

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Geräte für die Subfraktionierung von Hirngewebe der Ratte, die Extraktion, die High Pressure Liquid Chromatography (HPLC), den Radioimmunoassay (RIA) und die Proteinbestimmung sowie sonstige Geräte.

- Eppendorf-Pipetten, einstellbar 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettenspitzen 100 μ l, 1000 μ l (Eppendorf, Hamburg)
- Eppendorf-Multipette (Eppendorf, Hamburg)
- Combitips für die Multipette (0,5; 1,25; 2,5; 5,0; 12,5ml) (Eppendorf, Hamburg)
- Transferpipette (Sarstedt AG, Hannover)
- Reaktionsgefäße, 2ml (Eppendorf, Hamburg)
- Ultrazentrifugenröhrchen 14ml, 38ml (Beckman Instruments, Palto Alto, USA)
- Reagenzgläser 2,5ml, 55x12mm (Sarstedt AG, Hannover)
- Vorlaufgefäße mit konischer Spitze 10x55mm (Sarstedt AG, Hannover)
- Syring-Spritze 3ml (Becton-Dickinson, Basel, Schweiz)
- Sep-Pak Kartuschen C18 (Waters, Mass, USA)
- Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel 50ml (Sarstedt AG, Hannover)
- Polystyrol-Einwegküvetten für Photometer (Sarstedt AG, Hannover)
- Rack LKB 5 x 10 (Amersham Pharmacia, Freiburg)
- Glas-Teflon-Homogenisator mit 200 μ m Wandabstand (Braun Biotech International, Melsungen)
- Homogenisationsmotor (IKA, Staufen i. Breisgau)
- Schwenkbecherrotor SW 41 Ti (Beckman Instruments, Palto Alto, USA)
- Ultrazentrifuge L8-55 (Beckman Instruments, Palto Alto, USA)
- Tisch-Zentrifuge 5413 (Eppendorf, Hamburg)

- Zentrifuge Cryofuge 8000 (Heraeus Christ, Osterode)
- Wirbelmixer VF 2 (IKA, Staufen i. Breisgau)
- Ultraschallwasserbad (Amersham Pharmacia, Freiburg)
- Vakuum-Konzentrator (Savant, München)
- Photometer Pharmacia LKB Ultraspec III (Amersham Pharmacia, Freiburg)
- Autosampler ISS 200 (Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim)
- Gradient Pump 2249 (Amersham Pharmacia, Freiburg)
- HPLC Autosampler 565 2500 (Bio-Tek Instruments GmbH, Neufahrn)
- HPLC Pump System 52X (Bio-Tek Instruments GmbH, Neufahrn)
- 5µm Eurospher 100-C18, 4x250mm Säule (Kauer GmbH, Berlin)
- Gamma Counter Gamma Master 1277 (LKB Wallac, Turku, Finnland)
- 1470 Wizard Multi-Detector Gamma Counter (Amersham Pharmacia Freiburg)
- Analysenwaage Typ 2604 (Sartorius, Göttingen)
- Guillotine (Harvards, London)
- Magnetrührer Combimag RCH (IKA, Staufen i. Breisgau)
- Messing Platte
- Mikropräparationspinzetten (Moria-Dugast S.A., Paris, Frankreich)
- pH-Meter 761 (Knick, Berlin)

3.2 Chemikalien und Reagenzien

- Acetonitril 99,9% (Merck, Darmstadt)
- Antiserum gegen Thyroxin (T₄) (Prof. Meinhold, UKBF, Berlin)
- Antiserum gegen Trijodthyronin (T₃) (Prof. Meinhold, UKBF, Berlin)
- Bovines Gamma Globulin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Bovines Serum-Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Dikaliumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)
- Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck, Darmstadt)
- Essigsäure 100% (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Farbreagenz für Proteinbestimmung (BIO-RAD, München)
- HPLC-Wasser (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- ¹²⁵Jod (Amersham Buchler, Braunschweig)
- ¹²⁵J -Thyroxin ([¹²⁵I]-T₄) (AG Baumgartner, UKBF Berlin)
- ¹²⁵J -Trijodthyronin ([¹²⁵I]-T₃) (AG Baumgartner, UKBF Berlin)
- Kaliumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)
- L-Cystein (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- L-Iopansäure (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Magnesiumchlorid MgCl₂ (Merck, Darmstadt)
- Merthiolat (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Methanol 99,9% (Merck, Darmstadt)
- Natriumhydrogenphosphat-Monophosphat (Merck, Darmstadt)
- Natriumhydroxid (Merck, Darmstadt)
- Polyethylenglycol 6000 PEG (Serva, Heidelberg)
- Saccharose (Merck, Darmstadt)
- Trockeneis CO₂ (Eis-Czaby, Berlin)

3.3 Versuchstiere

Bei den Tieren handelte es sich um männliche Sprague-Dawley-Ratten von der Firma Tierzucht Schönwalde mit einem Gewicht zwischen 250 und 300g.

Die Versuche wurden im Rahmen eines vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigten Versuchsvorhabens durchgeführt (Genehmigungsnummer G 0073/98). Die Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken wurde angezeigt (T0129/01).

Die Tiere wurden jeweils zu viert in einem Käfig gehalten bei einer Temperatur von 20°C und einem simulierten 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus, wobei der Tag um 6.00 Uhr morgens und die Nacht um 18.00 Uhr abends begannen. Vor der ersten Behandlung oder sonstigen Intervention hatten die Tiere eine vierwöchige Eingewöhnungszeit und bekamen Futter und Wasser ad libitum. Am Ende der jeweiligen Untersuchung wurden die Tiere zwischen 11.00 und 13.00 Uhr ohne Betäubung dekapitiert. Kontrolltiere wurden gleichzeitig und unter gleichen Bedingungen gehalten.

3.4 Versuchsdurchführung

Alle Untersuchungen dieser Studie wurden in der Charité Universität Medizin, Campus Benjamin Franklin in der Arbeitsgruppe von Prof. Baumgartner durchgeführt. Die subzelluläre Fraktionierung des Rattenhirnhomogenats wurde mit Unterstützung von Dr. O. Brödel durchgeführt. Bei der Durchführung des HPLC war Dr. A. Jeitner behilflich.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit war es nicht möglich, alle Untersuchungsschritte selbst durchzuführen. Ich habe selbst die Extraktion der Schilddrüsenhormone aus subzellulären Fraktionen, die Quantifizierung durch Radioimmunoassay und die Proteinbestimmungen durchgeführt.

