

### 3. Methoden

#### 3.1. Mikrosomenherstellung

Die Herstellung der Mikrosomen erfolgte nach einer Methode von Lakshmi und Monder (90, 123). Als Quelle für die 11 $\beta$ -HSD-1 wurden Lebermikrosomen gewählt und für die 11 $\beta$ -HSD-2 Nierenrindenzellmikrosomen, da die jeweilige Isoenzymkonzentration in den beiden Geweben besonders hoch ist.

##### 3.1.1. Vorbereitung der Mikrosomenpräparation: Pufferherstellung

Als erster Vorbereitungsschritt wurden die zwei für die Mikrosomenpräparation benötigten Puffer hergestellt: ein Homogenisationspuffer bestehend aus 0,01 M Natriumphosphatpuffer mit pH 7,4 und 0,25 M Sucrose und ein 0,1 M Natriumphosphatpuffer mit pH 7,5 zum Einfrieren der Mikrosomen. Zur Herstellung der beiden unterschiedlich molaren Natriumphosphatpuffer wurden zunächst zwei Stammlösungen angesetzt, und zwar 0,1 molares di-Natriumhydrogenphosphat (Lösung A) und 0,1 molares Natriumdihydrogenphosphat (Lösung B).

<p><b>Lösung A: 0,1 M di-Natriumhydrogenphosphat:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 17,8 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (<math>\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}</math>)</li> <li>• 1 l Aqua bidest</li> </ul>
<p><b>Lösung B: 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 13,8 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (<math>\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}</math>)</li> <li>• 1 l Aqua bidest</li> </ul>

**Tabelle 3-1:** Zusammensetzung der Stammlösungen für die Natriumphosphatpuffer der Mikrosomenpräparation.

Um aus den Stammlösungen einen 0,01 M Natriumphosphatpuffer mit pH 7,4 zu bekommen, wurden 400 ml der di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung, die einen pH von 9,12 aufwies, mit dem Natriumdihydrogenphosphat (pH 4,42) titriert bis sich der gewünschte pH-Wert einstellte. Für den 0,01 M Natriumphosphatpuffer mit pH 7,4 wurden 100 ml von Lösung A und 100 ml von Lösung B mit jeweils 900 ml Aqua bidest verdünnt, so daß man zwei 0,01 M Lösungen erhielt. Zu 500 ml der verdünnten Lösung A wurde portionsweise verdünnte Lösung B hinzugefügt, bis sich der pH von 7,4 einstellte. Anschließend wurden 42,8 g Sucrose zu 500 ml des 0,01 M Natriumphosphatpuffers (pH 7,4) hinzugefügt und durch Erwärmen und Rühren gelöst.

### 3.1.2. Gewebhomogenisierung und -fraktionierung

Der nächste Schritt war die Homogenisierung des Gewebes. Dazu wurden die in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Gewebestückchen vorsichtig aufgetaut und zu einem Gewebepool vermischt. Es wurden mit einem Skalpell Würfel von ca. 4 mm Kantenlänge geschnitten, die in 3 g schwere Portionen aufgeteilt wurden. Diese wurden mit jeweils 12 ml Homogenisationspuffer in ein Eiswasser-gekühltes 15 ml Pottergefäß gegeben und mit einem Ultraturax für ca. 3 x 2 sec zerkleinert. Das Gewebe wurde anschließend mit einem Pottergerät mit 20 Hüben zu einem Homogenat weiterverarbeitet, wobei weiter ständig gekühlt wurde.

Das Homogenat wurde durch differentielles Zentrifugieren bei 4 °C in seine verschiedenen Fraktionen aufgetrennt. Zunächst wurde es mit einer Varifuge für 30 min bei 750 g (2250 U/min) zentrifugiert, wobei sich die groben Membranbestandteile und Zellkerne als Pellet ablagerten und verworfen wurden. Der Überstand wurde in einer Sorvall-Zentrifuge für 30 min bei 20 000 g (12 000 U/min) weiterverarbeitet. Als Pellet erhielt man hierbei die Mitochondrienfraktion, während der Überstand in Röhrchen für die Ultrazentrifuge umpipettiert wurde. In der Ultrazentrifuge wurden die restlichen Gewebefraktionen 60 min lang bei 105 000 g (39 000 U/min) ohne Bremse gut austariert zentrifugiert. Im Anschluß daran erhielten wir die Cytosolfraktion als Überstand, während sich die Mikrosomen im Pellet befanden. Das Pellet wurde mit 2 ml Homogenisationspuffer resuspendiert und erneut 60 min lang bei 105 000 g zentrifugiert. Die so gereinigte Mikrosomenfraktion wurde in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,5) aufgenommen und in 200 µl Portionen in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Auf diese Weise wurden sowohl die Mikrosomen aus dem Lebergewebe als auch die Mikrosomen aus dem Nierenrindengewebe hergestellt. Während der Lagerzeit im flüssigen Stickstoff konnte keine Abnahme der Enzymaktivität festgestellt werden.

### 3.2. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte vor jeder Inkubation mit einem Protein-Assay der Firma Bio-Rad (Hercules, USA), und zwar nach der „Standard Assay Procedure“, die für Proteinkonzentrationen zwischen 20-140  $\mu\text{g}$  (200-1400  $\mu\text{g/ml}$ ) Protein geeignet ist. Das Prinzip dieses Assays beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm nach Bindung des Proteins an den Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau, wobei die Zunahme der Absorption proportional zur Proteinkonzentration ist (100). Als Standardprotein wurde aliquotiertes bovines Serumalbumin in Konzentrationen von 700, 350 und 175  $\mu\text{g/ml}$  (Oxidationen) bzw. 500, 250, 200  $\mu\text{g/ml}$  (Reduktionen) verwendet.

