

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Materialien, Chemikalien und Geräte

#### 3.1.1. Steroide

**Cortisol, Cortison, Prednisolon, Prednison, Beclomethason und Dexamethason** wurden von *Sigma Chemical Co.* (St. Louis) bezogen.

**Prednyliden, 9 $\alpha$ -Fluorocortisol, 9 $\alpha$ -Fluorocortison, 11-Oxo-Dexamethason, Fluocortolon, 11-Oxo-Fluocortolon, 2Cl-Fluocortolon und 21Acetoxy-11-Oxo-2Cl-Fluocortolon** wurden von der *Schering AG* (Berlin) zur Verfügung gestellt.

**Betamethason, 11-Oxo-Betamethason und 11-Oxo-Beclomethasondipropionat** waren Geschenke der Firma *GlaxoWellcome* (Bad Oldeslohe).

**Flunisolid** und **Budesonid** waren Geschenke der Firmen *Boehringer Ingelheim* (Ingelheim) und *Astra Chemicals* (Wedel). **Fluticasonpropionat** und **Fluocinonid** waren Geschenke der Firma *Grünethal* (Stolberg). **Flumethason** und **21-Desoxy-Dexamethason** wurden von der Firma *Paesel & Lorei GmbH&Co* (Frankfurt/Main) gekauft. Die Substanzen **11-Dehydro-2Cl-Fluocortolon** sowie **11-Dehydro-Beclomethason** wurden durch Verseifung der veresterten Substanzen synthetisiert (Kapitel 3.2.). Das **11-Oxo-Prednyliden** wurde durch 11-Oxidation von Prednyliden mittels Chrom-VI-Oxyd und Schwefelsäure synthetisiert (Kap.3.2.). Die Synthese von **2 $\alpha$ -Methyl-9 $\alpha$ -Fluorocortison** wurde bei der Firma *Paesel & Lorei GmbH & Co* (Frankfurt/Main) in Auftrag gegeben. Strukturformeln und chemische Bezeichnung der Steroide finden sich nochmals im Anhang (Kap.9).

#### 3.1.2. Materialien für die Zellkultur

Für die Zellkultur wurden **Ham's F12 Medium** mit und ohne Phenolrot, **Fetales Kälberserum**, **Penicillin/Streptomycin-Lösung** (10000 IE/ml Penicillin; 10000 $\mu$ g/ml Streptomycin), **PBS-Puffer** (Phosphate Buffered Saline), **Fungizone<sup>®</sup>** (Amphotericin B, 250 $\mu$ g/ml), der Selektionsmarker **GENETICIN<sup>®</sup>** (G418) sowie **Trypsin/EDTA-Lösung** (0,5g/l Trypsin, 0,2g/l EDTA) von der Firma *Invitrogen* (San Diego, USA) gekauft. **LipofectAMINE PLUS<sup>™</sup>** Reagenz für die Transfektion, **Falconröhrchen** und **Gewebe-kulturflaschen** verschiedener Größen wurden von *NUNC-LifeTechnologies<sup>®</sup>* (Roskilde, Dänemark) bezogen.

#### 3.1.3. Materialien für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für Hochdruckflüssigkeitschromatographie und Probenaufbereitung wurden **Aceton**, **Ethanol**, **n-Hexan**, **2-Propanol** und **Methanol** jeweils in LiChrosolv-Qualität von *Merck* (Darmstadt) bezogen. **Sep-Pak®-C<sub>18+</sub>**-Kartuschen zur Aufreinigung steroidhaltiger Proben wurden von *Waters Millipore* (Eschborn) gekauft.

### 3.1.4. Materialien für die Probandenversuche

Für die Probandenversuche wurden folgende Medikamente von der Krankenhausapotheke des Universitätsklinikums Benjamin Franklin bezogen (Tabelle 3.1.):

Handelsname ( Dosis )	Wirkstoff	Hersteller
Celestamine <sup>®</sup> (0,5mg)	Betamethason	<i>Essex Pharma</i> (München)
Fortecortin <sup>®</sup> (0,5mg und 10mg)	Dexamethason	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Cortison CIBA <sup>®</sup> (25mg)	Cortisonazetat	<i>Novartis</i> (Nürnberg)
Hydrocortison Hoechst <sup>®</sup> (10mg)	Cortisol	<i>Hoechst</i> (Bad Soden)
Decortin H <sup>®</sup> (20mg)	Prednisolon	<i>Merck</i> (Darmstadt)
Chenofalk <sup>®</sup> (Kapseln zu 250mg)	Chenodesoxycholsäure	<i>Falk-Pharma</i> (Freiburg )

**Tab.3.1.:** Handelsnamen, Dosen und Wirkstoffe der für die Probandenversuche verwendeten Arzneistoffe

Für die Blutentnahmen wurden Serumröhrchen der Firma *Vacutainer* (Plymouth, Grossbritannien) verwendet.

## 3.2. Aufreinigung steroidhaltiger Proben und Analytik

### 3.2.1. Die Probenaufreinigung auf Sep-Pak<sup>®</sup>-C<sub>18</sub>-Kartuschen

Vor der analytischen Bestimmung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurden die Steroide aus der wässrigen Lösung extrahiert und aufgereinigt.

Dazu wurde die steroidhaltige Lösung mit der doppelten Menge an Methanol versetzt und auf einem Vortexer 5 bis 10 Sekunden lang gemischt. Danach wurde das Gemisch bei 6000 rpm für 30 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (Haereus Cryofuge 5000, *Haereus*, Osterode) und der Überstand in ein neues Falcon-Gefäß dekantiert.

Anschließend wurde das Vierfache der ursprünglichen Menge (vor Methanolzugabe) an destilliertem Wasser zugegeben und durch kräftiges Vortexen mit dem Überstand vermischt.

Die Sep-Pak<sup>®</sup> C<sub>18+</sub>-Kartuschen wurden zunächst mit 5 ml Methanol und nachfolgend mit 5ml H<sub>2</sub>O aktiviert (148). Anschließend wurden die Probenvolumina auf die Kartuschen aufgegeben und mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch den Kartuschenfilter gezogen. Um ein gleichmäßiges Durchlaufen der Proben zu gewährleisten, wurde der Sog gering gehalten.

Bei stark unterschiedlichen Laufverhalten der verschiedenen Proben auf den Säulen wurden die bereits durchgelaufenen Proben von der Saugglocke abgenommen und erst für den Waschprozeß wieder aufgesetzt. Nach dem Durchlauf der Proben erfolgte die Reinigung der im Kartuschenfilter zurückgehaltenen Steroide in der Reihenfolge 2ml H<sub>2</sub>O, 1ml 10% Methanol und 2ml 20% Acetonlösung.

