

3. Material

3.1. Material, Chemikalien und Geräte

3.1.1. Geräte und Reagenzien zur Mikrosomenherstellung

- § pH-Meter 761 Calimatic von Knick
- § Ultra-Turrax TP18\10 von Janke & Kunkel GmbH (Ika-Werke, Staufen)
- § Potter S von B. Braun
- § Falcon-Zentrifugenröhrchen 50 ml (Becton Dickinson, Heidelberg)
- § Sorvall[®]-Zentrifuge RC5C mit Rotor SA von 600 von DuPont
- § Ultrazentrifuge L855 mit Rotor 60 Ti von Beckmann
- § Feinwaage der Sartorius Werke Ag (Göttingen)
- § Dinatrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) von Merck Ltd. (Darmstadt) und Sucrose von Sigma Chemical Co. (St. Louis M.O. USA) zur Pufferherstellung

3.1.2. Geräte und Reagenzien zur Proteinbestimmung

- § Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, Kupfersulfat (CuSO_4), Natriumcarbonat (Na_2CO_3), Natriumtartrat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}_2$), Natriumhydroxyd (NaOH) von Merck (Darmstadt)
- § Rinderserumalbumin als Proteinstandard von Behring AG (Marburg).
- § Multidish[®] 24-Loch-Schalen (Nunclon)
- § Spectro-Photometer Uvikon 930 von Kontron Instruments (Neufahrn)

3.1.3. Geräte und Reagenzien zur Synthese von 11-Dehydrosteroiden

- § Hexan (C_6H_{14}), Isopropanol ($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$), Ethylacetat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) Methanol (CH_3OH), Schwefelsäure (H_2SO_4), Dichlormethan (CHCl_2) Aceton (CH_3COCH_3)
- § Kaliumhydroxid (KOH) Chrom(VI)Oxid, alle Merck Ltd. (Darmstadt); pro chromatographia Kieselgel 60 F₂₅₄ Dünnschichtchromatographie-Platten (20 x 20 cm mit Konzentrierungszone) Merck Ltd. (Darmstadt), Schutzgas N_2 (Fa. Linde)

3.1.4. Geräte und Reagenzien zur Inkubation und Probenaufreinigung

- § Multidish® 24-Loch-Schalen (Nunc), Dinatrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Ethylacetat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) Methanol (CH_3OH) (alle Merck)
- § NAD, NADH, NADP, NADPH (alle Sigma, St. Louis)

3.1.5. Geräte und Reagenzien zur HPLC-Analytik

- § Säule: 250x4,0 mm LiChrosorb-Diol-normal-phase-HPLC-Säule (Partikelgröße 5 μm) von VDS-Optilab (Berlin)
- § Vorsäule: Normal-phase Vorsäule LiChrosorb-Diol (Partikelgröße 5 μm) (Fa. Knauer, Berlin)
- § Fließmittel-Entgasungsgerät: Degasys DG 1200 von Uniflows Co. Ltd. (Tokyo, Japan)
- § Pumpe: Solvent delivery system 6000 A von Waters Millipore (Milford, MA, USA)
- § Probenaufgeber: Sample processor WISP 710 A von Waters Millipore (Milford, MA, USA)
- § Fließmittel-Mischregler: CIM und CSI (Sampling)
- § UV-Messgerät (Bischoff Lambda 1000) von Bischoff GmbH (Leonberg)
- § Hexan (C_6H_{14}), Isopropanol ($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$) Merck Ltd. (Darmstadt)

3.1.6. Steroide

- § Cortisol, Prednisolon (Δ^1 -dehydro-Cortisol), 9- α -fluoro-Cortisol, Dexamethason (9- α -fluoro-16- α -methyl-Prednisolon), Dexamethason-17,21-Diacetat, Betamethason (9- α -fluoro-16- β -methyl-Prednisolon), Betamethason-17,21-Diacetat von Sigma (St. Louis, USA)
- § Isoflupredon (9- α -fluoro-Prednisolon), Isoflupredon-17,21-Diacetat, Flumethason (6,9- α -fluoro-16- α -methyl-Prednisolon), Flumethason-17,21-Diacetat, Desoxymethason (21-desoxi-Dexamethason) von Paesel und Lorei (Hanau)
- § Fluocortolon (17-desoxi-6- α -fluoro-16- α -methyl-Prednisolon), Fluocortolon-21-Acetat
- § Diflucortolon (17-desoxi-Flumethason), Diflucortolon-21-Acetat, 6- α -methyl-Prednisolon, 16- α -methyl-Prednisolon, 16- β -methyl-Prednisolon, 6- α -fluoro-Cortisol von Schering (Berlin)
- § Cortison, Prednison (Δ^1 -dehydro-Cortison) von Sigma (St. Louis)

