die von ihr katalysierten Reaktionen. Diese Funktion übernimmt das Cytochrom b5 (227). Wir konnten auf mRNA Ebene ebenfalls die Expression von Cytochrom b5 in der menschlichen Niere nachweisen.

5 α -Reduktasen

Die 5α -Reduktasen beeinflussen in autokriner und parakriner Weise die aktiven Steroidkonzentrationen in Geweben und modulieren so Wachstum und Zellregulation. So beeinflussen 5α -Reduktasen durch die Aktivierung von Testosteron zum potenteren Androgen 5α -Dihydro-Testosteron, das eine höhere Affinität zum Androgenrezeptor besitzt, die Expression von Androgen-sensitiven Zielgenen. Der Abbau von 5α -Dihydro-Testosteron zum inaktiven 3α -Androstandiol wird durch Enzyme reguliert, die 3α -HSD Aktivität besitzen. Beim Menschen sind zwei 5α -Reduktasen beschrieben (228;229). Die 5α -Reduktase Typ 1 wird in zahlreichen Geweben wie Haut, Gehirn, Leber und Lunge exprimiert, die 5α -Reduktase Typ 2 dagegen überwiegend in Prostata, Haut des Genitalbereiches, Samenblase, Nebenhoden und Leber. Mutationen des Gens, das für die 5α -Reduktase Typ 2 kodiert, führen zum männlichen Pseudohermaphroditismus (229;230).

Desweiteren haben 5α -Reduktasen eine wichtige Funktion bei der Metabolisierung von Kortisol und Aldosteron. Die biologische Aktivität von Metaboliten, z.B. 5α -Metaboliten, ist jedoch nur teilweise untersucht. So gibt es Anhaltspunkte dafür, daß 5α -Metabolite von Kortisol bei Patienten mit Adipositas gegenüber 5β -Metaboliten überwiegen, was auf eine vermehrte 5α -Reduktase Aktivität bei Fettsucht schließen läßt (231;232). Ferner binden Progesteron-Metabolite (z.B. $3\alpha,5\alpha$ -Tetrahydro-Progesteron) am $GABA_A$ -Rezeptor und entfalten eine anästhetische und sedative Wirkung (233-235). Weiterhin wird bei 5α -reduzierten Metaboliten von Progesteron eine wachstumsfördernde Wirkung auf Brustkrebszellen vermutet, während 3α -Progesteron-Metabolite einen protektiven Einfluß haben sollen (236-240). Es gibt Untersuchungen an Mäusen, die belegen, dass die 5α -Reduktase Typ 1 für die Zervixreifung am Ende der Schwangerschaft eine entscheidende Bedeutung hat (84).

Unsere Studien erbrachten den Nachweis, dass die 5α -Reduktase Typ 1 für die Metabolisierung von Progesteron in der menschlichen Niere verantwortlich ist (194;195;241). Dabei stehen unsere Ergebnisse im Gegensatz zu den Beobachtungen von Thigpen et al. (242), die die 5α -Reduktase Typ 1 nicht in der menschlichen Niere nachweisen konnten. Das Gewebe, das Thigpen et al. verwendete war jedoch post mortem gewonnenes Material, im Gegensatz zu unserem, direkt aus dem Operationssaal bezogenem, Gewebe.

Aldo-Keto-Reduktasen

Die Zahl der bekannten Aldo-Keto-Reduktasen (AKR) ist in den letzten Jahren stark angewachsen, sodass heute fast 110 unterschiedliche Typen bekannt sind. Die Untergruppe 1C umfasst vier menschliche Enzyme, die sowohl für die intrakrine Regulation von Glukokortikoiden, Progestinen, Sexualsteroiden und Prostaglandinen, als auch für die Umwandlung von Gallensäuren und Xenobiotika wichtig sind. Die vier Isoenzyme zeigen eine große Homologie ihrer Nukleotid- und Aminosäuresequenz, und ihre Gene liegen in einem Cluster auf Chromosom 10p14-p15: AKR1C1 (auch: 20α -HSD, DD1), AKR1C2 (auch: 3α -HSD Typ 3, BABP, DD2), AKR1C3 (auch: 17β -HSD Typ 5, 3α -HSD Typ 2, PGFS, DDx) und AKR1C4 (auch: 3α -HSD Typ 1, DD4, Chlordecone Reduktase). Die Funktion der Enzyme ist sehr variabel, d.h. sie besitzen alle die

Eigenschaften der 3α -, 20α - und 17β -Reduktion/-Oxidation in unterschiedlich starker Ausprägung. Alle Enzyme können daher 5α -Dihydro-Testosteron zu 3α -Androstandiol, Progesteron zu 20α -Dihydro-Progesteron, Östron zu Östradiol und vice versa katalysieren (243). Damit spielen sie eine wichtige Rolle bei der intrakrinen Regulation der männlichen und weiblichen Sexualsteroiden. Ferner ist die 20α -HSD ein wichtiger Regulator des Menstruationszyklus und während der Schwangerschaft. So findet durch eine massive Induktion der 20α -HSD-Aktivität am Ende der Schwangerschaft eine Metabolisierung von Progesteron und damit der starke Konzentrationsabfall von Progesteron statt, der die Geburt einleitet. In der menschlichen Niere scheint vor allem die Umwandlung von Progesteron in 20α -Dihydro-Progesteron ein wichtiger Schritt der Inaktivierung von Progesteron zu sein.