3.5 Methoden

3.5.1 Tiergruppen

3.5.1.1 Experiment 1: Hypothyreose und Hyperthyreose

3.5.1.1.1 Induktion einer hypothyreoten Stoffwechsellaage

Zwölf Tiere wurden zur Induktion einer Hypothyreose über einen Zeitraum von sechs Wochen mit Methimazol und KClO_4 behandelt. Es wurden dem Trinkwasser 0,025% Methimazol sowie 1% KClO_4 beigefügt.

3.5.1.1.2 Induktion einer hyperthyreoten Stoffwechsellaage

Zur Induktion einer Hyperthyreose wurde sowohl T_3 verabreicht, als auch in getrennten Versuchsgruppen T_4 in zwei verschiedenen Konzentrationen. Eine Versuchsgruppe bekam über einen Zeitraum von vier Wochen $24\mu\text{g T}_4 / 30\text{ml Trinkwasser}$, um eine geringgradige Hyperthyreose zu induzieren. Die durchschnittliche Trinkwasseraufnahme lag bei etwa 30 ml pro Tier und Tag, was einer T_4 -Aufnahme von $24\mu\text{g}$ pro Tier und Tag entspricht. Eine stärkere T_4 -induzierte Hyperthyreose wurde durch eine sechswöchige Behandlung mit $96\mu\text{g T}_4 / 30\text{ml Trinkwasser}$ erzielt. Hierbei nahm das Einzeltier bei der Behandlung etwa $96\mu\text{g}$ pro Tag auf. Eine T_3 -induzierte Hyperthyreose wurde durch den Zusatz von $20\mu\text{g T}_3$ auf 30 ml Trinkwasser erreicht. Bei diesem Versuch nahmen die Tiere in etwa $20\mu\text{g T}_3$ pro Tier und Tag auf. Die Gruppengröße betrug bei allen genannten Versuchsgruppen $n = 12$.

Zur Stabilisierung der Schilddrüsenhormone in Leitungswasser wurde allen Lösungen eine 1% BSA-Lösung zugesetzt und zusätzlich wurden die Trinkbehälter mit Alufolie umwickelt, um sie vor Lichteinfall zu schützen.

3.5.1.2 Experimente 2-4: Untersuchung verschiedener Stressoren

3.5.1.2.1 Experiment 2: Intraperitoneale Injektionen einmal täglich über 14 Tage

Zwölf Tiere wurden zwei Wochen lang einmal täglich einer intraperitonealen Injektion mit 1ml 0,9% physiologischer Kochsalzlösung unterzogen. Die Tiere wurden 24 Stunden nach der letzten Injektion getötet. Die Befunde wurden mit jenen von unbehandelten Tieren (Kontrollgruppe) verglichen.

3.5.1.2.2 Experiment 3: Intraperitoneale Injektionen dreimalig innerhalb von 1,5 Stunden

Zwölf Tieren wurde innerhalb eines Zeitraumes von 1,5 Stunden dreimal jeweils 1ml 0,9% Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert und zwar um 11.00 Uhr, um 11.45 Uhr und um 12.30 Uhr. Die Tiere wurden zwei Stunden nach der ersten Intervention gegen 13.00 Uhr dekapitiert. Die Befunde wurden mit jenen von unbehandelten Kontrollgruppen verglichen.

3.5.1.2.3 Experiment 4: Schlafentzug

Zwölf Tiere wurden zwischen 6.00 Uhr morgens und 14.00 Uhr mittags über einen Zeitraum von acht Stunden durch unterschiedliche Manipulationen wach gehalten. Die Tiere waren jeweils zu viert in einem Käfig untergebracht. In den Anfangsstunden reichte dafür das Ein- und Ausschalten des Lichtes oder ein kurzes Anheben des Käfigdeckels, um die Tiere über längere Phasen wach zu halten. In den letzten Stunden mussten die Ratten dann durch gelegentliches Rütteln am Käfig oder durch Hochheben am Schwanz wach gehalten werden. Im Anschluss wurden die Tiere zwischen 14.00 und 15.00 Uhr zusammen mit unbehandelten Kontrolltieren getötet.

3.5.2 Tötung und Hirnpräparation

Die Tiere wurden ohne vorherige Betäubung mit Hilfe einer Guillotine dekapitiert und aus der Dekapitationswunde wurde von jedem Tier Blut gewonnen. Dieses wurde anschließend zentrifugiert und das gewonnene Serum kühl aufbewahrt.

Die Präparation des Gehirns erfolgte sofort im Anschluss an die Dekapitation nach der Methode von GLOWINSKI und IVERSEN (1966). Hierbei wurde der Schädel vom Hinterhauptsloch aus mit einer Kornzange nach außen aufgebrochen und die Schädeldecke dadurch entfernt. Das Gehirn wurde auf einer eisgekühlten Messingplatte durch zwei Transversalschnitte mit einem Skalpell in drei Teile zerlegt

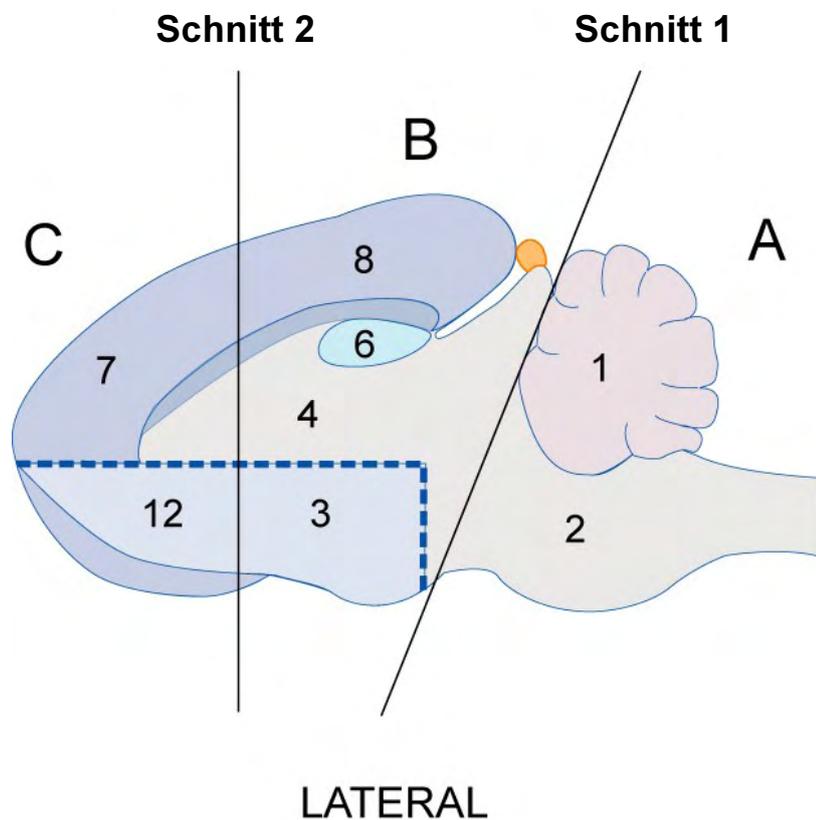


Abbildung 3.1 Zerlegung des Gehirns durch zwei transversale Schnitte in drei Teile