Danach ließen sich die Steroide mit 3 x 1ml Methanol extrahieren. Das Eluat wurde in Glasröhrchen aufgefangen und mit Luft verblasen. Bis zur Detektion wurden die Röhrchen bei -20°C gelagert (126).

### 3.2.2. Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) und Analytik

Vor jeder Injektion in die HPLC-Säule wurden die Steroide in Fließmittel aufgenommen und von größeren Partikeln befreit. Dazu wurden die Röhrchen mit den extrahierten Steroiden aufgetaut, 150µl Fließmittel (80% n-Hexan und 20% Isopropanol) zu jeder Probe pipettiert und auf dem Vortex gemischt. Die Probe wurde anschließend auf einen Filter (*Waters*

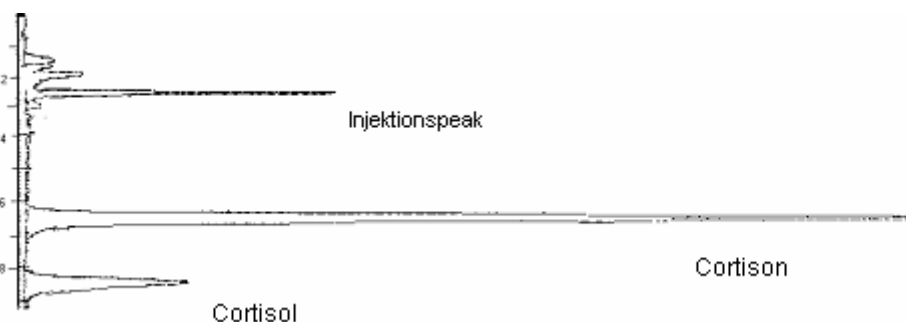
Millipore, Eschborn) gegeben und bei 6000rpm für 1min in einem Eppendorf Gefäß zentrifugiert, um größere Verunreinigungen zu beseitigen.

Bis auf die Detektion von Fluocortolon konnte für die HPLC-Analytik eine 250 x 4mm LiChrosorb-Diol-normal-phase-HPLC-Säule und eine LiChrosorb-Diol-normal-phase-Vorsäule (Partikelgröße jeweils 5µm) der Firma *Knauer* (Berlin) verwendet werden.

Als Fließmittel wurden n-Hexan (apolares Agens) und Isopropanol (polares Agens) im Mischungsverhältnis 80:20 bei einer Flussrate von 1,3 ml/min verwendet. Um die bei der Entspannung des Fließmittels im Detektor auftretenden Luftblasen zu vermeiden, wurde das Eluat vor Beginn der Messung für 15-30 min durch Durchperlen mit Helium entgast.

Die HPLC-Säule wurde vor dem ersten Probenlauf auf 40 °C vorgeheizt, die Laufzeit einer Probendetektion betrug 12 min. Jeweils 100µl der Probe wurden in die normal-phase-HPLC-Säule injiziert und die UV-Absorption bei 254 nm gemessen.

Da eine normal phase Säule mit isokratischem Gradienten verwendet wurde, erschien der Peak der 11-Oxo-Substanz zeitlich jeweils vor dem Peak der 11-Hydroxy-Substanz. Die durchschnittliche Peakbreite der detektierten Steroide betrug etwa 1 min. Damit waren die Peaks sowohl deutlich voneinander als auch deutlich von der Hintergrundaktivität („baseline“) abgrenzbar (Abb. 3.1.).

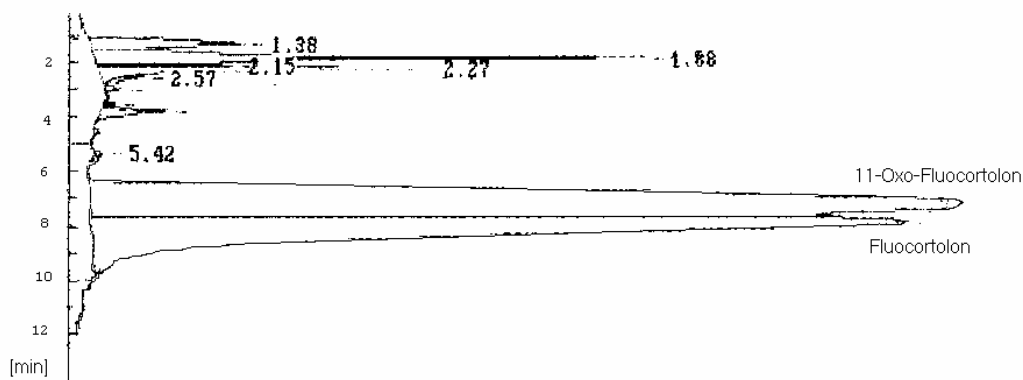


**Abb.3.1.:** UV-Chromatogramm (254nm –Wellenlänge) des HPLC-Laufes einer Inkubation von mit der 11β-HSD1 transfizierten CHO-Zellen (Reduktion von Cortison).

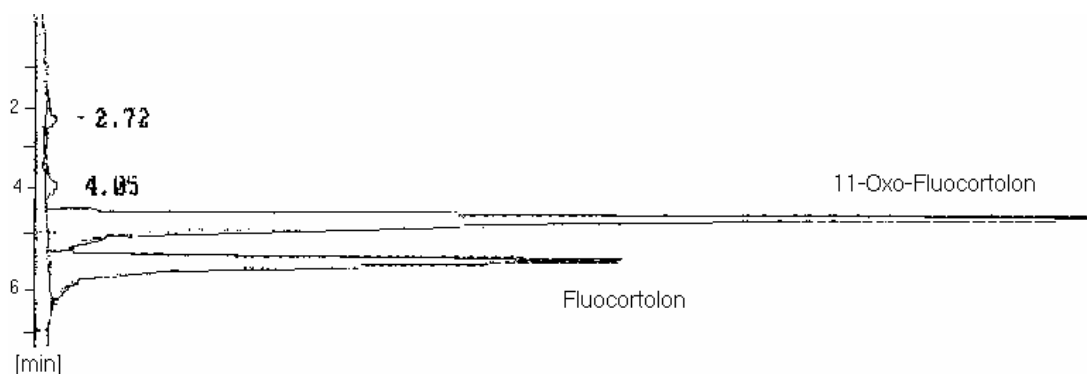
### 3.2.3. Detektion von Fluocortolon

Die Bestimmung von Fluocortolon ließ sich nicht mit der normal-phase Säule durchführen, da sich die Peaks der 11-Hydroxy- und der 11-Oxo-Substanz überlagerten. Es wurde daraufhin eine Spherisorb-ODS-Hypersil-reversed-phase Säule der Partikelgröße 3µm (*Knauer*, Berlin) sowie eine passende Vorsäule in das HPLC-Gerät eingebaut. Als mobile phase wurde zunächst ein Gemisch aus 35% Acetonitril und 65% Wasser verwendet. Damit ließ sich jedoch auch unter Verwendung der reversed-phase-Säule keine ausreichende Trennung der Peaks erreichen. Dies gelang erst unter Verwendung eines Fließmittels aus 80% Methanol und 20% Wasser. Die Flussrate betrug 0,5-0,8ml/min, die UV-Absorption wurde bei 240nm gemessen.