5 β -Reduktase

Die 5β -Reduktase katalysiert die 4-ene Reduktion von 3-Ketosteroiden zu 5β -Dihydro-Metaboliten, die Substrate für die 3α - und 20α -HSDs sind (244). Damit hat das Enzym eine wichtige Rolle im enzymatischen Abbau von Progesteron, Androstendione, 17α -Hydroxy-Progesteron und Testosteron. Sehr viel schlechter werden Steroide mit einer 11β -Hydroxy-Gruppe, wie Aldosteron, Kortikosteron und Kortisol umgesetzt. Die 5β -Reduktase wird überwiegend in der Leber, Hoden und Kolon exprimiert (182;209;245;246). 5β -Reduktase Aktivität wurde aber auch in zahlreichen anderen Geweben, wie der Parotis- oder Submandibulardrüse, Endometrium, Lymphozyten und in der fetalen Niere gefunden (241;247). In den von uns untersuchten Nierengeweben war die 5β -Reduktase nur relativ schwach ausgeprägt.

4.3 Androgensynthese in der Niere

Wie oben bereits erwähnt, identifizierten wir die Enzyme 5 α -Reduktase Typ 1, 5 β -Reduktase, AKR1C1, AKR1C2 und AKR1C3, 3 β -HSD Typ 2 und P450c17 in der menschlichen Niere als die hauptsächlich für den Progesteronabbau verantwortlichen Enzyme (247). Erstaunlicherweise sind diese Enzyme nicht nur im Metabolismus von Steroidhormonen involviert, sondern sind auch, wie oben beschrieben, für die Androgensynthese notwendig. Daher untersuchten wir die Fähigkeit der menschlichen Niere, Androgene zu synthetisieren. Die renale Expression von Enzyme 3 β -HSD Typ 2 und P450c17 legt die Vermutung nahe, dass die Konversion der Steroidvorstufe Pregnenolon zu Dehydroepiandrosteron (DHEA) und dem Androgen Androstenedion in der Niere möglich ist. Wir untersuchten daher Mikrosomen und zytosolische Fraktionen aus menschlicher Niere und inkubierten diese mit radioaktiv markierten Pregnenolon. Die menschlichen Nieren waren in der Lage, größere Mengen DHEA aus Pregnenolon zu synthetisieren (133;247). Dies spricht für eine 17 α -Hydroxylase und 17,20-Lyase Aktivität des Enzyms P450c17. Radioaktiv markiertes DHEA wurde weiter zu Androstenedion und Testosteron umgewandelt. Dies belegt die 3 β -HSD Typ 2 und 17 β -HSD Aktivität in der Niere. Weiterhin wurde Testosteron gering auch zu 5 α -Dihydro-Testosteron umgewandelt und weist auf die Existenz der 5 α -Reduktase Typ 1 in der Niere hin (248).

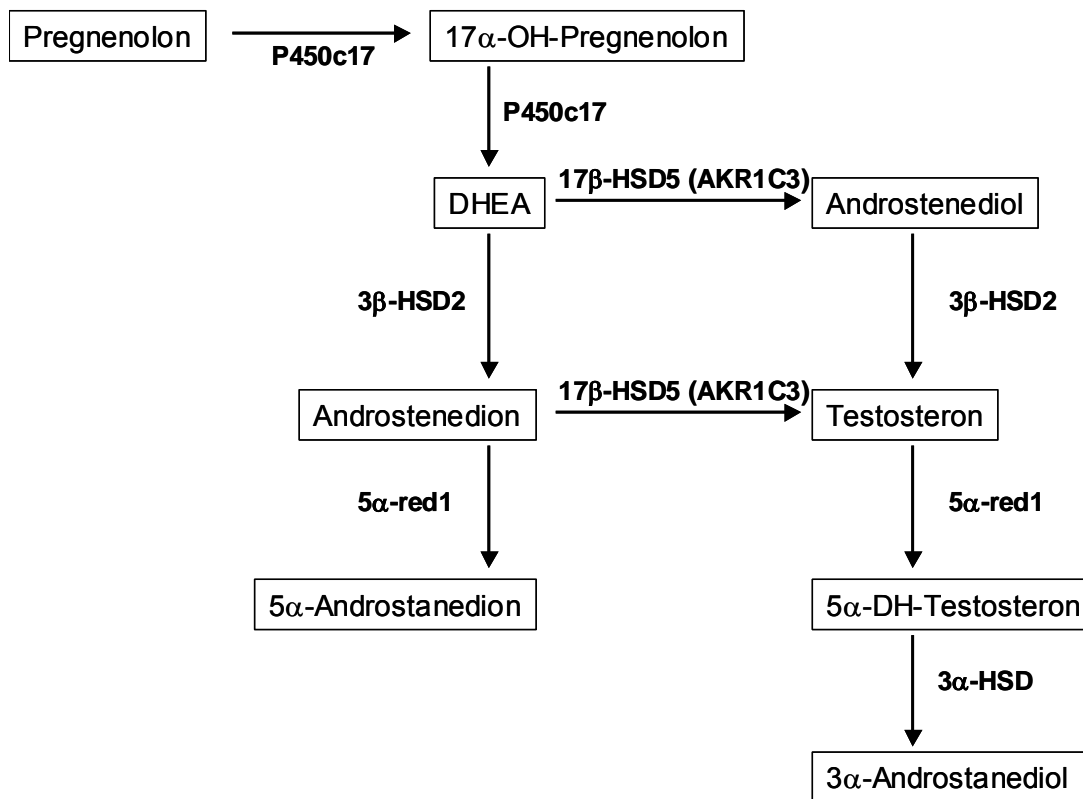


Abb. 12: Schematische Übersichtsdarstellung der Synthese von Sexualsteroiden in der menschlichen Niere und die daran beteiligten Enzyme. Red = Reduktase; HSD = Hydroxysteroid Dehydrogenase; DH = Dihydro; AKR = Aldo-Keto-Reduktase.

