

Stefanie Hammer

**LIGAND – REZEPTOR INTERAKTIONEN
UND SIGNALTRANSDUKTION
VON GLUCOCORTICOIDEN**

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Gedruckt auf holz- und säurefreiem Papier, 100 % chlorfrei gebleicht.

© Weißensee Verlag, Berlin 2002
Wilhelm-Wagenfeld-Str. 1, 13086 Berlin
Tel. 0 30 / 91 20 7-100
www.weissensee-verlag.de
e-mail: mail@weissensee-verlag.de

Alle Rechte vorbehalten

Umschlag: Chili Grafik-Design, Berlin, unter Verwendung einer Grafik der Autorin

Printed in Germany

ISSN 1611-0536
ISBN 3-934479-85-5

**LIGAND – REZEPTOR INTERAKTIONEN
UND SIGNALTRANSDUKTION
VON GLUCOCORTICOIDEN**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Stefanie Hammer

aus Ludwigshafen am Rhein

Berlin 2002

Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting danke ich sehr herzlich für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas, die wissenschaftlichen Anregungen, die ständige Gesprächsbereitschaft und ihre fördernde Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die freundliche Anleitung bei den Molecular Modelling Untersuchungen, die ständige Gesprächsbereitschaft bei der Veröffentlichung der Ergebnisse und die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Besonders danken möchte ich auch allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje für die freundliche Aufnahme und die große Hilfsbereitschaft, insbesondere Herrn Dr. Wolfgang Sippl für die Betreuung der QSAR-Untersuchungen und die Durchsicht der Arbeit sowie Frau Gisela Jessen für die Kooperation und die vielen für mich umgeänderten Abbildungen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Oliver Liesenfeld für die Überlassung der Hirnendothelzellen sowie Herrn Dr. Eule, Herrn Dr. Jung, Herrn Dr. Knoblauch und Herrn Dr. Schildknecht für das Gewebematerial zur Zellgewinnung.

Bei Herrn Jürgen Willert, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik Berlin, möchte ich mich herzlich für die Anleitung bei der Plasmidamplifizierung bedanken.

Frau Diana Behrens und Herrn Dr. Michael Becker aus der Gruppe von Frau Dr. Idu-na Fichtner, Max-Delbrück-Zentrum Berlin, danke ich für die Kooperation bei der Etablierung der RT-PCR.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting möchte ich für das freundschaftliche Arbeitsklima und die vielen tollen gemeinsamen Unternehmungen danken. Besonderer Dank gilt hier Frau Irina Spika für die enge Zusammenarbeit als Glucocorticoidgruppe und die persönliche Freundschaft, Herrn PD Dr. Burkhard Kleuser für die wissenschaftliche Beratung, die kritischen Diskussionen und die Korrektur der Arbeit, Frau Dr. Ulrike Trier für die Aufmunterung und Betreuung zu Beginn der Promotion sowie Frau Dr. Annekathrin Haberland und Herrn Uwe Münster für die Korrektur der Arbeit.

Originalarbeiten

H. Xu, J. Frank, U. Trier, S. Hammer, W. Schröder, J. Behlke, M. Schäfer-Korting, J.F. Holzwarth, W. Sängler: Interaction of Fluorescence Labeled Single-Stranded DNA with Hexameric DNA-Helicase RepA: A Photon and Fluorescence Correlation Spectroscopy Study. *Biochemistry* 40: 7211-7218, 2001

S. Hammer, I. Spika, W. Sippl, G. Jessen, B. Kleuser, H.-D. Höltje, M. Schäfer-Korting: Glucocorticoid Receptor Interactions with Glucocorticoids: Evaluation by Molecular Modeling and Functional Analysis of Glucocorticoid Receptor Mutants. *Steroids*, reviewed

I. Spika, S. Hammer, B. Kleuser, H.-C. Korting, M. Schäfer-Korting: Transcriptional Activity of Potent Glucocorticoids: Relevance of Glucocorticoid Receptor Isoforms and Drug Metabolites. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, im Druck

U. Münster, S. Hammer, U. Blume-Peytavi, M. Schäfer-Korting: Testosterone metabolism in human skin - influence of drugs. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, eingereicht

Poster

A. Gysler, S. Hammer, U. Königsmann, C. Santos Maia, M. Schäfer-Korting: Drug Penetration and Metabolism in Human Skin Models. Symposium "ZEBET's 10 Year Anniversary", BgVV, Berlin, 1999

S. Hammer, I. Spika, U. Trier, B. Kleuser, M. Schäfer-Korting: Glucocorticoid Receptor Alpha and Beta: Signal Transduction and Mutual Influence. *Arch Pharm (Suppl 2)* 333, 2000

U. Münster, S. Hammer, M. Schäfer-Korting: Testosterone metabolism in human skin and its inhibition by 17 α -estradiol and dutasteride. *Arch Pharm (Suppl 2)* 333, 2000

I. Spika, S. Hammer, B. Kleuser, M. Schäfer-Korting: Transactivation Induced by Topical Glucocorticoids. Naunyn-Schmiedeberg`s Arch Pharmacol (Suppl 4) 363, 2001

U. Münster, S. Hammer, U. Blume-Peytavi, M. Schäfer-Korting: Testosterone metabolism in human skin - inhibitory effects of 17 α -estradiol and dutasteride. 4th International Intensive Course and Workshop on Cell Culture and in vitro Models for Drug Absorption and Delivery, Saarbrücken, 2002

S. Hammer, I. Spika, G. Jessen, H.-D. Höltje, M. Schäfer-Korting: Glucocorticoid - Receptor Interactions: Evaluation by Molecular Modeling and Transactivation of Wild Type and Mutant Receptors. Naunyn-Schmiedeberg`s Arch Pharmacol (Suppl 1) 365, 2002

I. Spika, S. Hammer, M. Schäfer-Korting: High Transrepressive Action of Native Prednicarbate. Naunyn-Schmiedeberg`s Arch Pharmacol (Suppl 1) 365, 2002

S. Hammer, I. Spika, W. Sippl, G. Jessen, H.-D. Höltje, M. Schäfer-Korting: Glucocorticoid Receptor Interactions: Molecular Modeling and QSAR Investigations, Arch Pharm (Suppl 1) 335, 2002

1 EINLEITUNG	1
1.1 Struktur und Ligandenbindung des Glucocorticoid-Rezeptors	3
1.1.1 Funktionelle Domänen des Glucocorticoid-Rezeptors.....	3
1.1.2 Struktur der Ligandenbindungsdomäne	5
1.1.3 Interaktionen mit dem Liganden	6
1.1.4 Struktur/Wirkungs-Beziehungen der Glucocorticoide	7
1.2 Signaltransduktion über den Glucocorticoid-Rezeptor	9
1.2.1 Transkriptionelle Aktivierung und Hemmung von Genen durch DNA- Bindung des Glucocorticoid-Rezeptors	9
1.2.2 Hemmung von Transkriptionsfaktoren durch den Glucocorticoid- Rezeptor (Transrepression).....	12
1.3 Glucocorticoid-Rezeptor-Subtypen	14
1.4 Glucocorticoide in der Dermatologie.....	17
1.4.1 Das atopische Ekzem.....	17
1.4.2 Glucocorticoid-Therapie des atopischen Ekzems.....	18
1.4.3 Nutzen/Risiko-Bewertung	20
1.5 Fragestellung und Zielsetzung.....	21
2 MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1 Material	27
2.1.1 Geräte	27
2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	28
2.1.3 Glucocorticoid-Lösungen.....	31
2.2 Zellkultivierung und Transfektionen	32
2.2.1 Kultivierung von primären Keratinozyten und Fibroblasten	32
2.2.2 Kultivierung von COS-7-Zellen und humanen Hirnendothelzellen.....	33
2.2.3 Expressionsplasmide, Plasmidamplifikation und Restriktionsanalyse	34
2.2.4 Transfektion von COS-7-Zellen	36
2.2.5 Bestimmung der Transfektionseffizienz.....	36
2.3 Glucocorticoid-Rezeptor Protein und mRNA	38
2.3.1 Proteinbestimmung	38

