

2 Material und Methoden

2.1 Ausstattung

2.1.1 Geräte

Meßinstrumente. Feinwaage MC 210 S von Sartorius (Göttingen), pH-Meter 761 Calimatic von Knick (Berlin) zum Ansetzen von Pufferlösungen, Photometer GeneQuant II von Pharmacia Biotech (Freiburg) und Präzisionsküvette Typ 105.202.008-Q2 von Hellma (Müllheim) zur Bestimmung von DNA-Konzentrationen, Luminometer LB 9501 von Berthold Technologies (Bad Wildbad) zur Quantifizierung der Lichtemission bei Nachweisreaktionen für Luciferasen, β -Counter WinSpectral 1414 von PerkinElmer (Freiburg) für Messungen mit tritiummarkiertem Cortisol und seinen Metaboliten.

DNA-Analysezubehör. Heizblock Thermomixer 5436 von Eppendorf (Hamburg), Elektrophoresekammer Horizon 58 von Life Technologies (Karlsruhe) zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agaraosegel, UV-Gelkamera Reprostar II von Camag (Muttens, CH).

Zentrifugen. Tischzentrifuge 5415 C von Eppendorf (Hamburg) für die Bearbeitung kleiner Volumina (Minilysat, Alkoholpräzipitation); Varifuge K von Heraeus (Osterode) für die Pelletierung von Bakterien und CV-1-Zellen; Sorvall RC5C und Rotor SA-600 von Du Pont (Bad Homburg). Bei allen Zentrifugationsschritten wurde die Rotationsfrequenz in Umdrehungen pro Minute (rpm) angegeben. Der eingesetzte Zentrifugen- und Rotortyp ist hierbei zu beachten.

Sonstiges. Brutschränke und Reinluftwerkbänke, nach Bakterien- und Zellkultur getrennt, waren gefertigt von Heraeus (Osterode). Mikroskop Typ Diavert von Leitz (Wetzlar) mit Zählkammer nach Neubauer von Brand (Wertheim) zur Bestimmung der Zelldichte. Chromatographisch getrennte Steroide wurden im UV-Leuchtkasten Fluotest Universal von Quartzlampen Hanau detektiert.

2.1.2 Zubehör

Allgemeines. Pipetten und -spitzen stammten von Eppendorf (Hamburg), sterile Einmalpipetten von Becton Dickinson (Heidelberg). Reaktionsgefäße aus Kunststoff wurden für 1,5 ml Fassungsvermögen von Eppendorf und Brand (Wertheim) bezogen, für 12 ml von Greiner Labortechnik (Solingen), für 15 ml von Brand und für 50 ml von Sarstedt (Nümbrecht). 70 ml Glasröhrchen stammten von Karl Hecht (Sondheim), sonstige Glasgefäße und -geräte von Brand und Schott (Mainz).

Kulturmateri al. Zellkulturflaschen (75 cm² Oberfläche) stammten von Brand (Wertheim), Mehrfachansatzplatten mit 24 Vertiefungen (je 2,0 cm² Oberfläche) von Becton Dickinson (Heidelberg), Gefrierkulturröhrchen für CV-1-Zellen von Greiner Labortechnik (Solingen), Microbank[®] für Bakterien-Gefrierkulturen von Pro-Lab Diagnostics (Ontario, CAN). Sterilfilter Typ FP 30/0,2 CA-S (0,2 µm Porengröße, pyrogenfrei) wurden von Schleicher und Schuell (Dassel) bezogen.

Untersuchung der 11β-Konversion. Die Redoxpartner wurden auf DC-Alufolien mit Kieselgel 60 F₂₅₄ von Merck (Darmstadt) getrennt. Zur Messung des β-Zerfalls dienten Kunststoffbehälter à 20 ml mit Instant Scint-Gel Plus als Szintillationsflüssigkeit von Packard BioScience (Groningen, NL).

2.1.3 Chemikalien und biologische Komponenten

Reinstoffe. Die bei den Transaktivierungsversuchen eingesetzten Steroide sind in Tab. 5 aufgeführt. Jedes Steroid wurde in einer Konzentration von 10⁻² M in Ethanol gelöst, mit DMEM (s.u.) auf 10⁻⁴ M verdünnt und sterilfiltriert. Ausgehend von diesen Lösungen wurden Verdünnungsreihen hergestellt (siehe 2.3.4). Als Tracer zur Bestimmung enzymatischer Umsätze kam [1,2,6,7-³H]-Cortisol von Amersham (Little Chalfont, GB) zum Einsatz (spezifische Aktivität: 2,37 TBq/mmol). Alle anorganischen Salze, D-Glucose und Dimethylsulfoxid wurden in analytischer Qualität von Merck (Darmstadt) bezogen. Gleichfalls von Merck stammten Methanol, Ethanol, Isopropanol, Dichlormethan und Ethylacetat, jeweils in Chromatographiequalität.