- 1 Cerebellum (**Cr**b), 2 Medulla (**Med**), 3 Hypothalamus (**Hyp**),
 4 Mittelhirn (**Mit**), 6 Hippocampus (**Hip**), 7 frontaler Kortex (**fK**),
 8 parietaler Kortex (**pK**), 12 limbisches Vorderhirn (**IV**)
 A Rhombencephalon, B anteriorer Part, C posteriorer Part

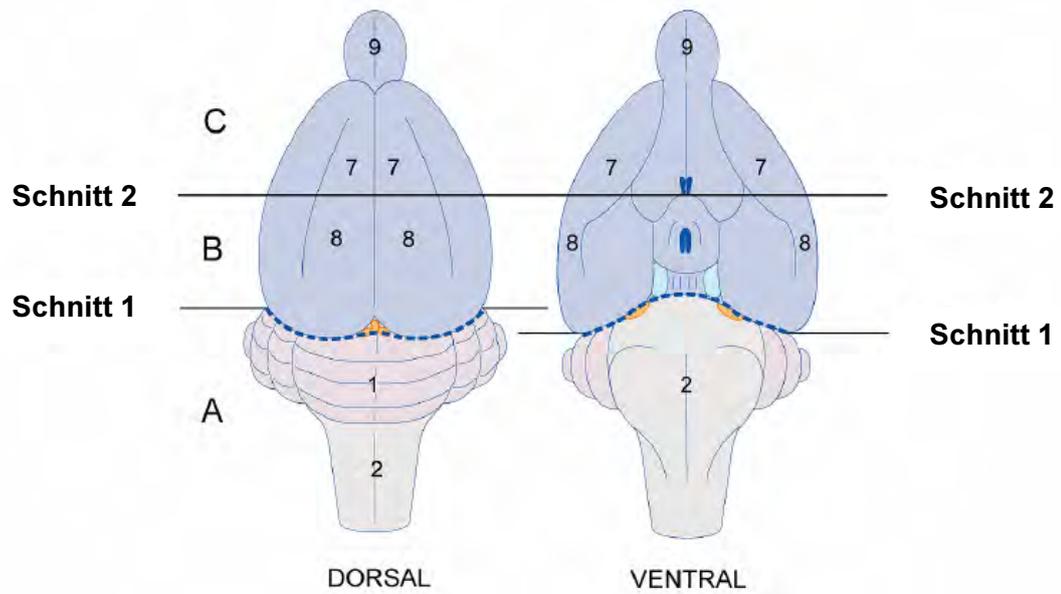


Abbildung 3.2 Gesamtgehirn der Ratte von dorsal und ventral mit den einzelnen Gehirnarealen
1 Cerebellum (**Crb**); **2** Medulla (**Med**); **3** Hypothalamus (**Hyp**);
7 Frontaler Kortex (**fK**); **8** Parietaler Kortex (**pK**); **9** Bulbus olfactorius (**Bo**)
A Rhombencephalon, **B** anteriorer Part, **C** posteriorer Part

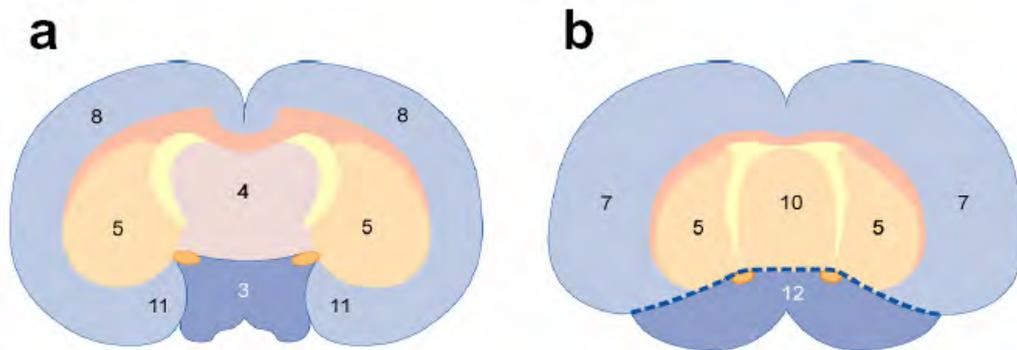


Abbildung 3.3 Ansicht der Schnittebenen des posterioren Teils (a) und des anterioren Teils (b)
3 Hypothalamus (**Hyp**); **4** Mittelhirn (**Mit**); **5** Striatum (**Str**);
7 Frontaler Kortex (**fK**); **8** Parietaler Kortex (**pK**);
10 Septum (**Sep**); **11** Amygdala (**Amy**); **12** limbisches Vorderhirn (**IV**)

Der erste Schnitt trennt die Hirnareale Medulla oblongata und Cerebellum vom übrigen Gehirn (A in Abb.3.1 + 3.2). Durch den zweiten Schnitt wird das restliche Gehirn in einen posterioren Teil (B in Abb.3.1 + 3.2, a in Abb. 3.3) und einen anterioren Teil (C in Abb.3.1 + 3.2, b in Abb. 3.3) getrennt.

Im posterioren Hirnabschnitt wurde zuerst der Hypothalamus (Hyp, 3 in Abb. 3.3) isoliert. Danach wurden das Mittelhirn (Mit, 4 in Abb.3.3), der hintere Teil des Striatums (Str, 5 in Abb.3.3), der Hippocampus (Hip, 6 in Abb.3.1), die Amygdala (Amy, 11 in Abb.3.3) und der parietale Kortex (pK, 8 in Abb.3.3) separiert.

Im anterioren Hirnabschnitt (C in Abb.3.1 +3.2, Abb.3.3b) wurden das limbische Vorderhirn (IV, 12 in Abb.3.3), das Septum (Sep, 10 in Abb.3.3), der vordere Teil des Striatums (Str, 5 in Abb.3.3) und der frontale Kortex (fK, 7 in Abb.3.3) voneinander getrennt.

Alle Hirnareale wurden nach der Isolierung sofort auf Trockeneis (CO₂) gebettet und tiefgefroren. Danach wurden die einzelnen Areale in 2ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bis zum Tag der subzellulären Fraktionierung bei -80°C gelagert.