4.3.1 Androgenwirkung in der Niere

Mit der Entdeckung, dass die Niere nicht nur ein Progesteron-metabolisierendes Organ ist, sondern auch Androgene synthetisieren kann, stellt sich die Frage welche Aufgaben und Funktionen Androgene in der Niere haben könnten. Da die Niere ein Hauptregulator des Blutdrucks ist, fragten wir uns, welche Einflüsse Androgene auf die Blutdruckregulation haben. Um dies besser verstehen zu können, werden zuerst Besonderheiten des Androgenrezeptors dargestellt und dann auf die geschlechtsspezifischen Unterschiede im Blutdruck eingegangen. Schliesslich werden mögliche Regulationsmechanismen der Androgene in der Niere beleuchtet und unsere neuesten Forschungsergebnisse erwähnt.

4.3.2 Androgenrezeptor

Testosteron stellt den größten Anteil an im Blut zirkulierenden Androgenen; die 5α -Dihydro-Testosteronkonzentration beträgt nur ein Zehntel der Testosteronkonzentration. Nachdem Testosteron in die Zelle gelangt ist, bindet es an den intrazellulären Androgenrezeptor, von dem nur eine Form beim Menschen vorkommt (249). Die hauptsächlichen Androgen-Zielzellen des männlichen Reproduktionstraktes besitzen die 5α -Reduktase Typ 2. Dieses Enzym wandelt Testosteron in das sehr viel potentere 5α -Dihydro-Testosteron um, das mit einer deutlich höheren Affinität an den Androgenrezeptor bindet als Testosteron. In peripheren Organen wie dem Muskel gibt es jedoch nur eine sehr geringe 5α -Reduktase Aktivität (250). Hier scheint Testosteron das maßgebliche Androgen zu sein und andere Zielgene zu regulieren (251;252). Aus Studien mit Patienten, die einen vererbten 5α -Reduktase Mangel haben, lässt sich der Schluss ziehen, dass die Entwicklung des Wolffschen Ganges, der Muskeln, der tiefen Stimme, der Spermatogenese und der Axilla- und Pubis-Behaarung von Testosteron stimuliert werden können (253). 5α -Dihydro-Testosteron scheint dagegen für die Entwicklung von Prostata, externen Genitalien, männlichem Bartwuchs und die Glatzenbildung verantwortlich zu sein (254). Patienten mit kompletten Androgen-Insensitivitäts-Syndrom, z.B. durch Mutationen des Androgenrezeptors, haben ein anderes Erscheinungsbild als Patienten mit 5α -Reduktase Mangel. Sie haben außer dem Hoden keine männlichen Geschlechtsorgane (255;256).

Eine Erklärung für den Mechanismus, warum Testosteron und 5α -Dihydro-Testosteron verschiedene Effekte und Funktionen in unterschiedlichen Geweben haben, obwohl sie an den gleichen Androgenrezeptor binden, ist bisher nicht gefunden worden. Eine Möglichkeit könnten verschiedene ARE-Sequenzen in den Promoterregionen von Androgen-sensitiven Genen sein, die unterschiedlich auf einen Testosteron-Androgenrezeptor-Komplex oder einem 5α -Dihydro-Testosteron - Androgenrezeptor-Komplex reagieren (257;258). Weiterhin wäre es möglich, dass diese Komplexe unterschiedliche Androgenrezeptor-Koregulatoren rekrutieren (259;260). Dabei scheint es von Bedeutung zu sein, welche Transkriptionsfaktoren proximal der ARE Bindungsstelle liegen (261). Ferner wäre es möglich, dass Testosteron und 5α -Dihydro-

Testosteron unterschiedliche allosterische Effekte auf den Androgenrezeptor und seine Bindung an die ARE haben (262;263). Der Androgenrezeptor wird neben den typischen Geweben der männlichen Geschlechtsorgane in einer Vielzahl verschiedener Gewebe, z.B. Haarfollikel, Arterien, Herzmuskel, Muskeln, Magen-Darm-Trakt und in der Niere, beim Menschen exprimiert (264;265).

4.3.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede im Blutdruck

Die Wirkung von weiblichen Sexualhormonen auf den Blutdruck wurde in zahlreichen Arbeiten und Übersichten beschrieben und ist relativ gut bekannt. Auf ihre Darstellung soll im Rahmen dieser Arbeit verzichtet werden, sondern der eher unbekanntere Effekt von männlichen Sexualhormonen auf den Blutdruck erläutert werden.

Beobachtungen beim Menschen

Beim Menschen finden sich vor der Pubertät keine Blutdruckunterschiede zwischen Jungen und Mädchen. Mit Beginn der Pubertät jedoch entwickeln Jungen einen höheren Blutdruck als gleichaltrige Mädchen (266;267). Diese Beobachtung setzt sich auch im Erwachsenenalter fort: unabhängig von der ethnischen Herkunft haben Männer einen höheren Blutdruck als Frauen (268;269). Der höhere Blutdruck, die höhere Prävalenz bezüglich der Entwicklung einer Hypertonie und der ungünstigere Verlauf bei Männern ist mit einem deutlich höherem kardiovaskulären Risiko und damit erhöhter Mortalität verbunden (270). Ferner zeigen Frauen mit einer Hyperandrogenämie signifikant höhere systolische Blutdruckwerte als alters- und gewichtsentsprechende Frauen mit normalen weiblichen Testosteronspiegeln (271).