Vor jedem Versuchsansatz wurde das Farbstoffreagenz frisch mit Aqua bidest 5fach verdünnt, da die Proportionalität zwischen Absorption und Proteinkonzentration nur bei frischen Lösungen gewährleistet ist, und der Farbstoff nach einiger Zeit Niederschläge bilden kann. Es wurden jeweils drei verschiedene Konzentrationen an Standardprotein und drei unterschiedliche Mikrosomenkonzentrationen sowie ein Leerwert für eine Proteinbestimmung verwendet, wobei immer mit Zweifachbestimmungen gearbeitet wurde. Die Nierenrindemikrosomen wurden 1:25, 1:50 und 1:100 und die Lebermikrosomen 1:50, 1:100 und 1:200 mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer verdünnt. Jeweils 100  $\mu\text{l}$  der Standards bzw. der verdünnten Mikrosomenlösungen wurden mit 5 ml des verdünnten Farbstoffreagenzes versetzt und einige Sekunden mit einem Vortex gemischt. Nach einer Wartezeit von 5 min wurde die Absorption bei 595 nm mit einem UV-Photometer bestimmt. Die hierbei ermittelten Absorptionswerte wurden gegen die Proteinkonzentrationen in einer Graphik aufgetragen, und aus der Ausgleichsgeraden der Standards wurde dann die Proteinkonzentration der Mikrosomen ermittelt.

	<b>durchschnittliche Proteinkonzentration</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>Anzahl der Proteinbestimmungen</b>
Lebermikrosomen	35,17 mg/ml	2,54	13
Nierenmikrosomen	8,71 mg/ml	1,25	13

**Tabelle 3-2:** Durchschnittliche Proteinkonzentrationen der Leber- und Nierenmikrosomen jeweils vor den Inhibitionsversuchen.

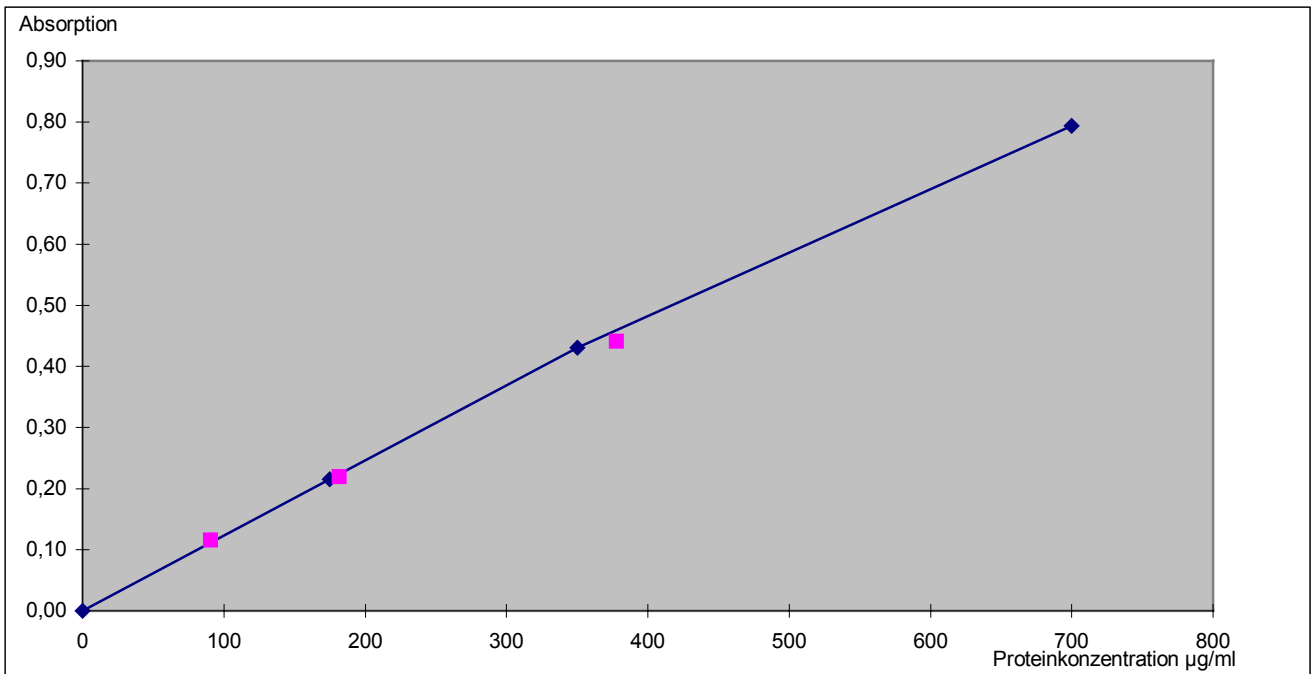
## Proteinbestimmung nach Bradford mit BIORAD Kit

### Standard

Standard $\mu\text{g/ml}$	Abs 1	Abs 2	MW Abs	R	m	b
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,99887	0,00	0,01348
175	0,2010	0,2298	0,2154			
350	0,4127	0,4491	0,4309			
700	0,7899	0,7987	0,7943			

### Proben

Verdünnungs- faktor	Abs 1	Abs 2	MW Abs	Proteinkonzentration (mg/ml)		
100	0,1163	0,1156	0,1160		9,05	
50	0,2299	0,2082	0,2191		9,08	
25	0,4526	0,4299	0,4413		9,45	
				<b>MW</b>	<b>9,19</b>	<b>mg/ml</b>