STEROID	CHEMISCHE BEZEICHNUNG	LIEFERANT
Aldosteron	11 β ,21-Dihydroxy-4-pregnen-18-al-3,20-dion [11 \rightarrow 18]-hemiacetal	Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA)
Beclometason	9 α -Chlor-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-16 β -methyl- 1,4-pregnadien-3,20-dion	Sigma Chemical
Betamethason	9 α -Fluor-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-16 β -methyl- 1,4-pregnadien-3,20-dion	Glaxo Research and Development (Stevenage, GB)
Budesonid	16 α ,17-Butylidendioxy-11 β ,21-dihydroxy- 1,4-pregnadien-3,20-dion	Sigma Chemical
2-Chlorfluocortolon	2-Chlor-6 α -fluor-11 β ,21-dihydroxy-16 α - methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion	Schering (Berlin)
Cortisol (= Hydrocortison)	11 β ,17 α ,21-Trihydroxy-4-pregnen-3,20-dion	Sigma Chemical
Cortison	17 α ,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,11,20-trion	Sigma Chemical
Deflazacort	11 β ,21-Dihydroxy-2'-methyl-5' β H-pregna- 1,4-dieno[17,16-d]oxazol-3,20-dion 21-acetat	Marion Merrel Dow (Berlin)
Desacetyldeflazacort	11 β ,21-Dihydroxy-2'-methyl-5' β H-pregna- 1,4-dieno[17,16-d]oxazol-3,20-dion	Marion Merrel Dow – Lepetit (Anagni, Italien)
Dexamethason	9 α -Fluor-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-16 α -methyl- 1,4-pregnadien-3,20-dion	Sigma Chemical
Dehydroepiandrosteron	3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on	Sigma Chemical
Flumetason	6 α ,9 α -Difluor-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-16 α - methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion	Sigma Chemical
6 α -Fluorocortisol	6 α -Fluor-11 β ,17 α ,21-trihydroxy- 4-pregnen-3,20-dion	Schering
9 α -Fluorocortisol (= Fludrocortison)	9 α -Fluor-11 β ,17 α ,21-trihydroxy- 4-pregnen-3,20-dion	Sigma Chemical
Isoflupredon (= 9 α -Fluoroprednisolon)	9 α -Fluor-11 β ,17 α ,21-trihydroxy- 1,4-pregnadien-3,20-dion	Paesel + Lorei (Hanau)
6 α -Methylprednisolon	11 β ,17 α ,21-Trihydroxy-6 α -methyl- 1,4-pregnadien-3,20-dion	Schering
Prednisolon	11 β ,17 α ,21-Trihydroxy- 1,4-pregnadien-3,20-dion	Sigma Chemical
Prednison	17 α ,21-Dihydroxy- 1,4-pregnadien-3,11,20-trion	Sigma Chemical
Prednyliden	11 β ,17 α ,21-Trihydroxy-16-methylen- 1,4-pregnadien-3,20-dion	Merck (Darmstadt)
Progesteron	4-Pregnen-3,20-dion	Sigma Chemical

Tab. 5: Kurzbezeichnung, chemische Bezeichnung und Bezugsquelle der verwendeten Steroide.

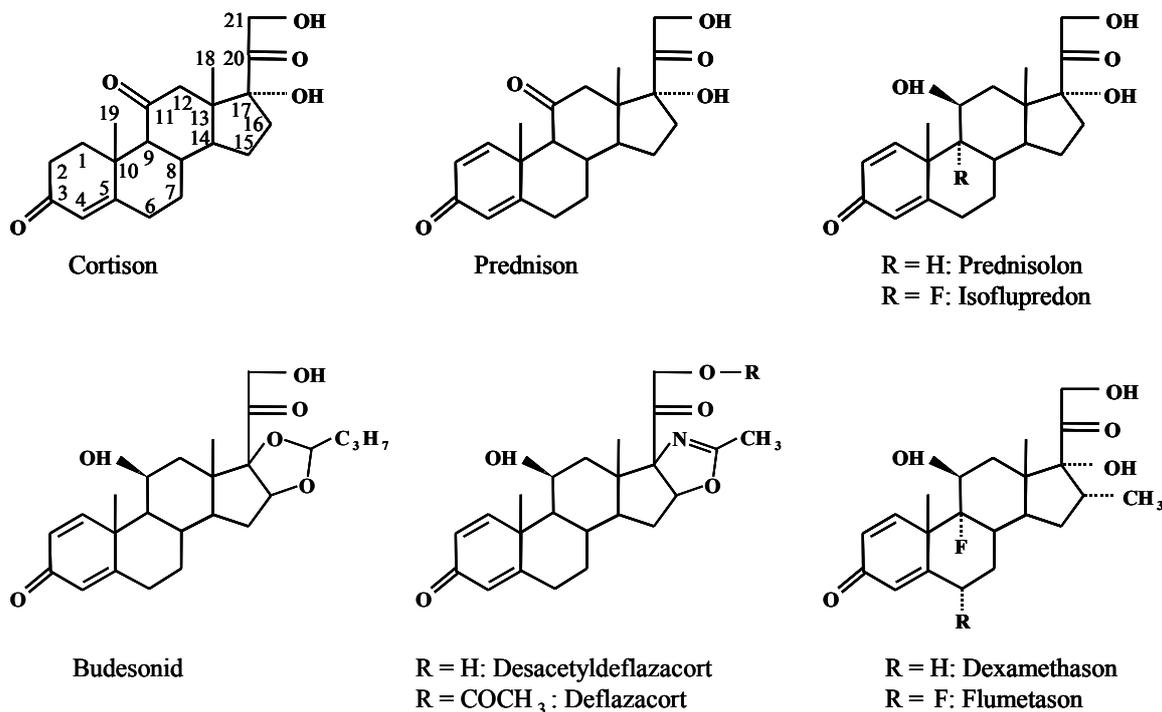


Abb. 4: Strukturformeln einiger untersuchter Glukokortikoide (vgl. Abb. 1).

