

6. Zusammenfassung

Die Isoenzyme der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (11 β -HSD) spielen eine Schlüsselrolle für die Modulation der Wirkung von Glucocorticoiden. Die *in vivo* als Reduktase fungierende 11 β -HSD1 ist mit dem Glucocorticoidrezeptor kolokalisiert und zeigt eine hohe Expression in Leber und visceralem Fettgewebe. Die 11 β -HSD2 wird hauptsächlich in Mineralocorticoid-Zielgeweben exprimiert, wo sie als Oxidase den Mineralocorticoidrezeptor vor der Okkupation durch endogene Glucocorticoide schützt. Gegenüber synthetischen 9 α -Fluorosteroiden hingegen fungiert die 11 β -HSD2 überwiegend als Reduktase. Da die 11 β -HSD-Isoenzyme in einer Prärezeptor-Regulation den Zugang zum Mineralocorticoid- und Glucocorticoidrezeptor determinieren, wurde in dieser Arbeit die Aktivität der 11 β -HSD1 und der 11 β -HSD2 gegenüber verschiedenen - häufig klinisch eingesetzten - synthetischen Steroide untersucht. Insbesondere wurden die Einflüsse von Substituenten im Steroidgerüst evaluiert.

Untersuchungen an transfizierten CHO-Zellen

Nach der Transfektion der Isoenzyme der 11 β -HSD in Chinese hamster ovarial (CHO) - Zellen konnte eine stabile Expression erreicht werden. Auch nach vielen Passagen der Zellen war kein Aktivitätsverlust feststellbar. Für die Bestimmung der 11 β -HSD - Aktivität wurden die Substrate dem Inkubationsmedium zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die 11-Oxo- und 11-Hydroxyform der Steroide im Überstand mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie analysiert.

An mit der 11 β -HSD1 transfizierten Zellen konnten bekannte *in vivo*-Charakteristika des Isoenzym beobachtet werden: Bei niedriger Substrataffinität fungierte das Enzym ausschließlich als 11 β -Reduktase. Die Reduktionsaktivität der 11 β -HSD1 wurde durch eine 2 α -Methylgruppe stark, durch eine 2-Chlorgruppe vollständig gehemmt. Eine 6 α -Methylierung (Methylprednisolon) sowie eine 16-Methylen-Konfiguration (Prednylidin) beeinflussten die Enzymaktivität nicht signifikant. Eine verstärkte 11 β -Reduktion ließ sich bei 9 α - und 6 α -Fluorosteroiden (Fluorocortisol und Fluocortolon) sowie bei Prednisolon (Δ 1-Dehydrokonfiguration) beobachten. Die first pass-Aktivierung in der Leber scheint daher bei Prednison effektiver abzulaufen als bei Cortison.

Die 11 β -HSD2 der transfizierten Zellen zeigte die charakteristische hohe Substrataffinität des Enzyms und fungierte gegenüber unfluorierten Steroiden ausschließlich als 11 β -Oxidase.

Die Reduktaseaktivität des Enzyms gegenüber 9 α -Fluorosteroiden war im Vergleich mit unseren Versuchen an humanen Nierengewebschnitten eher schwach ausgeprägt. Als Grund dafür ist vor allem ein intrazellulärer Mangel an NADH anzunehmen.

Die 11 β -Oxidation der 11 β -HSD2 war vermindert bei Steroiden mit einer 6 α -Methylgruppe (Methylprednisolon), 16-Methylenkonfiguration (Prednylidin), 16 α -Methylgruppe und 9 α -Fluorierung (Dexamethason). Eine 2 α -Methylgruppe sowie eine 2-Chlorgruppe hemmten sowohl 11 β -Oxidation als auch 11 β -Reduktion des Enzyms, die 2-Chlorgruppe blockierte beide Reaktionen vollständig. Im Gegensatz zu 9 α -Fluorosteroiden wurden 9 α -Chlorsteroiden von der 11 β -HSD2 nicht reduziert. Aus klinischer Sicht sind 9 α -Fluorsteroiden daher für den Einsatz in Geweben mit hoher 11 β -HSD2 Expression besonders geeignet. Auch für die Induktion der Lungenreifung beim Embryo sind diese Substanzen zu bevorzugen, da sie von der placentaren 11 β -HSD2 wenig oxidiert werden. Sollen allein bei der Mutter Steroideffekte erzielt werden, bieten sich Steroide an, die von der 11 β -HSD2 stark oxidiert werden (z.B. Prednisolon). Im Vergleich zu dem weithin verwendeten Prednisolon sollten 11-OH-Steroide mit geringerer 11-Oxidation durch die 11 β -HSD2 (z.B. 6 α -Methylprednisolon, Deflazacort oder Prednylidin) aus pharmakokinetischer Sicht für eine renale Immunsuppression vorteilhafter sein.

