

4 Methoden

4.1 Transaktivierungsversuche

4.1.1 Versuchskonzept der Transaktivierungsversuche

Um Aussagen über die intrinsischen Aktivitäten der untersuchten Progesteronmetabolite am hMR machen zu können, wurde ein Zelltransfektionsmodell an CV-1-Zellen gewählt.

Die CV-1-Zellen wurden hierbei mit drei Plasmiden transfiziert, die den humanen Mineralocorticoidrezeptor (hMR), eine durch den aktivierten hMR induzierbare Luciferase (Firefly-Luciferase) und eine konstitutiv exprimierte Luciferase (Renilla-Luciferase) tragen (Abbildung 4.1).

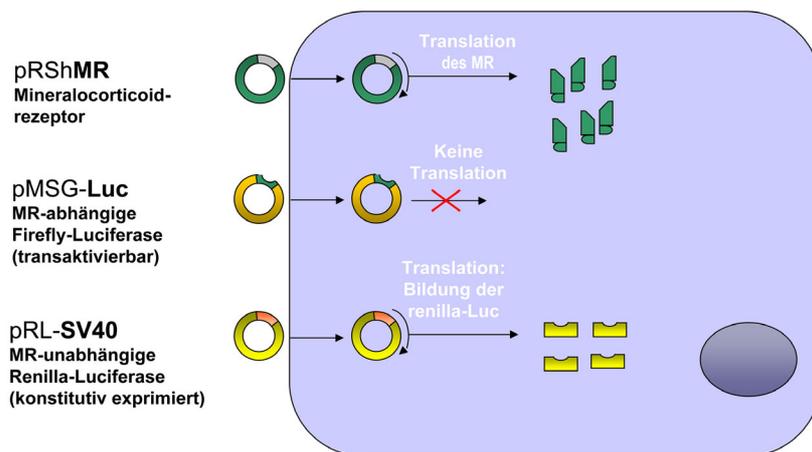


Abbildung 4.1: Transfektion der CV-1-Zellen

Nachdem die Zellen über eine gewisse Zeit den hMR exprimieren konnten, wurden diese mit den zu testenden Steroiden in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-6} mol/l inkubiert. Weist die Substanz eine starke agonistische Potenz auf, so wird das Verhältnis der Bildung von induzierbarer Luciferase zu konstitutiv exprimierter Luciferase größer. Ist die Substanz ein schwacher Agonist oder bindet gar nicht an den Rezeptor, so fällt die Bildung der induzierbaren Luciferase im Verhältnis zur konstitutiv exprimierten Luciferase geringer aus (Abbildung 4.2).

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Menge der gebildeten Luciferasen luminometrisch bestimmt.

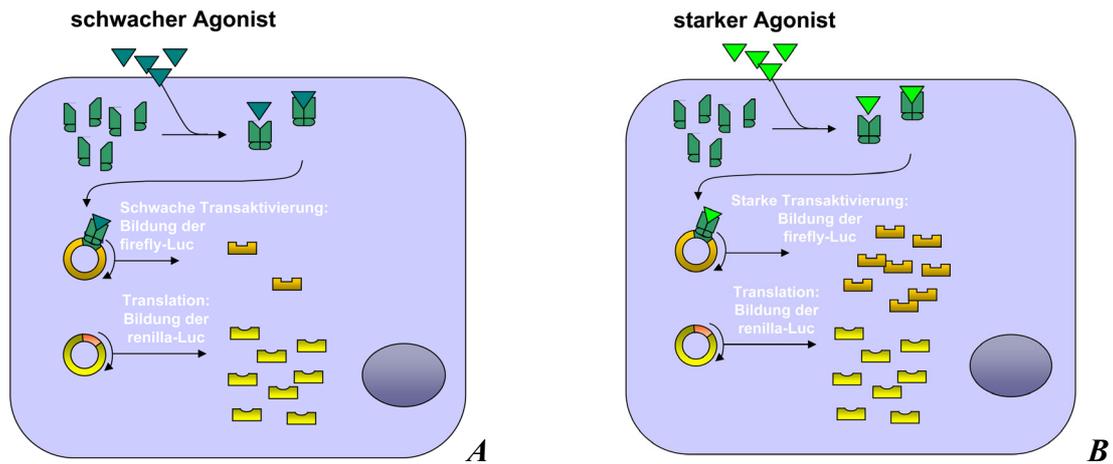


Abbildung 4.2: Inkubation der transfizierten CV-1-Zellen mit einem schwachen (A) oder starken Agonisten (B)

Neben der Einfachinkubation mit den zu untersuchenden Steroiden zur Bestimmung der agonistischen Potenz wurde das gleiche Modell auch verwendet, um die antagonistische Potenz der Substanzen zu ermitteln. Hierzu wurden die Zellen gleichzeitig mit den zu untersuchenden Steroiden in Konzentrationen von 10^{-11} bis 10^{-6} mol/l und Aldosteron (als physiologischer Agonist des hMR) in einer Konzentration von 10^{-9} mol/l inkubiert.

Je nach Minderung der durch Aldosteron allein ausgelösten Transaktivierung ist hierdurch ein Rückschluss darauf möglich, inwieweit die untersuchte Substanz Aldosteron aus der Bindung zu verdrängen vermag bzw. welche antagonistische Potenz die Substanz hierbei zeigt (Abbildung 4.3).

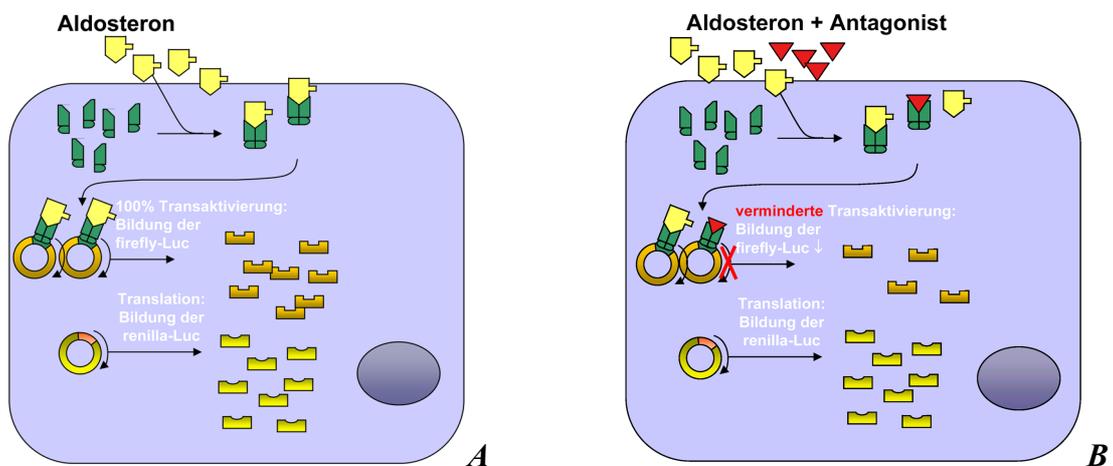


Abbildung 4.3: Inkubation der transfizierten CV-1-Zellen mit Aldosteron alleine (A) oder mit einem Antagonisten (B)

4.1.1.1 Beschreibung der verwendeten Plasmide

4.1.1.1.1 pRShMR

Zur Expression des hMR in den transfizierten Zellen wurde der pRShMR verwendet (Abbildung 4.4). Dieser Vektor wird bereits seit vielen Jahren zur Expression des hMR im Rahmen von Steroidbindungs- und Transaktivierungsversuchen eingesetzt[7].

Bei diesem Plasmid steht die für den hMR-kodierende Sequenz unter der Kontrolle des Promotors des Rous sarcoma Virus (RSV-LTR), um eine starke Expression zu gewährleisten. Im Anschluss an die Sequenz für den hMR trägt der Vektor die Polyadenylierungssequenz des Simian Virus 40 (SV40 poly A) zur Terminierung der Transkription. Zur Selektion im Rahmen der Transformation trägt das Plasmid außerdem eine für die β -Lactamase kodierende Sequenz (Amp).