2.3.2 Spezifische Proteindetektion mittels SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot.....	38
2.3.3 Analyse der mRNA-Transkription: mRNA-Isolierung, cDNA-Synthese und Polymerasekettenreaktion	40
2.4 Rezeptorbindung und transkriptionelle Aktivierung	43
2.4.1 Rezeptorbindungsstudien an intakten Zellen.....	43
2.4.2 Zytosolische Rezeptorbindungsstudien	44
2.4.3 Bestimmung der transkriptionellen Aktivierung.....	45
2.5 Bestimmung der Apoptoserate	46
2.5.1 Zellstimulation und –aufarbeitung.....	47
2.5.2 Einstellung des Durchflusszytometers und Messung	47
2.6 Theoretische Charakterisierung der Glucocorticoid - Rezeptor Wechselwirkungen	49
2.6.1 Kraffteld-Methoden	49
2.6.2 Konformationsanalysen	50
2.6.3 Moleküldynamik-Simulationen.....	50
2.6.4 Methoden zur Geometrieoptimierung	51
2.6.5 Charakterisierung der Proteinstruktur.....	52
2.6.6 Quantitative Struktur/Wirkungs-Beziehungen.....	52
2.7 Statistik.....	54
3 ERGEBNISSE	55
3.1 Experimentelle Bestimmung der Rezeptorbindung von Glucocorticoiden .	57
3.1.1 Rezeptorbindungsstudien an COS-7-Zellen	57
3.1.2 Rezeptorbindungsstudien an Fibroblasten	65
3.2 Theoretische Untersuchungen zur Rezeptorbindung von Glucocorticoiden	66
3.2.1 Simulation der Ligandenbindung	67
3.2.2 Charakterisierung der Ligand-Rezeptor-Komplexe: Moleküldynamik-Simulationen.....	69
3.2.3 Quantitative Struktur/Wirkungs-Beziehungen.....	73
3.3 Funktionelle Charakterisierung von hGRα-Mutanten.....	77
3.3.1 Ligandenbindung durch hGR α -Mutanten	77

3.3.2 Transkriptionelle Aktivierung durch hGR α -Mutanten.....	79
3.4 Bedeutung des Glucocorticoid-Rezeptor-Subtyps hGRβ	81
3.4.1 Vorkommen von hGR β in Keratinozyten und Fibroblasten.....	82
3.4.2 Einfluss von hGR β auf die Signalübertragung durch hGR α	87
3.5 Einfluss von Glucocorticoiden auf die Apoptose	91
3.5.1 Apoptotische Wirkung auf Keratinozyten und Fibroblasten	91
3.5.2 Antiapoptotische Wirkung auf Keratinozyten und Fibroblasten	92
3.5.3 Beeinflussung der Apoptose von Hirnendothelzellen	100
4 DISKUSSION	103
4.1 Experimentelle Untersuchung der Rezeptorbindung von Glucocorticoiden	105
4.2 Theoretische Betrachtung der Glucocorticoid-hGR α Wechselwirkungen	107
4.3 Ligandenbindung und Signaltransduktion von hGR α -Mutanten.....	110
4.4 Einfluss von Rezeptor-Subtypen.....	113
4.5 Einfluss von Glucocorticoiden auf die Apoptose	116
4.6 Ausblick.....	119
5 ZUSAMMENFASSUNG	121
6 LITERATURVERZEICHNIS	127

Acetyl-Co A	Acetyl-Coenzym A
Act	Actinomycin D
AF	Transaktivierungs-Domäne
Ala, A	Alanin
Amp ^r	Ampicillinresistenz
AP-1	Aktivatorprotein-1
AR	Androgen-Rezeptor
Arg, R	Arginin
Asn, N	Asparagin
Bcl-2	Humanes B-Zell-Lymphom-Protoonkogen-2
BM	Betamethason
BMDP	Betamethason-17,21-dipropionat
BMV	Betamethason-17-valerat
BPE	Boviner Hypophysenextrakt
BSA	Bovines Serumalbumin
BTF	Basale Transkriptionsfaktoren
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Binding-Protein
C ₂ -Cer	N-Acetyl-D-erythro-Sphingosin
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CBP	CREB-Binding-Protein
CD	Differenzierungsmarker (cluster of differentiation)
CLP	Clobetasol-17-propionat
CMV	Zytomegalie-Virus
CoMFA	Comparative-Molecular-Field-Analysis
COX-2	Cyclooxygenase-2
cpm	Zählrate (counts per minute)
CREB	cAMP-Response-Element-Bindungsfaktor
CVFF	Consistent-Valence-Force-Field
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DCE	Desoximetason-21-cinnamat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEX	Dexamethason
³ H-DEX	[1,2,4,6,7- ³ H] Dexamethason
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles' Medium
DMS	N,N-Dimethyl-D-erythro-Sphingosin
DMSO	Dimethylsulfoxid

DOM	Desoximetason
DTT	Dithiothreitol
EC _{50TA}	Halbmaximale Transaktivierungswerte
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Estrogen-Rezeptor
NFAT	Nuclear-Factor-of-Activated-T-Cells
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Durchflusszytometer (Fluorescence Activated Cell Sorting)
FBM	Fibroblasten-Basalmedium
FGM	Fibroblasten-Wachstumsmedium
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Forwardscatter
* g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
β-Gal	β-Galactosidase
Gln, Q	Glutamin
Glu, E	Glutamat
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
GRE	Glucocorticoid-Response-Element
HBMEC	Humane mikrovaskuläre Hirnendothelzellen
hEGF	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor
HRP	Meerrettich-Peroxidase
hsp	Hitzeschockprotein
HUVEC	Humane venöse Nabelschnurendothelzellen
IC _{50exp}	Experimentelle halbmaximale Verdrängungswerte
IC _{50pred}	Vorhergesagte halbmaximale Verdrängungswerte
ICAM-1	Intracellular-Adhesion-Molecule-1
ID	Immunogene Domäne
Ig-E	Immunglobulin-E
IL	Interleukin
IκBα	Inhibitorprotein des NFκB
KA	Koaktivator
KBM	Keratinozyten-Basalmedium
K _D	Dissoziationskonstante
KDa	Kilo Dalton

KGM	Keratinocyten-Wachstumsmedium
KR	Korepressor
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LLnL	N-Acetyl-Leucinyl-Leucinyl-Norleucinal
LOO	Leave-One-Out
MCP	Monocyte-Chemoattractant-Protein
Met, M	Methionin
MF	Mometason-17-furoat
MMTV	Mouse-Mammalian-Tumor-Virus
MP17P	Methylprednisolon-17-propionat
MPA	Methylprednisolonaceponat
MPD	Methylprednisolon
MPROGA	Medroxyprogesteronacetat
MR	Mineralocorticoid-Rezeptor
MW	Mittelwert
NK κ B	Nukleärer Faktor κ B
Oct-1	Octamer-Transkriptions-Faktor-1
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
Ori	Replikationsursprung
P17EC	Prednisolon-17-ethylcarbonat
P21EC	Prednisolon-21-ethylcarbonat
STAT-5	Signal-Transducer-and-Activator-of-Transcription-5
PAF	Plättchen-aktivierender-Faktor
PBS	Phosphatgepufferte-Salzlösung
PBST	PBS-Tween
PC	Prednicarbat
PD	Prednisolon
PEP	Prednisolon-17-ethylcarbonat, 21-phenylacetat
PI	Propidiumiodid
PLS	Partial-Least-Squares
PPAR	Peroxisom-Proliferator-Aktivator-Rezeptor
PR	Progesteron-Rezeptor
PS	Phosphatidylserin
3D QSAR	Dreidimensionale Struktur/Wirkungs-Beziehungen
RAR	Retinsäure-Rezeptor
RBA	relative Bindungsaffinität

RMS	Root-Mean-Square, Wurzel der Abweichungsquadrate
RSV	Rous-Sarcoma-Virus
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RU486	Mifepriston
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SD	Standardabweichung
SDEP	Standardfehler der Vorhersage
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERM	Selektive Estrogen-Rezeptor-Modulatoren
SLZ	Sulfasalazin
SRC-1	Steroid-Rezeptor-Coactivator-1
SSC	Sidewardscatter
SV 40	Simian Virus 40
TAF	TBP-Assoziierter-Faktor
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	TATA-Bindungs-Protein
TE	Tris-EDTA
TFM	Transfektionsmedium
TIF-2	Transcriptionfactor-Intermediary-Factor-2
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TPA	Phorbol-12-myristat, 13-acetat
TR	Thyroid-Rezeptor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Val, V	Valin
VDR	Vitamin D-Rezeptor
wt-hGR α	wild-type-hGR α
x-gal	3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid

1 EINLEITUNG

1.1 Struktur und Ligandenbindung des Glucocorticoid-Rezeptors

Die meisten bekannten Effekte natürlicher und synthetischer Glucocorticoide beim Menschen werden über den ubiquitär vorkommenden α -Subtyp des humanen Glucocorticoid-Rezeptors (GR), hGR α , ein im Zytosol lokalisiertes ca. 94 kDa großes Protein vermittelt (Hollenberg et al., 1985). Inzwischen wurden auch membranständige GR entdeckt (Gametchu et al., 1999), über deren Funktionsweise und Bedeutung jedoch noch sehr wenig bekannt ist. hGR α gehört zur Familie der Steroidhormon-Rezeptoren, die an einer Vielzahl von Funktionen im Organismus wie Homöostase, Differenzierung, Entwicklung, Fortpflanzung und Metabolismus beteiligt sind. Zur Familie der Steroidhormon-Rezeptoren gehören neben GR Mineralocorticoid-Rezeptoren (MR), Androgen-Rezeptoren (AR), Progesteron-Rezeptoren (PR) und Estrogen-Rezeptoren (ER), von denen jeweils mindestens 2 Isoformen gefunden wurden. Alle Steroidhormon-Rezeptoren weisen eine gemeinsame dreiteilige Struktur auf und wirken als ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren (Hollenberg et al., 1988; Mangelsdorf et al., 1995).