§ 6- α -methyl-Prednison, 16- α -methyl-Prednison, 16- β -methyl-Prednison, 11-DH-Desoxymethason, 6- α -fluoro-Cortison, 9- α -fluoro-Cortison von Schering (Berlin) als Geschenk erhalten

3.1.7. Humane Gewebe

Humanes Nierenrindengewebe stammt von Patienten, die wegen eines Nierenzellkarzinoms in der urologischen Abteilung der Charité, Campus Benjamin Franklin, nephrektomiert wurden (insgesamt 3 weibliche und 3 männliche Patienten zwischen 47 und 81 Jahren). Die Resektate wurden unverzüglich in eiskalter Ringerlösung gekühlt und durch den Pathologen begutachtet. Für den Pathologen entbehrliche Anteile des gesunden Resektionsrandes im Nierenrindenbereich wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Humanes Lebergewebe stammt von 15 Patienten zwischen 25 und 82 Jahren (9 Männer und 6 Frauen), die wegen eines hepatozellulären Karzinoms oder wegen Kolonkarzinommetastasen eine Leberteileresektion in der chirurgischen Abteilung der Charité, Campus Rudolf Virchow, erhielten. Makroskopisch gesunde Anteile der Resektate wurden hierbei sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

4. Methoden

4.1. Mikrosomen

4.1.1. Mikrosomenpräparation

Mikrosomen sind unter definierten Zentrifugationsbedingungen gewonnene Bestandteile eines Gewebehomogenisats. Wir verwendeten die Methode nach *Lakshmi* und *Monder*, für die eine Konzentration der zellulären 11- β -HSD im Mikrosomenpellet beschrieben ist [50, 51].

Die folgenden Arbeitsschritte gelten für Leber- und Nierengewebe und werden unter ständiger Eiskühlung durchgeführt:

- § Grobes Vorzerkleinern der Gewebestücke mit dem Skalpell in Portionen zu ca. 3 g
- § Aufnehmen in jeweils 12 ml Homogenisationspuffer
(0,25 Mol/l Sucrose in 0,01 Mol/l Phosphatpuffer ad pH 7,4)
- § Überführen in ein Pottergefäß und Zerkleinern mittels Ultra-Turrax®
- § Homogenisation im Potter. Zusammenführen der Homogenate zu einem Pool.
- § Zentrifugieren in der Varifuge® bei 750 g für 30 min
- § Weiterverarbeiten des Überstands in der Sorvall®-Zentrifuge bei 20000 g für 30 min
- § Abnehmen des Überstandes in Ultrazentrifugenröhrchen und Ultrazentrifugation bei 105000 g für 60 min
- § Resuspension des Bodensatzes in 2 ml Homogenisationspuffer und abermalige Ultrazentrifugation bei 105000 g für 60 min
- § Das so erhaltene Mikrosomenpellet wird nun in sucrosefreiem Phosphatpuffer (0,1 molar, pH 7,4) aufgenommen, homogenisiert und in 200 μ l-Portionen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

4.1.2. Proteinkonzentration im Mikrosomenpräparat

Um eine konstante Proteinkonzentration zu gewährleisten, wird vor jeder Inkubation eine Proteinbestimmung der jeweils entnommenen und gepoolten Mikrosomenportionen durchgeführt. Danach wird die für die Inkubation gewünschte Proteinkonzentration durch Verdünnung mit 0,1 molarem Phosphatpuffer pH 6,0 (für die Reduktion) oder pH 8,5 (für die Oxidation) eingestellt. Wir verwendeten die Methode nach *Lowry et al.* [52].