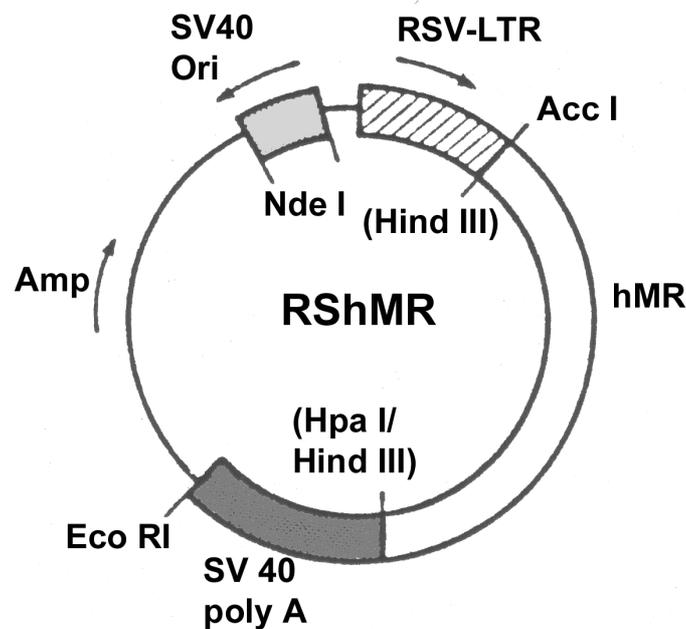


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des pRShMR aus:[7]

4.1.1.1.2 pMSG-Luc

Der pMSG-Luc dient im Transfektionsversuch als responsables Element für den hMR. Der Vektor wurde bereits im Rahmen von Transfektionsversuchen als steroidinduzierbares Reporterplasmid eingesetzt[56].

Die aus dem Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) stammende Promotorsequenz setzt sich aus einer glucocorticoidrezeptor- bzw. mineralocorticoidrezeptorinduzierbaren Promotorregion und der zugehörigen long terminal repeat-Sequenz zusammen und initiiert bei

Transaktivierung durch Bindung des Steroidrezeptors die Transkription der folgenden Sequenz der Firefly-Luciferase (*luc*). Das Gen der Firefly-Luciferase kodiert ein monomeres Protein mit einer Größe von 61 kDa, das um enzymatische Aktivität im Sinne einer Lumineszenzreaktion zu zeigen keiner posttranslationalen Modifikationen mehr bedarf.

Als Selektionsmechanismus im Rahmen der Transformation kompetenter *E. coli* zur Vervielfältigung des Plasmids dient das enthaltene Gen Amp^r , welches die Bildung einer β -Lactamase gewährleistet.

4.1.1.1.3 pRL-SV40

Zur Bestimmung der Effizienzkontrolle der Transfektion, Transkription und Translation wurde als Reportergen der pRL-SV40 Vektor eingesetzt (Abbildung 4.5). Der pRL-SV40 ist vom Hersteller für die Verwendung im Rahmen von Transfektionen von Säugetierzellen ausgelegt und exprimiert konstitutiv die Renilla-Luciferase[144].

Die starke konstitutive Expression der Renilla-Luciferase wird durch die Enhancer/Promotor-Region des SV40 gewährleistet, der ein chimäres Intron, welches sich aus Anteilen des menschlichen β -Globulin-Gens und des menschlichen Immunglobulin-Gens zusammensetzt, nachgeschaltet ist, um die Höhe der Genexpression zu steigern und ein fehlerhaftes Splicen innerhalb der die Renilla-Luciferase kodierenden Sequenz zu verhindern[144].

Dem *Rluc*-Gen der modifizierten Renilla-Luciferase geht unmittelbar der T7-Promotor voraus. Dieser dient als Angriffspunkt für die T7-RNA-Polymerase, die z. B. bei der zellfreien Transkription eingesetzt wird. Das ursprüngliche Gen der Renilla-Luciferase stammt von der gemeinen Seefeder *Renilla reniformis*, wobei die hier verwendete Basensequenz punktuell modifiziert wurde, um enthaltene Angriffspunkte für Restriktionsendonukleasen zu eliminieren. Die Aminosäuresequenz wird dadurch nicht beeinflusst. Die Beendigung der Transkription wird durch die späte Adenylierungssequenz des SV 40 gewährleistet. Das enthaltene Gen Amp^r dient wie bei den anderen verwendeten Plasmiden zur Selektion im Rahmen der Transformation kompetenter *E. coli* zur Vervielfältigung des Plasmids.

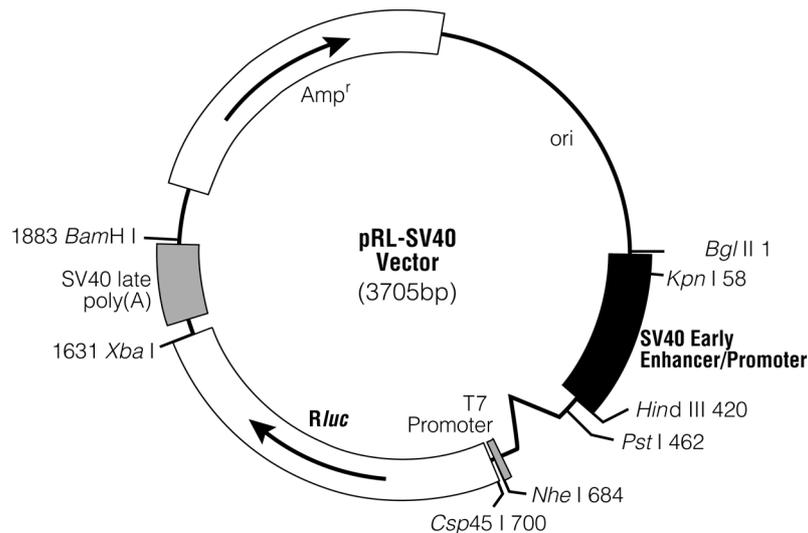


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung des pRL-SV40 aus:[144]

4.1.1.2 CV-1 Zellen

Bei den CV-1-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie, die aus der Niere einer erwachsenen männlichen Meerkatze durch F. C. Jensen im Jahre 1964 gewonnen wurde. Die Zellen wachsen relativ schnell und bilden Monolayer von fibroblastenähnlichen Zellen und sind im Rahmen von Transfektionsversuchen mit Steroidrezeptor-Reporterplasmidsystemen bereits etabliert[30].

4.1.2 Experimentelle Durchführung der Transaktivierungsversuche

4.1.2.1 Herstellung der Plasmide

4.1.2.1.1 Herstellung der Bakterienmedien

Zur Aussaat der transformierten Bakterien wurde mit Ampicillin versetztes LB-Medium nach Lennox (LB⁺-Medium) als Standardmedium zur Anzucht und Vermehrung von *E. coli* verwendet. Hierzu wurde nach den Angaben des Herstellers das Fertigmedium hergestellt und durch Zugabe von NaOH der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Das Medium wurde in sterile Flaschen gefüllt und im Anschluss autoklaviert (20min, 121°C, 1,2bar). Das unter 50°C abgekühlte Medium wurde unter sterilen Bedingungen mit 100mg/l Ampicillin versetzt.

Zur Herstellung des LB⁺-Agars wurde dieser nach den Angaben des Herstellers unter Erwärmung im Wasserbad gelöst sowie nach dem Autoklavieren zu 30 ml in Petrischalen gegossen und nach Aushärtung bei Raumtemperatur bei 4°C gelagert.

4.1.2.1.2 Herstellung der Plasmid-DNA

Zur Herstellung der Plasmide für die Transfektion wurde das Ultracomp® E. coli Transformationskit MC 1061/P3 der Fa. Invitrogen® verwendet.

Nach den Angaben des Herstellers wurden je 100µl der enthaltenen kompetenten E. coli-Bakteriensuspension mit 5ng Plasmid-DNA transformiert.

Als Positivkontrolle wurde nach Angaben des Herstellers der mitgelieferte pUC18-Vektor verwendet, der eine Ampicillinresistenz vermittelt. Zum Ausschluss einer Ampicillinresistenz der untransformierten Bakterien wurden als Negativkontrolle untransformierte Zellen verwendet.

Im Anschluss an die Transformation wurden die transformierten Bakterien sowie die Kontrollen auf LB⁺-Aggarplatten in Verdünnung der Stammlösung von 1:10 und 1:100 ausgestrichen.

Nach Inkubation über 12h bei (37°C, 100% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂) wurden geeignete Kolonien gepickt, in 5ml LB⁺-Medium überführt und nach Inkubation über weitere 12h (37°C, 100% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂) auf den Erfolg der Transformation mittels Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse überprüft. Von erfolgreich transformierten Zellen wurden Gefrierkulturen zur späteren Verwendung angelegt.

4.1.2.1.3 Isolierung der Plasmide

Zur Erfolgskontrolle der Transformation wurden aus den gewonnenen Bakterienkulturen die transformierten Plasmide isoliert. Hierzu wurde mittels Zentrifugation der Kultur (200g, 4°C, 5 min) ein Bakterienpellet gewonnen und der Überstand entfernt. Mittels Qiagen® Mini Plasmid Kit wurden nun nach Angaben des Herstellers die Plasmide isoliert.