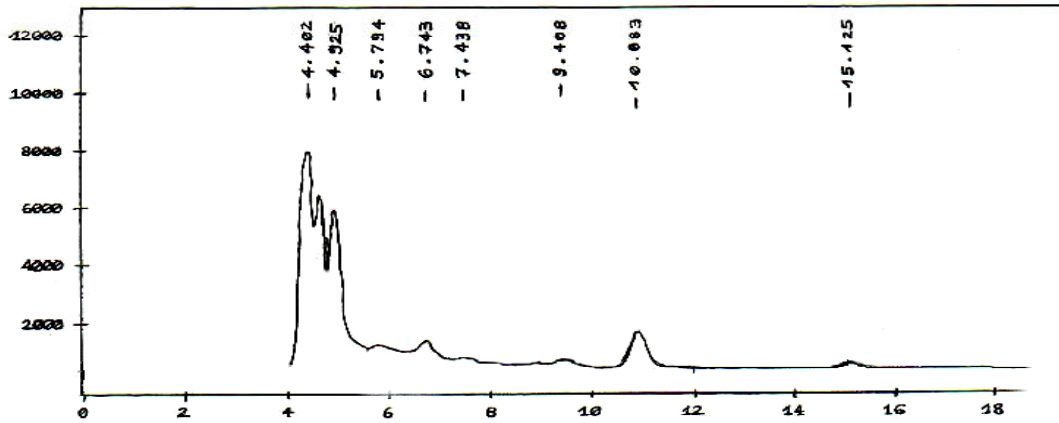


**Abb. 3-1:** Beispiel einer Proteinbestimmung durch photometrischen Vergleich von Standardproteinen und verschiedenen Verdünnungen der Mikrosomen (Y-Achse: Absorption, X-Achse: Proteinkonzentration  $\mu\text{g/ml}$ ).

### 3.3. Herstellung und Reinigung der <sup>3</sup>H-markierten Substrate

Als Tracer wurden <sup>3</sup>H-markiertes Cortisol und 11-Oxo-Dexamethason verwendet. Das käuflich erworbene radioaktiv markierte [1,2,6,7-<sup>3</sup>H]-Cortisol hatte eine spezifische Aktivität von 41 Ci/mmol/l. Um Verunreinigungen in Form von Zerfallsprodukten zu entfernen, wurde das markierte Cortisol vor den Versuchsreihen mittels normal phase HPLC über LiChrosorb<sup>®</sup>-Diolsäulen (Länge 25 cm, Durchmesser 4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit 85 % Hexan und 15 % Propanol als Fließmittel (Flußrate: 1,3 ml/min) gereinigt. Dazu wurde als erstes ein Probelauf mit unmarkiertem Cortisol durchgeführt und die Retentionszeit von diesem ermittelt. Nach einer Auswaschphase wurde das radioaktive Cortisol in die HPLC-Anlage injiziert. Es wurde nur die Fraktion des Cortisolpeakes aufgefangen; der Rest wurde verworfen. Die Radioaktivität des eingesetzten Cortisols, des verworfenen Restes und der aufgefangenen Cortisol-Fraktion wurden bestimmt. Es ließen sich keine relevanten radioaktiven Verunreinigungen in der Cortisol-Fraktion nachweisen.

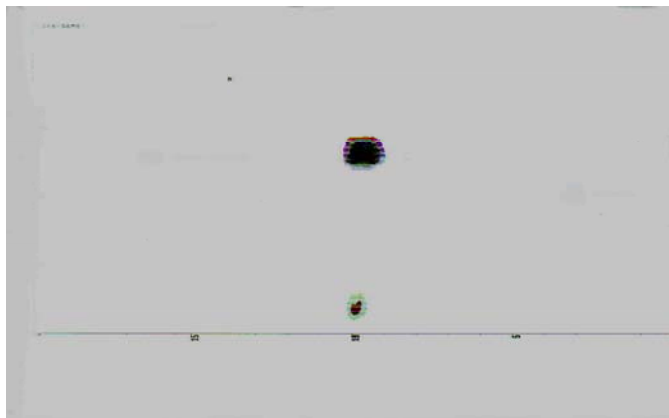
Das <sup>3</sup>H-markierte Oxo-Dexamethason wurde durch Oxidation von [1,2,4,6,7-<sup>3</sup>H]-Dexamethason (spezifische Aktivität 70 Ci/mmol/l) selbst hergestellt. Dazu wurde 1 µg [1,2,4,6,7-<sup>3</sup>H]-Dexamethason 15 h lang mit 50 µl einer 0,4%igen wäßrigen Chrom(VI)-oxid-Lösung in einem schüttelnden Wasserbad bei 37°C oxidiert. Zur Steroidabtrennung wurden Sep-Pak<sup>®</sup>-C<sub>18</sub>-Kartuschen verwendet, durch die verschiedene Flüssigkeiten mit Hilfe einer Vakuumpumpe tropfenweise gezogen wurden. Als erstes erfolgte die Aktivierung der Kartuschen mit 5 ml Methanol und 5 ml Wasser. Anschließend wurde die radioaktive Probe aufgegeben und mit 2 ml Aqua bidest. und 1 ml 10%igem Methanol gereinigt. Eluiert wurden die Steroide mit 3 x 1 ml Methanol. Die Auftrennung und Reinigung der Oxidationsprodukte des Dexamethasons erfolgte mittels HPLC (Fließmittel: Hexan : Isopropanol 80:20; Flußrate: 1,3 ml/min). Wieder konnte durch Vergleich mit Läufen von unmarkierten Steroiden der Peak von 11-Oxo-Dexamethason (bei 10,083 min) eindeutig identifiziert werden, so daß die Substanz von den Verunreinigungen, dem Dexamethason (bei 15,125 min) und dem 21-Dehydro-Dexamethason (bei 6,743 min), abgetrennt werden konnte (70).



**Abb. 3-2:** HPLC-Lauf (Fließmittel Hexan : Isopropanol 80:20, Flußrate=1,3 ml/min) des Reaktionsgemisches nach Oxidation von  $^3\text{H}$ -Dexamethason mit  $\text{Cr}_2\text{O}_3(\text{aq})$ -Lösung.