3.5.3 Subzelluläre Fraktionierung

3.5.3.1 Allgemeines

Die hier angewandte Methodik der subzellulären Fraktionierung kombinierte einzelne Elemente von bereits früher beschriebenen methodischen Entwicklungen von LOVTRUP-REIN und McEWEN (1966) sowie von DODD et al. (1981). Die Entwicklung der subzellulären Fraktionierung sowie die diesbezüglichen Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation wurden von Herrn Dr. Oliver Brödel aus der Arbeitsgruppe der Verfasserin durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine "Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation". Dabei werden nach einer schonenden Homogenisierung der Gewebeprobe die einzelnen Zellorganellen und die Membranvesikel durch mehrere Zentrifugationsschritte mit jeweils anderen Sucrose-Dichtegradienten aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und Dichte voneinander getrennt und gereinigt. Die verschiedenen Arbeitsschritte wurden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt, um die Aktivitäten der Dejodaseisoenzyme so gering wie möglich zu halten.

Die Zentrifugationen erfolgten in einer Beckman L 8-55 Ultrazentrifuge mit einem TST 41 Ti Schwenkmotor mit 14 ml Polypropylen-Röhrchen.

Folgende Lösungen wurden für die subzelluläre Fraktionierung benötigt:

Kalium-Phosphat-Puffer pH 6,5	80,0mM KH ₂ PO ₄ 20,0mM K ₂ HPO ₄
0,32M Sucroslösung Homogenisationslösung	0,32M Sucrose 25,0µM Iopansäure
1,3M Sucroslösung	1,3M Sucrose 1,0mM MgCl ₂ 1,0mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 6,5
1,2M Sucroslösung	1,2M Sucrose 25,0µM Iopansäure
0,8M Sucroslösung	0,8M Sucrose 25,0µM Iopansäure

Abb.3.4: Lösungen für die subzelluläre Fraktionierung

3.5.3.2 Homogenisierung der Gewebeproben

Die tiefgefrorenen Gewebeproben der einzelnen Hirnareale wurden nach dem Wiegen mit einem Skalpell zerkleinert und in einen Glas-Teflon-Homogenisator überführt. Die Homogenisierung erfolgte unter ständiger Eiskühlung im zehnfachen Gewebevolumen einer 0,32M Sucroslösung (Homogenisationslösung) bei einer Geschwindigkeit von 750 Umdrehungen pro Minute (UpM). Vom Homogenat wurde ein Aliquot von 100µl des Gesamtvolumens vor der subzellulären Fraktionierung abgenommen, in welchem ebenfalls die Schilddrüsenhormonkonzentrationen bestimmt wurden.

3.5.3.3 Zentrifugation des Homogenates

Das Homogenat wurde in einem 14ml Zentrifugenröhrchen für 15 min bei 2600 UpM zentrifugiert. Der Überstand (Ü1) enthielt Mitochondrien, Myelin, Synaptosomen und Mikrosomen, welche in einem neuen Zentrifugenröhrchen auf Eis gestellt wurden.

Im Pellet befanden sich unhomogenisierte Gewebefragmente, Zellmembranen, Einzelzellen und Zellkerne. Das Pellet wurde in 2 ml Homogenisationslösung resuspendiert und erneut 10 Minuten bei 2200 UpM zentrifugiert.

Der erhaltene Überstand wurde mit dem ersten Überstand (Ü1) gemischt und zur Isolierung der Mitochondrien, des Myelins, der Synaptosomen und der Mikrosomen weiterverarbeitet.

3.5.3.4 Isolierung der Zellkerne

Aus dem gewaschenen Pellet wurden die Zellkerne isoliert. Das Pellet wurde in 1,3 M Sucroslösung vollständig resuspendiert und bei 19700 UpM für 45 Minuten ultrazentrifugiert. Das resultierende Pellet enthielt gereinigte Zellkerne und wurde in 500µl Homogenisationslösung resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt.

3.5.3.5 Isolierung der Mitochondrien

Der Überstand (Ü1) wurde mit Homogenisationslösung auf etwa 8,5 ml aufgefüllt und vermischt. Diese Suspension wurde vorsichtig mit 1,2 M Sucroslösung unterschichtet, um eine Gefahr einer Verwirbelung zu vermeiden und dann 30 Minuten bei 39000 UpM ultrazentrifugiert. Danach wurde der 0,32 M Sucroseüberstand (Ü2) verworfen und die Interphase (I1) wurde zur Weiterverarbeitung in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Pellet befanden sich die Mitochondrien, es wurde in 500µl Homogenisationslösung resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt.

3.5.3.6 Isolierung der Myelinfraktion und der Synaptosomen

Die Interphase (I1) wurde mit 9ml Homogenisationslösung aufgefüllt, resuspendiert und vermischt. Nach Unterschichtung mit 0,85 M Sucroslösung wurde die Suspension bei 39000 UpM für 15 Minuten ultrazentrifugiert. Im Überstand (Ü3) befanden sich die Mikrosomen. Die Interphase (I2) enthielt das Myelin und im Pellet befanden sich die Synaptosomen. Das Pellet wurde in 500µl Homogenisationslösung resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das Myelin wurde anschließend hypoosmotisch behandelt, um sicherzustellen, dass tatsächlich nur die im Myelin enthaltenen Schilddrüsenhormone und nicht diejenigen der in den "Myelinkugeln" enthaltenen Vesikelflüssigkeit gemessen wurden. Die Myelinsuspension wurde mit 4ml 25 µM Iopansäure verdünnt und gemischt und anschließend für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Suspension bei 10000 UpM für 15 Minuten ultrazentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Myelinpellet wurde resuspendiert und in ein 2ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt.

3.5.3.7 Isolierung der Mikrosomen

Zur Isolierung der Mikrosomen wurde der Überstand (Ü3) mit Homogenisationslösung aufgefüllt und bei 39000 UpM für 30 Minuten ultrazentrifugiert.

Das resultierende Pellet mit den enthaltenen Mikrosomen wurde in 500 μ l Homogenisationslösung resuspendiert und in ein 2ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde verworfen.

3.5.3.8 Pelletierung und Lagerung der Subfraktionen

Die Reaktionsgefäße mit den resuspendierten Subfraktionen wurden in einer Tischzentrifuge für 30 Minuten bei 14000 UpM zentrifugiert und die Überstände mit einer Transferpipette abgesaugt. Die Pellets wurden bis zur Extraktion der Schilddrüsenhormone bei -80°C gelagert.