4.1.2.1.4 Quantifizierung der gewonnenen DNA

Zunächst wurde mittels spektralphotometrischer Messung im Spektralphotometer von je 3 Verdünnungsstufen (1:25, 1:100, 1:500) der gewonnenen Plasmid-DNA-Lösung die Konzentrationen und Reinheiten gemessen.

4.1.2.1.5 Restriktionsanalyse

In der sich anschließenden Restriktionsanalyse wurden je 0,5µg DNA mit je 5 U Restriktionsenzym sowie je 1µl des enzymespezifischen Pufferkonzentrats versetzt und der Ansatz mit sterilem Wasser auf 10µl aufgefüllt. Nach Inkubation über 3h bei enzymespezifischen Inkubationstemperaturen erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung

der entstandenen Spaltprodukte unter Verwendung eines DNA-Größenstandards. Hierzu wurden die Proben jeweils mit 2µl Gelladepuffer (bestehend aus 5ml Glycerol, 0,37g Na₂EDTA·2H₂O, 0,1g Natriumdodecylsulfat, 0,01g Bromphenolblau, Aqua bidest ad. 10ml) versetzt und auf ein 0,8% Agarosegel (bestehend aus 20 ml 10 x TAE- Puffer (400mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 20mM Na₂EDTA·2H₂O, 800mM Natriumacetat-Trihydrat, pH 8,3 mit Eisessig eingestellt) mit 160 mg Agarose und 20 µg Ethidiumbromid) aufgetragen. Im Anschluss an die Elektrophorese bei 75V über 30 min erfolgte die Fotodokumentation des Ergebnisses mittels UV-Gelkamera.

Die in der Restriktionsanalyse ermittelten DNA-Fragmentgrößen wurden im Anschluss auf ihr Übereinstimmen mit den theoretisch anhand der Sequenz berechneten Fragmentgrößen verglichen.

4.1.2.2 Zellkultivierung

4.1.2.2.1 Herstellung der Zellkulturmedien

Für die Kultivierung der CV-1-Zellen im Rahmen der Transfektion wurden die folgenden Medien hergestellt:

Tabelle 4.1: Herstellung der Zellkulturmedien

| | | |
|----------------|--------|---|
| Medium A | 450 ml | Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) |
| | 50ml | Fetales Kälberserum (FKS) |
| | | 10 ⁵ U/l Penicillin G, 100mg/l Streptomycin, |
| | | 2,5mg/l Amphotericin B |
| Medium B 10%ig | 450 ml | Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) |
| | 50ml | Fetales Kälberserum (FKS) |
| | | nach Aktivkohlebehandlung |
| Medium B 20%ig | 400 ml | Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) |
| | 100 ml | Fetales Kälberserum (FKS) |
| | | nach Aktivkohlebehandlung |

Für die Transfektion wird ein steroidfreies Medium benötigt, um eine Beeinflussung der Transaktivierung durch dritte, unbekannte proteingebundene Steroide auszuschließen. Hierzu wurde Fetales Kälberserum (FKS) mit 20g/l Aktivkohle versetzt und über 24h bei 37°C im Rüttler bei 220 min⁻¹ inkubiert. Im Anschluss wurde die Suspension in drei Arbeitsgängen zentrifugiert (1.000 g, 30min, 4°C) und jeweils der Überstand abpipettiert. Der gewonnene

Überstand wurde durch einen Sterilfilter gepresst und bei -20°C bis zur Verwendung eingefroren.

4.1.2.2.2 Zellkultivierung im Vorfeld der Transfektion

Umsetzen der Zellen

Sämtliche Arbeiten mit den CV-1-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen am LaminarFlow-Arbeitsplatz durchgeführt. Die verwendeten Lösungen wurden entweder bereits steril vom Hersteller bereitgestellt oder durch Autoklavieren oder Sterilfiltrieren behandelt. Die CV-1-Zellen wurden während der Dauer der Experimente in Zellkulturflaschen bei 37°C , 5% CO_2 und 100% Luftfeuchtigkeit in Medium A im Brutschrank kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte 2mal wöchentlich. Da die Zellen bei hochgradiger Konfluenz dazu neigen, Knospen zu bilden oder sich vom Boden lösen, wurden die Zellen bei annähernder Konfluenz in Kulturflaschen vereinzelt oder zur Transfektion genutzt.

Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS zweimalig gespült und mit 1ml Trypsin/EDTA-Lösung in PBS (0,05%/0,02%) für 10 bis 15 Minuten bis zum Zeitpunkt der annähernd vollständigen Lösung der Zellen im Brutschrank inkubiert. Zum Aufnehmen der Zellen wurde der Boden der Flaschen im Anschluss mehrmals mit 12ml Medium A gespült und die gewonnene Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

Zur Gewinnung eines Zellpellets wurde die Suspension zentrifugiert (200 g, 6 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10ml Medium A resuspendiert.

Zur Bestimmung der Zelldichte im Rahmen der Aussaat wurde eine Zählkammer nach Neubauer zur manuellen Auszählung der Zellen unter dem Mikroskop verwendet.

Zur Fortführung der Zelllinie wurden die Zellen in einer Dichte von 10^5 Zellen/Flasche ausgesät, wobei sich nach ca. 1 Woche erneut ein annähernd konfluenter Zellrasen bildete.

Zellaussaat

Der zeitliche Ablauf der Transfektionsversuche ist zusammenfassend in Tabelle 4.2 dargestellt. Für die Transaktivierungsversuche wurden die CV-1 Zellen zunächst in 24-well Zellkulturplatten in einer Dichte von $2 \cdot 10^4$ Zellen/well in einem Volumen von 1ml Medium A ausgesät. Nach drei Tagen im Brutschrank bei 37°C , 5% CO_2 und 100% Luftfeuchtigkeit erreichten die Zellen in den Wells eine Dichte von etwa 80-90%. Um eine Beeinflussung der Transfektion zu vermeiden und möglicherweise FKS-gebundene Steroide zu entfernen, wurde nun das Medium abgesaugt und gegen Medium B 10% ausgetauscht. 24h später wurde die Transfektion durchgeführt.

Table 4.2: *Ablauf der Transaktivierungsversuche*

| Zeit | |
|--------|--------------------------------|
| 0. Tag | Aussaat der Zellen in Medium A |
| 3. Tag | Mediumwechsel auf Medium B |
| 4. Tag | Transfektion |
| 5. Tag | Inkubation mit den Steroiden |
| 6. Tag | Lysieren der Zellen |

4.1.2.3 *Transfektion*

Zur Durchführung der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und nach dem Spülen mit 1ml PBS durch 200µl reines DMEM ersetzt, um mögliche Einflüsse des FKS, der Antibiotika und des Amphotericin B auf die Transfektionseffizienz zu vermeiden.

Für die Transfektion wurden nach den für CV-1-Zellen modifizierten Angaben des Herstellers des LipofectAMINE Plus[®] Transfektionskits je Well 0,3µg pRShMR-DNA, 0,02µg pRL-SV40-DNA und 0,15µg pMSG-Luc-DNA in 25µl DMEM aufgenommen, mit 4µl Lipofectamine PLUS Reagenz versetzt und über 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Je Well wurden im Anschluss 1µl Lipofectamin-Reagenz in 25µl DMEM hinzugegeben, 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und in die Wells gegeben. Als Negativkontrolle wurden je 4 Wells nur mit den Reporterplasmiden transfiziert, um die Expression eines an die Reporterplasmide bindenden Steroidrezeptors (GR oder MR) auszuschließen.

Nach 4 Stunden im Brutschrank wurde je Well 250µl Medium B 20%ig zugegeben, um insgesamt eine 10%ige FKS-Konzentration einzustellen.

4.1.2.4 *Inkubation*

Am nächsten Tag (24h nach Beginn der Transfektion) wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und je nach Ansatz mit den zu untersuchenden Steroiden allein oder in Gegenwart von Aldosteron inkubiert.

Als Leerwert wurden je Ansatz 4 Wells nur mit Medium B 10% inkubiert, um die Basalexpression der beiden Reportergene zu ermitteln. Die nur mit den Reporterplasmiden transfizierten Zellen wurden mit Aldosteron und Cortisol in den maximal eingesetzten Konzentrationen inkubiert.

