

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

- Auswiegen der Substanzmengen: Feinwaage der Sartorius Werke AG (Göttingen).
- Ansetzen von Puffer: pH-Meter 761 Calimatic von Knick.
- Zum Pipettieren wurden Pipetten und Pipettenspitzen der Firma Eppendorf (Hamburg) benutzt.
- Zur Inkubation der Gewebeschnitte und Homogenate: NUNC MULTIDISH[®].
- Zentrifugation: Varifuge K und Kryofuge 5000 von Haereus-Christ Holding GmbH (Osterode).
- Sep-Pak[®] plus (Short Body) C18-Cartridge von Waters (<http://www.waters.com>).
- Zerkleinerung der Gewebe und Homogenisation: Ultra-Turrax TP 18/10 von Janke & Kunkel GmbH (Ika-Werke, Staufen), Potter S von B.Braun.
- Aktivitätsbestimmung: β -Szintillationszähler Minaxi Tri-Carb[®] 4000 Series von Packard Instruments B.V. (Groningen, Niederlande).

2.1.2 Chemikalien

- Substrate: Hydrokortison und Kortison von Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).
- Tracer: [1,2,6,7-³H(n)]-Kortisol von DuPont de Nemours GmbH und [1,2(n)-³H]-Kortison von Amersham International plc (Buckinghamshire, UK).
- Dünnschichtchromatographie-Platten: 20 x 20cm Kieselgel 60 F₂₅₄ (MERCK).
- Szintillationsflüssigkeit: Instant Scint Gel Plus von Packard Instrument Company (Meriden, USA).
- Krebs-Ringer-Bikarbonat-Glukose-Puffer: Natriumchlorid, Kaliumchlorid (KCl), Kalziumchlorid (CaCl₂*2H₂O), Magnesiumsulfat (MgSO₄*7H₂O), Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄), Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO₃) und D-Glukose von Merck Ltd. (Darmstadt).

- Für Homogenat-Puffer: Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat und Natriumdi-hydrogenphosphat-Monohydrat von Merck Ltd. (Darmstadt), Sucrose von Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) und Natriumchlorid-Lösung 0,9 g/l von Braun Melsungen AG.
- Kosubstrat: β -NADP⁺, β NAD⁺, β NADPH und β NADH von Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).
- Für Meerschweinchen-Injektionen: Synacthen Depot 1mg[®] (100 IU/ml) von CIBA-GEIGY GmbH (Wehr), Natriumchlorid-Lösung 0,9 g/l von Braun Melsungen AG.

2.1.3 Tiere

Es wurden männliche Duncan-Hartley-Meerschweinchen mit einem Gewicht von circa 300 Gramm vom Moellegaard Aufzuchtzentrum (Schönwalde) bezogen. Die Versuchspläne waren vor Durchführung der Untersuchung der Kommission für Tierversuche der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales des Landes Berlin vorgelegt und für ethisch unbedenklich befunden worden (Geschäftszeichen: 5.2/315 - G 0280/98; Bearbeiterin: Frau Oschatz).

Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen bei einer Temperatur von $20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, einer Luftfeuchtigkeit von 60-70 %, einer 12-stündigen Lichtperiode von 6-18 Uhr und Wasser und Futter *ad libitum* gehalten.

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeines

- ◆ Die unmarkierten Steroide wurden mit Hilfe einer Feinwaage eingewogen und anschließend mit Ethanol in Lösung gebracht. Hierzu wurden 3,6247 mg F bzw. 3,6045 mg E in 10 ml Ethanol gelöst. Diese 10^{-3} M Stammsubstanz wurde bei -20°C aufbewahrt und die nötigen Verdünnungsreihen angefertigt. Das Ethanol wurde für die Inkubationen vollständig mit Raumluft verblasen und die Steroide mit KRBG-Puffer in Lösung gebracht. Bei zuvor in der Arbeitsgruppe durchgeführten Löslichkeitsprüfungen der Steroide in KRBG-Puffer, ergab sich eine 65-70 % Löslichkeit im Vergleich mit Ethanol [61].
- ◆ Die in Methanol gelösten Tracer wurden mit Raumluft verblasen und in Ethanol aufgenommen, so dass sich eine Aktivität von 8000-10000 cpm/ μl , also 80000-100000

cpm pro Reaktionsansatz befand. Dies entspricht einer $^3\text{H-F}$ bzw. $^3\text{H-E}$ -Konzentration von circa 10^{-9} mol/l im Inkubat.