Es wird jeweils eine Standardmessreihe mit Rinderalbumin als Referenz angelegt. Wir benutzen Lösungen mit 10, 25 und 50 mg/100 ml. Die Proteinkonzentration der Nierenrindenmikrosomen lag zwischen 12-15 mg/ml, die der Lebermikrosomen zwischen 50-55 mg/ml. Es werden daher bei den Nierenrindenmikrosomen Verdünnungsreihen von 1:40, 1:80 und 1:160; bei den Lebermikrosomen von 1:125, 1:250 und 1:500 angelegt und jeweils als Doppelbestimmung gegen die Albuminstandardlösungen vermessen. Die Messergebnisse der Standardlösung werden mit Hilfe einer Excel®-Tabelle als Bestgerade dargestellt und hieraus die Proteinkonzentration ermittelt.

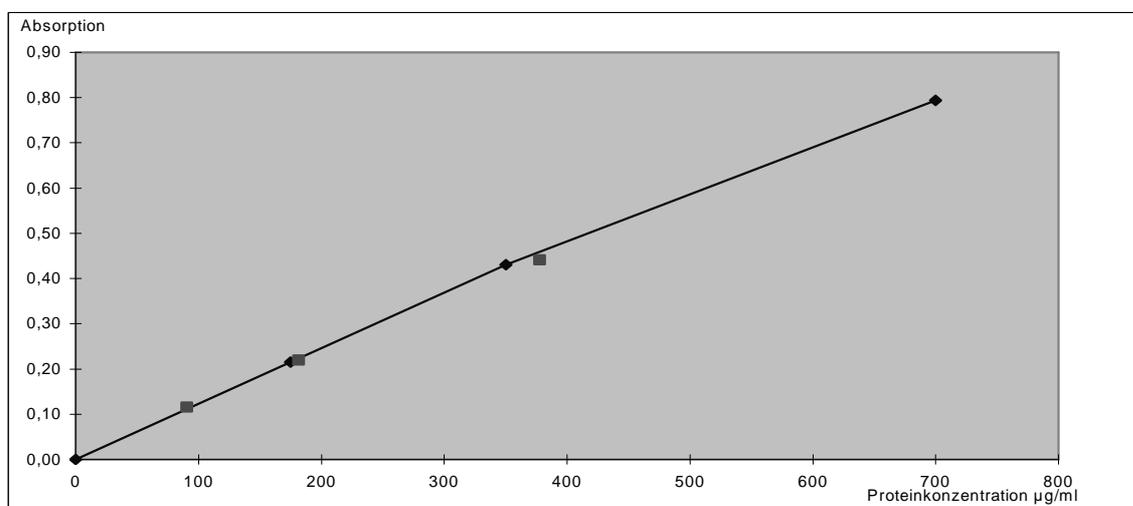


Abbildung 9: Grafische Ermittlung der Proteinkonzentration, Methode nach *Lowry*

Gebrauchslösung zur Proteinbestimmung (jeweils frisch herzustellen):

- 0,5 ml 1% CuSO₄ Lösung
- 0,5 ml 2% C₄H₄O₆Na₂ Lösung
- 49 ml 2% Na₂CO₃ Lösung

Pipettierschema			
100 µl	Standardlösung	100 µl	Mikrosomenverdünnung
900 µl	0,9 % NaCl Lösung	900 µl	0,9 % NaCl Lösung
+ 5 ml	Gebrauchslösung (mischen auf Vortex, 10 Minuten stehen lassen)		
+ 0,5 ml	Folin-Ciocalteus-Reagenz 1:1 (mischen auf Vortex, 30 Minuten stehen lassen)		
→ bei 750 nm im Photometer vermessen			

Tabelle 2: Pipettierschema zur Bestimmung der Proteinkonzentration

4.2. Synthese von 11-Dehydrosteroiden

4.2.1. Grundlagen

Nur wenige pharmakologisch eingesetzte Glukokortikoide sind kommerziell in der 11-Dehydroform erhältlich (Cortison, Prednison); andere wurden uns von der Firma Schering in Berlin freundlicherweise zur Verfügung gestellt (6- α -methyl-Prednison, 16- α -methyl-Prednison, 16- β -methyl-Prednison, 11-DH-Desoxymethason, 6- α -fluoro-Cortison, 9- α -fluoro-Cortison).