***In vivo* Versuche an gesunden Probanden**

In vitro wird die Reduktaseaktivität der 11 β -HSD1 unter dem Einfluß von Glucocorticoiden stimuliert. In dieser Arbeit untersuchten wir den *in vivo* Effekt einer fünftägigen Gabe von 30mg Prednisolon auf die Aktivität der 11 β -HSD1. Dazu wurde bei Probanden der Serumquotient aus Cortisol (F) zu Cortison (E) nach Einnahme von Cortisonazetat gemessen. Unter Prednisolon zeigte sich eine signifikant stärkere Umwandlung von Cortison zu Cortisol sowie ein signifikant höherer Cortisol/Cortison-Quotient im Serum. Diese *in vivo* Daten machen eine direkte durch Glucocorticoide vermittelte Aktivitätssteigerung oder eine Induktion (Zunahme der Expression) der 11 β -HSD1 sehr wahrscheinlich. Eine Induktion der 11 β -HSD1 durch Glucocorticoide scheint daher die ACTH-Antwort des Körpers in Stresssituationen zu verstärken. Aus pathophysiologischer Sicht könnte man wegen dieses Mechanismus Stress als möglichen Risikofaktor für die Entstehung des Metabolischen Syndroms betrachten, wozu es bisher keine eindeutigen epidemiologischen Daten gibt.

Die Expression der 11 β -HSD1 in Leber und Fettgewebe trägt möglicherweise zur Pathogenese von Insulinresistenz und Adipositas bei. Die Entwicklung selektiver Inhibitoren der 11 β -HSD1 ist daher von pharmakologischem Interesse. Wir überprüften mit Chenodesoxycholsäure eine potentielle Substanz auf ihre Wirksamkeit *in vivo*. Im Probandenversuch sollte die Reduktion von oral gegebenem Cortisonazetat durch die gleichzeitige Einnahme von Chenodesoxycholsäure gehemmt werden. Es konnte jedoch kein Effekt auf die Reduktaseaktivität der 11 β -HSD1 nachgewiesen werden. Höher selektive und potentere Inhibitoren des Enzyms können vermutlich erst nach Aufklärung der Tertiärstruktur beider Isoenzyme der 11 β -HSD entwickelt werden.

Die *in vitro* beschriebene geringe 11-Oxidation von Dexamethason durch die renale 11 β -HSD2 konnten wir durch eine *in vivo* Untersuchung bestätigen. In dieser Arbeit wurde die 11 β -HSD2-Aktivität gegenüber Dexamethason und Cortisol *in vivo* verglichen. Als Maß dienten die Urinquotienten Dexamethason/11-Dehydrodexamethason sowie F/E. Es konnte gezeigt werden, dass bedingt durch mangelnde 11 β -Oxidation und Rückumwandlung des in geringen Mengen entstehenden Dehydrodexamethasons via effektiver 11 β -Reduktion durch die 11 β -HSD2 auch *in vivo* das Redoxgleichgewicht des Enzyms auf Seiten der 11 β -Hydroxyform liegt. Die Gabe von Dexamethason ist daher besonders indiziert, wenn Steroidwirkungen in Geweben mit hoher 11 β -HSD2 Expression erwünscht sind.

Beide von uns etablierten Bioassays eignen sich in sehr guter Weise für die klinische Testung der Aktivität der Isoenzyme der 11 β -HSD: Nach oraler Gabe von Cortison lässt sich durch die Bestimmung des entstehenden Cortisols sehr gut die Aktivität der hepatischen 11 β -HSD1 abschätzen. Die Bestimmung der freien 11-OH- und 11-Oxosteroide im Urin erlaubt verlässliche Rückschlüsse auf die 11 β -HSD2-Aktivität. Somit eröffnen die von uns etablierten *in vitro* - und *in vivo* - Systeme neue Einblicke in Funktion und Regulation der physiologisch und pathophysiologisch wichtigen 11 β -HSD-Enzyme.