a)



b)



**Abb.3.2.:** UV-Chromatogramme der HPLC von Inkubationsversuchen zur Reduktion von 11-Oxo-Fluocortolon in mit der 11β-HSD1 transfizierten CHO-Zellen.

a) Detektion bei 254 nm unter Verwendung einer LiChrosorb-Diol-normal-phase-HPLC-Säule, Fließmittel aus 80% n-Hexan und 20% Isopropanol

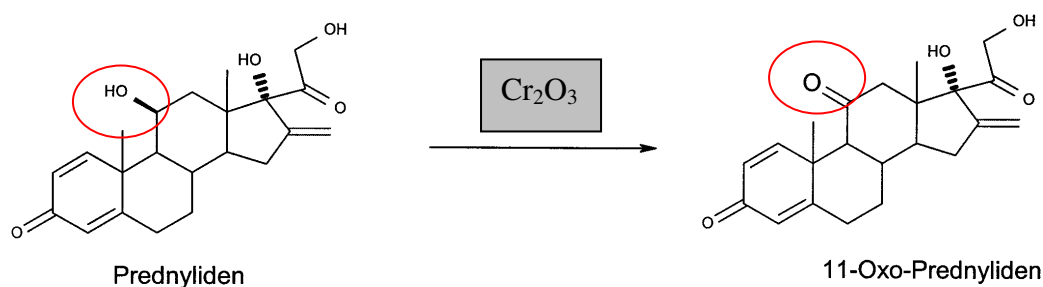
b) Detektion bei 240 nm nach Einbau einer Spherisorb Hypersil-reversed-phase-HPLC-Säule; Fließmittel aus 80% Methanol und 20% H<sub>2</sub>O, Fließgeschwindigkeit 0,5 ml/min

### 3.3. Synthese von 11-Oxo-Prednyliden

Da die 11-Oxo-Substanz des Prednylids nicht kommerziell erhältlich war, wurden Versuche zur biologischen und chemischen 11-Oxidation von Prednyliden durchgeführt.

Die 11-Oxo-Substanz konnte mit Hilfe von Sep-Pak<sup>®</sup> C<sub>18+</sub>-Kartuschen aufgereinigt und direkt nach dem Durchlauf durch den Detektor der HPLC aufgefangen werden.

#### 3.3.1. Die 11 $\beta$ -Oxidation von Prednyliden durch Chrom-VI-oxyd



**Abb.3.3.:** Strukturformeln von Prednyliden und 11-Oxo-Prednyliden.

Für Dexamethason ist die 11-Oxidation in 0,4%iger wässriger Chrom(VI)oxyd ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ )-Lösung bekannt (69). Die analoge 11-Oxidation von Prednyliden gelang jedoch auch nach mehrmaligem Ändern der  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ -Konzentration nicht. In der HPLC-Auftrennung ließ sich kein peak als die entsprechende 11-Oxo-Substanz identifizieren.

Die Synthese konnte schließlich mit einem Gemisch aus Chrom(VI)oxyd und Schwefelsäure (jeweils einmolar) nach einer Methode von *Bowers et. al.* durchgeführt werden (28).

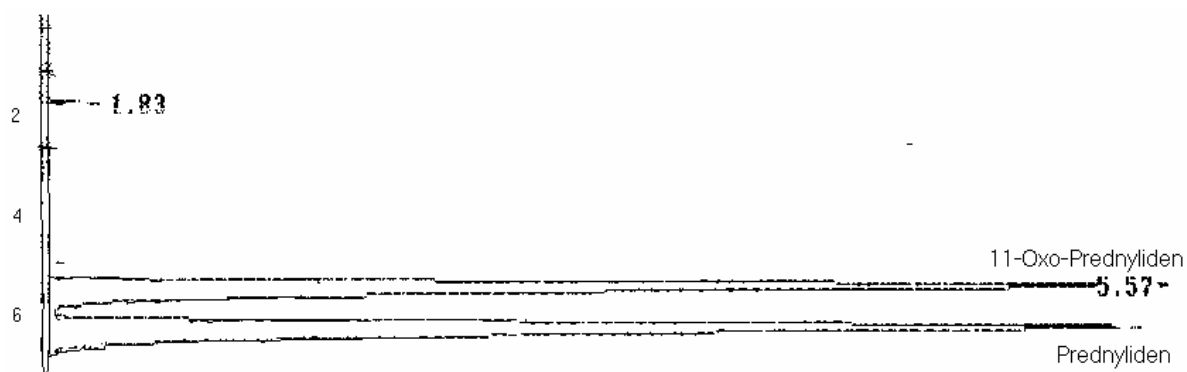
Dazu wurden 10mg Prednyliden in 2ml Aceton gelöst und die Lösung anschließend in einem Eisbad (Magnetrührer) bis auf 10-15°C heruntergekühlt.

Danach wurden tropfenweise maximal 20-30 $\mu$ l der einmolaren  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ - $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung hinzugefügt bis sich diese zunächst tiefbraune Lösung nach dem Eintropfen nicht mehr entfärbte. Anschließend wurde tropfenweise 100%iges Ethanol zugegeben bis die Lösung eine tiefgrüne Farbe annahm. Durch langsames Hinzutropfen von Wasser entstand ein grüner Niederschlag aus Chromoxyd, der sich absaugen ließ, während die übrige Lösung weitestgehend entfärbt wurde.

Nochmals wurde 1ml Wasser zugefügt, anschließend die Lösung langsam mit Luft verblasen. Dabei verdunstete zunächst das restliche Aceton. Die gelösten Steroide fielen in der wässrigen Lösung als weißer Niederschlag aus. Der Niederschlag wurde getrocknet, in Fließmittel (80% n-Hexan und 20% Isopropanol) gelöst und anschließend fraktioniert in die HPLC-Säule injiziert.