Agonismus

Zur Bestimmung der agonistischen Potenz der zu untersuchenden Steroide wurden diese in einer Konzentration von 1 mmol/l in Ethanol gelöst und eine Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 10^{-11} mol/l bis 10^{-6} mol/l in Medium B 10%ig erstellt. Jeweils 4 Wells wurden mit je 1ml einer Konzentration eines jeden Steroids inkubiert.

Je Versuchsansatz wurde als Bezugsgröße für 100%ige Transaktivierung eine Inkubation von je 4 Wells je Konzentration mit Aldosteron in Konzentrationen von 10^{-11} mol/l bis 10^{-6} mol/l durchgeführt.

Antagonismus

Zur Untersuchung der antagonistischen Potenz der eingesetzten Steroide gegenüber Aldosteron am hMR wurden Verdünnungsreihen mit Konzentrationen von 10^{-11} mol/l bis 10^{-6} mol/l in Medium B 10%ig erstellt, denen dann in Ethanol gelöstes Aldosteron so zugegeben wurde, dass sich eine effektive Aldosteronkonzentration von 10^{-9} mol/l ergab.

Jeweils 4 Wells wurden mit 1ml einer Konzentration eines jeden Steroids in Gegenwart von Aldosteron inkubiert. Je Versuchsansatz wurde als Bezugsgröße für 100%ige Transaktivierung eine Inkubation von je 4 Wells mit Aldosteron in einer Konzentration von 10^{-9} mol/l durchgeführt.

4.1.2.5 *Lysieren der Zellen und Messung der Lumineszenz*

Nach 22 Stunden der Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt und die Zellen nach Spülung mit 1ml PBS je Well mit 100 μ l des im Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System-Kit enthaltenen passiven Lyse-Puffer lysiert. Das Lysat wurde bei -80°C eingefroren.

Lumineszenzmessung

Zur Bestimmung der Transaktivierung wurden nach Angaben des Herstellers des Dual-Luciferase[®] Reporter Assay Systems 20 μ l des Zelllysats mit 100 μ l Luciferase Assay Reagenz II (LAR II) bei Raumtemperatur versetzt und die Aktivität der hMR-induzierten Firefly-Luciferase im Luminometer über 20s bestimmt. Direkt im Anschluss wurden 100 μ l Stop & Glo[®]-Reagenz (SGR) zugegeben, um die durch die Firefly-Luciferase hervorgerufene Lumineszenz zu beenden und die Aktivität der Renilla-Luciferase im Luminometer über 20s durch gleichzeitige Bereitstellung deren Substrates zu bestimmen.

4.1.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Zur Berechnung der Transaktivierung wurde der Transaktivierungsquotient aus ermittelter Lumineszenzaktivität in [rlu] der Firefly-Luciferase und Renilla-Luciferase gebildet.

Je Versuchsansatz wurde die Basalexpression als Quotient der beiden Luciferaseaktivitäten bei Inkubation mit dem reinen Medium ohne Steroidzusatz berechnet.

4.1.3.1 Agonismus

Zur Untersuchung der agonistischen Potenz wurde eine Transaktivierungskurve für Aldosteron aus der Inkubation mit Konzentrationen von 10^{-11} mol/l bis 10^{-6} mol/l erstellt. Die hierbei maximal erreichte Transaktivierung diente als Bezugsgröße (100%). Die anteilige Transaktivierung der untersuchten Steroide wurde durch Bildung eines Quotienten aus dem konzentrationsabhängig erreichtem Transaktivierungsquotienten und dem durch Aldosteron als maximal ermittelten Transaktivierungsquotienten bestimmt.

Bei einer einem sigmoidalen Kurvenverlauf folgenden Einzelpunktverteilung bei logarithmischer Auftragung der Transaktivierung über der Konzentration als Zeichen einer Rezeptorbindung und stattgehabten Transaktivierung erfolgte die Ermittlung einer Dosis-Wirkungs-Kurve durch nicht-lineare Regressionsanalyse mit der GraphPad® Prism® 3.0-Software. Zugrunde gelegt wurde die dargestellte sigmoidale Funktion (Gleichung 4.1 A) mit variabler Steigung.

Um ein vergleichbares Maß für die absolute agonistische Potenz aller Substanzen zu ermitteln, wurde aus der berechneten Funktion durch Umformung die $EC_{50(Aldo)}$ als die Konzentration halbmaximaler Wirkung ($TA(X) = 50\%$) im Bezug auf die durch Aldosteron maximal erreichbare Transaktivierung (=100%) bestimmt (Gleichung 4.1 B). Gerade bei Substanzen, die nur eine sehr geringe maximale Transaktivierung zeigen, ist durch die Berücksichtigung der maximal durch Aldosteron erreichten Transaktivierung bei der $EC_{50(Aldo)}$ im Gegensatz zur EC_{50} eine Aussage über die tatsächliche agonistische Potenz möglich. Abbildung 4.6 stellt die in der Gleichung enthaltenen Parameter graphisch dar.

$$TA(X) = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{(\log EC_{50} - X) \cdot HillSlope}} \quad (4.1 A)$$

$$\log(EC_{50(Aldo)}) = \log(EC_{50}) - \frac{\log\left(\frac{Top - Bottom}{50 - Bottom} - 1\right)}{HillSlope} \quad (4.1 B)$$

TA = Transaktivierung in %

X = dekadischer Logarithmus der Steroidkonzentration

$Bottom$ = angestrebtes Minimum der berechneten Kurve

Top = angestrebtes Maximum der berechneten Kurve

$Hillslope$ = Steigung der Kurve

EC_{50} = Konzentration halbmaximaler Transaktivierung durch das eingesetzte Steroid

$EC_{50(Aldo)}$ = Konzentration halbmaximaler Transaktivierung bezogen auf 100% Transaktivierung durch Aldosteron

Gleichung 4.1: (A) Transaktivierung in Abhängigkeit von der eingesetzten Steroidkonzentration und (B) Berechnung der $EC_{50(Aldo)}$

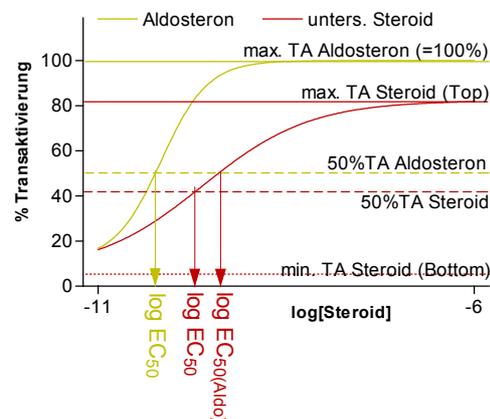


Abbildung 4.6: graphische Darstellung einer Transaktivierungskurve und von deren Funktionsparametern

(TA = Transaktivierung)

Bei Einzelpunktverteilungen, die keinen Anhalt für Transaktivierung boten und somit keiner sigmoidalen Verteilung folgten, erfolgte lediglich eine graphische Darstellung.

4.1.3.2 Antagonismus

Bei der Untersuchung der antagonistischen Potenz wurde die Transaktivierung durch Aldosteron in einer Konzentration von 10^{-9} mol/l ermittelt. Die hierbei erreichte Transaktivierung diente als Bezugsgröße (100%). Die bei Hemmung durch die untersuchten Steroide gemessene Transaktivierung wurde durch Bildung eines Quotienten aus dem konzentrationsabhängig erreichten Transaktivierungsquotienten und dem durch Aldosteron bei 10^{-9} mol/l ermittelten Transaktivierungsquotienten bestimmt.

Die Auswertung der antagonistischen Potenz erfolgte analog zur agonistischen Potenz. Aus der ermittelten Funktion (Gleichung 4.2 A) wurde die $IC_{50(Aldo)}$ als die Konzentration halbmaximaler Hemmung (TA=50%) im Bezug auf die durch Aldosteron bei 10^{-9} mol/l erreichte Transaktivierung bestimmt (Gleichung 4.2 B):

$$TA(X) = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{(\log IC_{50} - X) \cdot HillSlope}} \quad (4.2 A)$$

$$\log(IC_{50(Aldo)}) = \log(IC_{50}) - \frac{\log\left(\frac{Top - Bottom}{50 - Bottom} - 1\right)}{HillSlope} \quad (4.2 B)$$

TA = Transaktivierung in %

X = dekadischer Logarithmus der Steroidkonzentration

$Bottom$ = angestrebtes Minimum der berechneten Kurve

Top = angestrebtes Maximum der berechneten Kurve

$HillSlope$ = Steigung der Kurve

IC_{50} = Konzentration halbmaximaler Hemmung der Transaktivierung durch das eingesetzte Steroid

$IC_{50(Aldo)}$ = Konzentration halbmaximaler Hemmung der Transaktivierung bezogen auf 100% Transaktivierung durch Aldosteron

Gleichung 4.2: (A) Hemmung der Transaktivierung in Abhängigkeit von der eingesetzten Steroidkonzentration und (B) Berechnung der $IC_{50(Aldo)}$

4.2 Rezeptorbindungsstudien

4.2.1 Versuchskonzept der Rezeptorbindungsstudien

Um die pharmakologischen Eigenschaften der untersuchten Progesteronmetabolite genauer beschreiben zu können und um eine weitere Möglichkeit der Differenzierung zwischen intrinsischer Aktivität und Affinität zum Rezeptor zu haben, wurden Rezeptorbindungsstudien durchgeführt.