Die Steroidhormon-Rezeptoren zählen aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zusammen mit den Schilddrüsenhormon- (Thyroid-) Rezeptoren (TR), den Vitamin D-Rezeptoren (VDR), den Retinoid-Rezeptoren, den Peroxisom-Proliferator-Aktivator-Rezeptoren (PPAR) und den Orphan-Rezeptoren zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren. In den letzten Jahren wurden viele neue Orphan-Rezeptoren entdeckt, für die jedoch bisher keine endogenen Liganden identifiziert worden sind (Giguere, 1999; Sladek et al., 2000).

1.1.1 Funktionelle Domänen des Glucocorticoid-Rezeptors

Die einzelnen Funktionen des hGR α können bestimmten Domänen zugeordnet werden (Abb. 1). Der aus 439 Aminosäuren bestehende N-terminale Abschnitt des hGR α ist an der Aktivierung der Transkription beteiligt und wird daher als Transakti-

vierungsdomäne (AF-1) oder wegen seiner starken antigenen Potenz auch als immunogene Domäne (ID) bezeichnet. Wichtig für die Transaktivierung sind entweder direkte Wechselwirkungen mit basalen Transkriptionsfaktoren oder Einflüsse auf unterstützende Koaktivatoren (Ford et al., 1997; Henriksson et al., 1997).

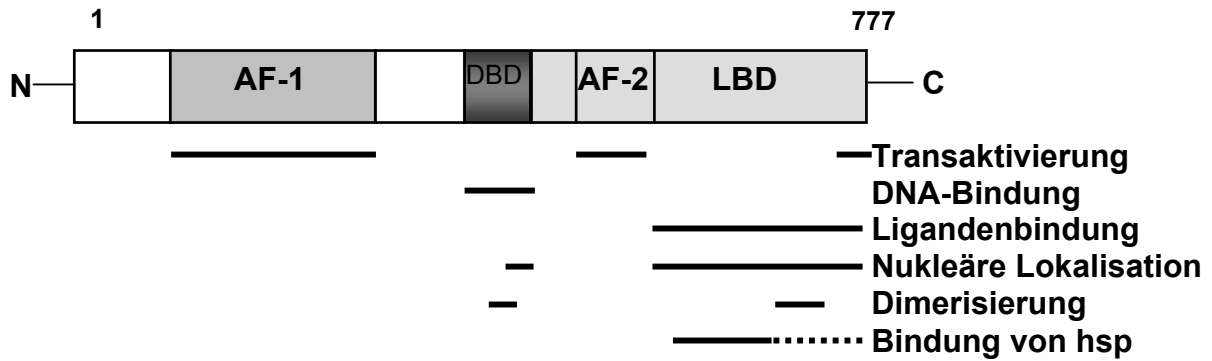


Abb. 1: Funktionelle Domänen des hGR α . hGR α besteht aus 3 wichtigen Bereichen, welche die transkriptionelle Aktivierung (AF), die DNA-Bindung (DBD) und die Ligandenbindung (LBD) bewirken. Darin finden sich bestimmte Regionen, die für die nukleäre Lokalisation, die Dimerisierung und die Bindung von Hitzeschockproteinen (hsp) verantwortlich sind.

Der zentrale, aus zwei "Zinkfingern" gebildete Anteil des Moleküls, ist für die Bindung an die DNA der Zielgene verantwortlich und wird daher als DNA-Bindungsdomäne (DBD) bezeichnet. Dieser Abschnitt ist 66 Aminosäuren groß und bei allen nukleären Rezeptoren sehr stark konserviert. Jeder Zinkfinger wird als tetraedrischer Komplex aus einem Zink-Ion und 4 Cysteinen gebildet. GR binden als Dimer an eine DNA-Sequenz, die als Glucocorticoid-Response-Element (GRE) bezeichnet wird, eine palindromische Sequenz von je 6 Nukleotiden (AGAACA_nnnTGTTCT), die durch 3 Nukleotide getrennt sind. Jeweils ein GR-Molekül bindet an eine Hälfte (Hard et al., 1990; Luisi et al., 1991; Zilliacus et al., 1995). Die gleiche Sequenz wird auch von MR, AR und PR erkannt, während ER an eine andere, aber verwandte palindromische DNA-Sequenz bindet. Der erste Zinkfinger enthält Aminosäuren zur Erkennung der spezifischen Sequenz und wird als P-Box bezeichnet. Der 2. Zinkfinger ist für die Dimerisierung verantwortlich und wird daher D-Box genannt. Außerdem enthält die DBD an ihrem C-terminalen Ende noch Signalstrukturen für die Translokation des Rezeptors in den Zellkern (Picard et al., 1987).

Wassermolekül (Brzozowski et al., 1997; Williams et al., 1998; Pike et al., 1999; Bledsoe et al., 2002). Die erste Aminosäure ist ein Arginin von hGR, hER und hPR, das bei der ganzen Steroidhormon-Rezeptor-Familie konserviert ist (entsprechend Arg-611 in hGR α). Die zweite Aminosäure ist ein Glutamat bei hER und ein Glutamin im hPR und hGR. Alle Rezeptoren für Steroide mit einer C3-Carbonylfunktion besitzen in der entsprechenden Position ein Glutamin (Gln-570 in hGR α).

Strukturen von hER im Komplex mit verschiedenen Liganden zeigen, dass die Ligandenbindungstasche in der Nähe des D-Rings eine relativ große Plastizität aufweist und in Abhängigkeit vom Liganden verschiedene Konformationen einnehmen kann. In wie weit dies bei anderen Steroidhormon-Rezeptoren der Fall ist, muss noch untersucht werden (Kumar et al., 1999).

1.1.4 Struktur/Wirkungs-Beziehungen der Glucocorticoide

Verschiedene funktionelle Gruppen und Modifikationen des Steroidgerüsts ermöglichen eine selektive Bindung an die verschiedenen Steroidhormon-Rezeptoren. Der PR-Ligand Progesteron bindet an hGR α nur mit niedriger Affinität. Hydroxylierungen in Position 11, 17 und 21 führen zum Cortisol, dem wichtigsten Glucocorticoid des Menschen (Ojasoo et al., 1988). Die Kristallstruktur der hGR α -LBD weist auf ein umfangreiches Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen den Hydroxylgruppen der Glucocorticoide und dem hGR α hin (Bledsoe et al., 2002). Große Ähnlichkeit besteht zwischen Glucocorticoiden und Mineralocorticoiden, daher überlappen auch die Affinitäten für die Rezeptoren. hMR bindet nahezu alle Glucocorticoide und Mineralocorticoide, während das Mineralocorticoid Aldosteron nur eine sehr geringe Affinität zum hGR α besitzt (Rupprecht et al., 1993).

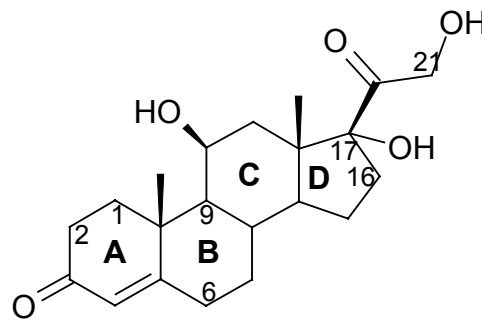


Abb. 3: Struktur des Cortisols (Hydrocortison). Positionen deren Modifikation zu einer Änderung der Affinität und Selektivität für den hGR α führte sind mit Nummern bezeichnet.

Ein für die Therapie mit Glucocorticoiden entscheidender Vorteil gelang durch die Differenzierung von mineralocorticoiden und glucocorticoiden Wirkungen durch Einführung einer zweiten Doppelbindung zwischen Position 1 und 2 in Ring A des Cortisols (Abb. 3) (Shroot et al., 1982). Das daraus resultierende Prednisolon (PD) ist vierfach stärker glucocorticoid und nur 2/3 so stark mineralocorticoid wirksam wie Cortisol. Eine Halogenierung in Position 9 α und 6 α erhöht die Affinität zu hGR α zusätzlich, noch ausgeprägter jedoch die Bindung an hMR. Durch Einführung einer weiteren Methyl- oder Hydroxylgruppe in Position 16 steigt dagegen die Glucocorticoid-Wirkung nochmals, bei gleichzeitiger fast vollständiger Elimination der mineralocorticoiden Effekte (Dahlberg et al., 1984). Durch Halogenierung in Position 9 und/oder 6 und gleichzeitige Methylierung oder Hydroxylierung in Position 16 können also Arzneistoffe mit sehr starker Affinität zum hGR α und vernachlässigbarer hMR-Bindung erreicht werden (Brattsand et al., 1982; Dahlberg et al., 1984; Rupprecht et al., 1993).