Tiermodelle

Bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) zeigen männliche Tiere einen höheren Blutdruck als weibliche Tiere. Durch Kastration lässt sich der Blutdruck der männlichen Tiere auf das Niveau der weiblichen Tiere senken (271;272). Die Kastration der männlichen Tiere verlangsamte auch die Progression der Hypertonie und zeigte einen positiven Einfluss auf den Erhalt der Nierenfunktion. Erhielten die kastrierten Männchen oder ovariectomierte Weibchen Testosteron, so stieg der Blutdruck wieder auf das

Niveau der männlichen unbehandelten Ratten, und die Nierenschädigung gewann wieder an Progredienz (273). Eine Behandlung von hypertensiven männlichen Tieren mit dem Androgenrezeptor-Antagonisten Flutamid bewirkte eine Blutdrucksenkung in gleichem Masse wie eine Kastration (274). Diese Ergebnisse sind nicht nur bei SHR Ratten gefunden worden. Normotensive männlichen Wistar-Kyoto Ratten (WKY) entwickeln unter einer natriumreichen Ernährung einen Bluthochdruck. Wurden diese Ratten vor Eintritt der Pubertät mit dem Androgenrezeptor-Antagonisten Flutamid behandelt, konnte der Blutdruck signifikant gesenkt werden, nicht jedoch durch das Antihypertensivum Clonidin (275;276).

4.3.4 Mögliche Regulationsmechanismen durch Androgene

Androgene scheinen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der geschlechtsspezifischen Unterschiede der Hypertonie-Entstehung zu spielen. Andere Sexualhormone scheinen aber auch eine Rolle zu spielen. So beeinflussen z.B. Östrogene die Funktion der Gefäßendothelzellen und bewirken eine Vasodilatation und Senkung des Blutdruckes bei Frauen (277;278). Die Rolle der Androgene bei der Blutdruckregulation und der Pathogenese des Bluthochdruckes ist bisher nicht eingehend untersucht worden.

Die Beobachtungen beim Menschen und die Studien am Rattenmodell deuten daraufhin, dass Androgene eine wichtige Rolle in der Blutdruckregulation spielen. Die Mechanismen sind jedoch nicht eindeutig beschrieben. Mögliche Ursachen könnten eine höhere Plasma-Reninaktivität bei Männern im Vergleich zu Frauen (279) und eine Erhöhung der Angiotensinogen mRNA Expression durch Testosteron in der Niere zu sein (280). Bekanntermaßen beeinflussen Androgene die Erythropoetinproduktion, das Wachstum von Nierentubuluszellen und damit eine Hypertrophie der Nieren (272;273). Reckelhoff et al. vermuten, dass in ihren Rattenmodellen ein direkter Effekt von Androgene auf die Steigerung der proximalen tubulären Rückresorption vorliegt, gefolgt von einer verminderten Natrium-Exposition der Macula densa mit vermindertem afferenten arteriellen Widerstand (Vasodilatation) und Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS), oder aber durch eine direkte Aktivierung des RAAS (281). Andere Autoren vermuten, dass Testosteron eine vermehrte Speicherung und Freisetzung von Noradrenalin in der Niere fördert (282).

4.3.5 Regulation des α ENaC durch Testosteron

Um die Wirkung von Testosteron auf die Niere besser untersuchen zu können, benutzten wir eine menschliche Nierenzelllinie HKC-8 (256). Es zeigte sich bei diesen Zellen kein signifikanter Metabolismus von DHEA oder Testosteron, jedoch exprimierten sie den Androgen-Rezeptor (AR) sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene. Mehrere menschliche Nierenproben von männlichen Patienten zeigten ebenfalls eine deutliche Androgenrezeptor Expression. Wir benutzten die HKC-8 Zellen für die Untersuchung Androgen-abhängiger Genexpression in dieser Nierenzelllinie, und führten dies mit Affymetrix Microarray Chip Technik durch. Überraschenderweise wurde die alpha-Untereinheit des epithelialen Natriumkanals (α -ENaC) als eines der Testosteron-Zielgene durch Testosteron stimuliert. Diese Induktion konnten wir durch quantitative Real-time PCR Untersuchungen bestätigen und durch den Androgenrezeptor-Antagonisten Flutamid vollständig aufheben. Eine Transkriptionsfaktoren-Datenbankanalyse mit TESS der Promoterregion des menschlichen α -ENaC Gens, zeigte ein mögliches Androgenrezeptor responsives Element (ARE) ca. 140 Nukleotide oberhalb des Transkriptionsstartes für Exon 1A.