Zunächst wurde zur Bestimmung des K_d -Wertes ein Scatchard-Experiment durchgeführt.

Im Anschluss wurden Kompetitionsversuche durch Inkubation des Rezeptors mit Steroiden in Gegenwart von Aldosteron durchgeführt. Hierbei wurde die konzentrationsabhängige Verdrängung des Aldosterons aus seiner Bindung an den hMR ermittelt und der K_i -Wert der eingesetzten Steroide bestimmt.

4.2.1.1 Scatchard-Experiment

Um die Rezeptorbindungsstudien durchführen zu können, wurde zunächst in einem aus Kaninchen-Retikulozytenlysat gewonnenen System zur *in vitro*-Transkription und -Translation der hMR hergestellt.

Zum Nachweis des hMR im gewonnenen Lysat und zur Ermittlung des K_d -Wertes von [^3H]Aldosteron am im verwendeten System exprimierten hMR wurde ein Scatchard-Experiment durchgeführt.

Beim Scatchard-Experiment handelt es sich um die Bestimmung der spezifischen Bindung eines radioaktiv markierten Tracers (hier [^3H]Aldosteron) an einen Rezeptor (hier der hMR). Die Grundlagen des Versuchs sind schematisch in Abbildung 4.7 A – F dargestellt.

Wird einer den hMR enthaltenden Lösung [^3H]Aldosteron zugegeben, so liegt dieses in drei verschiedenen Formen vor. Zunächst wird [^3H]Aldosteron an den Rezeptor gebunden (spezifische Bindung, B_{spez}), des weiteren bindet es an sonstige Lösungsbestandteile (unspezifische Bindung, B_{unspez}) und liegt zum Dritten ungebunden im Lösungsmittel vor (Abbildung 4.7 A). Bindet man durch Zugabe von Aktivkohle den freien Tracer (Abbildung 4.7 B) und entfernt ihn durch Zentrifugation aus der Lösung (Abbildung 4.7 C), so ist die im Überstand gemessene Radioaktivität proportional zur Gesamtbindung B_{ges} , bestehend aus spezifischer Bindung und unspezifischer Bindung.

Gibt man nun zusätzlich zum radioaktiv markierten Tracer den nicht-markierten Tracer (hier Aldosteron) im 1000fachen Überschuss hinzu (Abbildung 4.7 D – F), so wird der markierte

Tracer zum Großteil aus der einer Sättigung unterliegenden spezifischen Bindung verdrängt (Abbildung 4.7 D). Da die unspezifische Bindung annähernd linear von der Konzentration abhängig ist und erst in wesentlich höheren Konzentrationsbereichen ein Sättigungsverhalten zeigt, bleibt die unspezifische Bindung des markierten Tracers unbeeinflusst. Somit entspricht die nun nach Zugabe von Aktivkohle und Zentrifugation (Abbildung 4.7 E-F) im Überstand gemessene Radioaktivität der unspezifischen Bindung B_{unspez} .

Aus der Differenz der gemessenen Aktivitäten lässt sich nun ein Äquivalent für die spezifische Bindung B_{spez} berechnen und die Konzentration halbmaximaler Sättigung des hMR (K_i -Wert) für $[^3\text{H}]$ Aldosteron bestimmen.

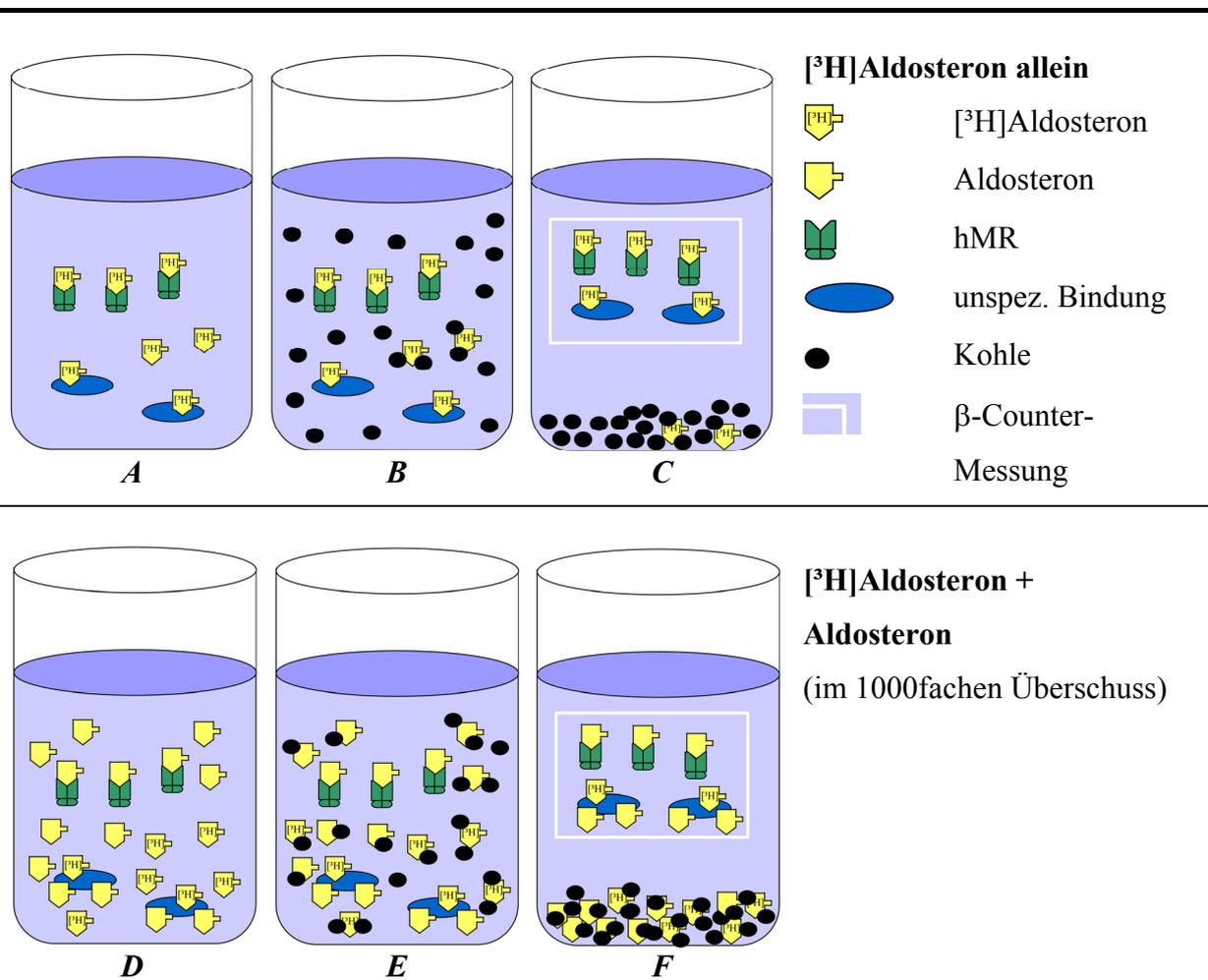


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung des Scatchard-Experiments

A – C = Bestimmung der Gesamtbindung, D – F = Bestimmung der unspezifischen Bindung (siehe Text)

4.2.1.2 *Kompetitionsversuche*

Um die Affinität der untersuchten Steroide zum hMR zu quantifizieren bzw. deren K_d -Wert zu ermitteln, wurde im Kompetitionsversuch deren Fähigkeit bestimmt, den an den hMR gebundenen Anteil des Tracers [^3H]Aldosteron bei einer Konzentration von 5nmol/l aus seiner Bindung zu verdrängen.

Hierzu wurde wie beim Scatchard-Experiment das den hMR enthaltende Retikulozytenlysat hergestellt. Das Lysat wird nun zunächst nur mit [^3H]Aldosteron in einer dem K_d -Wert nahen Konzentration von 5nmol/l alleine bzw. mit dem 1000fachen Überschuss an kaltem Aldosteron inkubiert, um die bei dieser Aldosteronkonzentration maximal erreichbare spezifische Bindung $\hat{B}_{spez}(5nM)$ zu bestimmen.

Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit den potentiell kompetierenden Steroiden in 6 verschiedenen Konzentrationen. Bei einer Bindung des kompetierenden Steroids an den hMR wurde [^3H]Aldosteron aus seiner Bindung verdrängt. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Lösung mit Aktivkohle versetzt und die freien Steroide wurden durch Bindung an die Aktivkohle und sich anschließende Zentrifugation abgetrennt. Die im Überstand gemessene Aktivität entspricht nach Abzug der im Vorfeld ermittelten unspezifischen Bindung B_{unspez} der verbliebenen spezifischen Bindung B_{spez} unter den kompetitiven Bedingungen.

Teilt man nun die verbliebene spezifische Bindung B_{spez} durch die ermittelte maximale spezifische Bindung $\hat{B}_{spez}(5nM)$, so beschreibt der Quotient die relative Verdrängung von [^3H]Aldosteron aus der Bindung an den hMR.

4.2.1.3 *Beschreibung des Plasmids pchMR*

Der pchMR diente als Vektor zur Expression des hMR. Er besteht aus der unter der Kontrolle eines T7-Promotors stehenden cDNA des hMR, gefolgt von einer Polyadenylierungssequenz zur Terminierung der Transkription.

4.2.2 Experimentelle Durchführung der Rezeptorbindungsstudien

4.2.2.1 Herstellung der Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden aus folgenden Einzelsubstanzen hergestellt:

Tabelle 4.3: TEGDW-Puffer

| | |
|--------------|-------------------------|
| TEGDW-Puffer | 20 nM Tris-HCl (pH 7,4) |
| | 1 mM EDTA |
| | 1 mM Dithiothreitol |
| | 20 mM Natriumwolframat |
| | 10% Glycerol |
| | (+Steroid) |

Tabelle 4.4: DCC-Suspension

| | |
|----------------|---|
| DCC-Suspension | 0,5% Dextran coated charcoal in TEGDW-Puffer |
|----------------|---|

4.2.2.2 Herstellung des hMR

Zur Durchführung der Rezeptorbindungsstudien wurde der hMR mit Hilfe des TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System der Fa. Promega zur kombinierten *in vitro*-Transkription und Translation nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung des Plasmids pchMR hergestellt.

Da das Gen für den hMR bei diesem Plasmid unter der Kontrolle des T7-Promotors steht, wurde entsprechend dem Protokoll die T7 RNA-Polymerase eingesetzt. Der Ansatz wurde gemäß Protokoll über 90 min bei 30°C inkubiert. Die Beendigung der Transkription und Translation wurde durch die Zugabe des steroidhaltigen 4°C kalten TEGDW-Puffers erreicht. Abweichend vom Protokoll wurden weder Luciferase-Kontrollplasmide noch [³⁵S]Methionin zur Erfolgskontrolle eingesetzt. Die Kontrolle der erfolgreichen Transkription und Translation erfolgte über die Messung der spezifischen und unspezifischen Bindung von Aldosteron im Lysat und der Bestimmung des K_d -Werts für Aldosteron im Scatchard-Experiment.

4.2.2.3 *Scatchard-Experiment*

Um den Anteil der spezifischen Bindung des Tracers an den hMR und somit den K_d -Wert bestimmen zu können, wurden je zwei Aliquots des Retikulozytenlysats mit dem Tracer allein oder in Gegenwart des 1000fachen Überschusses an kaltem Aldosteron inkubiert.

Je Verdünnungsstufe wurde [^3H]Aldosteron in je 12,5 μl TEGDW-Puffer, der zur Lösungsvermittlung 0,2% Vol. Ethanol enthielt so gelöst, dass sich im resultierenden Gesamtprobenvolumen nach Zugabe von 12,5 μl Retikulozytenlysats eine Konzentration von 8 nM, 4 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM und 0,25 nM ergab. Die Proben zur Bestimmung der unspezifischen Bindung enthielten zusätzlich je 8 μM , 4 μM , 2 μM , 1 μM , 0,5 μM und 0,25 μM kaltes Aldosteron im Gesamtprobenvolumen.

Nach der Inkubation über 4h bei 4°C wurde je Probe 1ml DCC-Suspension zugegeben, um die ungebundenen Steroide aus der Lösung zu entfernen. Die Proben wurden für 7min bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert und im Anschluss bei 14.000 g über 10 min bei 4 °C zentrifugiert, um die an die Kohle gebundenen Steroide aus dem Überstand zu entfernen.

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden je 780 μl des kohlefreien Überstandes vorsichtig abpipettiert, in die Szintillationslösung überführt und im β -Counter unter Verwendung eines externen Standards die Aktivität des Überstandes bestimmt. Tabelle 4.5 stellt schematisch die Probenaufteilung dar.

Tabelle 4.5: Schematische Darstellung der Probenaufteilung im Scatchard-Experiment

| |  | |  | |  | |  | |  | |  | |
|----------------------------|---|-----------------|---|-----------------|---|-----------------|---|-----------------|---|-------------------|---|--------------------|
| [^3H]Aldosteron | 8nM | 8nM | 4nM | 4nM | 2nM | 2nM | 1nM | 1nM | 0,5nM | 0,5nM | 0,25nM | 0,25nM |
| Aldosteron kalt | | 8 μM | | 4 μM | | 2 μM | | 1 μM | | 0,5 μM | | 0,25 μM |

4.2.2.4 *Kompetitionsversuche*

Je Versuchsansatz wurden zwei Proben mit [^3H]Aldosteron allein (Konzentration im Gesamtprobenvolumen 5nmol/l) und je zwei weitere Proben mit [^3H]Aldosteron (Konzentration im Gesamtprobenvolumen 5nmol/l) und dem 1000fachen Überschuss kalten Aldosterons (Konzentration im Gesamtprobenvolumen 5 $\mu\text{mol/l}$) zur Bestimmung der unspezifischen und der spezifischen Bindung analog zum Scatchard-Experiment inkubiert.

Zur Bestimmung der kompetitiven Potenz der Progesteronmetabolite am hMR gegenüber Aldosteron wurden Verdünnungsreihen des zu untersuchenden Progesteronmetaboliten in 12,5 μl TEGDW-Puffer, der zur Lösungsvermittlung 0,2% Vol. Ethanol enthielt, so erstellt,

dass sich wiederum nach Zugabe von 12,5µl Retikulozytenlysat im Gesamtprobenvolumen von 25µl eine Konzentration von 10^{-11} mol/l bis 10^{-6} mol/l einstellte.

Nach der Inkubation über 4h bei 4°C wurde den Proben je 1ml DCC-Suspension zugegeben und diese für 7min bei 4°C auf dem Rüttler zur Bindung der freien Steroide an die Kohle inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation bei 14.000g bei 4°C über 10min wurden die an die Kohle gebundenen Steroide aus dem Überstand der Lösung entfernt.

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden je 780µl des kohlefreien Überstandes vorsichtig abpipettiert, in die Szintillationslösung überführt und im β -Counter unter Verwendung eines externen Standards die Aktivität des Überstandes bestimmt. Tabelle 4.6 stellt die verschiedenen Inkubationsansätze schematisch dar.

Tabelle 4.6: Schematische Darstellung der Probenaufteilung im Wettbewerbsversuch

| |  |  |  |  |  |  |  |
|-----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| [³ H]Aldosteron | 5nM | 5nM | 5nM | 5nM | 5nM | 5nM | 5nM |
| Aldosteron kalt | - | 5µM | - | - | - | - | - |
| Progesteron* | | | 10^{-11} M | 10^{-10} M | 10^{-9} M | 10^{-8} M | 10^{-7} M |
| Bindung | $\hat{B}_{spez}(5nM) + B_{unspez}(5nM)$ | | | | | | |
| | $B_{unspez}(5nM)$ | | | | | | |

$\hat{B}_{spez}(5nM)$ = maximale spezifische Bindung bei [³H]Aldosteron = 5nM

$B_{unspez}(5nM)$ = unspezifische Bindung bei [³H]Aldosteron = 5nM

* bzw. sonstige untersuchte Steroide

4.2.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse

4.2.3.1 Scatchard-Experiment

Je Konzentration von 0,25 nmol/l bis 8 nmol/l wurden je zwei Wertepaare ermittelt, die bei Inkubation mit [³H]Aldosteron alleine der Gesamtbindung B_{ges} und bei Inkubation mit dem 1000fachen Überschuss an kaltem Aldosteron der unspezifischen Bindung B_{unspez} entsprachen. Da die unspezifische Bindung im Gegensatz zur spezifischen Bindung im eingesetzten Konzentrationsbereich annähernd linear von der Konzentration abhängig ist, wurde durch Bildung der Mittelwerte für die unspezifische Bindung eine Ausgleichsgerade berechnet und die sich daraus als Funktion der Konzentration ergebenden Werte für die unspezifische Bindung von den Werten für die Gesamtbindung abgezogen. Diese Differenz stellt die

spezifische Bindung von $[^3\text{H}]$ Aldosteron in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an den hMR dar.