- ◆ Der KRBG-Puffer wurde wie folgt in einem Liter Aqua bidest angesetzt: NaCl 6,7 g/l, KCl 0,208 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,367 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,295 g/l, KH_2PO_4 0,163 g/l sowie NaHCO_3 2,1 g/l und D-Glukose 2g/l, die beide erst unmittelbar vor Gebrauch eingewogen wurden, um Bakterienwachstum zu verhindern. Die anderen Substanzen wurden bereits zwei Tage vor den Inkubationsversuchen angesetzt und bei -20°C gelagert.
- ◆ Der NaPhosphat-Puffer wurde in verschiedenen Konzentrationen und pH-Werten benötigt. Dazu wurden zwei verschieden Ausgangslösungen hergestellt:
 - Lösung A (0,1 M / di-Natriumhydrogenphosphat / pH 9,1): 17,8 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MW 177,99, Merck 6580) auf 1 Liter Aqua bidest.
 - Lösung B (0,1 M / Natriumdihydrogenphosphat / pH 4,3): 13,8 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, MW 137,99, Merck 6346) auf 1 Liter Aqua bidest.

Um den geeigneten Puffer für die Inkubationsversuche mit Homogenaten herzustellen, wurde die obigen Lösungen A und B mit Hilfe des pH-Meters auf das gewünschte pH-Niveau titriert. Für die Reduktionsreaktion betrug der pH-Wert 6,0 und für die Oxidationsreaktion ein pH-Wert von 8,0.

Zur Homogenisierung der Gewebe wurde ein 0,01 M NaPhosphat-Puffer hergestellt. Dazu wurden die obigen Lösungen A und B auf 0,01 M verdünnt und dann so unter pH-Meter Kontrolle gemischt, dass der gewünschte pH-Wert von 7,4 erreicht wurde. Unmittelbar vor dem Homogenisieren wurde noch 0,25 M Sucrose hinzugegeben und der Puffer bis zur Homogenisierung auf Eis gekühlt.

- ◆ Die in Pulverform gelieferten Kosubstrate NADH und NADPH wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn in NaPhosphat-Puffer (0,1 M) mit pH 6,0 und die Kosubstrate NAD^+ und NADP^+ in NaPhosphat-Puffer (0,1 M) mit pH 8,5 gelöst, so dass eine 10^{-2} molare Lösung entstand.

2.2.2 Tiere

Die 12 Tiere wurden nach Anlieferung von 1-12 durchnummeriert und mit einem wasserunlöslichen Stift auf dem Rücken markiert. Danach wurden sie der Zahlenfolge nach paarweise in Käfigen gehalten. Täglich wurden die Tiere gewogen.

Vor Beginn der ACTH- bzw. NaCl-Behandlung und am dritten Behandlungstag wurden die Tiere einzeln in Stoffwechsellkäfige gesetzt, um 24h-Urin sammeln zu können.

Die zweimal tägliche subkutane Injektion mit ACTH oder NaCl über drei Tage wurde nach einer Eingewöhnungszeit von sechs bzw. sieben Tagen begonnen (siehe Anhang). Dabei wurden 12 Tiere in 2 Versuchsgruppen eingeteilt, so dass die eine Gruppe einen Tag länger Eingewöhnungszeit hatte und dementsprechend auch einen Tag später getötet wurde. Die dreitägige Injektionsbehandlung mit ACTH bzw. NaCl wurde um 7.45Uhr und 17.45Uhr durchgeführt. Hierbei wurde mit einer Insulinspritze jeweils 0,1 ml Synacthen Depot[®], entsprechend 10 IU ACTH, bzw. 0,1ml NaCl-Lösung streng subkutan injiziert.

Die Tiere wurden 3 Stunden nach der letzten Injektion narkotisiert und nach Herzpunktion in einer CO₂-Glocke nacheinander getötet. Die Organe wurden in folgender Reihenfolge entnommen: Nebenniere, Niere, Leber, Herz, Lunge und Kolon.

Die Organe wurden soweit wie möglich von anhängendem Fett- und Bindegewebe befreit und das Kolon mit H₂O gesäubert. Nebennieren, Herz, Lunge, Kolon und jeweils die halbe Leber wurden noch am Sektionstisch in Plastikröhrchen und in flüssigen Stickstoff (-80 °C) eingefroren. Die andere Hälfte der Leber und die Nieren wurden in vorgekühltem Sterofundin[®]-Puffer auf Eis konserviert und umgehend zum Inkubationsversuch transportiert. Die Zeit vom Sektionsbeginn bis zum Versuchsbeginn betrug bei diesem Procedere maximal 70 min.