Besonders für die topische Therapie ist auch die Synthese von Ester-Derivaten der Glucocorticoide interessant, da durch die erhöhte Lipophilie eine bessere lokale Penetration erreicht werden kann (Gysler et al., 1999). Eine Veresterung in Position 17 der Steroide erhöht gleichzeitig die Affinität zum hGR α , während eine Veresterung in Position 21 je nach Länge des Säure-Substituenten die Bindungsaffinität mehr oder weniger stark erniedrigt. Für Glucocorticoid-Doppelester wurde also eine Rezeptorbindung detektiert, die zwischen den 17- und den 21-Estern liegt (Ponec et al., 1981; Shroot et al., 1982; Ponec et al., 1986; Pörtner et al., 1988).

1.2 Signaltransduktion über den Glucocorticoid-Rezeptor

Der inaktive hGR α befindet sich im Zytosol und liegt dort an Hitzeschockproteine (hsp) gebunden vor. Meist sind an diesem Komplex ein hsp90 Dimer, weitere hsp und Immunophiline beteiligt (Pratt et al., 1997). Die hsp sind Chaperone, die die korrekte Faltung des Proteins gewährleisten, und damit die Ligandenbindung ermöglichen. Andererseits halten sie den hGR α im inaktiven Zustand im Zytosol (Pratt et al., 1999). Bei Bindung eines Glucocorticoids dissoziiert durch eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins der hGR-hsp-Komplex und der Rezeptor erlangt die Fähigkeit zur Dimerisierung (Bamberger et al., 1996; Bledsoe et al., 2002). Des Weiteren gelangen für den Übergang des Rezeptors in den Zellkern wichtige Domänen an die Oberseite des Rezeptorproteins, die daraufhin mit spezifischen Proteinen der Kernporen in Kontakt treten (Picard et al., 1987; Wikstrom et al., 1987; Gasc et al., 1989; Cadepond et al., 1992). Der ligandenaktivierte hGR α wandert in den Zellkern und kann dort auf zwei unterschiedliche Arten die Genexpression regulieren. Zum einen wird nach DNA-Bindung die Transkription spezifischer Zielgene aktiviert oder reprimiert, ferner kann durch Interaktion mit bestimmten Transkriptionsfaktoren deren Aktivität gehemmt werden (Barnes, 1998; Göttlicher et al., 1998; Webster et al., 1999).

1.2.1 Transkriptionelle Aktivierung und Hemmung von Genen durch DNA-Bindung des Glucocorticoid-Rezeptors

Die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen stellt den klassischen Wirkmechanismus der Steroidhormone über nukleäre Rezeptoren dar. Ein Homodimer aus zwei aktivierten hGR α bindet die spezifische Erkennungssequenz, das GRE in der DNA. Die AF-1-Transaktivierungsdomäne kann nun mit basalen Transkriptionsfaktoren wie der RNA-Polymerase II, dem TATA-Bindungs-Protein (TBP) oder dem TBP-Assoziierten-Faktor (TAF) interagieren und deren Aktivität erhöhen (Bamberger et al., 1996; Adcock, 2000). Zur Verstärkung der Genaktivierung sind Interaktionen mit weiteren Koaktivatoren wichtig (Abb. 4) (McKenna et al., 1999).

Für eine Genaktivierung bedeutsame Kofaktoren sind das cAMP-Response-Element-Bindungsfaktor- (CREB-) Binding-Protein (CBP) und das verwandte p300 (Janknecht et al., 1996; Kamei et al., 1996). Diese acetylieren Histonproteine und bewirken daher nach Bindung an aktivierte hGR α oder zahlreiche andere Transkriptionsfaktoren eine Entspiralisierung der im Ruhezustand dicht gepackten Chromatinstruktur. Die Auflösung der Nukleosomen erleichtert die Bindung der basalen Transkriptionsfaktoren und damit die Aktivierung der Promotoren (Kamei et al., 1996; Imhof et al., 1998).

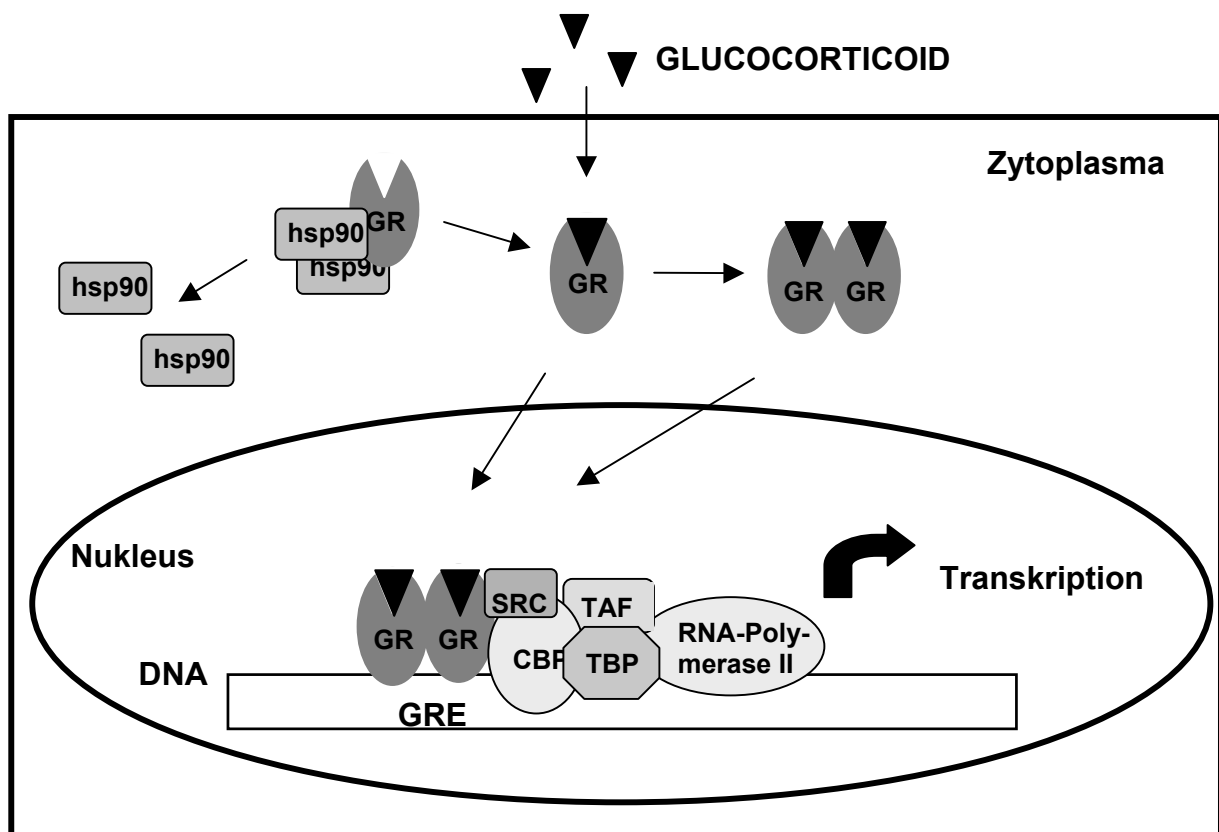


Abb. 4: Mechanismus der hGR α -vermittelten Aktivierung von Zielgenen. Die im Ruhezustand an Hitzeschockproteine (hsp90) gebundenen hGR α wandern nach Aktivierung durch Glucocorticoide in den Zellkern, interagieren dort mit GRE der DNA und initiieren die Transkriptionsaktivierung durch Interaktion mit basalen Transkriptionsfaktoren wie RNA-Polymerase II, TATA-Bindungs-Protein (TBP) und TBP-Assoziierter-Faktor (TAF) und Koaktivatoren wie Steroid-Receptor-Coactivator (SRC) und CREB-Binding-Protein (CBP) (nach Bamberger et al., 1996; Adcock et al., 2000).

Die Interaktion des hGR α mit CBP/p300 erfolgt entweder direkt oder über andere nukleäre Koaktivatoren, wie den Steroid-Receptor-Coactivator-1 (SRC-1) (Onate et al., 1995), den Signal-Transducer-and-Activator-of-Transcription-5 (STAT-5) oder

den Transcriptionfactor-Intermediary-Factor-2 (TIF-2) (Ding et al., 1998; McKenna et al., 1999; Refojo et al., 2001; Steinmetz et al., 2001). Alle diese Koaktivatoren besitzen eine als NR-Box bezeichnete Sequenz LXXLL (L steht für Lysin, X für jede beliebige Aminosäure), über die sie mit der AF-2-Domäne des GR in Verbindung treten (Heery et al., 1997).