Der Peak der entsprechenden 11-Oxo-Substanz konnte anhand der Retentionszeit identifiziert werden (Vergleich mit 11-Oxo-Prednyliden aus der Oxidation in transfizierten Zellen). Unmittelbar nach der Passage des Detektors wurde die Substanz aufgefangen. Auf diese Weise ließen sich in 15-20 HPLC-Zyklen insgesamt etwa 2-3mg 11-Oxo-Prednyliden gewinnen. Diese Menge reichte jedoch nicht für eine erneute Einwaage aus. Daher wurde der steroidhaltige Niederschlag erneut in Methanol gelöst und wiederum ein großer Teil verblasen. Zur Adjustierung auf die gewünschte Konzentration von 10mmol/l und zur Überprüfung der Reinheit der gewonnenen Substanz wurden nacheinander 10µl der Ausgangssubstanz und anschließend die selbe Menge der synthetisierten Dehydrosubstanz in 300µl Laufmittel auf die HPLC-Säule aufgetragen und die Fläche der Peaks verglichen .

Die Reinheit der gewonnenen Substanz erwies sich als vergleichbar mit der Reinheit der Standardsubstanz. Nach mehreren Zyklen konnten beide Peakflächen mit einer Genauigkeit von  $\pm 2\%$  angeglichen werden (Abb.3.4.). Das gewonnene 11-Oxo-Prednyliden der Konzentration von 10mmol/l wurde sofort für die Reduktionsreaktion in mit 11β-HSD1 transfizierten Zellen eingesetzt.

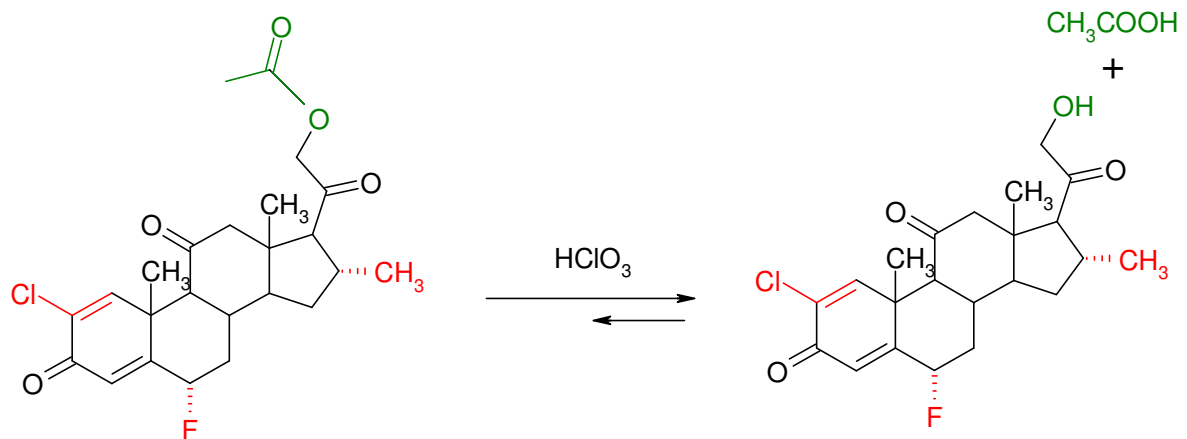


**Abb.3.4.** UV-Chromatogramm (254nm Wellenlänge) eines HPLC Laufes mit jeweils 10µl Prednyliden und 11-Oxo-Prednyliden der Konzentration 10mmol/l (jeweils in 300µl Fließmittel gelöst, davon 100µl in die HPLC Säule injiziert). Auf der Ordinatennachse ist die Retentionszeit (min) dargestellt.

### 3.4. Verseifung von Steroidestern

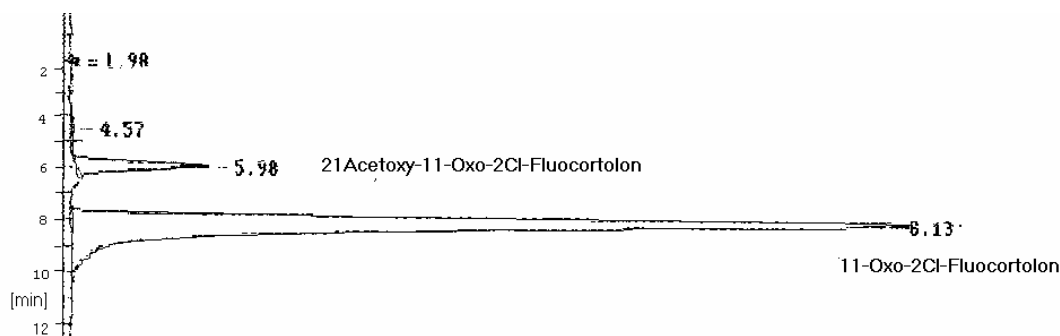
Die 11-Dehydroformen von Beclomethason und 2-Cl-Fluocortolon standen lediglich als 17-21-Dipropionat beziehungsweise als 21-Acetat zur Verfügung (Abb.3.5.). Für die Experimente an mit der 11 $\beta$ -HSD1 transfizierten Zellen sollte jedoch die reine 11-Oxo-Substanz als Substrat eingesetzt werden.

Entsprechende Vorschriften für die Verseifung von Steroidestern wurden freundlicherweise vom Institut für Arzneimittelchemie der *Schering AG* zur Verfügung gestellt.



**Abb.3.5.:** Verseifung von 21-Acetoxy-11-Oxo-2-Cl-Fluocortolon zu 11-Oxo-2Cl-Fluocortolon und Essigsäure.

Zur Esterspaltung wurden 25mg Steroid in 1,7ml Methanol gelöst und mit 175 $\mu$ l 70%iger Perchlorsäure (HClO<sub>4</sub>) versetzt. Das Gemisch wurde für 48h bei 0-4°C inkubiert und konnte danach direkt mit Laufmittel vermischt und in die HPLC-Anlage injiziert werden.



**Abb.3.6.:** UV-Chromatogramm der HPLC einer Verseifung von 21-Acetoxy-11-Oxo-2Cl-Fluocortolon. Der entsprechende 11-Oxo-Peak ließ sich unmittelbar nach Passage des Detektors auffangen.



Im Chromatogramm erscheint zu etwa 5% die unverseifte Ausgangssubstanz und zu etwa 95% das Endprodukt der Reaktion (Abb.3.6.). Der Peak der entsprechenden 11-Oxo-Substanzen wurde wiederum durch Vergleich mit biologisch hergestellten Substanzen identifiziert und nach Durchlauf des Detektors aufgefangen. In Analogie zu 11-Oxo-Prednyliden (Kapitel 3.3.) konnte eine Lösung der Konzentration 10mmol/l hergestellt werden.

### 3.5. *In vitro* Versuche an transfizierten CHO-Zellen

#### 3.5.1. Inkubationsbedingungen und Passage der CHO-Zellen

Die CHO-K1 Zellen (Chinese hamster ovary cells, American Type Culture Collection ATCC, Rockville, MD, USA) wurden bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% in einem Brutschrank (*Heraeus*, Osterode) inkubiert. Die Zusammensetzung des Inkubationsmediums wird in Tabelle 3.2. zusammengefasst.