2.2.3 Serum

Die Serumproben der Meerschweinchen wurden unmittelbar vor der Tötung in Narkose mittels Herzpunktion gewonnen. Dazu wurde mit einer handelsüblichen Spritze und Kanüle (20 G Sterican[®] B.Braun Melsungen) eine perkutane Punktion der Herzhöhlen vorgenommen und das aspirierte Volumen in Vacutainer[®] gefüllt. Die Proben blieben gekühlt und wurden nach circa einer Stunde bei 3000 U/min für 10 min zentrifugiert und das Serum in Eppendorf-Behälter abpipettiert und bei -20°C gelagert. Die Bestimmung von F und E wurde mittels

einer reversed-phase HPLC in einem auswärtigem Labor (Prof. Schöneshöfer, KH Spandau, Berlin) und mittels Radioimmunoassay (Dr. Maser-Gluth, Uni Heidelberg) durchgeführt. Die Bestimmung des Progesterons, 17-Hydroxy-Progesteron und Androstendion erfolgte mittels Radioimmunoassay im Gynäkologischen Hormon-Labor (Prof. Lübbert, FU Berlin).

2.2.4 Urin

Der Urin wurde in sogenannten Stoffwechselkäfigen gesammelt, in denen sich die Tiere jeweils für 24 Stunden einzeln befanden. Dies wurde einmal nach einer Eingewöhnungsphase vor der Behandlung mit ACTH bzw. NaCl und ein zweites Mal nach der 3-tägigen Behandlung unmittelbar vor der Tötung durchgeführt. Der Urin wurde am nächsten Morgen gesammelt, von groben Verunreinigungen befreit und nach Bestimmung des Volumens in Plastikröhrchen gefüllt. Diese wurden für einige Stunden stehen gelassen, danach dekantiert und bei -20° C gelagert. Vor der Analyse wurde der Urin aufgetaut und bei 3000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1,5 ml Eppendorf-Behälter abpipettiert und zur Analyse in ein auswärtiges Labor (Abteilung Dr. Maser-Gluth, Uni Heidelberg) verschickt. Dort wurde dann mittels eines Radioimmunoassays die Kortisol- und Kortisonmenge sowie die Menge an 5 β -Tetrahydrokortisol (THF), 5 α -Tetrahydrokortisol (alloTHF) und Tetrahydrokortison (THE) quantifiziert [62].

2.2.5 Schnitte

Es wurden Gewebeschnitte von Niere und Leber angefertigt, wobei jeweils 4 Inkubationen pro Tier, Organ und Reaktionsrichtung durchgeführt wurden.

Die Nieren wurden mit Hilfe eines Einmalskalpells von ihrer Kapsel getrennt und anschließend in Rinde, Mark und Kelchsystem seziiert. Letzteres wurde verworfen, das Nierenmark umgehend in Plastikröhrchen getan und in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Dann wurden etwa 1 mm breite Schnitte der Nierenrinde und der Leber mit Hilfe einer Rasierklinge angefertigt und diese in eisgekühlten KRBG-Puffer gebracht. Vor dem Abwiegen wurden die Gewebeschnitte mit Kleenex[®]-Tüchern trocken getupft und jeweils 0,07 g Gewebe pro Inkubationsansatz abgewogen [54].

Die Gewebeschnitte wurden dann in NUNC MULTIDISH[®] (Well-Schalen) inkubiert, in die zuvor folgende Teile zu einem Gesamtvolumen von 1 ml pipettiert worden waren:

- ◆ 890 μ l KRBG-Puffer

- ◆ 100µl unmarkiertes F oder E (10^{-6} M)
- ◆ 10µl ^3H -F oder ^3H -E (10^{-9} M)

Die Konzentration der unmarkierten Steroide im Inkubat betrug demnach 10^{-7} M. Die Inkubation erfolgte im Wasserbad bei leichter Bewegung, 37°C und Begasung mit 95% Sauerstoff und 5% CO₂ über eine Zeitdauer von 90 min. Bei Inkubationsende wurden die Well-Schalen auf Eis gelegt und der Überstand der Inkubation in mit 2 ml Methanol gefüllte Glasröhrchen abpipettiert, so dass es zu einer Ausfällung der Proteine kam. Alle Proben wurden dann für 30-40 Sekunden mittels Vortex geschüttelt und danach bei 3000 U/min für 10 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand (Inkubat + Methanol) in Plastikröhrchen abpipettiert, so dass die Proteine als weißlicher Bodensatz zurückblieben und entsorgt wurden. Die Plastikröhrchen wurden verschlossen und bei -20° C tiefgefroren.

Vor der Auftrennung der Steroide wurden die Proben in Reagenzgläser gebracht, die mit 6 ml H₂O gefüllt waren und die Probe wiederum auf dem Vortex für 10 sec durchmischt. Sep-Pak[®] C18 Kartuschen [63] wurden mit 5 ml Methanol und nachfolgend mit 5 ml H₂O aktiviert. Die 9 ml Probenvolumen wurden auf die Kartuschen aufgegeben und mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch den Kartuschenfilter gezogen [64]. Dann wurden die Proben nacheinander mit 2 ml H₂O, 1ml Methanol (10%) und 2ml Aceton (20%) gereinigt, wobei auf eine moderate Flussrate (ca. 2-10 ml/min) geachtet wurde, um einen zu großen Verlust der Analyte zu verhindern. Schließlich wurden die Steroide mit 3 x 1 ml Methanol eluiert und in Plastikröhrchen aufgefangen. Das Methanol wurde mit Raumluft verblasen und die Röhrchen bei -20° C gelagert.