- 21-Dehydro-Dexamethason-Peak bei 6,74 min
- Oxo-Dexamethason-Peak bei 10,08 min
- Dexamethason-Peak bei 15,13 min

Die als Oxo-Dexamethason identifizierte Substanz wurde mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und mit einem Radioaktivscanner auf ihre Reinheit überprüft. Die Identität wurde nochmals durch Vergleiche mit reinem unmarkierten Oxo-Dexamethason getestet. Es zeigte sich, daß auf der Dünnschichtplatte neben dem Auftragungspunkt am unteren Ende nur eine weitere Substanz vorhanden war, die sich bei der Auftrennung analog zum unmarkierten Oxo-Dexamethason verhielt (s. Abb.3-3).



**Abb. 3-3:** Detektion der Radioaktivität mit einem Radioaktivscanner nach Auftrennung des selbst hergestellten  $^3\text{H}$ -Oxo-Dexamethason durch Dünnschichtchromatographie.

### 3.4. Herstellung der Substrat-, Cosubstrat- und Inhibitorlösungen

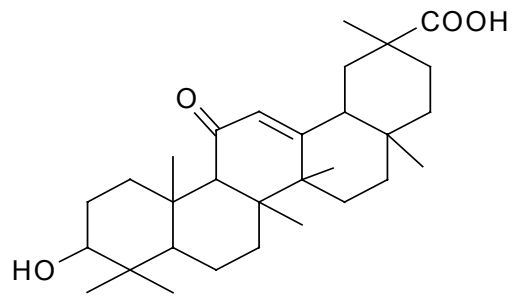
Die verschiedenen Substrate und Inhibitoren wurden für die Oxidation in 0,1 M Natriumphosphatpuffer mit pH 8 und für die Reduktion in 0,1 M Natriumphosphatpuffer mit pH 6,5 angesetzt. Die Lösungen A und B der Mikrosomenpräparation dienten als Stammlösungen. Sie wurden in einem solchen Verhältnis miteinander gemischt, daß sich der beabsichtigte pH-Wert einstellte. Die benötigten Substratkonzentrationen sind der Tabelle 3-3 zu entnehmen:

Lösungspuffer	0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 8)	0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,5)
Substrat-konzentration	Cortisol <sub>Niere</sub> = 250 nM Cortisol <sub>Leber</sub> = 9,8 µM	Oxo-Dexamethason <sub>Niere</sub> = 650 nM Oxo-Dexamethason <sub>Leber</sub> = 16 µM

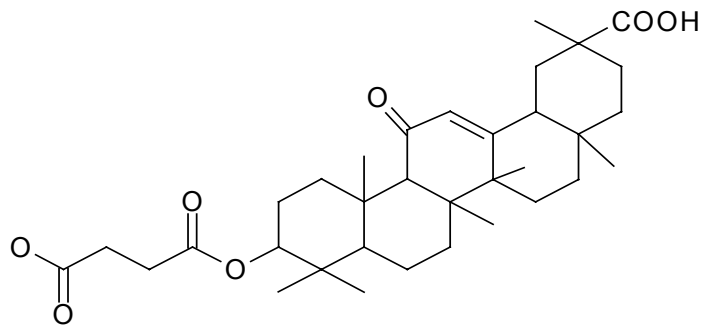
**Tabelle 3-3:** Benötigte Substratkonzentrationen und die verwendeten Lösungspuffer für die Inhibitionsversuche.

Die z.T. schlecht löslichen Inhibitoren wurden in Methanol gelöst und mit entweder 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 8 (Oxidation) oder pH 6,5 (Reduktion) verdünnt, so daß die Gesamtmethanolvolumen pro Inkubationsansatz bei den Inhibitionsversuchen < 1 % war. Höhere Methanolanteile könnten zu einer Veränderung der Enzymaktivität führen. Für jede potentielle Inhibitorsubstanz wurden Lösungen mit Konzentrationen von  $10^{-4}$  mol/l bis  $10^{-8}$  mol/l in Zehnerschritten hergestellt. Die untersuchten Substanzen mit ihrer Strukturformel sind in Abbildung 3-4 und 3-5 dargestellt.

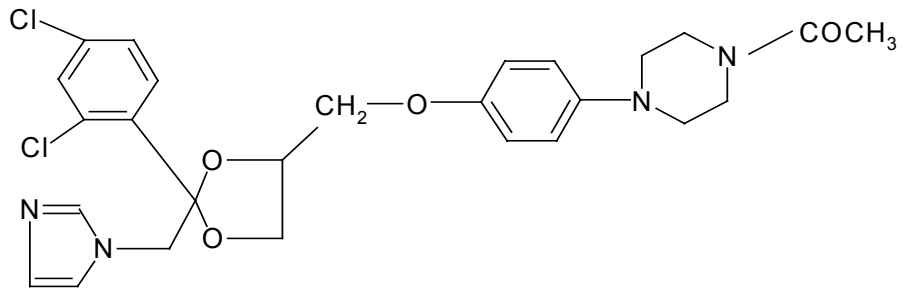
Die Cosubstrate wurden jeweils mit denselben 0,1 M Natriumphosphatpuffern wie die Substrate und Inhibitoren angesetzt, und zwar in einer Konzentration von  $10^{-2}$  mol/l, um eine Endkonzentration von  $10^{-3}$  mol/l im Reaktionsansatz zu erreichen.



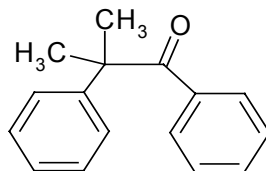
Glycyrrhetinsäure



Carbenoxolon



Ketokonazol



Metopiron

Abb. 3-4: Strukturformeln der untersuchten Inhibitoren (Teil 1).