3.5.3.9 Charakterisierung der subzellulären Fraktionen durch Elektronenmikroskopie und biochemische Marker

Die Reinheit und die morphologische Qualität der subzellulären Fraktionen wurden elektronenmikroskopisch durch Frau Prof. Dr. Gisela Stoltenburg (Abteilung für Neuropathologie, Charité Berlin) charakterisiert.

Alle Fraktionen zeigten einen hohen Reinheitsgrad mit nur geringgradigen Kontaminationen der jeweils anderen Fraktionen. Außerdem charakterisierten fraktionsspezifische biochemische Marker die Reinheit und die Ausbeute der unterschiedlichen Subfraktionen.

Die Zellkerncharakterisierung (Abb. 3.8) erfolgte durch DNA-Bestimmungen, welche eine zehnfache Anreicherung der DNA in der Kernfraktion gegenüber dem Homogenat zeigten. Die Mitochondrienreinheit (Abb.3.6) wurde mit Hilfe der Bestimmung der Succinatdehydrogenaseaktivität und der Cytochromoxidaseaktivität gemessen. Die Charakterisierung des Myelins (Abb.3.7) erfolgte über die CNPase-Aktivität und die Mikrosomenuntersuchung (Abb. 3.5) über die NADPH-Cytochrom-C-Reduktaseaktivität. Die cytosolische Verunreinigung der einzelnen Subfraktionen wurde über die Laktatdehydrogenaseaktivität untersucht. Die Ausbeute und Reinheit der Synaptosomenfraktion (Abb.3.9) wurde durch Western-Blots über Syntaxin und Synapsin quantifiziert. Diese Untersuchungen zeigten eine 4-bis 20-fache Anreicherung der jeweiligen Fraktion im Vergleich zum Homogenat. Nur in der synaptosomalen Subfraktion fanden sich nennenswerte Kontaminationen mit mitochondrialen Enzymen, da Mitochondrien einen integralen Bestandteil synaptischer Endplatten darstellen.

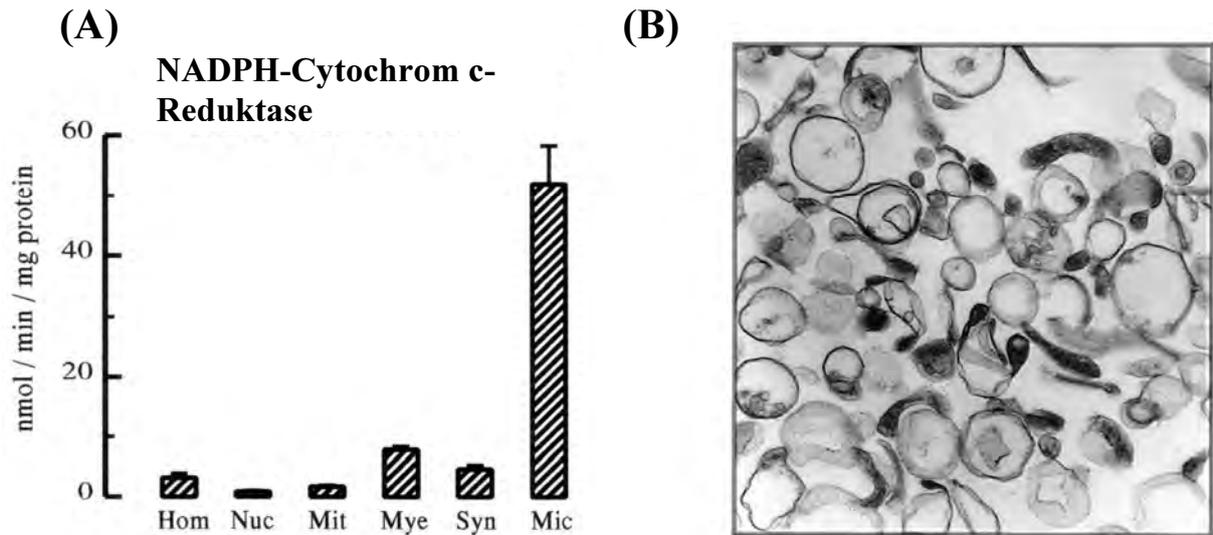


Abbildung 3.5 NADPH-Cytochrom c-Reduktase

Spezifische Aktivität der NADPH-Cytochrom c-Reduktase im Homogenat und in subzellulären Fraktionen (A) und elektronenmikroskopische Aufnahme der isolierten Mikrosomen, Vergrößerung 20000x (B).

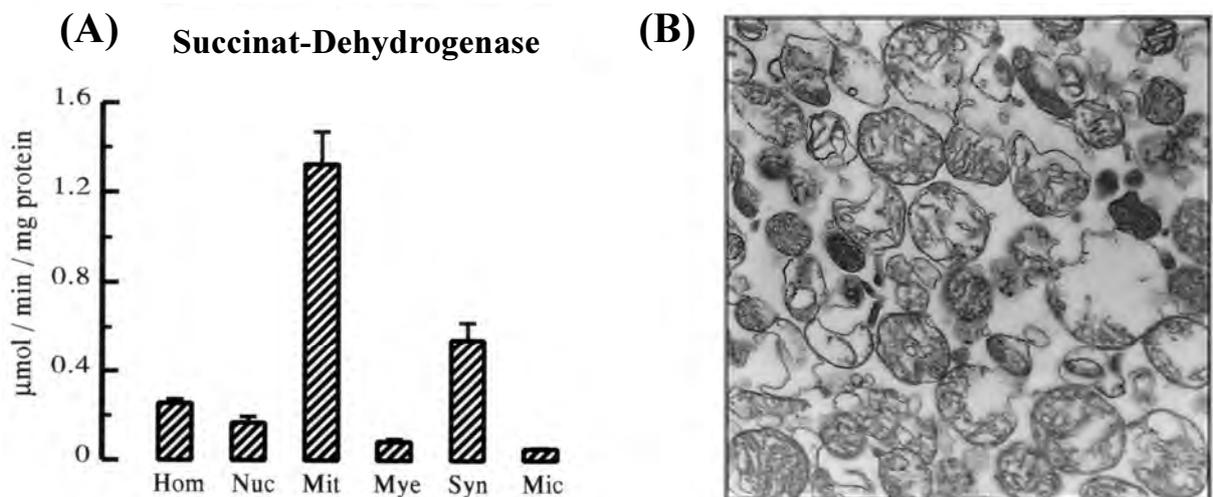


Abbildung 3.6 Succinat-Dehydrogenase

Spezifische Succinat-Dehydrogenase-Aktivität im Homogenat und in subzellulären Fraktionen (A) und elektronenmikroskopische Aufnahme der isolierten Mitochondrien, Vergrößerung 12000x (B).