Medium	Serum	Antibiotischer Zusatz	Antimykotischer Zusatz
Ham`s F12	10 % Fetales Kälberserum	Penicillin (100IE/ml) Streptomycin (100µg/ml)	0,25µg/ml Amphotericin

**Tab.3.2.:** Zusammensetzung der Inkubationsmediums der CHO-Zellen, nach Transfektion zusätzlich Zugabe von *Geneticin*<sup>®</sup> (G418), Endkonzentration 200µg / ml (63).

Das Zellmaterial wurde in beschichteten Gewebekulturflaschen (Größe 75 cm<sup>2</sup>) inkubiert, ein Wechsel des Inkubationsmediums erfolgte alle 2-3 Tage. Bei konfluentem Wachstum wurde das Medium abgesaugt, die adhärenen Zellen mit PBS-Puffer abgespült und durch Zugabe von 1-2ml Trypsin/EDTA-Lösung und 5minütiger Inkubation im Brutschrank abgelöst. Durch Zugabe von 5ml komplettem Wachstumsmedium konnte das Trypsin inaktiviert werden. Restliche Zellverbände wurden durch kräftiges Hin- und Herspülen der Lösung suspendiert. Etwa 10–20% der Zellen wurden nach Bedarf erneut ausgesät und pro Flasche mit 15ml Inkubationsmedium überschichtet, das restliche Zellmaterial verworfen.

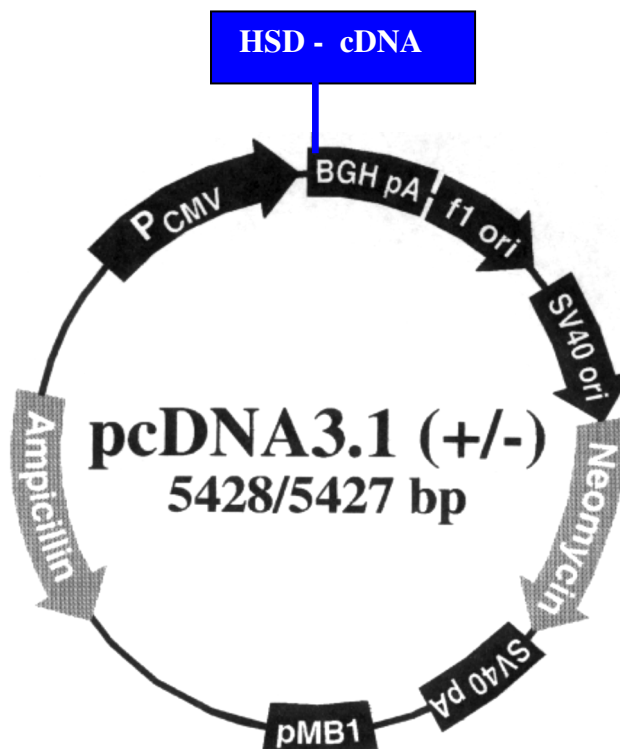
Zur Aussaat in einer bestimmten Zelldichte wurden die trypsinisierten Zellen durch Auf- und Abpipettieren mit einer Eppendorf-Pipette suspendiert und die Zelldichte mit Hilfe einer *Neubauer-Kammer* bestimmt.

### 3.5.2. Transfektionsvektor pcDNA 3.1

Für die Expressionsexperimente wurde das eukaryonte Vektorsystem pcDNA3.1 (*Invitrogen*, San Diego, USA) verwendet (Abb. 3.7., Tab. 3.3.). Die cDNA's der humanen 11 $\beta$ -HSD Isoenzyme wurden freundlicherweise von Dr. A.K. Agarwal (6) zur Verfügung gestellt. Die Einklonierung in das Vektorsystem war bereits erfolgt, Orientierung und Sequenz des Inserts anhand von Restriktionsexperimenten und Sequenzanalysen überprüft.

Gen	Funktion
<b>Cytomegalievirus (CMV) Promotor</b>	- effiziente Expression des Inserts
<i>BGH pA</i>	- Poly-A Segment für Termination/Stabilisierung der mRNA
<i>SV 40 ori</i>	- Promotor des Neomycin-Resistenz-Gens
<b>Neomycin</b>	- Neomycin (G418)-Resistenz zur eukaryonten Selektion
<b>SV 40 pA</b>	- Termination/Stabilisierung der mRNA des Resistenz Gens
<b>Ampicillin</b>	- Gen der $\beta$ -Lactamase (Selektion in <i>E. coli</i> durch Ampicillin- Resistenz)

**Tab.3.3.:** Kodierende Sequenzen des Transfektionsvektors pcDNA 3.1.



**Abb.3.7.:** Struktur des Transfektionsvektors pcDNA 3.1.

### 3.5.3. Stabile Transfektion von CHO-Zellen

Die Transfektion erfolgte nach der LipofectAMINE PLUS<sup>TM</sup>-Methode.

LipofectAMINE-Reagent besteht aus einem 3:1 Gemisch eines polykationischen Lipides und eines polyanionischen Lipides in Wasser. PLUS-Reagenz dient zum Präkomplexieren der DNA. Die Emulsion aus Wasser und Liposomen wird mit der Plasmid-DNA komplexiert und kann dann in die Zelle eindringen (61).

#### Pipettierschema für die Transfektion:

1. Aussaat von CHO-Zellen in einer 60mm Gewebekulturschale, Überschichten mit komplettem Wachstumsmedium, über Nacht konfluent wachsen lassen.
2. Am Tag der Transfektion Mischen von 2µg Plasmid-DNA mit 8µl PLUS Reagenz in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß, anschließend Zugabe von 250µl Medium (serumfrei), Inkubation für 15min bei Raumtemperatur.
3. Verdünnen von 12µl LipofectAMINE Reagenz in 250µl serumfreiem Medium in einem zweiten Eppendorf-Gefäß
4. Mischen der in Schritt 2 und 3 hergestellten Lösungen, Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur (Ausformen der DNA-Liposomenkomplexe). Währenddessen Austausch des Inkubationsmediums der Gewebekulturschale gegen 2ml frisches Medium.
5. Zugabe der in Schritt 4 hergestellten DNA-Liposomenkomplex-Lösung zum Zellmedium der Gewebekulturschale.
6. Inkubation der Zellen für 3h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Danach Zugabe von 2,5ml Wachstumsmedium mit der doppelten Menge an Serum .
7. Nach 24h Austausch des Mediums gegen komplettes Wachstumsmedium.
8. Nach weiteren 24h Zugabe des Selektionsmarker GENETICIN<sup>®</sup> (G418) in einer Konzentration von 200 µg/ml (64).