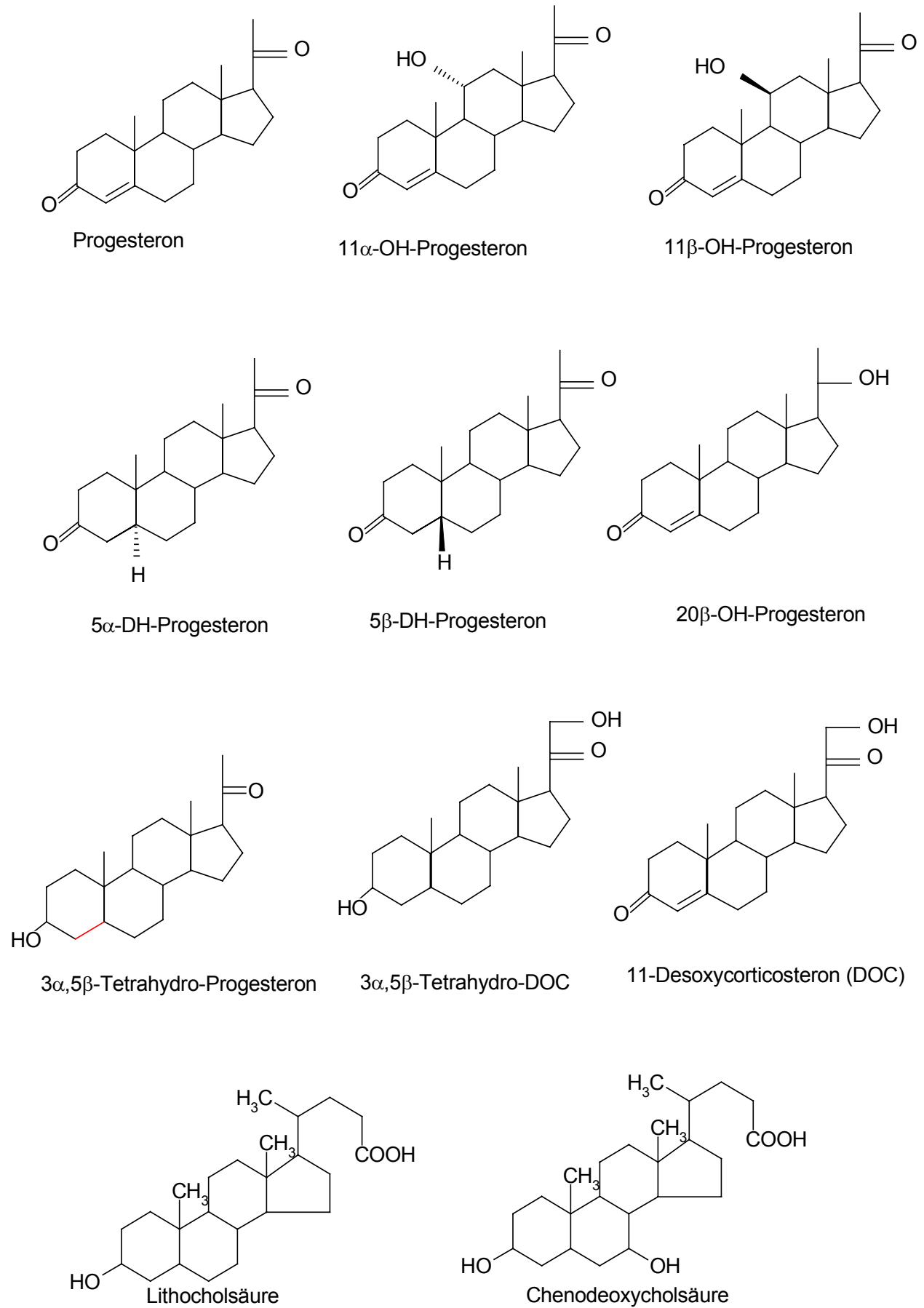


Abb. 3-5: Strukturformeln der untersuchten Inhibitoren (Teil 2)

### 3.5 Inkubation der Mikrosomen

Untersucht werden sollte die Hemmbarkeit sowohl der Oxidations- als auch der Reduktionsreaktion der 11 $\beta$ -HSD-1 bzw. -2 in humanen Leber- bzw. Nierenrindenmikrosomen. Dazu wurden zunächst die Bedingungen für die Reaktionen ohne Inhibitoren ermittelt.

#### 3.5.1 Ermitteln der Reaktionsbedingungen

Die Reaktionsbedingungen sollten einen möglichst hohen Substratumsatz ermöglichen, der noch linear mit der Zeit ansteigt. Damit sollte einerseits gewährleistet werden, daß die Reaktion hauptsächlich in eine Richtung stattfindet und die Produkte und Edukte gut nachweisbar sind. Andererseits sollte eine Substratsättigung vermieden werden, da sonst die Hemmung nicht mehr quantifizierbar ist.

Da Voruntersuchungen gezeigt haben, daß Cortisol von der 11 $\beta$ -HSD besonders gut oxidiert und 11-Oxo-Dexamethason besonders gut reduziert wird, wurde für alle Oxidationsreaktionen Cortisol und für alle Reduktionsreaktionen 11-Oxo-Dexamethason als Substrat verwendet. Die gewählten Konzentrationen liegen im Bereich der jeweiligen  $K_m$ -Werte, in dem eine besonders gute Regulierbarkeit der Enzyme gewährleistet ist.

<b>Niere (Oxidation)</b>	[F] = 25 nmol/l
<b>Niere (Reduktion)</b>	[Oxo-Dexa] = 65 nmol/l
<b>Leber (Oxidation)</b>	[F] = 0,98 $\mu$ mol/l
<b>Leber (Reduktion)</b>	[Oxo-Dexa] = 1,6 $\mu$ mol/l

**Tabelle 3-4:** Substratkonzentrationen pro Inkubationsansatz für die Oxidation (Substrat: Cortisol) und Reduktion (Substrat: Oxo-Dexamethason) durch die 11 $\beta$ -HSD-1 (Lebermikrosomen) und 11 $\beta$ -HSD-2 (Nierenmikrosomen).