Die einfache Oxidation der 11-hydroxy-Substanz mit wässriger Lösung von Chrom(VI)Oxid nach *Gaignage et al.* führte in unserer Arbeitsgruppe zu unvollständigem Umsatz und zu Verunreinigungen [53]. Da bisher nur kleine Mengen radioaktiv markiertes 11-DH-Dexamethason zu synthetisieren waren, konnte die Substanz mittels HPLC aufgereinigt werden [54]. Da für die vorliegende Arbeit keine radioaktiv markierten Tracersubstanzen zur Verfügung stehen und die HPLC-Analytik durch UV-Resorptionsspektrometrie erfolgen soll, müssen größere Substanzmengen erzeugt werden, die sich auch zur Konzentrationseinstellung mittels Einwaage eignen.

Die Hauptverunreinigung erwies sich im Vorversuch als 21-dehydro-Dexamethason, was sich dadurch erklärt, dass die OH-Gruppe an Position 21 (und, in geringerem Ausmaß, die OH-Gruppe an Position 17 bei den Cortisolderivaten) der oxidierenden Wirkung des Jones-Reagenz in gleicher Weise ausgesetzt ist wie die OH-Gruppe an Position 11. Wir beschlossen daher, die zur Synthese der 11-Dehydrosubstanzen bestimmten Steroide als Essigsäureester zu erwerben (21-Acetat bei den Corticosteronderivaten, 17,21-Diacetat bei den Cortisolderivaten) und in dieser Form zu oxidieren. Die Essigsäurereste schützen die Hydroxylgruppen vor Oxidation und werden anschließend durch Verseifung mit NaOH entfernt.

4.2.2. Oxidation mit Jones-Reagenz

- § 50 mg Steroidacetat in 25 ml Aceton im Wasserbad bei 40°C lösen
- § 30 mg CrO₃ in 1 ml einmolarer H₂SO₄ gelöst – langsam zutropfen
- § für 35 min weiterrühren
- § Abstoppen der Oxidation durch Zugabe von 10 ml CH₃OH
- § Verblasen der Lösungsmittel unter N₂ – Schutzgasatmosphäre
- § Rückstand in 25 ml CHCl₂ aufnehmen
- § In Scheidetrichter 2x mit Aqua bidest waschen

4.2.3. Verseifung der 11-Dehydrosteroidacetate

- § Steroidacetat in CHCl_2 unter N_2 im Eisbad mit 1 ml CH_3OH versetzen
- § 1 ml einmolare NaOH-Lösung zugeben
- § Nach 15 min mit N_2 auf 5ml einengen
- § In 50 ml eiskaltes Aqua bidest ausfällen und durch Filter saugen
- § Trocknen und einwiegen

Anleitung modifiziert nach *Laurent und Zehntel* Schering AG, Berlin

4.2.4. Identitäts- und Reinheitskontrolle

Die Qualitätskontrolle der 11-Dehydrosteroidsynthese basiert auf vier Methoden:

Stichprobenhafte dünnschichtchromatographische Fortschrittskontrolle der Oxidation und der Verseifung:

- DC-Kontrolle von alle 5 min entnommenen Stichproben
- § Auftragen von 50 μl auf eine Kieselgel 60 F₂₅₄ DC Platte
- § Entwickeln in Fließmittel (75 ml CHCl_2 und 25 ml CH_3OH)
- § Detektion unter UV-Licht bei 256 nm

Hier fanden sich häufig während der Verseifungsreaktion polare Nebenflecken, die aber nach dem Ausfällen in Aqua bidest nicht mehr nachweisbar waren.

Die Substanz 11-DH-Dexamethason wurde im Institut für klinische Pharmakologie der FU Berlin mittels HPLC-MS auf ihre Identität geprüft, die Substanz 11-DH-Diflucortolon wurde bei Schering AG, Berlin, mittels Nuklearmagnetresonanz untersucht. In beiden Fällen konnte die Identität bestätigt werden.