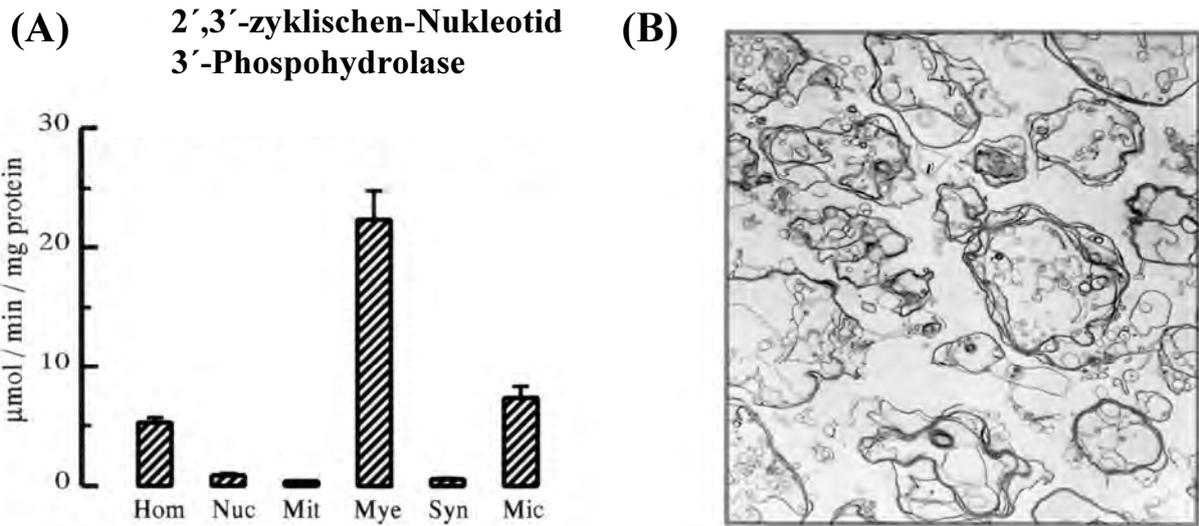


Abbildung 3.7 2',3'-zyklischen-Nukleotid 3'-Phosphohydrolase

Spezifische Aktivität der 2',3'-zyklischen-Nukleotid 3'-Phosphohydrolase (CNPase) im Homogenat und in den subzellulären Fraktionen (A) und elektronenmikroskopische Aufnahme der Myelinfraktion, Vergrößerung 7000x (B).

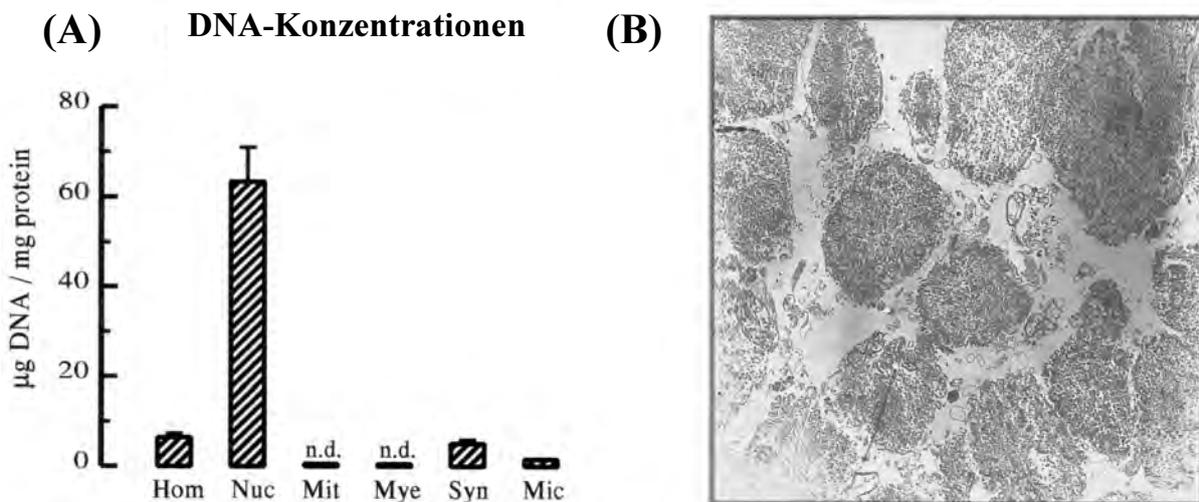
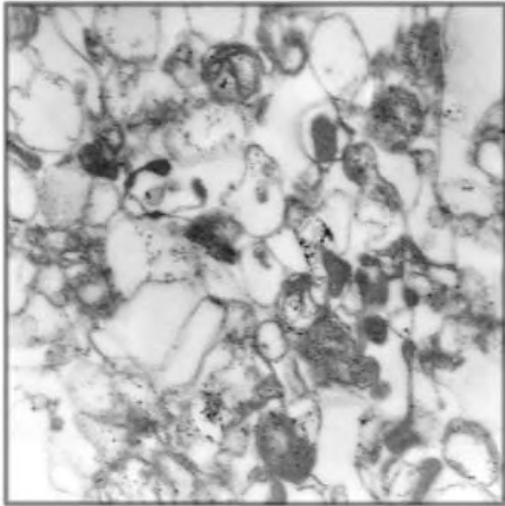


Abbildung 3.8 DNA-Konzentrationen

DNA-Konzentrationen im Homogenat und in den subzellulären Fraktionen (A) und elektronenmikroskopische Aufnahme der isolierten Zellkerne, Vergrößerung 3000x (B).

(A)



(B)

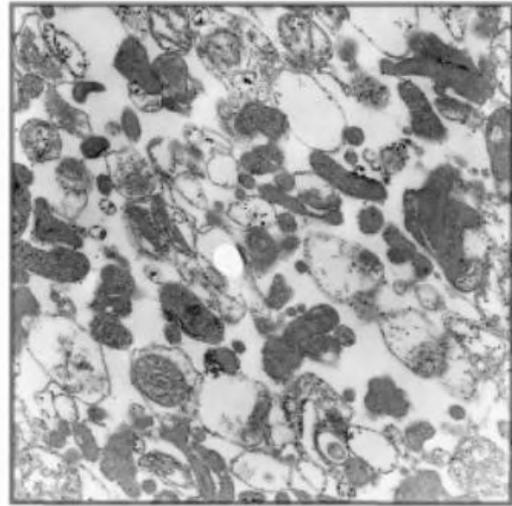


Abbildung 3.9 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der isolierten Synaptosomen

Vergrößerung 7000x. Links (A) wurden die Gewebeprobe vor der subzellulären Fraktionierung bei -80°C gelagert. Rechts (B) wurde die subzelluläre Fraktionierung unmittelbar nach der Präparation der Hirnareale durchgeführt, das Gewebe war nicht eingefroren worden.