Für die Detektion wurde den Ansätzen jeweils 100 000 cpm tritiummarkiertes Substrat hinzugefügt. Hierdurch wird eine gute Meßbarkeit bei geringer Strahlenbelastung erreicht.

Den Reaktionsansätzen der Leber wurden NADP (Oxidation) oder NADPH (Reduktion) als Cosubstrate hinzugefügt; in der Niere wurden NAD (Oxidation) oder NADH (Reduktion) verwendet. Im Inkubationsansatz betrug die Cosubstratkonzentration jeweils 1 mmol/l, um die Reaktion möglichst vollständig in eine Richtung ablaufen zu lassen.

Die dazugehörigen Mikrosomenkonzentrationen wurden durch Voruntersuchungen ermittelt. Ein möglichst hoher noch im linearen Bereich liegender Umsatz bei möglichst geringem Proteinverbrauch wurde angestrebt. Daraus ergaben sich für die verschiedenen Reaktionen folgende Mikrosomenkonzentrationen pro Inkubationsansatz:

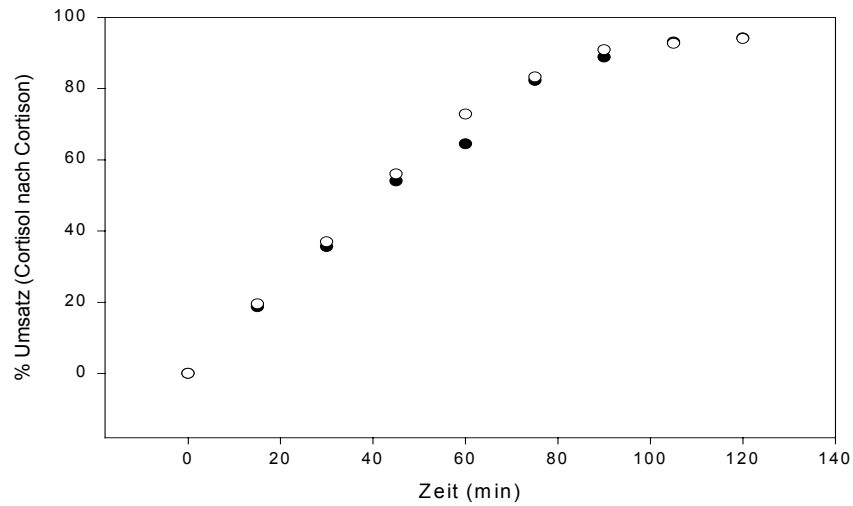
<b>Leber (Oxidation)</b>	0,15 mg/ml
<b>Leber (Reduktion)</b>	0,03 mg/ml
<b>Niere (Oxidation)</b>	0,03 mg/ml
<b>Niere (Reduktion)</b>	0,0075 mg/ml

**Tabelle 3-5:** Mikrosomenkonzentrationen, die für die Untersuchung der Hemmbarkeit der 11 $\beta$ -HSD-1 (Lebermikrosomen) und 11 $\beta$ -HSD-2 (Nierenmikrosomen) gewählt wurden.

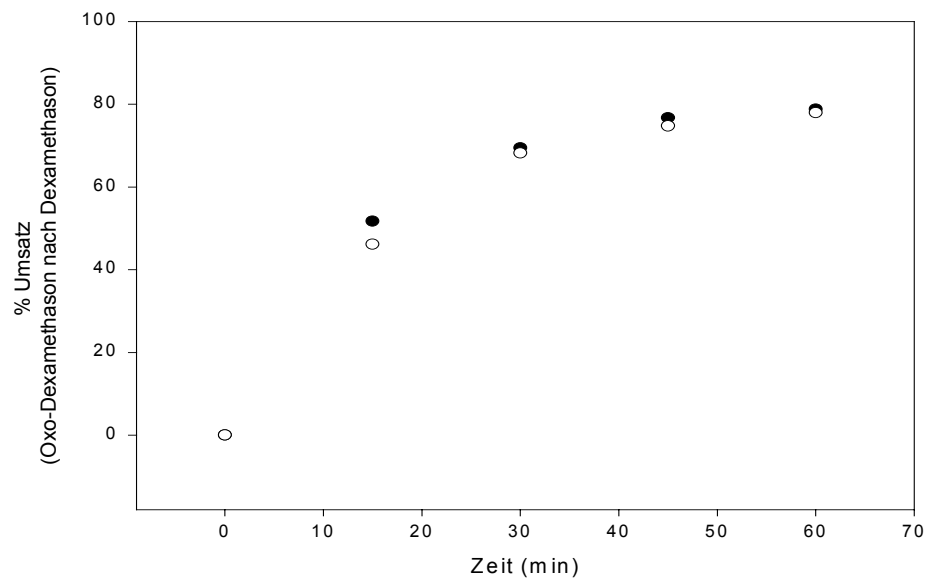
Zur Ermittlung der optimalen Reaktionszeit wurden Zeitkinetiken der Oxidations- und Reduktionsreaktion der 11 $\beta$ -HSD-1 und -2 durchgeführt.

### **3.5.1.1 Zeitkinetiken für die 11 $\beta$ -HSD-1 katalysierten Reaktionen**

Die Zeitkinetikkurve für die 11 $\beta$ -HSD-1-Oxidation zeigt einen linearen Anstieg innerhalb der ersten 80 min und geht dann in den Sättigungsbereich über mit maximalen Umsätzen um die 95 % (siehe Abb. 3-6). Als Reaktionszeit wurden 50 min gewählt. Bei der 11 $\beta$ -HSD-1-Reduktion kommt es spätestens nach 35 min zu einer Sättigungsreaktion (siehe Abb. 3-7). Als Reaktionszeit wurden daher 30 min gewählt.