### 3.5.4. Selektion transfizierter Zellklone durch Geneticin<sup>®</sup> (G418)

Das Aminoglykosid *Geneticin<sup>®</sup>* (G418) wirkt durch Angriff an den Ribosomen und Blockade der Translation toxisch auf eukaryonte Zellen. Da der toxische Effekt auf die nicht transfizierten Zellen verzögert eintritt, wurde nach drei Wochen mit der Selektion von Zellklonen begonnen. Die Expression der Isoenzyme der 11β-HSD ließ sich in der Arbeitsgruppe durch RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion) sichern.

Im Gegensatz zu untransfizierten Zellen konnte bei den selektierten Zellklonen ein Umsatz von 11-Hydroxy- beziehungsweise 11-Oxo-Steroiden nachgewiesen werden.

### 3.5.5. Bestimmung des Umsatzes von Steroiden in transfizierten Zellen

#### Pipettierschema:

- **2,7 x 10<sup>6</sup> Zellen** werden in einer 75 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflasche ausgesät und mit **13 ml komplettem Wachstumsmedium** überschichtet
- Nach 24 Stunden Absaugen des Mediums; kurzes Spülen der Zellen mit vorgewärmter PBS-Pufferlösung, um Reste von Phenolrot zu entfernen, Überschichten mit dem vorbereitetem Inkubationsmedium (s.u.)
- Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank
- Nach Inkubation Überführen des Überstandes in ein 50 ml Falcon-Gefäß; Aufbewahrung bei -20°C bis zur Aufreinigung der Proben; Zellen werden verworfen
- Zur Probenaufreinigung Auftauen des Überstandes, Abzentrifugieren der Zelltrümmer bei 5000rpm (Haereus Cryofuge 5000, *Haereus*, Osterode), Dekantieren des Überstandes, Steroidextraktion mit Sep-Pak<sup>®</sup> C<sub>18+</sub>-Kartuschen, Analytik mittels HPLC

#### 3.5.5.1. Herstellen des substrathaltigen Inkubationsmediums

Für die Inkubationsversuche wurde phenolrotfreies Hams F12-Medium verwendet, da Phenolrot sich bei der Probenaufbereitung nicht vollständig entfernen läßt und die HPLC-Analytik behindert. Ebenso wurde auf den Zusatz von Kälberserum verzichtet, da es geringe Mengen an Cortisol und Corticosteron enthält und insgesamt den Umsatz der Steroide behinderte (Abb.3.8.).

Die Substrate wurden zunächst in einer Konzentration von 1mmol/l oder 10 mmol/l in Methanol gelöst. Direkt vor Beginn der Inkubation wurden jeweils 100µl Steroidlösung zu 100 ml Inkubationsmedium gegeben. Dadurch ließ sich eine 1µmolare beziehungsweise 10µmolare Lösung herstellen, mit der die Zellen überschichtet wurden (pro Gewebekulturflasche wurden 13ml steroidhaltiges Inkubationsmedium verwendet). Die Methanolkonzentration im Versuchsansatz betrug jeweils 0,1%.

### 3.5.6. Vorversuche zur Inkubationskinetik

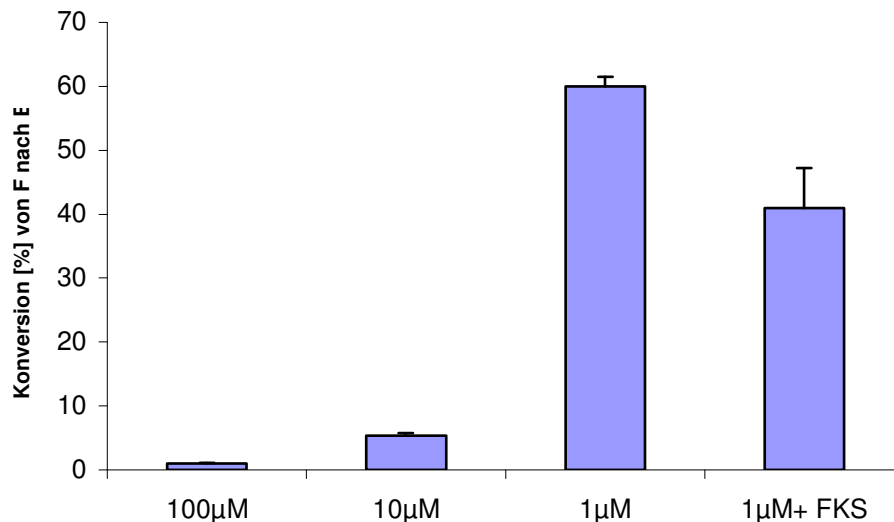
Die Untersuchungen an den transfizierten Zellen sollten im linearen Bereich der Konversionsreaktion durchgeführt werden.

Daher wurden Vorversuche mit verschiedenen Inkubationszeiten- und Steroidkonzentrationen durchgeführt. Als Referenzsubstanzen dienten Cortisol für die 11-Oxidation und Cortison für die 11-Reduktion. Von diesen beiden Substanzen sollten zu Versuchsende nur jeweils 15-30% umgesetzt sein, damit auch im direkten Vergleich mit besseren Substraten der 11 $\beta$ -HSD ein Erreichen der Sättigungskinetik vermieden wird.

Die Substratkonzentration sollte einerseits im  $V_{max}$ -Bereich der Enzymkapazität liegen, durfte andererseits jedoch nicht zu hoch sein, damit die Zeitkinetik hinreichend den Bereich der Initialgeschwindigkeit ( $=V_o$ ) definiert und quantitative Vergleiche der Reaktionen möglich sind.

#### 3.5.6.1. Vorversuche zur 11-Oxidation durch die 11 $\beta$ -HSD2

Die Ergebnisse der Vorversuche zur Oxidation durch die 11 $\beta$ -HSD2 sind in Abb.3.8. dargestellt. Bei einer Substratkonzentration von 1 $\mu$ mol/l konnte nach 24 stündiger Inkubation ein Umsatz von  $60 \pm 1,5\%$  erzielt werden.