Im weiteren Verlauf verglichen wir die synthetisierten 11-Dehydrosbstanzen mittels HPLC mit den durch die mikrosomale 11- β -HSD oxidierten Substanzen.

Als weiteren Hinweis auf die Identität der synthetisierten Substanzen betrachteten wir ihre Reduzierbarkeit durch mikrosomale 11- β -HSD zu bekannten 11-hydroxy-Steroiden.

4.2.5. Lagerung und Einwaage

Alle erworbenen und selbst hergestellten Steroide wurden im Trockenschrank getrocknet und entsprechend ihres errechneten Molekulargewichts mit der Feinwaage als 10^{-3} molare Stammlösung in 10 ml CH_3OH eingewogen und im Gefrierschrank bei -40°C aufbewahrt.

Das Molekulargewicht der 11-hydroxy-Steroide wurde dem *Merck Index* entnommen; das Gewicht des korrespondierenden 11-Dehydrosteroids wurde mit 2 g/mol geringer angenommen. Die Molekulargewichte liegen zwischen 358,47 g/l (Prednison) und 400,47 g/l (Flumethason).

Für die Enzyminkubationen wurden Gebrauchslösungen von 10^{-4} mol/l (für die Lebermikrosomen) bzw. 10^{-5} mol/l (für die Nierenmikrosomen) in Phosphatpuffer (pH 8,5 für die 11-Hydroxy-Steroide, pH 6,0 für die 11-Dehydrosteroiden) jeweils frisch zubereitet.

4.3. Bestimmung der 11- β -HSD Aktivität

4.3.1. Grundlagen

Außer Cortisol/Cortison und Dexamethason/11-DH-Dexamethason lag keines der untersuchten Steroidpaare als radioaktiv markierte Tracersubstanz vor. Für die verwendete HPLC-Analytik mit UV-Detektion liegt die Nachweisgrenze für Cortisol, Dexamethason und 9- α -Fluorocortisol bei 10 nMol/l [48] und damit deutlich unterhalb der K_m -Werte der 11- β -HSD1 [55, 56] und etwas unterhalb jener der 11- β -HSD 2 [57] für die genannten Leitsubstanzen.

Wir führten daher Bestimmungen der Initialgeschwindigkeiten (V_0) durch. Bei der Wahl der Substratkonzentration orientierten wir uns an den V_{max} -Werten der 11- β -HSD für die Konversion von Cortisol/Cortison für die nicht halogenierten Substanzen und von Dexamethason/11-DH-Dexamethason für die halogenierten Substanzen. Die Enzyminkubationen fanden unter pH-Optimierung und Kosubstratüberschuss statt [54].

4.3.2. Enzyminkubationen

Alle Enzyminkubationen wurden in Nunclon® 24-Loch-Platten im auf 37°C vorbeheizten, bewegten Wasserbad durchgeführt. Das Inkubationsvolumen betrug stets 1 ml, die Kosubstratkonzentration 1 mMol/l. Als Reaktionsmedium diente 0,1 molarer Phosphatpuffer, titriert auf einen pH-Wert von 6,0 für die Reduktionsreaktion und 8,5 für die Oxidationsreaktion.

Pipettierschema:

- § 100 μ l vorverdünntes Substrat
- § 100 μ l 10^{-2} molares Kosubstrat
- § 100 μ l vorverdünnte Mikrosomen
- § 700 μ l Inkubationspuffer

Diese Bedingungen wurden stets beibehalten. Es variierten folglich: Art und Konzentration des Substrats, Art und Konzentration der Mikrosomen, Art (aber nicht Konzentration) des Kosubstrats, Inkubationsdauer und pH-Wert des Puffers.

Die höher konzentrierte Gebrauchslösung enthält 10% Methanol, so dass im Inkubationsansatz eine effektive Methanolkonzentration von 1% vorliegt. Diese behindert die Aktivität der 11- β -HSD nicht [36].