3.5.4 Extraktion der Schilddrüsenhormone aus subzellulären Fraktionen

Nach der Subfraktionierung erfolgte die Extraktion der Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 mit Methanol. In jedes 2ml-Reaktionsröhrchen mit der entsprechenden Subfraktion wurde 1ml 99,9% Methanol gegeben. Außerdem wurden zu jeder Probe ca. 250cpm (counts per minute) radioaktiv markierte Schilddrüsenhormone ($^{125}\text{JodT}_3$ und $^{125}\text{JodT}_4$) in 100 μl Methanol hinzugefügt. Dies ermöglichte eine Identifizierung der einzelnen Hormone im HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) und eine Berechnung der Recovery der eingesetzten Radioaktivität nach der Extraktion und der HPLC anhand der noch vorhandenen Radioaktivität im Bezug auf die Ausgangsradioaktivität.

Die Resuspension der Proben erfolgte in einem Ultraschall-Wasserbad individuell für ca. 30-60 sec. Danach wurden sie 2min geschüttelt und anschließend 30min bei 14000 UpM in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen PTFE-Membranfilter (0,2 μm Porengröße) filtriert und nach Zugabe von 100 μl Aqua dest. wurden die Proben ca. 10h in einem Vakuum-Konzentrator getrocknet. Das Pellet mit den Organellenfragmenten wurde nach dem Trocknen bis zur Bestimmung des Proteingehaltes bei -20°C gelagert.

Es wurden außerdem Leerproben ('Blankwert', jeweils 10% der Probenanzahl) angefertigt, welche ebenso 1ml Methanol, die Tracer mit entsprechender Radioaktivität sowie 25 μl der

Homogenisationslösung enthielten. Diese Menge wurde anstelle der eigentlichen Probe beigefügt und entsprach dem durchschnittlichen Probenvolumen. Die Blanks dienen als Qualitätskontrolle, um zu prüfen, ob die Extraktion, die HPLC-Reinigung und der RIA ohne Vorhandensein von Hormonen bereits Hormonkonzentrationen anzeigen.

3.5.5 Isolierung und Reinigung der Schilddrüsenhormone mittels HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)

Bei der Chromatographie beruht die Trennung von einzelnen Komponenten auf ihrer unterschiedlichen Polarität. Wenn man ein Gemisch unpolarer Stoffe auf ein unpolares Material in einer Säule, die als stationäre Phase dient, aufträgt, binden sich diese durch hydrophobe Wechselwirkungen an das Material. Spült man anschließend mit einem polaren Lösungsmittel, welches die mobile Phase darstellt, so wandern die aufgetragenen Substanzen ihrer Polarität und Größe entsprechend mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch die Säule. Hydrophile kleine Stoffe gehen nur geringe Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial ein und werden zuerst eluiert. Hydrophobe große Stoffe werden dementsprechend später eluiert. Als Säulenmaterial (stationäre Phase) dienen bei der HPLC sehr kleine Kieselgelpartikel und benötigen daher erhöhten Druck. Die mobile Phase besteht aus wässrigen Lösungsmitteln (z.B. Puffer) mit zunehmendem Anteil an unpolarem Acetonitril (CH_3CN). Die Zusammensetzung der mobilen Phase wird mit Hilfe programmierbarer Gradientenmischer gesteuert. An der Durchführung der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) war Herr Dr. A. Jeitner (Arbeitsgruppe Prof. Baumgartner, Charité, Berlin) behilflich.

Zur Trennung und Reinigung der Schilddrüsenhormone werden die Hormonextrakte in 1400 μl einer Suspensionslösung aus 36 % Acetonitril, 64 % HPLC-Wasser und zur Verhinderung der spontanen Dejodierung der Schilddrüsenhormone zusätzlich mit 1 % Essigsäure resuspendiert. Im Anschluss wurden die Proben 10 s geschüttelt und für 10 min im Ultraschallbad behandelt, diese Prozedur wurde zweimal wiederholt. Die Trennung der Hormone erfolgte mit einer 5 μm Eurospher 100-C18, 4 x 250 mm Säule (Knauer, Berlin). Zunächst wurde die Säule mit einer Lösung aus 43 % Acetonitril und 57 % Wasser (enthielt 1% Essigsäure) bei einer Durchflussrate von 1ml/min äquilibriert. Nach dem Auftragen der Probe wurde ein linear aufsteigender Gradient mit einer Endkonzentration von 45 % Acetonitril und 55 % Wasser (enthielt 1% Essigsäure) eingestellt, welche nach 15 min erreicht wurde. Das kleinere Hormon T_3 wurde nach etwa 7- bis 10 Minuten eluiert, das

größere Hormon T₄ nach etwa 15- bis 17 Minuten. Nach 21 Minuten wurde das System für 5 min auf 100 % Acetonitril eingestellt, um die Säule von eventuell darin verbliebenen Geweberesten zu säubern. Danach wurde in einer 5-minütigen Äquilibrierungsphase die Ausgangskonzentration von 43% Acetonitril und 57% Wasser wiederhergestellt. Mithilfe eines Gammacounters wurden die Hormone anhand ihres radioaktiven Signals identifiziert, in Glasröhrchen gesammelt und anschließend in einem Vakuum-Verdampfer ca. 10 h getrocknet. Die getrockneten Hormone T₃ und T₄ wurden im Gammacounter gemessen, um aus den Zählraten der Proben den Wiederfindungsfaktor (Recovery) der entsprechenden Hormone zu ermitteln. Dies erfolgt durch Division der Aktivität des vor der Extraktion hinzugefügten markierten Hormons durch die Zählrate der Probe. Die Proben wurden bis zur Weiterbearbeitung bei -20°C gelagert.

3.5.6 Radioimmunologische Bestimmung der T₃- und T₄- Konzentrationen

3.5.6.1 Allgemeines

Die T₃- und T₄ - Quantifizierungen in subzellulären Fraktionen wurden nach der von PINNA et al. (1999) entwickelten RIA-Methode durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode können T₃- und T₄- Konzentrationen sowohl in Homogenaten als auch in subzellulären Fraktionen von kleinen Hirnarealen, wie z.B. der Amygdala bestimmt werden.