2.2.6 Homogenate

Das Gewebe, das in flüssigem Stickstoff tiefgefroren worden war, wurde aufgetaut, gewogen und mit Skalpell und Schere in kleine Würfel geschnitten. Danach wurde es zusammen mit dem vierfachen Volumen an eisgekühltem NaPhosphat-Puffer (0,01M /pH 7,4) in ein Pottergefäß getan. In diesem wurde das Gewebe zunächst mit einem Ultra-Turrax[®] (3 x 2 sec) zerkleinert und danach im Pottergerät homogenisiert. Es wurde hierbei darauf geachtet, dass das Gefäß stets gut gekühlt war (Pottergefäß in Eiswasser, Pause nach 5 Hüben). Die Zeit zwischen Auftauen und Beginn der Inkubation überschritt nie mehr als 30 min.

Vorpipettiert wurde ein Ansatz aus unmarkiertem (10^{-7} M effektive Konzentration) und markiertem (ca. 100000 cpm) F oder E mit NaPhosphat-Puffer (0,1 M) und Kosubstrat (10^{-3} M effektive Konzentration).

Pipettierschema:

- ◆ 10 µl Tracer
- ◆ 100µl unmarkiertes Steroid
- ◆ kein Kosubstrat oder 100µl NADP⁺/H bzw. NAD⁺/H
- ◆ Homogenat (20-200µl)

ad 1000µl NaPhosphat-Puffer (0,1 M)

Kosubstrat war entweder NADH /NADPH für die Reduktionsreaktion oder NAD⁺ /NADP⁺ für die Oxidationsreaktion. Vor Beginn der Inkubation wurden die Platten vorgewärmt. Gestartet wurde die Inkubation durch Zugabe des Homogenats zum Ansatz. Die Homogenatmenge wurde in Vorversuchen ermittelt und variierte zwischen den einzelnen Versuchsansätzen innerhalb eines Bereich von 20-200 µl pro Ansatz.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Well-Schalen auf Eis gelegt und das Inkubationsvolumen sofort in mit 3 ml Ethylacetat gefüllte Reagenzgläser abpipettiert. Dieses Gemisch wurde für 30 sec mit dem Vortex durchmischt und dann bei 3000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in Glasröhrchen abpipettiert und nach Verblasen des Ethylacetats bis zur Auftrennung bei -20 C tiefgekühlt.

2.2.7 Separation der Steroide mittels Dünnschichtchromatographie

Die tiefgekühlten Proben wurden mit 30 µl Ethanol und 20 µl einer Standardlösung (10^{-3} M F und E in Ethanol) aufgenommen und für einige Sekunden auf dem Vortex durchmischt. Dann wurden die Proben möglichst in kleinen Portionen (Konzentrierungszone) auf die Dünnschichtchromatographie-Platten aufgetragen. Das Laufmedium bestand aus 75 ml Dichlormethan und 5 ml Methanol, die Laufzeit betrug zwischen 60 und 120 min und zwar bis die Lauffront das obere Plattenende erreichte. Nach Ende der Auftrennung wurden die DC-Kieselgelplatten erst gescannt und dann unter UV-Licht (256 nm) die kalten Steroide markiert, um eine Übereinstimmung von kalten und heißen Steroiden zu gewährleisten. Danach wurden die Markierungen großzügig ausgeschnitten und in Behälter überführt. Darin wurden die DC-Plattenstücke in 15 ml Instant Scint Gel Plus[®] und 1 ml Wasser für 24h

inkubiert. Danach wurden die Plattenstücke mit einer Pinzette entfernt und die Aktivität im β -Szintillationszähler gemessen [53].

2.2.8 Statistik

Statistische Berechnungen wurden mit dem SPSS Programm Version 10.07 von SPSS Inc. (Chicago, Illinois, USA) oder Sigma Stat 2.0 von Jandel Corporation (San Rafael, California, USA) durchgeführt. Grafiken, Texte und Tabellen wurden mit Hilfe von Word 97/2000 und Excel 97/2000 von Microsoft (Microsoft Corporation, USA) erstellt.

Bei der statistischen Analyse der Gewebeschnitte wurde zunächst ein Mittelwert der 4 Replikate gebildet, der dann in die Analyse einging. Die statistische Betreuung erfolgte am Institut für Medizinische Statistik der FU Berlin. Für die Berechnung des Signifikanzniveaus wurde der student's t-test verwendet. In den Fällen, in denen keine Normalverteilung gegeben war, wurde vom statistischen Programm automatisch der Mann-Whitney Rank Sum Test verwendet.