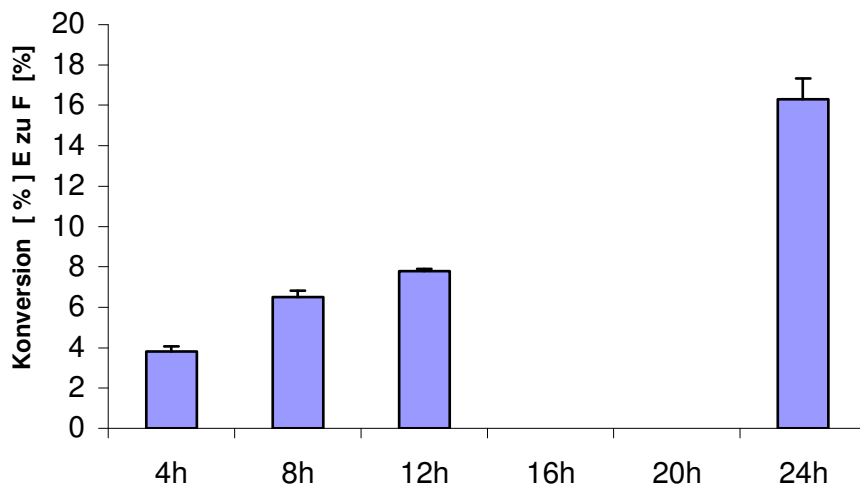
**Abb.3.8.:** HSD2 abhängige Konversion von Cortisol (F) zu Cortison (E) in stabil transfizierten CHO-Zellen bei verschiedenen Konzentrationen von F, Inkubationszeit 24h; 2,7Mio Zellen/Flasche, 13ml Inkubationsmedium, Inkubationszeit 24h. Mittelwerte  $\pm$  SEM von je 3 Proben. FKS = Fetales Kälberserum (10% Volumenanteil).

Da die Konversion einer Sättigungskinetik unterliegt und eine Endprodukthemmung auftritt, wurden analog zu obigen Überlegungen folgende Inkubationsbedingungen für die 11 $\beta$ -Oxidation durch die mit der 11 $\beta$ -HSD2 transfizierten Zellen gewählt, um im linearen Bereich der Konversionsreaktion arbeiten zu können:

1. Substratkonzentration 1 $\mu$ mol/l
2. Inkubationszeit 12h
3.  $2,7 \times 10^6$  Zellen/Ansatz, 13ml Inkubationsmedium ohne Kälberserum und Phenolrot

### 3.5.6.2. Vorversuche zur 11-Reduktion durch die 11 $\beta$ -HSD1

Da der  $K_m$ -Wert der 11 $\beta$ -HSD1 verglichen mit dem der 11 $\beta$ -HSD2 etwa eine Zehnerpotenz höher liegt, wurde die Inkubationskinetik mit einer Substratkonzentration von 10 $\mu$ mol/l erstellt (Abb.3.9.).



**Abb.3.9.:** HSD1 abhängige Konversion von E zu F in stabil transfizierten CHO-Zellen; Mittelwerte +/- SEM von je 3 Proben;  $2,7 \times 10^6$  Zellen/Flasche, 13ml Inkubationsmedium, Substratkonzentration 10 $\mu$ mol/l, Inkubationszeiten von 4h-24h.

Nach 24 Stunden wurde ein Umsatz von  $16,3 \pm 1,03$  % erzielt.

Für alle weiteren Versuche zur 11 $\beta$ -HSD1 abhängigen Reduktion wurden daher folgende Versuchsbedingungen gewählt:

1. Substratkonzentration 10 $\mu$ mol/l
2. Inkubationszeit 24h
4.  $2,7 \times 10^6$  Zellen/Ansatz, 13ml Inkubationsmedium ohne Kälberserum und Phenolrot.

Durch die Wahl der Versuchsbedingungen für die Inkubationsversuche wird davon ausgegangen, dass jeweils im linearen Bereich der Reaktion gearbeitet wird. Die Darstellung aller weiteren Ergebnisse soll daher als  $V_0$  - Berechnung in  $\text{pmol}/10^6 \text{ Zellen} \times \text{h}^{-1}$  erfolgen. Die Berechnung der  $V_0$ -Initialgeschwindigkeit aus den bei den Inkubationen erzielten Umsätzen wird in Tabelle 3.4. verdeutlicht.

	<b>HSD1-Reduktion</b>	<b>HSD2-Oxidation</b>
<b>Substratkonzentration</b>	10 $\mu\text{mol/l}$	1 $\mu\text{mol/l}$
<b>Substrat in 13ml Medium</b>	130nmol	13nmol
<b>Inkubationszeit</b>	24h	12h
<b>Versuchsaufbau</b>	2,7 x 10 <sup>6</sup> Zellen/Flasche, 13 ml Hams F12 , (-)Phenolrot, (-)FKS, 0,1% Methanol	
<b>Berechnung <math>V_0</math> bei 1% Umsatz</b>	0,01(1%) x 130nmol / 2,7 x 10 <sup>6</sup> Zellen x 24h <sup>-1</sup>	0,01(1%) x 13nmol / 2,7 x 10 <sup>6</sup> Zellen x 12h <sup>-1</sup>
<b><math>V_0</math> (bei 1% Umsatz)</b>	<b>20,06pmol/ 10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup></b>	<b>4,01pmol/ 10<sup>6</sup>Zellen x h<sup>-1</sup></b>

**Tabelle 3.4.:** Zusammenfassung der Versuchsbedingungen für die Inkubationsversuche an mit 11 $\beta$ -HSD1- und 11 $\beta$ -HSD2 transfizierten CHO-Zellen sowie Berechnung der  $V_0$ -Geschwindigkeit.

### 3.6. Probandenversuche

#### 3.6.1. *In vivo* Versuche zur Induktion der 11 $\beta$ -HSD1 durch Glucocorticoide

In verschiedenen *in vitro* - Studien konnte eine Steigerung der 11 $\beta$ -HSD Aktivität durch Glucocorticoide beobachtet werden (33;88;90). An gesunden männlichen Probanden soll untersucht werden, ob sich dieser Effekt auch beim Menschen nach sechstägiger oraler Gabe von je 30mg Prednisolon pro Tag erzielen läßt. Zur Bestimmung der 11 $\beta$ -HSD1-Aktivität dient die Messung des Quotienten F/E im Plasma nach oraler Gabe von Cortisonacetat. Eine Zunahme des Quotienten repräsentiert dabei eine Zunahme der Aktivität der 11 $\beta$ -HSD1. Die Aktivität der 11 $\beta$ -HSD2 soll durch den Quotienten F/E im Urin bestimmt werden. Hierbei würde eine Abnahme dieses Quotienten mit einer Zunahme der renalen 11 $\beta$ -HSD2-Enzymaktivität korrelieren. Am Versuchstag „11 $\beta$ -HSD-basal“ wird die Produktion körpereigener Glucocorticoide durch vorherige Einnahme von Dexamethason supprimiert. Am Versuchstag „11 $\beta$ -HSD unter Prednisolon“ wird anstelle des Prednisolons die Äquivalenzdosis von 5mg Dexamethason eingenommen, da Prednisolon die Analytik von E und F behindert.