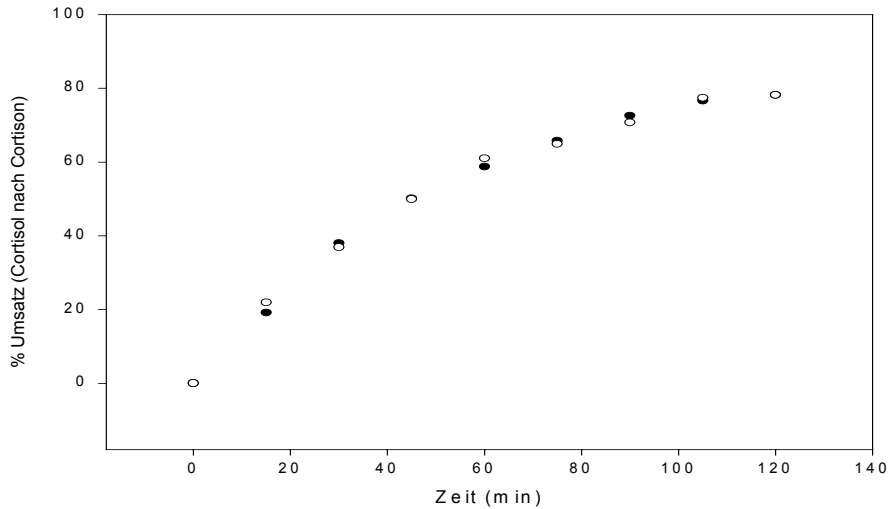
**Abb. 3-6:** Zeitkinetik der Oxidationsreaktion der 11 $\beta$ -HSD-1 (n=2): Prozentuale Umsätze von Cortisol nach Cortison in humanen Lebermikrosomen bei einer Mikrosomenkonzentration von 0,15 mg/ml und Reaktionsbedingungen wie in Tabelle 3-6 angegeben.



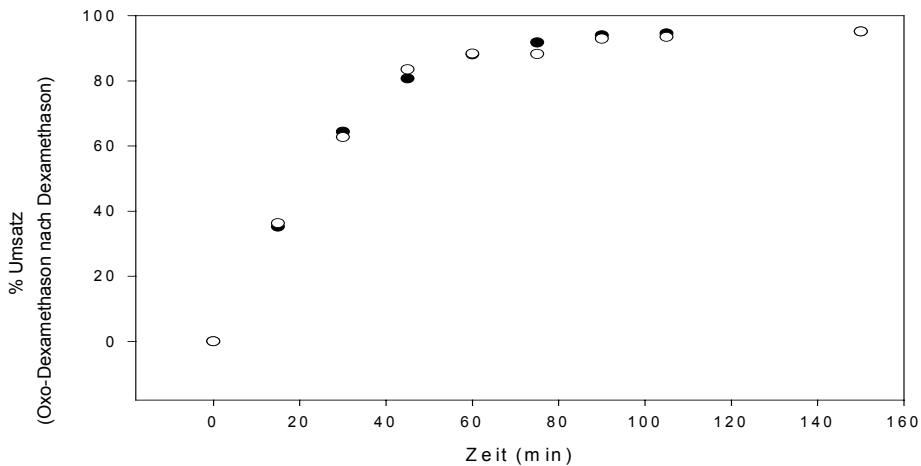
**Abb. 3-7:** Zeitkinetik der Reduktionreaktion der 11 $\beta$ -HSD-1(n=2): Prozentuale Umsätze von Oxo-Dexamethason nach Dexamethason in humanen Lebermikrosomen bei einer Mikrosomenkonzentration von 0,03 mg/ml und Reaktionsbedingungen wie in Tabelle 3-6 angegeben.

### 3.5.1.2. Zeitkinetiken für die 11 $\beta$ -HSD-2 katalysierten Reaktionen

Die 11 $\beta$ -HSD-2-Oxidations- (Abb. 3-8) und -Reduktionsumsätze (Abb. 3-9) sind innerhalb der ersten 40 min proportional zur Reaktionszeit. Die Reaktionszeiten wurden daher auf 30 min festgelegt.



**Abb. 3-8:** Zeitkinetik der Oxidationsreaktion der 11 $\beta$ -HSD-2: Prozentuale Umsätze von Cortisol nach Cortison in 0,03 mg/ml humanen Nierenmikrosomen pro Ansatz bei einer Substratkonzentration von 25 nm und Zugabe von NAD<sup>+</sup> ( $1 \times 10^{-3}$  mol/l) (n=2).



**Abb. 3-9:** Zeitkinetik der Reduktionreaktion der 11 $\beta$ -HSD-2: Prozentuale Umsätze von Oxo-Dexamethason nach Dexamethason in 7,5  $\mu$ g/ml humanen Nierenmikrosomen pro Ansatz bei einer Substratkonzentration von 65 nmol/l und Zugabe von NADH ( $1 \times 10^{-3}$  mol/l) (n=2).