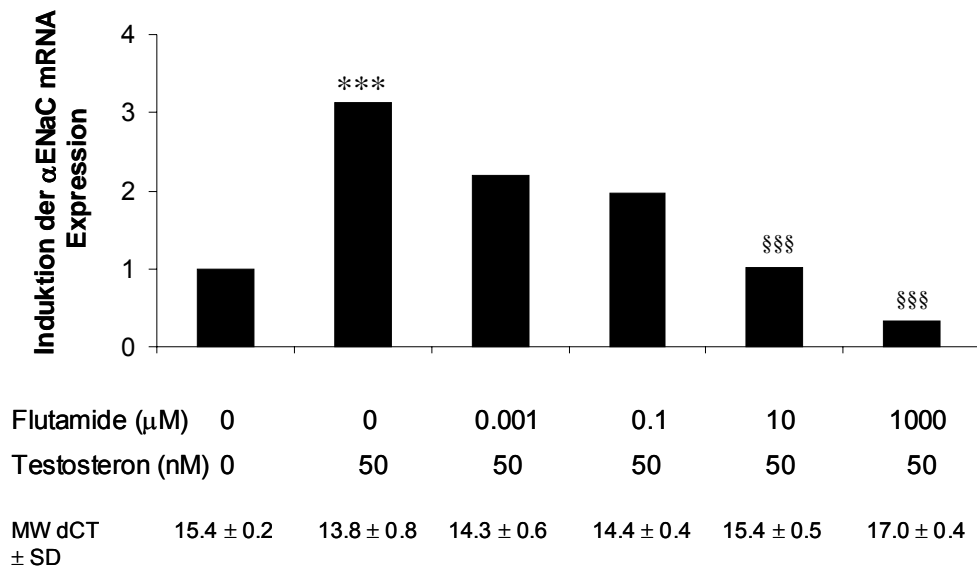


Abb. 13: Testosteron stimuliert die α ENaC Expression über den Androgenrezeptor (AR): Änderung der α ENaC mRNA Expression zwischen Kontroll-HKC-8 Zellen und Testosteron-behandelten (50nM) HKC-8 Zellen bei steigenden Konzentrationen des AR Antagonisten Flutamid. Expression von Zellen ohne Testosteron und Flutamid wurden gleich 1 gesetzt. Für jede Konzentrationsstufe wurden 3 Zellkulturflaschen gezüchtet. Die cDNA jeder Zellkulturflasche wurde mindestens doppelt mittels singleplex quantitative TaqMan real-time PCR mit 18S als housekeeping gene bestimmt. Alle Inkubationen wurden dreimal wiederholt. *** = $p < 0.001$ im Vergleich zu den Kontrollen; §§§ = $p < 0.001$ im Vergleich zu Zellen mit 50nM Testosteron-Behandlung.

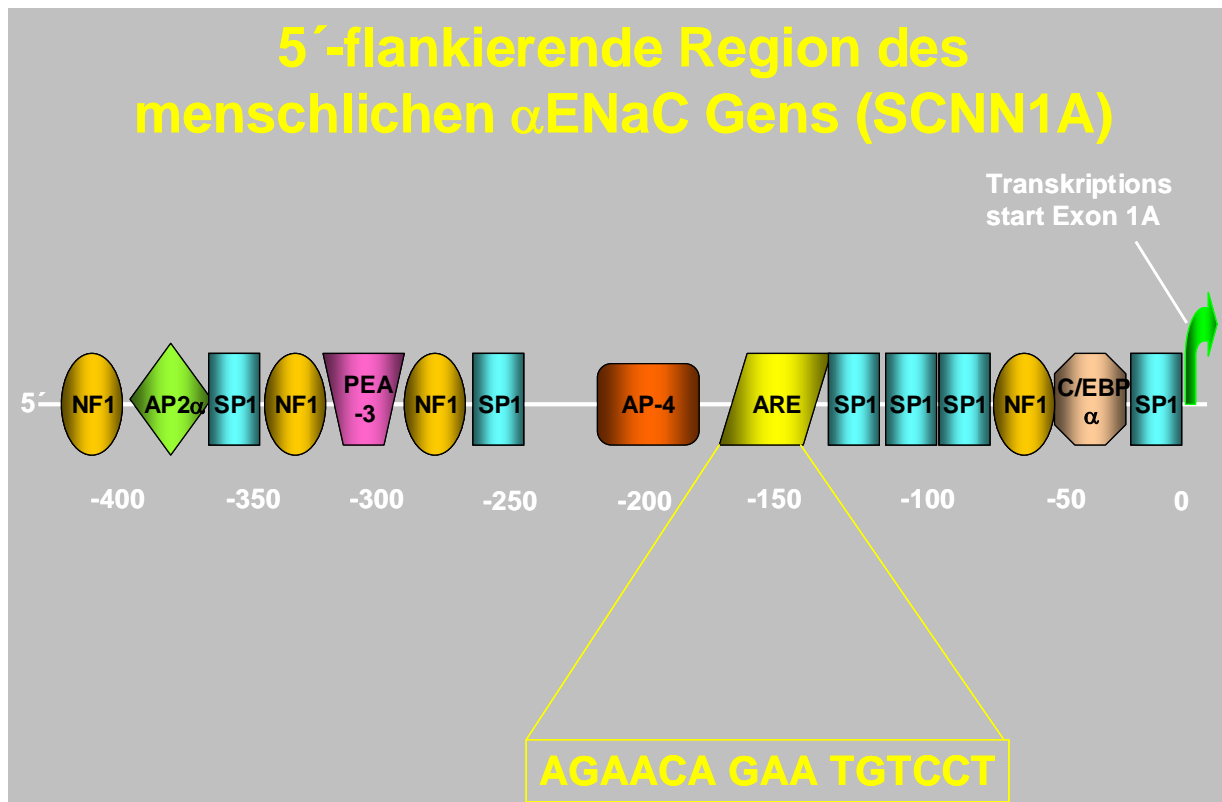


Abb. 14: Schematische Darstellung des 5'-Endes des menschlichen α ENaC Gens (SCNN1A) mit möglichen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen. Der gebogene Pfeil zeigt den Transkriptionsstart für α ENaC-1 (Exon 1A) an. ARE = Androgen Rezeptor responsives Element.