Unter der Annahme, dass die Bindung dem Massenwirkungsgesetz folgt und sich nach der Inkubation ein Gleichgewicht eingestellt hat, nur ein Rezeptortyp mit einer konstanten Bindungsaffinität bzw. einem konstanten K_d -Wert vorliegt und der gebundene Anteil des Steroids einen Bruchteil des zugesetzten ausmacht und somit die Konzentration im Ansatz der zugesetzten Konzentration entspricht, darf die spezifische Bindung wie in Gleichung 4.1 als Funktion der Konzentration dargestellt werden [103] (Gleichung 4.3):

$$B_{\text{spez}}(X) = \hat{B}_{\text{spez}} \cdot \frac{X}{K_d + X}$$

$B_{\text{spez}}(X)$ = spezifische Bindung in Abhängigkeit von X
[dps = Bq]

\hat{B}_{spez} = max. spezifische Bindung [dps = Bq]

X = eingesetzte $[^3\text{H}]$ Aldosteron-Konzentration

K_d = Konzentration halbmaximaler Sättigung der
spez. Bindung

Gleichung 4.3: Spezifische Bindung in Abhängigkeit von der Aldosteronkonzentration

Mittels nichtlinearer Regression wurden die Parameter \hat{B}_{spez} und K_d unter Minimierung der Summe der Abstandsquadrate berechnet und die Funktion in Verbindung mit den Messpunktmittelwerten graphisch dargestellt (Abbildung 5.4, S. 66).

4.2.3.2 **Kompetitionsversuche**

Im Rahmen der Kompetitionsversuche wurde zunächst bei jedem Ansatz die maximale spezifische Bindung bei der eingesetzten $[^3\text{H}]$ Aldosteronkonzentration von 5nmol/l $\hat{B}_{\text{spez}}(5nM)$ und die spezifische Bindung unter Konkurrenz in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration des Kompetitors $B_{\text{spez}}(X)$ als Differenz der gemessenen Gesamtbindung $B_{\text{ges}}(X)$ und der unspezifischen Bindung B_{unspez} ermittelt (Tabelle 4.6). Unter Verwendung der so ermittelten Daten und unter Einsatz der folgenden Gleichung, die die kompetitive Bindungskurve beschreibt, wurden die IC_{50} -Werte mittels nichtlinearer Regression für die untersuchten Steroide berechnet (Gleichung 4.4) [103].

$$B_{spez}(X) = \frac{\hat{B}_{spez}(5nM)}{1 + 10^{\log(X) - \log(IC_{50})}}$$

$B_{spez}(X)$ = spezifische Bindung in Abhängigkeit von X
 [dps = Bq]
 $\hat{B}_{spez}(5nM)$ = max. spezifische Bindung [dps=Bq] durch
 [³H]Aldosteron alleine (5nmol/l)
 X = eingesetzte Steroidkonzentration
 IC_{50} = Konzentration des Kompetitors bei
 halbmaximaler Sättigung des Rezeptors

Gleichung 4.4: Spezifische Bindung in Abhängigkeit von der eingesetzten Steroidkonzentration

Die graphische Darstellung der Funktion erfolgte als anteilige Bindung in % durch Division der $B_{spez}(X)$ durch $\hat{B}_{spez}(5nM)$. Bei ermittelten Bindungswerten, die keinen Anhalt auf stattgehabte Bindung an den hMR zeigten, erfolgte lediglich die graphische Darstellung der Mittelwerte.

Zur Berechnung des K_i -Wertes als Konzentration halbmaximaler Rezeptorbindung bzw. halbmaximaler Hemmung der Bindung des Tracers durch den Kompetitor wurde die Cheng-Prusoff-Gleichung (Gleichung 4.5) zu Grunde gelegt[28]:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[Tracer]}{K_d}}$$

K_i = K_i -Wert
 IC_{50} = Konzentration des Kompetitors bei
 halbmaximaler Sättigung des Rezeptors
 [Tracer] = eingesetzte [³H]Aldosteron-Konzentration
 K_d = K_d -Wert von [³H]Aldosteron im verwendeten
 System (aus Scatchard-Experiment)

Gleichung 4.5: Berechnung des K_i -Wertes

4.3 Progesteroninfusionsstudie

4.3.1 Konzeption der Progesteroninfusionsstudie

Im Rahmen der Progesteroninfusionsstudie wurde Patienten ohne Nebennierenfunktion per infusionem exogenes Aldosteron und Progesteron zugeführt. Ziel der Studie war es, die tatsächliche antimineralocorticoide *in vivo*-Potenz von Progesteron zu ermitteln, da *in vitro*-Untersuchungen jeweils nur einen Teilaspekt der sehr komplexen Interaktion von Progesteron, seinen Metaboliten und Aldosteron mit dem Mineralocorticoidrezeptor beschreiben.

Vor Beginn der Studie wurde das Studiendesign schriftlich fixiert und der Ethikkommission des UKBF zur Prüfung vorgelegt und durch diese genehmigt. Die Leitung der Studie hatte Dr. med. Marcus Quinkler, Med. Klinik IV, Abteilung für Endokrinologie und Ernährungsmedizin, UKBF Berlin.

4.3.2 Probanden

Als Probanden wurden acht Patienten ohne Nebennierenfunktion unterschiedlicher Ursache (Tabelle 4.7) mit einem Alter zwischen 38 und 62 Jahren gewählt.

Tabelle 4.7: Probanden der Progesteroninfusionsstudie

| Nr. | Patient | Ätiologie der adrenalen Insuffizienz | Erstdiagnose | Geschlecht | Alter [Jahre] | BMI [kg/m ²] |
|-----|----------|--|--------------|------------|------------------|-----------------------------|
| W1 | I. B. | Bilaterale Adrenalektomie wegen Cushing-Syndrom | 06/1991 | ♀ | 53 | 20,0 |
| W2 | K. S. | M. Addison unklarer Genese | 10/1990 | ♀ | 57 | 23,6 |
| M1 | U. W. | Autoimmunadrenalitis | 02/1997 | ♂ | 37 | 23,9 |
| W3 | M. K. | M. Addison unklarer Genese | 04/1971 | ♀ | 62 | 20,8 |
| M2 | K.-W. K. | Bilaterale Adrenalektomie wegen Cushing-Syndrom | 06/1962 | ♂ | 45 | 30,9 |
| M3 | P.W. | Nebennieren-Tuberkulose | 06/1970 | ♂ | 57 | 28,4 |
| M4 | N.W. | Bilaterale Adrenalektomie wegen Cushing-Syndrom | 10/1977 | ♂ | 39 | 28,7 |
| M5 | B. B. | M. Addison unklarer Genese | 01/1997 | ♂ | 38 | 21,6 |

Auf Grund der fehlenden endogenen Aldosteronsekretion waren diese Patienten geeignete Probanden für die Studie, da eine Gegenregulation, die bei gesunden Probanden durch Aldosteronausschüttung erfolgen würde, ausbleibt. Eine Beschränkung auf männliche Probanden und weibliche postmenopausale Probandinnen erfolgte, um eine zyklusbedingte Progesteronsekretion auszuschließen.

Zur Teilnahme an der Studie wurden die Patienten ärztlich untersucht und eine ausführliche Anamnese erhoben. Labormedizinische Befunde (Blutbild, Blutzucker, z. T. Urinstatus) aus der Patientenakte sowie zu Beginn der Studie bestimmte Werte (Natrium, Kalium und Kreatinin im Serum) wurden zum Ausschluss eines Infektes, einer Nierenfunktionsstörung oder einer vorbestehenden Elektrolytentgleisung herangezogen.

Als Ausschlusskriterien wurden akute und chronische Infektionskrankheiten, psychiatrische Erkrankungen, Krampfleiden, Niereninsuffizienz, Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen, Polyurie, Polydipsie, Elektrolytentgleisungen, geplante oder gerade durchgeführte Impfungen sowie Vorbehandlung mit Immunsuppressiva definiert.