#### Studienprotokoll:

Probanden: 7 gesunde Männer

Versuchsplan: 2 Versuchstage: Tag 1 zur Bestimmung der basalen 11 $\beta$ -HSD1-Aktivität, Tag 7 „11 $\beta$ -HSD unter Prednisolon“

<b>Tag 1</b> „HSD-basal“	0.00 Uhr - Einnahme von 1mg Dexamethason 6.00 Uhr - Einnahme von 0,5mg Dexamethason 8.00 Uhr - Einnahme von 25mg Cortisonacetat 8.00 Uhr - 15.00 Uhr – stündlich Blutabnahmen und Urinsammlung
<b>Tage 2–6</b>	8.00 Uhr - jeweils Einnahme von 30mg Prednisolon
<b>Tag 7</b> „HSD unter Prednisolon“	- Ablauf wie Tag 1, statt 30mg Prednisolon wird um 8.00 Uhr die Äquivalenzdosis an Dexamethason (5mg) eingenommen (s.o.)

**Tab.3.5.:** Versuchsprotokoll zur Induktion der 11 $\beta$ -HSD1.

Die Analytik der Steroide in Serum und Urin wurde von Herrn Prof. Dr. Dr. Schöneshöfer, Abteilung für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Krankenhaus Berlin Spandau, vorgenommen. Bei dem dabei verwendeten vollautomatischen HPLC-System kann



auf eine aufwendige Vorreinigung der Proben mit Sep-Pak<sup>®</sup>-Kartuschen verzichtet werden (146). Es wurde jeweils die „area under the curve“ der bei der chromatographischen Detektion entstandenen Peaks bestimmt. Die Serum- und Urinkonzentrationen der Steroide wurden aus dem Vergleich der Peakflächen mit der „area under the curve“ einer Standardlösung der Konzentration 100ng/ml berechnet.

### 3.6.2. Pharmakokinetik von Cortisol und Dexamethason *in vivo*

Durch Untersuchungen an gesunden Probanden soll überprüft werden, ob die *in vitro* verminderte Oxidaseaktivität von 11 $\beta$ -HSD1 und 11 $\beta$ -HSD2 gegenüber Dexamethason auch *in vivo* eine Rolle spielt. Nach Einnahme von 10mg Dexamethason oder 10mg Cortisol werden jeweils Serum- und Urinproben gewonnen. Als Maß für die Aktivitäten von 11 $\beta$ -HSD1 und 11 $\beta$ -HSD2 dienen die Quotienten aus 11-Hydroxy- und 11-Oxoform der Steroide in Serum und Urin. Da hier Dexamethason selbst getestet wird, muss die Suppression der endogenen Steroide mit Betamethason erfolgen, welches sich in der HPLC sauber von Dexamethason trennen lässt.

#### Studienprotokoll:

Probanden: 5 gesunde Männer

Versuchsplan: Jeweils 1 Versuchstag für Cortisol und einer für Dexamethason im Abstand von mindestens 4 Tagen.

<b>Suppression endogener Steroide</b>	0.00 Uhr - Einnahme von 1mg Betamethason 6.00 Uhr - Einnahme von 0,5 mg Betamethason
<b>Einnahme der Versuchssubstanz</b>	8.00 Uhr - Einnahme von 10 mg Cortisol bzw. 10 mg Dexamethason
<b>Gewinnung von Serum/Urin</b>	8.00 Uhr - Gewinnung von Serum und Urin vor Einnahme der Versuchssubstanz <b>Blutentnahmen:</b> bis 13.00 Uhr jeweils halbstündlich, danach stündlich bis 16.00 Uhr <b>Sammeluriningewinnung:</b> bis 16.00 Uhr stündlich, danach um 19.00 Uhr und um 21.00 Uhr

**Tab.3.6.:** Versuchsprotokoll zur Pharmakokinetik von Dexamethason versus Cortisol.

Die Bestimmung der Konzentrationen der 11-Hydroxy- und 11-Oxosteroide erfolgte wiederum in Kooperation mit Prof. Schöneshöfer, Krankenhaus Spandau.

### 3.6.3. Selektive Hemmung der 11 $\beta$ -HSD1 durch Chenodesoxycholsäure

Der *in vitro* nachweisbare Hemmeffekt von Chenodesoxycholsäure auf die Aktivität der 11 $\beta$ -HSD1 soll durch *in vivo*-Daten überprüft werden. Es soll geprüft werden, ob die simultane Einnahme von Chenodesoxycholsäure die Reduktion von oral gegebenem Cortisonazetat signifikant vermindert. Als Maß für die HSD-Aktivität dienen wiederum die Quotienten aus Cortisol/Cortison im Serum (11 $\beta$ -HSD1) und Urin (11 $\beta$ -HSD2). Gleichzeitig soll die Pharmakokinetik von 12,5mg Cortisonazetat im Vergleich zur Äquivalenzdosis an Cortisol ( $\cong$ 10mg) verglichen werden (s.a. Kapitel 3.6.2.).

#### Studienprotokoll:

Probanden: 5 gesunde Männer

Versuchsplan: 2 Versuchstage: Tag 1 zur Bestimmung der basalen 11 $\beta$ -HSD1-Aktivität,  
Tag 2: „HSD1 unter Chenodesoxycholsäure“

<b>Suppression endogener Steroide</b>	0.00 Uhr - Einnahme von 1mg Betamethason 6.00 Uhr - Einnahme von 0,5mg Betamethason
<b>Einnahme der Versuchssubstanz</b>	8.00 Uhr - Einnahme von 12,5mg Cortisonazetat
<b>Gewinnung von Serum/Urin</b>	- Blutentnahmen sowie Urinsammlung analog den Versuchen zur Pharmakokinetik von Cortisol und Dexamethason (Tab. 3.6.)

**Tab.3.7.:** Versuchsprotokoll zur selektiven Inhibierung der 11 $\beta$ -HSD1 durch Chenodesoxycholsäure (Tag 1).

Zur Hemmung der 11 $\beta$ -HSD1 nehmen die Probanden zusätzlich am Tag 2 jeweils 500 mg Chenodesoxycholsäure um 6.30 Uhr, 7.30 Uhr, 8.30 Uhr, 9.30 Uhr und 10.30 Uhr ein.

Analoge Bestimmung von Cortisol und Cortison in Plasma und Urin in Kooperation mit Prof. Schöneshöfer, Krankenhaus Spandau.

### 3.7. Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit einem MS-Excel 2000 Programm von *Microsoft* (Microsoft Corporation, USA) durchgeführt, mit dessen Hilfe auch die Grafiken erstellt wurden. Für die Versuche zur Induktion der 11 $\beta$ -HSD1 wurde der Zwei-Stichproben t-Test für paarige Stichproben verwendet. Die Auswertung aller anderen Daten erfolgte mit dem Zwei-Stichproben-t-Test für unverbundene Stichproben.