Wir konstruierten zur weiteren Analyse des α ENaC Promoters vier verschieden große Promoterkonstrukte (bis 1,5 kb Größe) und ligierten diese in pGL3 Vektoren. Das kleinste Konstrukt (construct 1) enthielt nicht das ARE, die anderen drei enthielten die ARE Sequenz. Der pGL3 Vektor besitzt einen firefly Luciferase Promoter, der bei erfolgreicher Geninduktion, die firefly Luciferase Genexpression stimuliert. Die Promoterkonstrukte wurden mit der Lipofectamin Methode in HKC-8 Zellen transfiziert. Als Transfektionskontrolle kotransfizierten wir die Zellen mit der renilla Luciferase.

Wir konnten zeigen, dass eine Induktion der Luciferaseaktivität durch dieses ARE sehr wahrscheinlich ist. Construct 1, das nicht das ARE enthielt, zeigte keine Stimulation durch steigende Konzentrationen von Testosteron. Das Construct 2 jedoch zeigte eine eindeutige konzentrations-abhängige Induktion der Luciferaseaktivität durch Testosteron. Construct 3 und 4 zeigten ebenfalls eine Stimulierbarkeit durch Testosteron, jedoch war die Stimulation nicht so ausgeprägt. Dies lässt vermuten, dass in diesem Bereich eventuell hemmende Transkriptionsfaktoren modulierend eingreifen. Die Induktion war ebenfalls durch den Androgenrezeptor-Antagonisten Flutamid vollständig zu hemmen.