Die erhöhte Transkriptionsrate der Glucocorticoid-responsiven Gene führt zur Translation und einer vermehrten Bildung der Zielproteine. Die meisten über die klassische Transaktivierung vermittelten Glucocorticoid-Wirkungen dienen der Regulation von metabolisch und kardiovaskulär relevanten Genen (Bamberger et al., 1997; Hatz, 1998). Es werden aber auch einige antiinflammatorisch wirkende Proteine verstärkt gebildet, wie z. B. Lipocortin, Interleukin-1-Rezeptor und das Inhibitorprotein des nukleären Faktors κ B ($I\kappa$ B α) (Barnes, 1998; Adcock, 2000). Eine vermehrte Synthese spezifischer Ribonukleasen kann zudem den Abbau bestimmter mRNA beschleunigen und daher die Bildung von entzündungsrelevanten Proteinen reduzieren. Beobachtet wurde dies für den Granulozyten/Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) und die induzierbare Cyclooxygenase-2 (COX-2) (Ristimaki et al., 1996). Des Weiteren wurde die Apoptoseinduktion durch Glucocorticoide bei T-Zellen auf eine Förderung der Genexpression zurückgeführt, da Glucocorticoide bei T-Zellen mit transaktivierungsdefizientem GR nicht in der Lage sind, Apoptose auszulösen (Ramdas et al., 1998; Reichardt et al., 1998)

Durch Bindung an eine spezifische DNA-Sequenz ist in Einzelfällen auch eine negative Genregulation möglich (Webster et al., 1999). Negative GRE unterscheiden sich von den positiven und wurden z.B. in den Promotoren der Gene für das Corticotropin-Releasing-Hormon (Malkoski et al., 1997) und den Vasoaktiven-Intestinal-Polypeptid-Rezeptor (Pei, 1996) gefunden. Eine weitere Möglichkeit der Genrepression durch spezifische DNA-Bindung des hGR α ist eine überlappende Bindungsstelle des hGR α mit den TATA-Box Elementen eines Promotors. Dann ist bei Bindung eines aktivierten hGR α an spezifische DNA-Erkennungssequenzen keine Bindung des TBP und weiterer für die Genaktivierung wichtiger basaler Transkriptionsfaktoren mehr möglich. Ein Beispiel für diese Art der Glucocorticoid vermittelten Genrepression ist das Osteocalcin Gen (Meyer et al., 1997).

1.2.2 Hemmung von Transkriptionsfaktoren durch den Glucocorticoid-Rezeptor (Transrepression)

Glucocorticoide beeinflussen aber auch eine große Zahl von hauptsächlich immunologisch bedeutsamen Genen, in deren Promotorsequenzen kein GRE vorkommt (Göttlicher et al., 1998). Viele dieser Gene werden durch proinflammatorische Transkriptionsfaktoren reguliert, wie zum Beispiel durch das Aktivatorprotein 1 (AP-1) bestehend aus den Untereinheiten c-Fos und c-Jun (Karin et al., 2001) und den nukleären Faktor κ B (NF κ B) bestehend aus den p50 und p65 Untereinheiten (Almawi et al., 2002a).

NF κ B befindet sich im inaktiven Stadium im Zytosol und ist dort in einem Komplex mit dem Inhibitorprotein I κ B α gebunden. Zur NF κ B Aktivierung kommt es, indem I κ B α phosphoryliert, anschließend ubiquitinyliert und vom Proteasomkomplex abgebaut wird (McKay et al., 1999). Als Mechanismus der Glucocorticoid vermittelten NF κ B-Hemmung wurde zunächst bei Jurkat Zellen (T-Zell Lymphom) und Monozyten eine Induktion des I κ B α -Proteins beobachtet (Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995). Dadurch wird NF κ B im inaktiven Zustand im Zytosol gehalten und so an der DNA-Bindung und Genaktivierung gehindert. Bei murinen Fibroblasten und primären humanen Fibroblasten hingegen wurde eine Hemmung der Interleukin-(IL-) 6-Expression und der p65 abhängigen transkriptionellen Aktivierung durch Glucocorticoide beobachtet, ohne dass der I κ B α -Gehalt, die Lokalisation oder die DNA-Bindung von NF κ B verändert wurde (De Bosscher et al., 1997).

Eine mögliche Erklärung ist die Hemmung der NF κ B-Aktivierung aufgrund einer Konkurrenz um für die Genaktivierung wichtige, aber limitierte Kofaktoren wie CBP/p300 oder SRC-1 (Sheppard et al., 1998) (Abb. 5B). In anderen Systemen wurde jedoch eine Hemmung der NF κ B Genaktivierung unabhängig von den in den Zellen vorhandenen Kofaktor-Mengen nachgewiesen (De Bosscher et al., 2000). Deren Ursache konnte auf eine direkte Wechselwirkung der aktivierten GR mit der p65-Untereinheit oder anderen basalen Transkriptionsfaktoren in der TATA-Box Umgebung zurückgeführt werden (Abb. 5C), eine zusätzliche Rekrutierung von Korepressoren wurde ebenfalls beschrieben (Abb. 5D) (Almawi et al., 2002a).

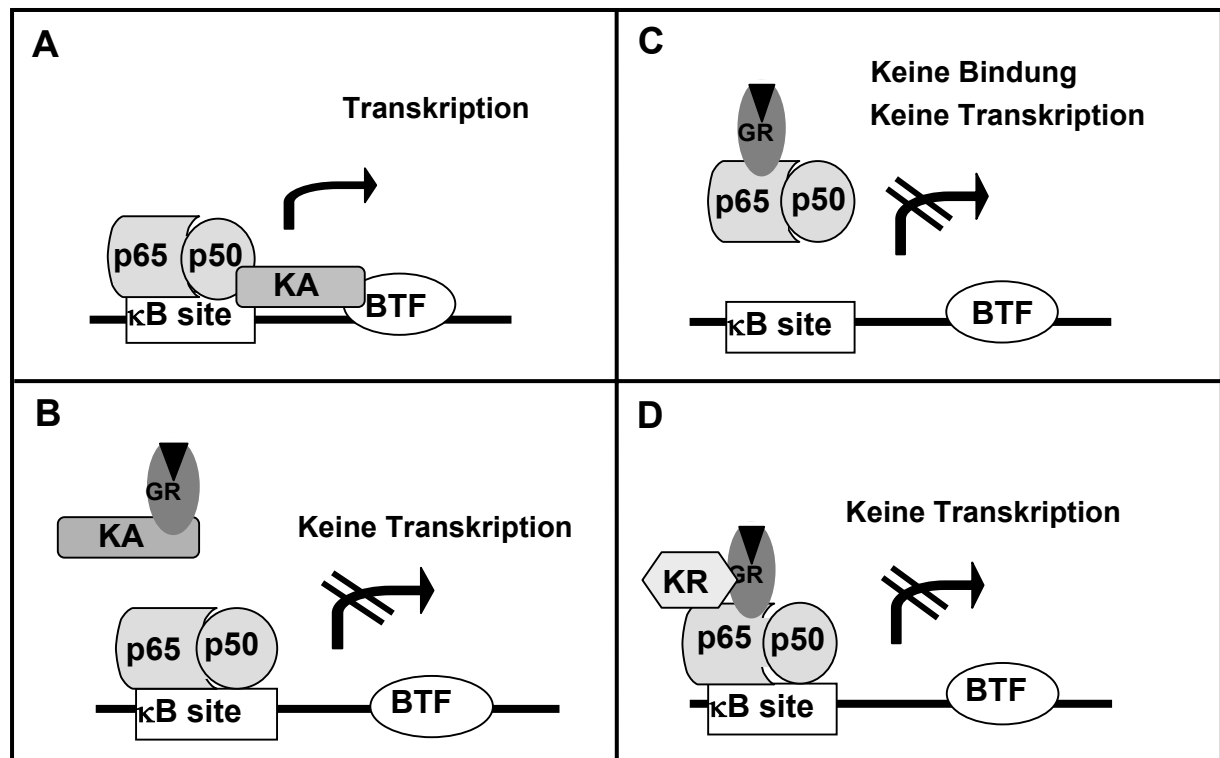


Abb. 5: Mechanismen der $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Hemmung durch aktivierte GR. A: Transkriptionell aktiver $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Komplex. Ein Dimer aus p50 und p65 bindet an die Erkennungssequenz der DNA (κB -site), Koaktivatoren (KA) können rekrutiert und die basalen Transkriptionsfaktoren (BTF) aktiviert werden. B: Hemmung durch Konkurrenz um limitierte Koaktivatoren in der Zelle. C: Hemmung durch Inhibierung der Bindung des $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Komplexes an die DNA. D: Hemmung der Transkription durch Protein-Protein Wechselwirkungen und Korepressor- (KR-) Rekrutierung (nach Almawi et al., 2002).