### 3.5.2 Zusammenfassung der Versuchsbedingungen

<b>Oxidation durch die 11<math>\beta</math>-HSD-1 (Lebermikrosomen)</b>		
• [Mikrosomen]	=	0,15 mg/ml
• [Cortisol]	=	0,98 $\mu$ mol/l
• [ <sup>3</sup> H]-Cortisol	=	100 000 cpm
• [NADP]	=	1 mmol/l
• t	=	50 min
• 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer pH 8		
<b>Oxidation durch die 11<math>\beta</math>-HSD-2 (Nierenrinde)</b>		
• [Mikrosomen]	=	0,03 mg/ml
• [Cortisol]	=	25 nmol/l
• [ <sup>3</sup> H]-Cortisol	=	100 000 cpm
• [NAD]	=	1 mmol/l
• t	=	30 min
• 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer pH 8		
<b>Reduktion durch die 11<math>\beta</math>-HSD-1 (Lebermikrosomen)</b>		
• [Mikrosomen]	=	0,03 mg/ml
• [Oxo-Dexa]	=	1,6 $\mu$ mol/l
• [ <sup>3</sup> H]-Oxo-Dexamethason	=	100 000 cpm
• [NADPH]	=	1 mmol/l
• t	=	30 min
• 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer pH 6,5		
<b>Reduktion durch die 11<math>\beta</math>-HSD-2 (Nierenrinde)</b>		
• [Mikrosomen]	=	0,0075 mg/ml
• [Oxo-Dexamethason]	=	65 nmol/l
• [ <sup>3</sup> H]-Oxo-Dexamethason	=	100 000 cpm
• [NADH]	=	1 mmol/l
• t	=	30 min
• 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer pH 6,5		

**Tabelle 3-6:** Versuchsbedingungen für die verschiedenen Inkubationen.

In eine 24multi-well-Platte von Nunclon wurde pro well 1 ml Inkubationsansatz eingesetzt. Die Reaktion fand in 0,1 mmol/l Natriumphosphat-Puffer (pH für Oxidation 8, für Reduktion 6,5) statt. Während der Reaktionsdauer befanden sich die Inkubate in einem 37°C warmen schüttelnden Wasserbad. Außer den Mikrosomen, die nach dem Auftauen aus dem flüssigen Stickstoff auf Eis gelagert wurden und die zum Ansatz als letztes hinzugegeben wurden, waren alle Komponenten vorgewärmt.

### 3.5.3. Untersuchung der Inhibition

Für die Untersuchung der Hemmwirkung von Substanzen auf die 11 $\beta$ -HSD-1 und -2 wurden verschiedene potentielle Hemmstoffe in Endkonzentrationen zwischen  $10^{-9}$  bis  $10^{-5}$  mol/l zu den Reaktionsansätzen dazugegeben. Diese Umsätzen wurde mit denen von Ansätzen ohne Hemmstoff verglichen. Zur Ermittlung der IC<sub>50</sub>-Werte wurde der Umsatz ohne Hemmstoff gleich 100 % gesetzt und der Umsatz mit Hemmstoff darauf bezogen. Die Inhibitorkonzentration, bei der der Umsatz um 50 % reduziert ist, ist der IC<sub>50</sub>-Wert.

Alle Ergebnisse beruhen mindestens auf Dreifachbestimmungen.

#### Pipettierschema pro Inkubationsansatz:

- 100  $\mu$ l Substrat
- 100  $\mu$ l [<sup>3</sup>H]-Substrat
- 100 $\mu$ l Cosubstrat
- 100  $\mu$ l potentieller Inhibitor
- 600  $\mu$ l Mikrosomen in 0,1 M Natriumphosphatpuffer verdünnt

### 3.6. Umsatzbestimmung: Analytik

Nachdem die Inkubationszeit verstrichen war, wurden die einzelnen Inkubationsansätze in Reagenzgläser mit jeweils 3 ml eiskaltem Ethylacetat umpipettiert. Diese wurden mit einem Vortex einmal gut durchgemischt und dann etwa eine Minute stehengelassen, damit die zwei entstehenden Phasen gut voneinander abgrenzbar waren. Die obere Phase bestehend aus in Ethylacetat gelösten Steroiden wurde abpipettiert. Die untere wäßrige Phase mit den Proteinanteilen wurde verworfen. Anschließend wurde das Lösungsmittel der oberen Phase mit Luft verblasen und durch 40  $\mu$ l Methanol ersetzt, dem kaltes Produkt und Edukt zugefügt worden war. Die Lösung wurde mit einer 2  $\mu$ l Pipette auf eine Kieselgel 60 F<sub>254</sub> DC-Platte mit Konzentrierungszone tropfenweise aufgetragen und in einer gläserne Dünnschichtchromatographiekammer mit einem Fließmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol (75+5 ml für Oxidation; 70+10 ml für Reduktion) aufgetrennt. Die Produkte und Edukte

wurden mit einer UV-Lampe bei 256 nm detektiert und die Areale mit einem Bleistift umrandet. Die so markierten Stellen wurden weiträumig ausgeschnitten. Die DC-Plattenstücke wurden in einem mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit (Instant Scint Gel Plus von Packard Instrument B.V.) und 1 ml Wasser gefüllten 20 ml-Szintillations-Vial zur Extraktion belassen. Nach 12 Stunden wurde die Zählerausbeute mit einem  $\beta$ -Counter gemessen.

Die Wiederfindungsrate der Steroide lag sowohl für Cortisol und Cortison als auch für Oxo-Dexamethason und Dexamethason zwischen 84,3 und 89,1 %, wobei das unvollständige Abpipettieren bei der Zweiphasentrennung für die Schwankungen verantwortlich ist. Das Verhältnis der korrespondierenden 11-OH- und 11-Oxo-Metabolite in einem Inkubationsansatz, das für unsere Untersuchungen relevant ist, bleibt davon unbeeinflusst.

### **3.7. Auswertung und Statistik**

Die Texte und Daten wurden mit Word 2000 und Exel 2000 von Microsoft (Microsoft Corp. USA) erstellt und berechnet. Für die graphische Darstellung der Inhibitionskurven wurde SigmaPlot 5.00 für Windows der Firma Jandel Scientific benutzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 10,0 der SPSS Inc. (Chicago, Illinois, USA). Es wurde der Duncan-Multiple-Range-Test zur Berechnung der signifikanten Inhibitionen verwendet. Die Formeln wurden mit ISIS /Draw 2.3 von MDL Information Systems, Inc. erstellt.