Alle Komponenten außer den Mikrosomen wurden für 10 min im Wasserbad vorinkubiert, die Inkubationszeit wurde nach Zugabe der Mikrosomen berechnet. Die Reaktion wurde gestoppt, indem der Inhalt der einzelnen wells in vorbereitete Röhren mit jeweils 1200 μ l eiskaltem C₄H₈O₂ (Ethylacetat) abpipettiert und im Vortex gemischt wurde.

4.3.3. Extraktion der Steroide mit Ethylacetat

Nach dem Trennen der Phasen wurden 1000 μ l des polaren Überstands in neue Röhren dekantiert und mit Druckluft verblasen. Die Röhren mit dem getrockneten Rückstand wurden verschlossen und bei -40°C bis zur Analytik gelagert.

Die Wiederfindungsraten der 11-Hydroxy- und der 11-Dehydrosbstanzten unterscheiden sich nicht signifikant. Die folgenden Vorversuche nach *Hanke* wurden mit 3 ml Ethylacetat durchgeführt (n=5), allerdings wurde versucht, die gesamte organische Phase abzunehmen. Hierdurch erklärt sich die Schwankung. Beim absichtlichen Zurücklassen von 200 μ l verringert sich zwar die Wiederfindung um ein Sechstel, bleibt aber konstanter.

Steroid	Wiederfindungsrate (%)
Cortisol	89,1 \pm 7,4
Cortison	85,8 \pm 4,5
Dexamethason	84,3 \pm 6,1
11-DH-Dexamethason	86,4 \pm 4,4

Tabelle 3: Wiederfindungsraten der Referenzsubstanzen nach Schüttelextraktion mit Ethylacetat (n=5).

Die Wiederfindungsraten mit dem sehr viel teureren Sep-Pak® Kartuschensystem liegen bei 77-80% [58].

4.3.4. HPLC-Analytik

Die Analyse des Steroidumsatzes erfolgte mit Hilfe einer normal-phase HPLC mit apolarer stationärer Phase.

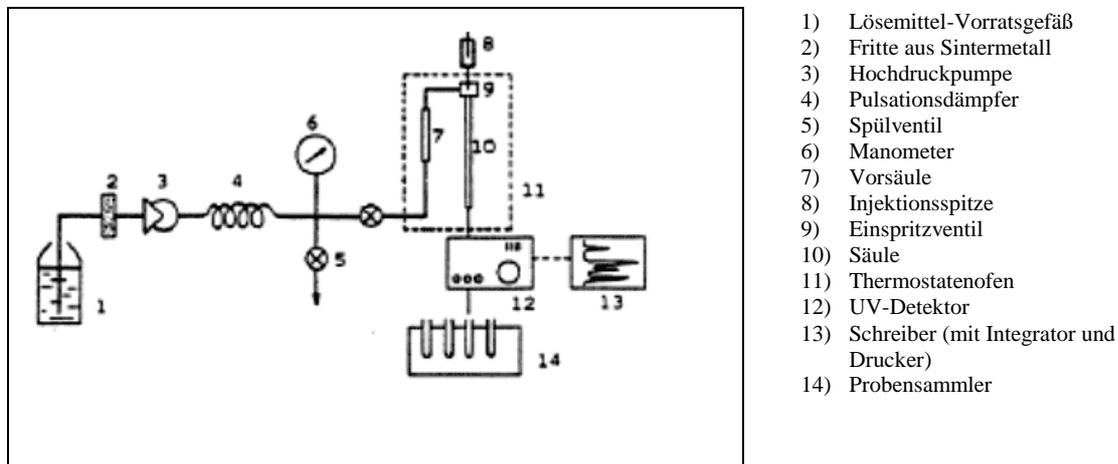


Abbildung 10: Schematischer Aufbau einer *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC)-Anlage.

Als Fließmittel (polare mobile Phase) diente ein Hexan (C_6H_{14}) / Isopropanol (C_3H_7OH) Gemisch im Verhältnis 80/20 oder 90/10.

Die Flussrate betrug 1,3 ml/min.

Die stationäre Phase wurde mit Hilfe des Säulenofens auf 40°C temperiert.

Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Die zu vermessenden Proben wurden aus dem Kühlschrank genommen mit jeweils 100 µl Fließmittel versetzt und kurz im Vortex vermischt. Dann wurde jede Probe in ein Waters-WISP® Röhrchen pipettiert und mit einem durchstechbaren PTFE-Deckel verschlossen. Die Probengefäße wurden dann in die Revolvertrommel des WISP-Probenaufgebers einsortiert und die Analyse begonnen.

Die Retentionszeiten lagen zwischen 6 min (Cortison) und 22 min (Diflucortolon).

Zur Vermeidung von Verfälschungen durch retinierte Metaboliten wurden Probelaufzeiten von 30 min eingehalten.

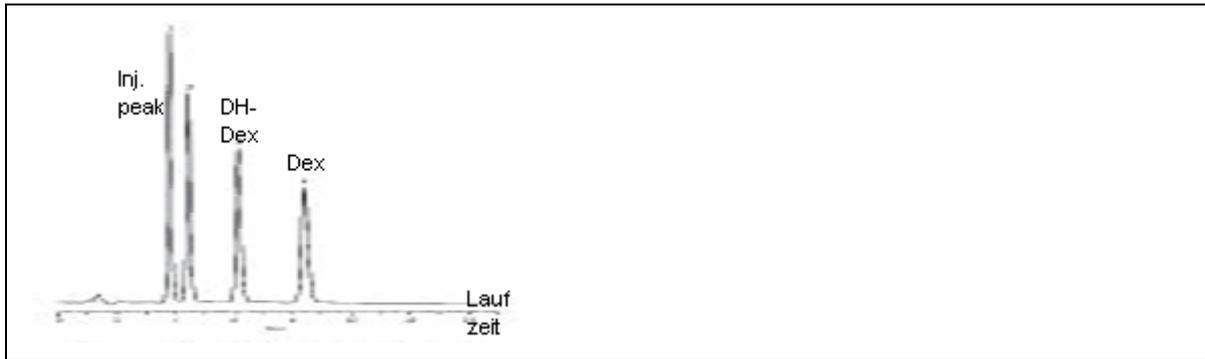


Abbildung 11: HPLC-Chromatogramm von Dexamethason und 11-DH-Dexamethason

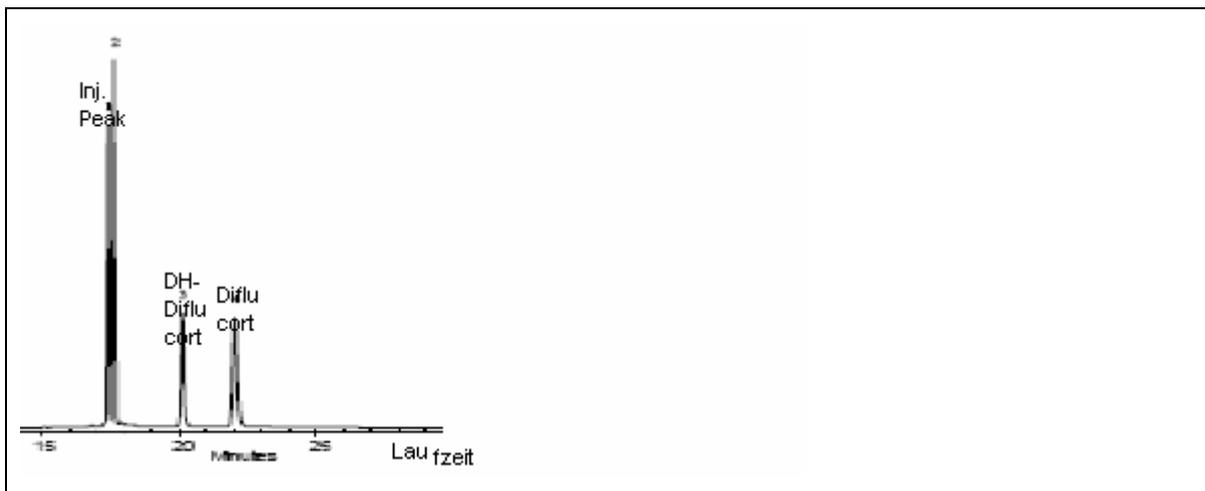


Abbildung 12: HPLC-Chromatogramm von Diflucortolon und 11-DH-Diflucortolon

Der Flächeninhalt unter dem Peak wurde als AUC durch den angeschlossenen PC berechnet.