Die Probanden wurden im Vorfeld der Studie schriftlich über das Studiendesign informiert und erklärten schriftlich ihre Bereitschaft zur Teilnahme an der Studie. Für alle Probanden wurde eine Probandenversicherung abgeschlossen.

4.3.3 Herstellung der Infusionslösungen

4.3.3.1 Herstellung der Progesteroninfusionslösung

Zur Herstellung der Progesteronstammlösung wurden 208,4ml Ethanol 95%Vol. p. i. mit 11,6 ml Aqua ad inject. versetzt. In 200ml dieser 90Vol% Ethanollösung wurden 4.000mg Progesteron aufgelöst und steril filtriert. Als Trägerinfusion diente eine unter sterilen Bedingungen hergestellte Mischung aus 215ml Glucose 5% Infusionslösung, 215ml Sterofundin[®]-Infusion und 70ml Humanalbumin 20%. 10ml der Trägerinfusion wurden entnommen und verworfen. Mittels einer an einen Drei-Wege-Hahn angeschlossenen 1ml-Spritze wurden nun in einem Zeitraum von 10min unter ständigem Schütteln 10ml der Progesteronstammlösung in die Trägerinfusion gegeben, wobei ein Zurückfließen der Trägerinfusion in die 1ml-Spritze durch Öffnen und Schließen des Drei-Wege-Hahns verhindert wurde. Die Herstellung der Progesteroninfusionslösung erfolgte unmittelbar vor der Verabreichung, die durch eine Infusionspumpe erfolgte.

4.3.3.2 Herstellung der Aldosteroninfusionslösung

150µg Aldosteron zu Infusionszwecken wurde nach den Angaben des Herstellers in 3ml Aqua ad inject. gelöst und in 500ml 0,9%ige NaCl-Infusionslösung überführt. Die Verabreichung der Aldosteroninfusion erfolgte durch eine Infusionspumpe.

4.3.4 Durchführung und Ablauf der Studie

4.3.4.1 Glucocorticoid- und Mineralocorticoid-Substitutionstherapie

Die Hydrocortison-Substitution der Patienten wurde bis zum Nachmittag des Tages vor Infusionsbeginn fortgeführt. Am Morgen des Testtages erhielten die Patienten um 8 Uhr als Glucocorticoidersatz 1mg Prednisolon p. o. gefolgt von 0,5mg Prednisolon p. o. alle 2 Stunden, um eine Addisonkrise zu verhindern und gleichzeitig einen mineralocorticoiden Effekt der sonst üblichen Hydrocortison-Substitution auszuschließen.

Die Mineralocorticoidsubstitution mit 9α-Fluor-Cortisol wurde vier Tage vor Studienbeginn abgesetzt. Die Probanden wurden darauf hingewiesen, keine übermäßig kochsalzhaltige oder -arme Nahrung einzunehmen, um eine Elektrolytentgleisung im Vorfeld zu verhindern.

Durch das Absetzen der Medikation wurde bei den Patienten ein leicht hypomineralocorticoider Zustand mit einem hohen Natrium/Kalium-Quotienten im Urin angestrebt.

4.3.4.2 Verabreichung der Aldosteron- und Progesteroninfusion

Vor Beginn der Infusionsstudie wurde den Probanden an beiden Armen im Bereich der V. basilica bzw. der V. cephalica eine Venenverweilkanüle gelegt und deren korrekte Lage durch Spülung bzw. initiale Blutentnahme überprüft. Jede der beiden Kanülen wurde entweder nur zur Verabreichung der Infusion oder nur zur Blutentnahme genutzt.

Die Aldosteroninfusion erfolgte kontinuierlich über den gesamten Zeitraum der Studie von 8½ Stunden mit einer Infusionsrate von 12,5µg/h. Nach 4 Stunden wurde die Progesteroninfusion mit einer Infusionsrate von zunächst 0,15mg/kg*h begonnen, wobei nach 90 Minuten die Infusionsrate für die verbleibenden 3 Stunden auf 0,65mg/kg*h gesteigert wurde.

4.3.4.3 Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme während der Studie

Um eine ausreichende Urinproduktion zu gewährleisten, wurden die Probanden dazu angehalten, 250ml natriumarmes Mineralwasser pro Stunde zu trinken. Nach 4 Stunden gegen 12:30 wurde den Probanden eine Mahlzeit serviert.

4.3.4.4 Blutentnahmen

Im Rahmen der Studie erfolgten halbstündlich Blutentnahmen zur Gewinnung von Serum oder EDTA-Blut zur Bestimmung von Serum-Natrium, -Kalium, Aldosteron und Reninkonzentration im Plasma (PRC).

Vor und während der Progesteroninfusion erfolgte zusätzlich aus dem gewonnenen Blut die Bestimmung von Progesteron, 17 α -Hydroxy-Progesteron und Desoxycorticosteron (DOC) im Plasma sowie von Dehydroepiandrosteron (DHEA), Androstendion, Estron und Testosteron im Serum. Einmalig wurde initial bei jedem Probanden Blut für die Bestimmung von Kreatinin, Albumin und SHBG (Sexualhormon bindendes Globulin) gewonnen.

4.3.4.5 Urinproben

Halbstündlich wurden die Probanden dazu aufgefordert, ihre Blase vollständig zu entleeren. Die Urinmenge wurde gemessen und eine Urinprobe von 15ml zur Bestimmung von Natrium, Kalium und Chlorid im Urin gewonnen.

Des weiteren wurden 17 α -Hydroxy-Progesteron, Prednisolon und Prednison im Urin bestimmt.

4.3.4.6 Kreislaufüberwachung

Zur Kreislaufüberwachung wurde alle zwei Stunden der Blutdruck und der Puls gemessen.

4.3.5 Analyseverfahren

Bei allen bestimmten Werten handelt es sich um Einfachbestimmungen je Zeitpunkt und Proband.

4.3.5.1 *Natrium, Kalium, Chlorid*

Die Bestimmung von Natrium und Kalium im Blut erfolgte mittels indirekter Potentiometrie, die Bestimmung im Urin wurde flammenphotometrisch im Rahmen des Routinebetriebs im Zentrallaboratorium des UKBF durchgeführt. Die Chloridbestimmung im Urin erfolgte mittels direkter Potentiometrie im Deutschen Institut für Ernährung (Tabelle 3.10, Seite 28; Tabelle 3.8, Seite 28).

4.3.5.2 *Kreatinin, SHBG, Albumin*

Die Bestimmung von Kreatinin im Serum und Urin, SHBG und Albumin im Serum erfolgte durch das Zentrallaboratorium des UKBF (Bestimmungsverfahren und eingesetzte Kits siehe Tabelle 3.10, Seite 28).

4.3.5.3 *Renin*

Die Bestimmung der Reninkonzentration im Plasma wurde unter Verwendung eines für die klinische Diagnostik zugelassenen IRMA-Komplettkits nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (Tabelle 3.9, Seite 28).

4.3.5.4 *Aldosteron, Progesteron, 17 α -OH-Progesteron, DHEA, Androstendion, Estron, Testosteron, DOC*

Die Bestimmung von Aldosteron, Progesteron, 17 α -Hydroxy-Progesteron, Estron, Testosteron, DHEA und Androstendion (4-Androsten-3,17-dion) erfolgte mittels Coated Tube Radioimmunoassay (CT-RIA) nach den Angaben der Hersteller der kommerziell erhältlichen und für die klinische Diagnostik zugelassenen Kits (Tabelle 3.9, Seite 28).

Zur Bestimmung von 17 α -Hydroxy-Progesteron wurde eine Extraktion nach Lee et. al. wie vorbeschrieben durchgeführt[83].

Desoxycorticosteron wurde im pharmakologischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg nach Extraktion mittels Silitsäulenchromatographie im Radioimmunoassay bestimmt.

4.3.5.5 *Prednisolon, Prednison*

Die Bestimmung von Prednison und Prednisolon erfolgte mittels HPLC im Laboratorium von Prof. Dr. Schöneshöfer, Krankenhaus Berlin-Spandau.

4.3.6 *Statistische Auswertung der Ergebnisse*

Für alle bestimmten Werte wurde der Mittelwert sowie der Standardfehler (SEM) ermittelt. Die statistische Signifikanz der ermittelten Werte wurde mittels Wilcoxon-Test bestimmt, wobei eine statistische Signifikanz bei $p < 0,05$ angenommen wurde. Auf Grund der kleinen Probandenzahl ist die bestmögliche zu erreichende Signifikanz bei $n = 8$ im Wilcoxon-Test $p = 0,012$.