Neben $\text{NF}\kappa\text{B}$ und AP-1 sind der Octamer-Transkriptions-Faktor-1 (Oct-1), das CCAAT-Enhancer-Binding-Protein (C/EBP) und der cAMP-Response-Element-Bindungsfaktor (CREB) weitere Faktoren, deren Transkription durch $\text{hGR}\alpha$ gehemmt wird (Adcock, 2001; Adcock et al., 2001; Refojo et al., 2001). Des weiteren inhibieren Glucocorticoide die Signalübertragung des Nuclear-Factor-of-Activated-T-Cells (NFAT), indem sie die zur Genaktivierung nötige kooperative Bindung des Transkriptionsfaktors an AP-1 beeinträchtigen (Refojo et al., 2001). Die Transrepression von Kofaktoren wird heute als wichtigster Mechanismus der antiinflammatorischen und immunologischen Glucocorticoid-Wirkung angenommen. Es kommt zur Hemmung der Expression einer großen Zahl von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1, -2, -3, -4, -5, -6, -11, -12, -13, $\text{TNF}\alpha$, GM-CSF), Chemokinen (IL-8, Rantes,

MCP-1, -3, -4) und Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, E-Selectin) (Barnes, 1998; Almawi et al., 2002b). Neuere Beobachtungen zeigen auch die Bedeutung der Transrepression für proapoptotische und antiproliferative Glucocorticoid-Wirkungen, so konnten bisher keine proapoptotischen Gene mit GRE identifiziert werden, der Glucocorticoid-induzierten Apoptose von T-Zellen geht allerdings eine Suppression des für das Überleben und die Proliferation wichtigen Faktors c-myc voraus (Helmberg et al., 1995; Greenstein et al., 2002).

Der von der DNA-Bindung unabhängigen Genrepression durch Glucocorticoide wird neuerdings besondere Bedeutung zugesprochen. Versuche an Mäusen mit einer Mutation in der DBD, die die Dimerisierung und DNA-Bindung von hGR α verhindert, zeigen, dass diese Mäuse trotz einiger funktioneller Störungen überlebensfähig sind, während komplette GR-Knockout-Mäuse kurz nach der Geburt aufgrund respiratorischer Störungen sterben (Heck et al., 1994; Cole et al., 1995; Reichardt et al., 1998).

1.3 Glucocorticoid-Rezeptor-Subtypen

Das Gen für den hGR ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 5 lokalisiert und besteht aus 10 Exons (Abb. 6). Alternatives Spleißen der Primär-RNA im Exon 9 führt zu 2 Subtypen des hGR, die als hGR α und hGR β bezeichnet werden (Hollenberg et al., 1985).

Beide Rezeptor-Subtypen sind identisch bis zu Aminosäure 727, hGR α besitzt weitere 50 Aminosäuren, die 9 α -Sequenz, die die Informationen für die bekannte Ligandenbindungsdomäne enthält. hGR β enthält die 9 β -Sequenz, die aus nur 15 weiteren nicht homologen Aminosäuren besteht und keine intakte Ligandenbindungsstelle aufweist (Abb. 7). hGR β ist daher nicht in der Lage Glucocorticoide zu binden.

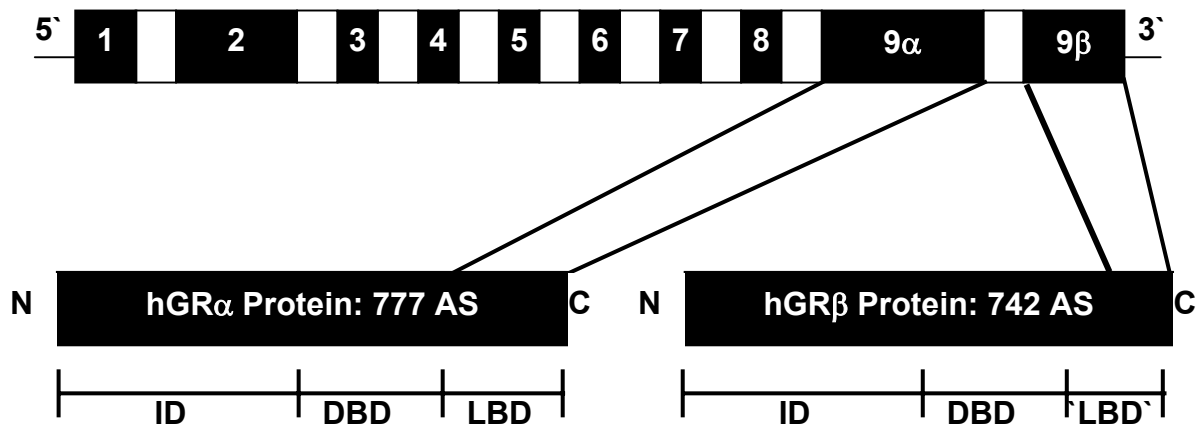


Abb. 6: Entstehung der 2 hGR-Spleißvarianten aus dem hGR-Gen. Beide Rezeptor-Subtypen bestehen aus den Aminosäuren von 8 identischen Exons und dem neunten, spezifischen Exon (nach Bamberger et al., 1996).

Die bekannten Effekte von hGR α wurden im vorangegangenen Kapitel erläutert, die Bedeutung von hGR β dagegen ist nach wie vor unklar. Bamberger et al. (Bamberger et al., 1995) entdeckten, dass hGR β als möglicher dominant negativer Inhibitor auf die hGR α vermittelten Effekte wirkt, die Repression der hGR α -induzierten Genaktivierung wurde in einigen Zellsystemen beobachtet. Weitere Untersuchungen zeigten, dass hGR β in der Lage ist an hsp und GRE zu binden, es wurde die Bildung eines Heterodimers aus hGR α und hGR β postuliert (Oakley et al., 1999) (Abb. 7). Andere Arbeitsgruppen diskutieren die Ergebnisse aus Reporter-genversuchen jedoch kontrovers (Hecht et al., 1997; Carlstedt-Duke, 1999; Vottero et al., 1999).

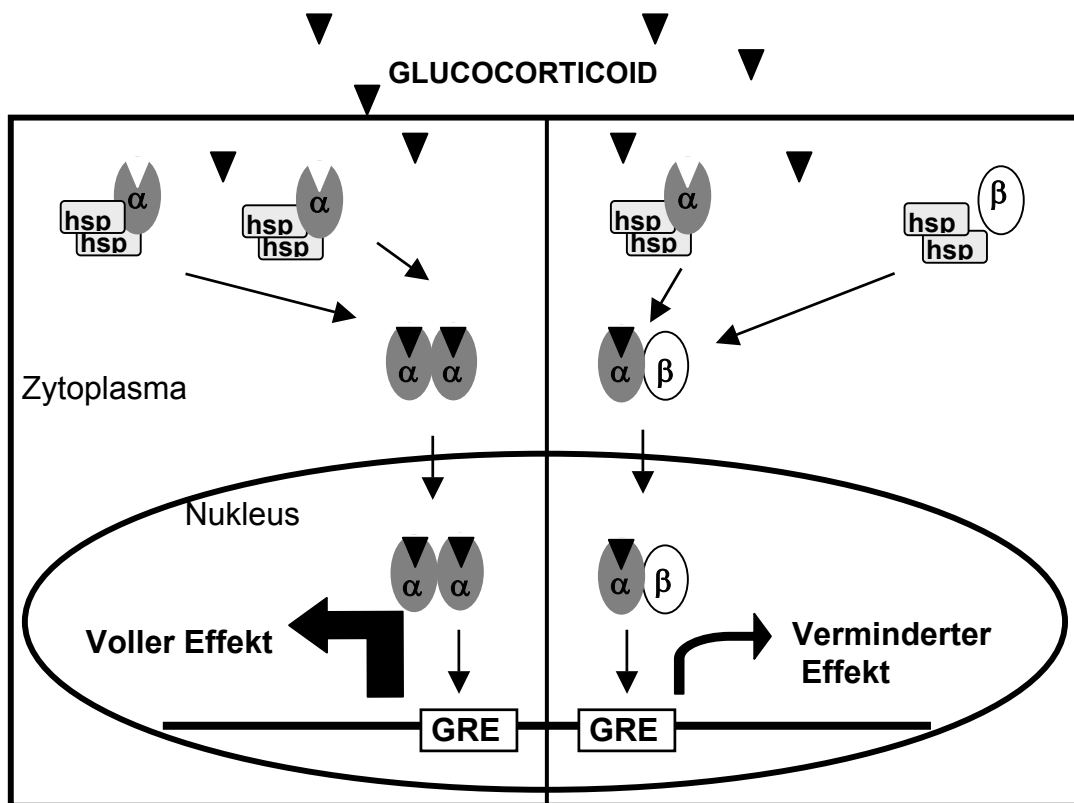


Abb. 7: Postulierter Wirkmechanismus des hGR β . Die Bildung eines Heterodimers aus hGR α und hGR β schwächt die durch hGR α vermittelte transkriptionelle Aktivierung ab (nach Bamberger et al., 1996; Oakley et al., 1999).

Leung et al. (Leung et al., 1997) wiesen nach, dass verschiedene Zytokine die Expression von hGR β beeinflussen können, eine Inkubation mit IL-2 und IL-4 steigert die Expression von hGR β in T-Zellen gesunder Probanden, bei Patienten mit Steroid resistentem Asthma wurden im Bronchialsekret erhöhte IL-2 und IL-4 Spiegel zusammen mit einer vermehrten Bildung von hGR β gefunden. Eine weitere In-vitro-Studie zeigte, dass Staphylokokken-Superantigene in peripheren Blutmonozyten eine Glucocorticoid-Resistenz induzieren können, indem sie zytokinabhängig die Bildung von hGR β Protein steigern (Hauk et al., 2000). Außer in Leukozyten und Bronchialepithelzellen von Patienten mit Steroid-insensitivem Asthma (Korn et al., 1998; Leung et al., 1998; Hamid et al., 1999; Sousa et al., 2000) wurden auch in Monozyten von Patienten mit Colitis ulcerosa und Rheumatoider Arthritis, die nicht auf eine Behandlung mit Glucocorticoiden anspricht, erhöhte hGR β Spiegel gefunden (Honda

et al., 2000; Chikanza, 2002). Alle diese Hinweise sprechen für eine Regulation der Steroid-Sensitivität von Geweben durch hGR β .