Das Prinzip des Radioimmunoassays (RIA) besteht in einer Konkurrenzreaktion zwischen einem radioaktiv markierten Antigen definierter Konzentration (Tracer) und dem zu untersuchenden unmarkierten Antigen unbekannter Konzentration um die Bindung an einen limitiert vorhandenen Antikörper. Es konkurriert ein mit Jod¹²⁵ markiertes Schilddrüsenhormon als Tracer mit dem zu messenden Hormon um die Bindung am Antikörper. Je höher die Konzentration unmarkierter Antigene, desto höher ist die Verdrängung der markierten Tracermoleküle (Antigene) vom Antikörper.

Nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes werden die Antigen-Antikörper-Komplexe durch Ausfällen vom ungebundenen Antigen separiert und die Radioaktivität des Niederschlages wird gemessen. Als Vergleich dient eine Standardkurve mit bekannten Konzentrationen an unmarkierten Hormonen, anhand welcher die Konzentration der zu untersuchenden Probe bestimmt wird.

3.5.6.2 Reinigung des Tracers für die T₃- und T₄- Bestimmung

Da die radioaktiv markierten Schilddrüsenhormone T₃ und besonders T₄ einer spontanen Dejodierung unterliegen, war es erforderlich, vor dem RIA das freigesetzte Jod aus dem Tracer zu entfernen. Die Reinigung des Tracers erfolgte mit Hilfe von Sep-Pak C18 Kartuschen, welche zuerst mit 1 ml 99,9 % Methanol äquilibriert wurden.

Die berechnete Menge des Tracers wurde mit 1 ml 50 % Methanol und 0,003 % Orthophosphorsäure gemischt und dann auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde danach mit 3 ml 50 % Methanol und 0,003 % Orthophosphorsäure gespült, um die freien Jodmoleküle herauszufiltern. Zum Schluss wurde der Tracer mit 1 ml 99,9 % Methanol eluiert. Anhand der gemessenen Aktivität wurde die geeignete Konzentration des Tracers mit Hilfe des entsprechenden Puffers eingestellt. Die Aktivität der Tracerlösung sollte annähernd 4000 cpm in 100 µl Puffer betragen (Puffer B für T₃, Puffer G für T₄).

3.5.6.3 Durchführung eines RIA

Für die T₃- und T₄-Quantifizierungen wurden acht Standards zwischen 0,312 und 40 pg aus einer jeweiligen Stammlösung durch Verdünnungen mit einem Phosphatpuffer hergestellt. Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe haben die mit Jod¹²⁵ markierten T₃- und T₄-Tracer nach der Chloramin-T-Methode (NAKAMURA et al., 1977) hergestellt. Die nach der HPLC-Trennung getrockneten Proben wurden mit jeweils 60µl eines Phosphatpuffers (T₃ : Puffer A, T₄ : Puffer F) resuspendiert und 30 min geschüttelt. Die 60 µl wurden als Einfachbestimmung zusammen mit 100 µl des jeweiligen Tracers (ca. 4000 cpm) und 100 µl des jeweiligen Antiserums pipettiert. Die Proben wurden über Nacht auf dem Schüttler inkubiert und am nächsten Morgen wurden 3 ml einer Stopplösung hinzugefügt. Daraufhin wurden die Proben 45 min bei 4°C und 3000 UpM zentrifugiert und anschließend im Gammacounter gemessen. Die Sensitivität der radioimmunologischen Bestimmungen lag im niedrigen Picogrammereich. Die ED 80 lag bei den T₃- Quantifizierungen zwischen 1 und 1,5 pg/tube und bei den T₄- Bestimmungen zwischen 2 und 2,6 pg/tube.

3.5.7 Quantitative Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte anhand der Methode von BRADFORD (1976). Sie beruht auf einer konzentrationsabhängigen Absorptionsverschiebung einer sauren Coomassie-Brilliant-Lösung (Bio-Rad-Protein-Assay).

Zur Berechnung der Hormonkonzentrationen wurde die pro Tube gemessene Menge an Schilddrüsenhormonen anhand der gemessenen Recovery korrigiert und anschließend auf die in der jeweiligen Subfraktion gemessene Proteinmenge bezogen.

Die bei der Extraktion gewonnenen Pellets mit den Organellenfragmenten wurden mit 250 µl 1 N NaOH überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zu einer Protein-Stocklösung (200 µg Protein/ml 0,25 N NaOH, je 100 µg γ-Globulin und 100 µg Bovines Serum-Albumin/ml) wurden 400 µl 1 N NaOH hinzugegeben und ebenfalls über Nacht inkubiert. Die Proben und die Protein-Stocklösung wurden 30 min geschüttelt und dann mit 750- bzw. 1100 µl H₂O verdünnt, wodurch die resultierende NaOH-Konzentration jeweils 0,25 N NaOH betrug. Nach dem Austesten der jeweils nötigen Verdünnung zur geeigneten Proteinkonzentration wurde die entsprechende Menge 0,25 N NaOH hinzugefügt. Zu jedem Ansatz wurden 700 µl H₂O, 100 µl Proteinprobe und 200 µl der Färbelösung pipettiert. Alle Standards bzw. Proben wurden in Doppelbestimmungen pipettiert.

Die Standardkurve wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Standard Nr.	H ₂ O [µl]	Proteinstandards [µl]	0,25 N NaOH [µl]	Biorad-Färbelösung [µl]	Protein [mg/tube]
Blank	700	0	100	200	0
1	700	10	90	200	0,0035
2	700	20	80	200	0,007
3	700	40	60	200	0,014
4	700	60	40	200	0,021
5	700	80	20	200	0,028
6	700	100	0	200	0,035

Abbildung 3.10 Pipettierschema Standardkurve

Nachdem alle Standards und Proben gefärbt waren, wurden sie kurz geschüttelt und dann in Einwegküvetten (Sarstedt) überführt. Die Messung erfolgte innerhalb einer Stunde bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer gegen den Nullwert (Blank), da die Farbreaktion des Protein-Assays nicht stabil ist und daher die Farbintensität und damit auch die Extinktion mit der Zeit abnimmt.

Der Proteingehalt wurde mit Hilfe eines Computerprogrammes (Costat) ausgewertet. Aus der Extinktion der Standards wurde eine Regressionsgerade gebildet und durch Einsetzen der Probenextinktion in die Geradengleichung wurde die Proteinkonzentration errechnet und dann um den Verdünnungsfaktor korrigiert.

3.6 Statistische Auswertung der Daten

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SfM) angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Hormonkonzentrationen der Kontrollgruppen und den jeweils behandelten Tiergruppen wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. Hierbei gelten Werte von $p < 0,05$ als signifikant.

Als Computerprogramm wurde das Softwareprogramm COSTAT verwendet.