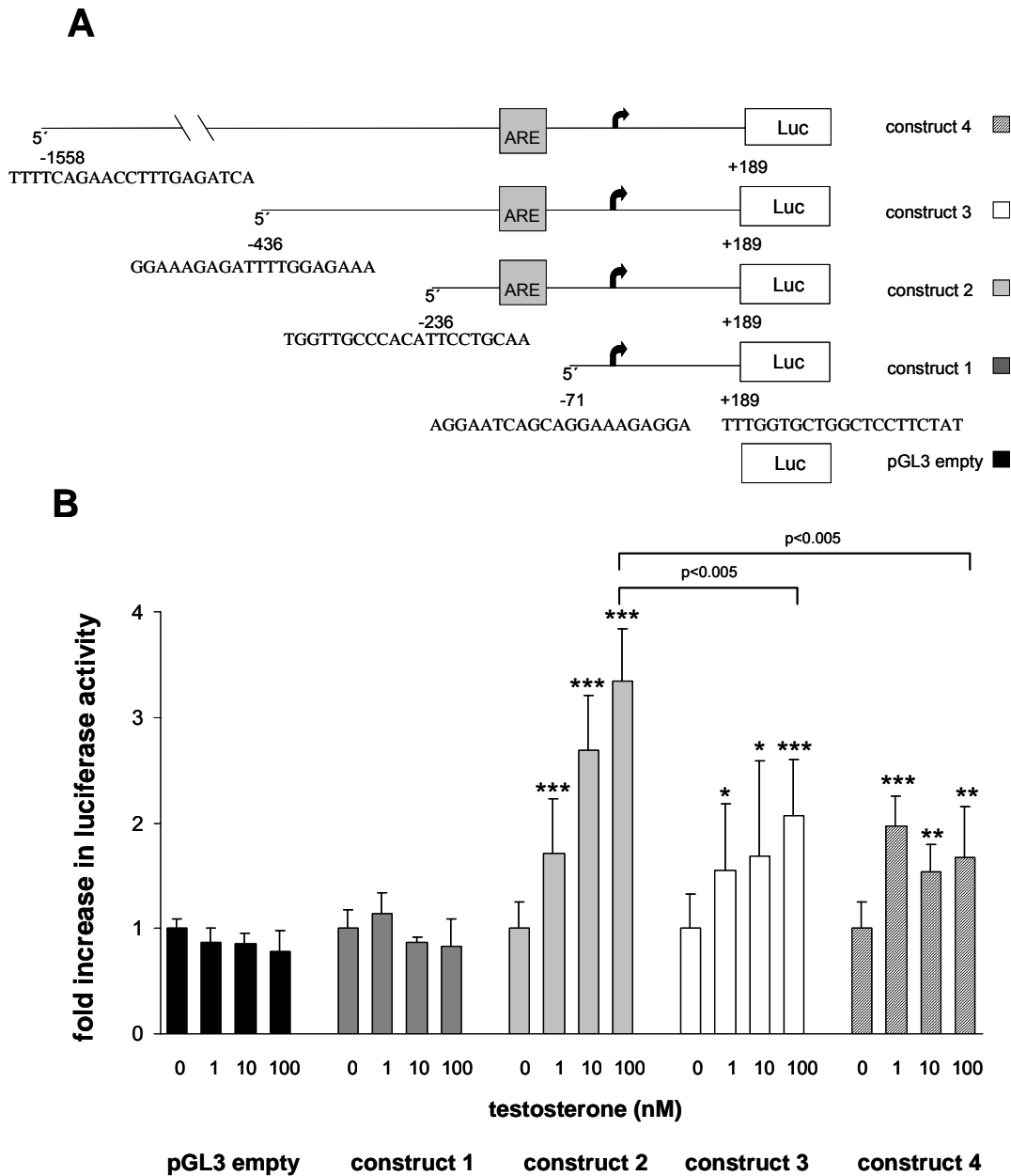


Abb. 15: Direkte Effekte von Testosteron auf den Promoter des Gens SCNN1A, das für den α ENaC kodiert. **A.** Konstrukte der 5'-flankierenden Region und die verwendeten Primer. Der gebogene Pfeil zeigt den Transkriptionsstart für α ENaC-1 (Exon 1A). **B.** Die Konstrukte wurden transient in HKC-8 Zellen transfiziert und mit oder ohne Testosteron inkubiert (0-100 nmol/l). Luciferase Aktivitäten wurden als x-fache Induktion (fold increase) dargestellt und auf das jeweilige Konstrukt mit 0 nmol/l Testosteron bezogen, das gleich 1 gesetzt wurde. Mittelwerte \pm Standardabweichung von n=4 und jeweils Doppelmessungen. * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001.

Eine zusätzliche interessante Beobachtung war, dass 5α -Dihydro-Testosteron nicht die gleiche Wirkung wie Testosteron auf die α -ENaC Regulation zeigte. Sowohl in intakten Zellen als auch in mit α -ENaC Promoterkonstrukten transfizierten Zellen zeigte 5α -Dihydro-Testosteron keinen Testosteron-vergleichbaren Anstieg der α -ENaC Expression. Wir vermuten, dass die ARE Sequenz ein wichtiger Faktor in der Unterscheidung zwischen Testosteron und 5α -Dihydro-Testosteron Wirkungen ist (257;258). Zusätzlich könnten durch Testosteron und 5α -Dihydro-Testosteron verschiedene Koregulatoren aktiviert werden (283;284).

Mit diesen Versuchen konnten wir zeigen, dass die Expression des α -ENaC direkt durch Testosteron erfolgen kann und eine mögliche Erklärung für den geschlechtsspezifischen Unterschied im Blutdruck sein kann.

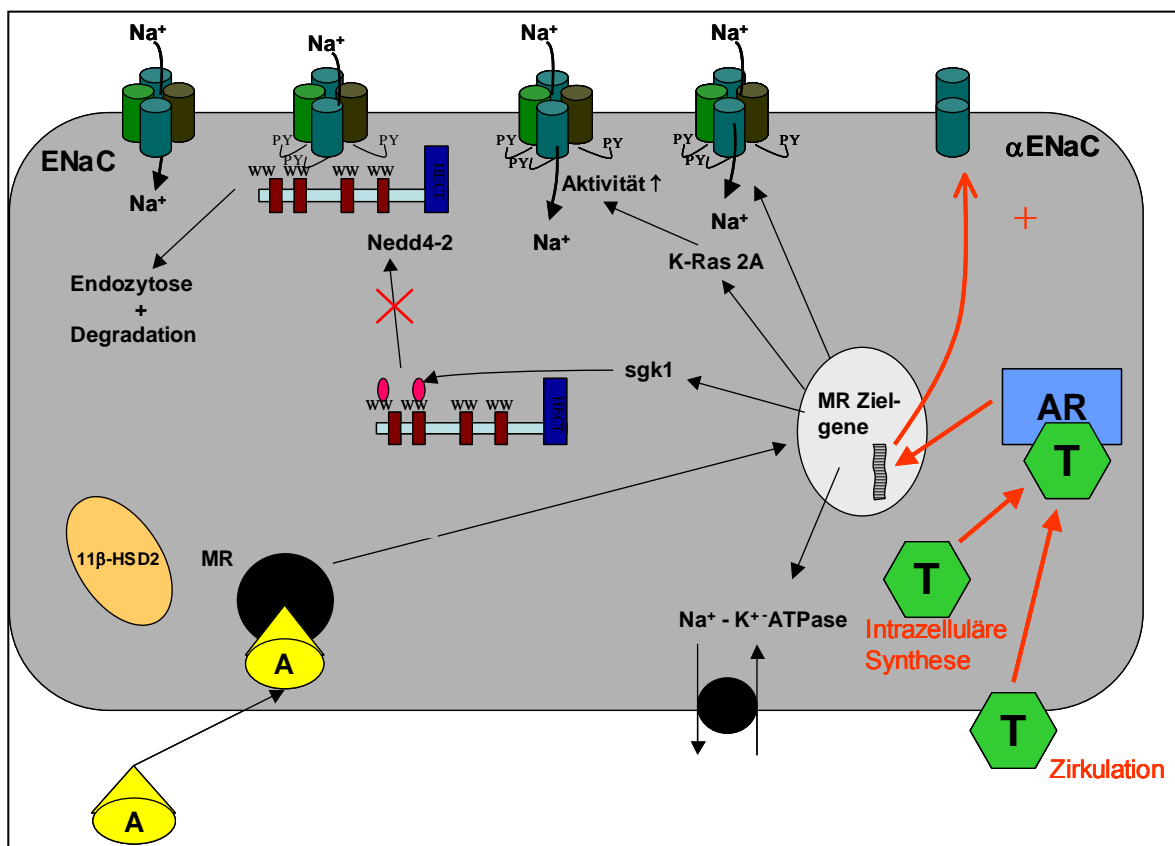


Abb. 16: Die bekannte Regulation des epithelialen Natriumkanals (ENaC) läuft über die Bindung von Aldosteron (A) an den durch die 11β -HSD2 geschützten Mineralokortikoidrezeptor (MR). Die alpha-Untereinheit des epithelialen Natriumkanals

(α ENaC) kann direkt durch Testosteron (T) über den Androgenrezeptor (AR) reguliert werden. Das Testosteron stammt entweder aus der Blutzirkulation oder kann auch in der Nierenzelle selber aus Vorläufersteroiden, wie DHEA, synthetisiert werden.