Die AUC-Werte von Eduktpeak und Produktpeak wurden addiert und der Umsatz in Prozent errechnet.

4.3.5. Berechnung der Initialgeschwindigkeit V_0

Die gemessenen Umsätze wurden in ein Excel®-Datenblatt eingetragen und Initialgeschwindigkeit V_0 , Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Anhand einer graphischen Darstellung wurde die lineare Regression abgeschätzt. Bei deutlichem Abknicken der Kurve wurde die Inkubation mit der Hälfte der Inkubationszeit wiederholt.

Substanz: 11-DH-Desoxymethason
 c(Substrat)[nmol/l]: 1000
 Gewebetyp: Niere
 Kosubstrat: NADH
 c(Protein)[mg/ml]: 0,1

Inkubationsdauer	Umsatz	V_0 (nmol/min/mg Protein)
Probe1	60 22%	36,67
Probe2	60 25%	41,67
Probe3	60 23%	38,33
Probe4	120 58%	48,33
Probe5	120 54%	45,00
Probe6	120 51%	42,50

Mittelwert 42,08
St.abw. 4,27

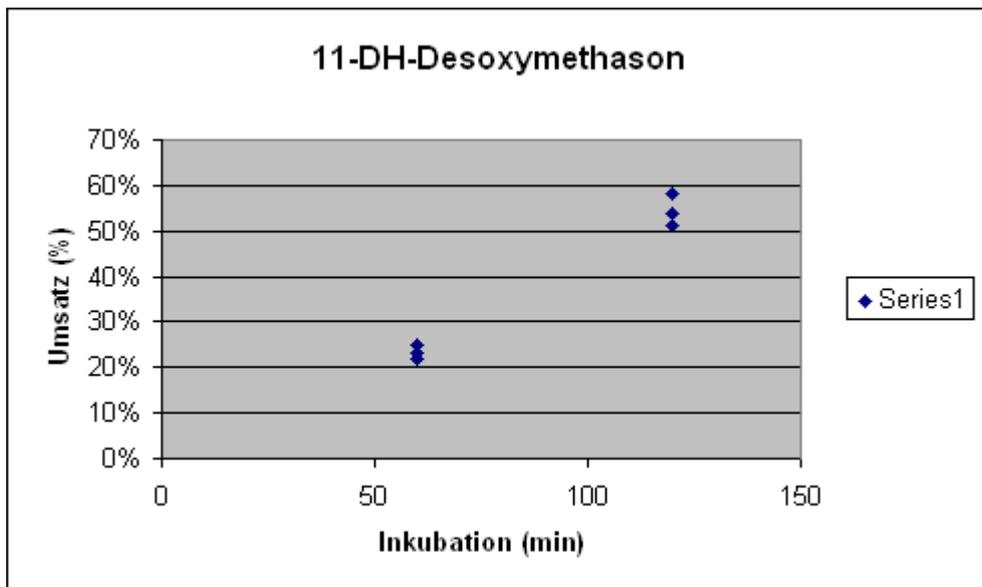


Abbildung 13: Berechnung der Initialgeschwindigkeiten

4.3.6. Statistische Auswertung

Leber (12 Substanzen)	Oxidation	(T1 + T2) x 3
	Reduktion	
Niere (14 Substanzen)	Oxidation	(T1 + T2) x 3
	Reduktion	

Tabelle 4: Anzahl der notwendigen Versuche: 12 bzw. 14 Substanzen pro Organsystem (Leber und Niere), jeweils für Oxidation und Reduktion und mit je zwei Inkubationszeiten zur Erstellung der Initialgeschwindigkeitskurven (T1 und T2) und jeweils drei Replikaten (n=3). Es sind 312 Inkubationen und Messungen erforderlich (ohne Vorversuche).

Die Erstellung der Tabellen und die Errechnung von Mittelwert und Standardabweichung sowie der Vergleich der Initialgeschwindigkeiten einzelner Substanzen untereinander mittels 2-teiligem t-Test für verbundene Datenreihen erfolgte mit MS Excel® 2000.