1.4 Glucocorticoide in der Dermatologie

Aufgrund ihrer ausgeprägten antiinflammatorischen, antipruriginösen und immunsuppressiven Eigenschaften sind topisch applizierte Glucocorticoide seit vielen Jahren Therapie der 1. Wahl in der Behandlung verschiedener entzündlicher Hauterkrankungen, insbesondere dem atopischen Ekzem (Ring et al., 1996). Darüber hinaus kommen Glucocorticoide bei toxischen und allergischen Kontaktdermatiden, Lichtdermatosen und der Psoriasis vulgaris zum Einsatz (Hatz, 1998). Als wichtigste Indikation für eine Glucocorticoid-Therapie in der Dermatologie soll im folgenden das atopische Ekzem und seine Behandlung genauer erläutert werden.

1.4.1 Das atopische Ekzem

Der Begriff Atopie kennzeichnet eine familiäre Überempfindlichkeit der Haut und Schleimhaut gegenüber Umweltfaktoren, die mit erhöhter Immunglobulin-E (Ig-E) Synthese und oder veränderter unspezifischer Reaktivität einhergeht (Kapp et al., 1991; Czech et al., 1995). Für die Manifestation müssen zur familiären Disposition Triggerfaktoren wie Allergene, Infekte, klimatische oder psychisch-neurologische Zustände hinzukommen, die die Krankheitsschübe auslösen (Borirakchanyavat et al., 2000). Etwa 5-20 % aller Kinder und 1-3 % der Erwachsenen neigen zum Leiden an einem atopischen Ekzem, das auch als atopische Dermatitis oder Neurodermitis bezeichnet wird, in den letzten Jahren ist eine steigende Inzidenz zu beobachten (Schubert, 2002). Die zu den Symptomen der atopischen Dermatitis führenden Störungen der Immunreaktion zeigen sich in einem relativen Übergewicht von T-Helferzellen (CD4+) im Verhältnis zu T-Suppressorzellen (CD8+) (Leung et al., 1986). Nach Antigenexposition wird bevorzugt eine Subpopulation der T-Helferzellen, die sogenannten Th-2 zytokinproduzierenden T-Zellen, aktiviert. Diese produzieren

vermehrt die Zytokine IL-4 und -13, die zu einer erhöhten Ig-E Bildung führen, außerdem IL-5, das Reifung und Überleben von eosinophilen Granulozyten fördert (Abbas et al., 1996; Teraki et al., 2000). Über eine gesteigerte IL-10-Freisetzung wird des Weiteren die Aktivierung von T-Helferzellen vom Typ Th-1 gehemmt.

Ausgelöst werden akute Schübe der Neurodermitis durch endogen gebildete Autoallergene oder exogen in die Haut gelangte Aeroallergene, die von Langerhanszellen, den Antigen präsentierenden Zellen der Haut aufgenommen werden (Schubert, 2002). Diese führen zu einer allergischen Reaktion vom Spättyp und lösen die Aktivierung der T-Zellen vom Th-2 Typ aus. Als Folge der daraufhin induzierten Interleukinfreisetzung wandern vermehrt eosinophile und neutrophile Granulozyten und Makrophagen in die Haut (Kapp, 1993; Borirakchanyavat et al., 2000), darüber hinaus steigt die Ausschüttung von Histamin und weiteren Zytokinen aus Mastzellen. Es entwickelt sich ein Kreislauf, der zu einer immer stärkeren Entzündungsreaktion führt. Als klinisches Bild kommt es als Folge einer erhöhten Gefäßpermeabilität zu Ulzera, Nässen, Bläschen, Rötung und Ödembildung, außerdem zu starkem Juckreiz. Die hohen Zytokinkonzentrationen und eine zusätzliche Belastung der Haut durch Kratzen führen zu einer vermehrten Freisetzung von IL-1 und -3 aus Keratinozyten (Kupper et al., 1995; Groves et al., 1996; Murphy et al., 2000). Daraufhin kommt es zu einer weiteren Aktivierung von Langerhanszellen mit anschließender Sekretion von IL-1, $\text{TNF}\alpha$, Plättchen-aktivierendem-Faktor (PAF) und Histamin-Releasing-Factor, wodurch die T-Zellen noch stärker aktiviert werden. Gleichzeitig ist die Keratinisierung und Ausdifferenzierung von Keratinozyten gestört, was sich im klinischen Bild der Schuppen- und Flechtenbildung äußert (Hanifin, 1982). Eine durch die Differenzierungsstörung ausgelöste zu geringe Ceramid-Synthese in der Epidermis vermindert darüber hinaus deren Barrierefunktion, die Haut wird trockener und Krankheitserreger können leichter eindringen (Imokawa et al., 1989; Melnik et al., 1990).

1.4.2 Glucocorticoid-Therapie des atopischen Ekzems

Glucocorticoide zeichnen sich bei der Therapie der atopischen Dermatitis durch ihre starke antientzündliche und immunsuppressive Wirkung aus. Sie verringern effektiv

die Bildung proinflammatorischer Zytokine, insbesondere des IL-1 α durch Keratinozyten der Epidermis (Lange et al., 1997). Dies ist von großer Bedeutung, da Keratinozyten die wichtigste Quelle für Entzündungsmediatoren innerhalb der Haut sind (Groves et al., 1995; Kupper et al., 1995; Murphy et al., 2000). Des Weiteren reduzieren Glucocorticoide die Zahl der T-Lymphozyten im Gewebe durch antiproliferative und proapoptotische Effekte, die wiederum auf die Hemmung der Interleukinsynthese durch die Steroide zurückgeführt werden können (Almawi et al., 2002b; Amsterdam et al., 2002). Auch die verlängerte Überlebenszeit der eosinophilen Granulozyten beim Atopiker wird durch die Apoptose induzierende Wirkung der Glucocorticoide reguliert (Barnes, 1998). Zusätzlich unterstützen die vasokontrahierenden und gefäßabdichtenden Effekte der Glucocorticoide den schnellen Rückgang der Rötung, Bläschen- und Ödembildung, die überschießende Verhornung, Schuppen- und Krustenbildung der Epidermis nimmt ab. So können verschiedene Symptome der atopischen Dermatitis schnell und effektiv durch eine lokale Glucocorticoid-Anwendung gebessert werden (Niedner, 1991; Niedner, 1996). Eingeschränkt wird die topische Therapie mit Glucocorticoiden jedoch durch die von den Steroiden ausgelöste Verdünnung der Haut (Atrophie). Die unerwünschten Effekte entstehen durch eine Inhibierung der Proliferation und der Kollagensynthese von Fibroblasten (Lehmann et al., 1983; Oikarinen et al., 1991; Koivukangas et al., 1995; Russell et al., 1995), wodurch es zu einer Abnahme an elastischen Fasern und Kollagenfasern kommt (Oikarinen et al., 1992; Siddiqui et al., 1992). Die initial reversible Hautverdünnung des perivaskulären Bindegewebes geht bei einer Fortsetzung der Steroidapplikation in eine irreversible Degeneration elastischer Fasern mit der Bildung von Striae (Hautdehnungsstreifen) und ebenfalls irreversiblen Teleangiektasien (Erweiterungen oberflächlicher Hautgefäße) über (Heng et al., 1990). Darüber hinaus hemmen Glucocorticoide die Chemotaxis von Fibroblasten (Hein et al., 1994; Hatz, 1998), so dass Wundheilungsstörungen ausgelöst werden (Cutroneo, 2002).

Als weitere lokale unerwünschte Wirkung muss eine mögliche Allergisierung durch die Glucocorticoide selbst beachtet werden, darüber hinaus kann es bei plötzlichem Absetzen der Glucocorticoide zu Tachyphylaxie kommen. Glucocorticoide sollen daher intermittierend angewendet und ausschleichend abgesetzt werden, womit sich Rebound-Phänomene weitgehend vermeiden lassen (Niedner, 1991). Systemische Nebenwirkungen treten vor allem bei längerer Anwendung von hochpotenten fluorierten Glucocorticoiden unter Okklusion oder auf Hautarealen mit dünnerer Hornschicht,

wie zum Beispiel im Gesicht, auf. Zu beachten ist insbesondere die Gefahr einer Nebennierenrindenatrophie und von Wachstumsstörungen bei Kindern (Hatz, 1998). Die systemischen Nebenwirkungen können jedoch durch Einsatz eines Glucocorticoids von adäquater Wirkstärke vermieden werden und sind in der Regel reversibel (Niedner, 1991).