4.3.6 *In vivo* Effekt von Androgenen auf die Niere

Um den *in vivo* Effekt von Testosteron und 5α -Dihydro-Testosteron auf die Niere zu untersuchen, wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. B. Allolio, Würzburg, Nieren eines Rattenversuches zur Verfügung gestellt. Erwachsene männliche Wistar Ratten wurden orchietomiert und dann entweder mit Placebo (jede Gruppe n=4), oder mit einer Einzeldosis lang-wirksamen Testosteron (Testosteron Undecanoat, 100mg/kg Körpergewicht), oder mit 500mg/kg Körpergewicht Testosteron, oder mit 75mg/Pellet 5α -Dihydro-Testosteron (s.c. implantiertes Pellet mit 21 Tage Freisetzung) für 2 Wochen behandelt. Von allen 16 Tieren erhielten wir jeweils eine Niere zur weiteren Untersuchung. Nach RNA Extraktion und Transkription in cDNA, analysierten wir mittels quantitativer real-time PCR in einem ersten Versuch die α -ENaC Expression in den Nieren dieser Ratten. Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse. Es zeigte sich eine deutliche dosisabhängige Induktion der α -ENaC Expression in den Nieren der Tiere, die mit Testosteron behandelt wurden. Ratten, die 5α -Dihydro-Testosteron erhielten, zeigten zwar auch einen geringen signifikanten Anstieg der α -ENaC Expression. Dieser war jedoch deutlich schwächer als der durch Testosteron. Die Testosteron-vermittelte Induktion der α -ENaC Expression ist damit nicht nur ein *in vitro*- oder Zellkultureffekt, sondern auch *in vivo* zu beobachten. Weiterhin hat sich der Verdacht erhärtet, dass Testosteron und 5α -Dihydro-Testosteron in der Niere unterschiedliche Effekte haben.

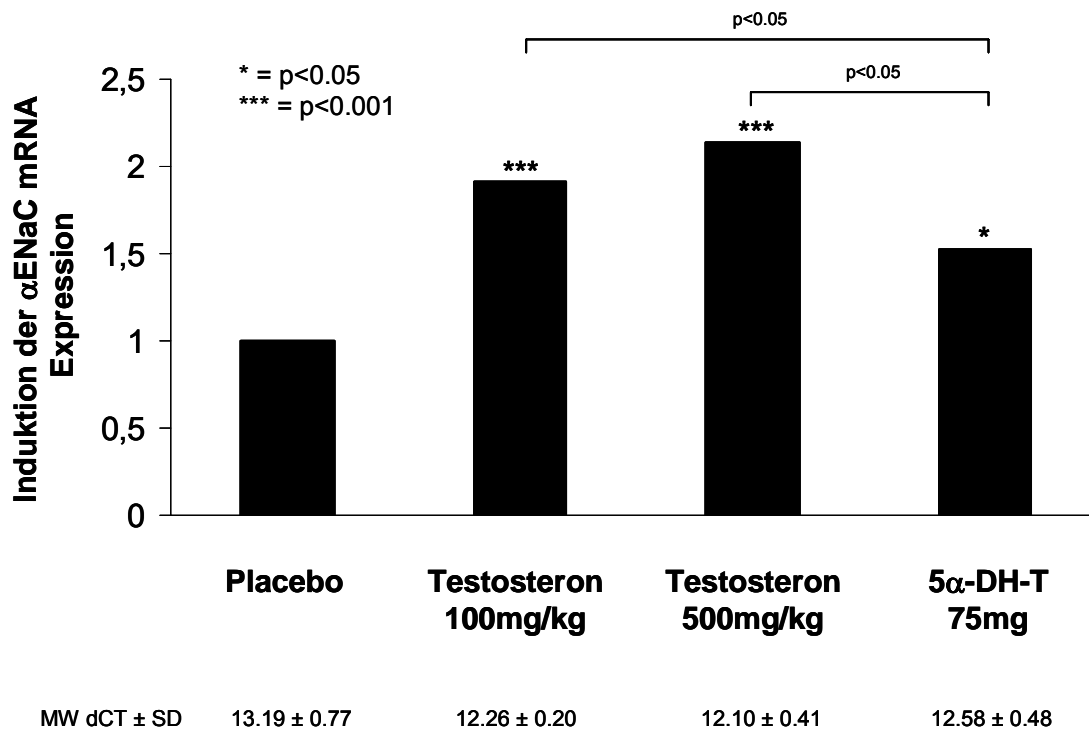


Abb. 17: Regulation der mRNA Expression der alpha-Untereinheit des epithelialen Natriumkanals (α -ENaC) in Ratten unter Androgenbehandlung. Darstellung als x-facher Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe, deren Expression gleich 1 gesetzt wurde. 5 α -Dihydro-Testosteron (5 α -DH-T) wurde über 75mg Pellets verabreicht.