Neue Trends zeigen Möglichkeiten auf, Glucocorticoide beim schweren atopischen Ekzem auch zur Rezidivprophylaxe einzusetzen (Van Der Meer et al., 1999; Veien et al., 1999). Eine längerfristige Behandlung mit Glucocorticoiden wird jedoch durch die atrophogenen Nebenwirkungen limitiert. Der Suche nach Glucocorticoiden mit möglichst starker antiinflammatorischer Wirksamkeit aber geringen antiproliferativen Nebenwirkungen kommt daher besondere Bedeutung zu.

1.4.3 Nutzen/Risiko-Bewertung

Die Entwicklung von halogenierten Glucocorticoid-Derivaten (s. Kap. 1.1.4) führte zwar zu hochpotenten Wirkstoffen mit stark gesteigerter Rezeptoraffinität, allerdings stieg in gleichem Maße wie die Wirkstärke auch das Nebenwirkungspotential (Brazzini et al., 2002).

Ein Vorteil bei der Entwicklung von Glucocorticoid-Derivaten konnte durch den Einsatz der nichthalogenierten Glucocorticoid-17, 21-Doppelester erzielt werden, die aufgrund ihrer Lipophilie das Stratum corneum gut durchdringen können. Durch Metabolisierung des Esters in Position 21 wird die Substanz zunächst in der Haut zusätzlich aktiviert, dann allerdings entstehen durch Umlagerung des 17-Esters zur Position 21 und darauf folgender Spaltung des 21-Esters weniger stark wirksame Glucocorticoide. Dabei wurden Unterschiede in der Hydrolyserate von Keratinozyten und Fibroblasten gefunden (Gysler et al., 1997; Gysler et al., 1999). Zu diesen auch als „soft steroids“ bezeichneten Arzneistoffen gehören Methylprednisolonaceponat (Methylprednisolon-17-propionat, 21-acetat; MPDA), Prednicarbat (Prednisolon-17-ethylcarbonat, 21-propionat; PC), Hydrocortisonbuteprat (Hydrocortison-17-butytrat, 21-propionat) und Hydrocortisonaceponat. All diese Substanzen zeigen in klinischen Studien keine systemischen Nebenwirkungen, wie dies bei Applikation fluorierter Derivate der Fall war. Darüber hinaus wurde u. a. für PC aber auch das halo-

genierte Mometasonfuroat (MF) bei guter antiinflammatorischer Wirksamkeit ein signifikant niedrigeres Atrophierisiko festgestellt (Hanifin et al., 1994; Schäfer-Korting et al., 1996 Brazzini B 2002, Prakash A 1998; Korting et al., 2002). In-vitro-Versuche an Keratinozyten und Fibroblastenkulturen zeigen außerdem eine starke antientzündliche Wirkung von nativem PC bezüglich der Interleukinfreisetzung in Keratinozyten, während die Interleukinsynthese und die Proliferation von Fibroblasten deutlich weniger beeinträchtigt wird (Lange et al., 1997; Lange et al., 2000). Durch die Anwendung von PC wurde also eine bessere Verträglichkeit erreicht. Die Ursachen für die pharmakodynamischen Unterschiede und die Keratinozyten-Selektivität sind jedoch noch nicht aufgeklärt.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Aufgrund ihrer antiinflammatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften werden Glucocorticoide zur Behandlung vieler Erkrankungen eingesetzt, wobei jedoch die mit dem Wirkspektrum der Glucocorticoide verknüpften Nebenwirkungen in Kauf genommen werden müssen (Hatz, 1998). In der Therapie entzündlicher Hauterkrankungen schränkt das Risiko einer Hautatrophie den Einsatz ein. Ziele bei der Entwicklung von Glucocorticoiden für die Dermatologie sind also Substanzen mit einer starken antiinflammatorischen Wirksamkeit auf Keratinozyten und geringeren antiproliferativen Effekten auf Fibroblasten. Ein günstigeres Nutzen/Risiko-Verhältnis konnte für den nichthalogenierten Prednisolon-Doppelester Prednicarbat nachgewiesen werden, die Gründe für diese Verbesserung sind jedoch unklar. Zur Entwicklung selektiverer Substanzen müssen die spezifischen Strukturanforderungen an die Glucocorticoide durch Analyse der Glucocorticoid-hGR α Wechselwirkungen genauer aufgeklärt werden, des weiteren ist die Kenntnis der nachfolgenden Signaltransduktionsmechanismen unter Berücksichtigung des Einflusses von Rezeptor-Subtypen von Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher folgende Aspekte betrachtet:

- Die Rezeptorbindung einer Reihe von in der Dermatologie eingesetzten Glucocorticoiden, darunter PC und Standard-Glucocorticoide wie Dexamethason (DEX)

und Betamethason-17-valerat (BMV) und deren Metabolite, sollte für Fibroblasten und transfizierte COS-7-Zellen charakterisiert werden. Die Aufmerksamkeit galt dabei strukturellen Anforderungen an die Liganden, insbesondere aber auch möglichen zelltypspezifischen Unterschieden in der Rezeptorbindung. Dies war von Interesse, da die Rezeptorverteilung, Bindungsaffinität und intrinsische Aktivität gewebsabhängig sein können (Ponec et al., 1980; Serres et al., 1996), die Rezeptorbindungsaffinität von PC und seinen Metaboliten bisher jedoch nur in Synovialgewebe bestimmt wurde (Pörtner et al., 1988). Selbst für die Standard-Glucocorticoide standen nur Daten aus sehr heterogenen Versuchssystemen zur Verfügung (Ponec et al., 1986; Esmailpour et al., 2000).

- Die Rezeptorbindungsdaten sollten mit Untersuchungen an einem hGR α -Modell verglichen werden. Da die Koordinaten der erst kürzlich veröffentlichten Kristallstruktur der hGR α -LBD für die Simulationen noch nicht zur Verfügung standen (Bledsoe et al., 2002), sollte ein von Höltje und Jessen (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) aus den PR-Kristallstrukturdaten erstelltes Homologiemodell für die Untersuchungen verwendet werden (Williams et al., 1998). Dieses hGR α -Homologiemodell diente zur Analyse der Eigenschaften der Liganden, als auch der durch die Glucocorticoide verursachten Konformationsänderungen des Rezeptorproteins. So sollten wichtige Aminosäuren für die Glucocorticoid-hGR α Wechselwirkungen identifiziert und deren Bedeutung dann in Bindungs- und Transaktivierungs-Experimenten mit den entsprechenden hGR α -Mutanten charakterisiert werden (Lind et al., 2000). Darüber hinaus war die Entwicklung eines quantitativen Modells der Struktur/Wirkungs-Beziehungen zur Vorhersage der Bindungsaffinitäten neuer Steroide von Interesse.
- Wie unter 1.4 beschrieben konnten unterschiedliche Einflüsse der Glucocorticoide auf die Entzündungsreaktion von Keratinozyten und die Fibroblasten-Proliferation auf eine differenzierte Beeinflussung der Interleukinsynthese in Keratinozyten und Fibroblasten zurückgeführt werden (Lange et al., 1997; Lange et al., 2000). Eine interessante Erklärungsmöglichkeit für die zellspezifischen Unterschiede in der Sensitivität von Keratinozyten und Fibroblasten gegenüber Glucocorticoiden stellen Rezeptor-Subtypen dar. Für den ER wurden Liganden gefunden, die aufgrund unterschiedlicher Affinität zu hER α und hER β gewebsspezifisch verschiedene Effekte auslösen (Katzenellenbogen et al., 2000a; Katzenellenbogen et al., 2000b).

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Expression von hGR α und hGR β in Hautzellen untersucht werden. Eine selektive Beeinflussung der hGR-Subtypen könnte zu spezifisch wirksamen Glucocorticoiden führen, weshalb der Einfluss von hGR β auf die durch hGR α vermittelte Signaltransduktion von Interesse war. Es sollte die Beeinflussung der hGR α Ligandenbindungsaffinität, -selektivität und Transaktivierung durch hGR β untersucht werden.

- Zur genaueren Kenntnis der bei der Therapie von Hauterkrankungen relevanten Effekte galt die Aufmerksamkeit ferner der Beeinflussung apoptotischer Prozesse von Hautzellen durch Glucocorticoide. Erwünschte antientzündliche und immun-suppressive Wirkungen der Glucocorticoide sind auf eine Hemmung der Proliferation und gleichzeitige Förderung der Apoptose von T-Lymphozyten zurückzuführen, neuerdings wurden allerdings auch zytoprotektive Wirkungen von Glucocorticoiden auf residente Zellen beobachtet (Amsterdam et al., 2002). Es sollte daher untersucht werden, ob der antiproliferative Effekt von Glucocorticoiden auf Fibroblasten mit einer Beeinflussung der Apoptoserate in Zusammenhang steht. Dabei war die Analyse zelltypspezifischer Wirkungen und Signaltransduktionswege, die zu einer Beeinflussung des programmierten Zelltods führen, von Interesse.