NAME	ZUSAMMENSETZUNG
Puffer I	Glucose 0,05 M + Tris-HCl 0,025 M (pH 8,0) + EDTA 0,01 M + Lysozym nach Herstellerangabe
Puffer P1	Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) + EDTA 0,01 M + RNase A 0,1 mg/ml
Puffer P2	NaOH 0,2 M + SDS 10,0 mg/ml
Puffer P3	Natriumacetat 3,0 M (pH 5,5)
Puffer QBT	NaCl 0,75 M + MOPS 0,05 M (pH 7,0) + Isopropanol 15 % + Triton X-100 0,15 %
Puffer QC	NaCl 1,0 M + MOPS 0,05 M (pH 7,0) + Isopropanol 15 %
Puffer QF	NaCl 1,25 M + Tris-HCl 0,05 M (pH 8,5) + Isopropanol 15 %
S.O.C. Medium	Trypton 20,0 g/l + Hefeextrakt 5,5 g/l + NaCl 0,01 M + KCl 0,01 M + MgCl ₂ 0,01 M + MgSO ₄ 0,01 M + Glucose 0,02 M
TE-Puffer	Tris-HCl 0,01 M (pH 8,0) + EDTA 0,001 M Sterilisation durch Autoklavieren

Tab. 6: Zusammensetzung spezieller Lösungen, soweit im Text nicht angegeben.

DNA-Analyse. Von Life Technologies (Karlsruhe) wurden die Restriktionsendonukleasen mit dazugehörigen Puffern, die 1 kb PLUS DNA LADDER als Größenstandard für linearisierte Doppelstrang-DNA, der Gelladepuffer 10x BLUEJUICE, ultrareine Agarose und Ethidiumbromidlösung bezogen. TAE-Puffer als Elektrophoreselösung und zur Herstellung von Agarosegelen wurde selbst angesetzt: die 10fach konzentrierte Stammlösung enthielt 200 mM Natriumacetat, 400 mM Tris und 20 mM EDTA in wässriger Lösung, eingestellt auf pH 8,3.

Plasmidaufarbeitung. Die Plasmide pRShGR und pRShMR wurden von R. M. Evans (San Diego, CA, USA), pMSG-Luc von B. Gellersen (Hamburg) zur Verfügung gestellt; pRL-SV40 wurde von Promega (Madison, WI, USA) erworben (Beschreibung siehe 2.2.1). Max Efficiency DH5 α [®] Zellen (kompetente E. coli) mit S.O.C. Medium von Life Technologies (Karlsruhe) dienten zu Transformationszwecken. LB⁺-Medium und -Agar zur Bakterienkultivierung wurden durch Lösen von 10 g NaCl, 10 g Trypton und 5 g Hefeextrakt in 1 l H₂O (ggf. Hinzufügen von 15 g Agar) und Sterilisation im Autoklaven sowie Zugabe von 100 mg Ampicillin nach Abkühlen unter 50 °C hergestellt. Trypton und Hefeextrakt stammten von Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA), Ampicillin Trockensubstanz von ratiopharm (Ulm). Das QIAfilter Plasmid Maxi Kit zur Isolierung größerer Plasmidmengen stammte von Qiagen (Hilden). Puffer I wurde selbst angesetzt. Die Zusammensetzung einzelner Pufferlösungen ist in Tab. 6 aufgeführt.

Zellkultur. CV-1-Zellen (siehe 2.3.1) wurden von ATCC (Manassas, VA, USA) bezogen. Dulbecco's minimal essential medium (DMEM), fetales Kälberserum (FKS), Penicillin-Streptomycin-Lösung, Trypsin-EDTA-Lösung und Ca²⁺- und Mg²⁺-freie Phosphate Buffered Saline (PBS) lieferte Biochrom (Berlin), Amphotericin B Trockensubstanz Squibb Pharma (München). Nullserum (charcoal-stripped serum) entstand aus FKS durch Kohleadsorption eventuell vorhandener Hormone. Dazu wurden 500 ml FKS unter sterilen Bedingungen mit 10 g Holzkohle 24 h unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation der Suspension bei 5000 rpm für 30 min wurde der Überstand sterilfiltriert und aliquotiert.

Transaktivierung. Die Transfektionsreagenzien LipofectAMINE und PLUS stammten von Life Technologies (Karlsruhe). Meßlösungen mit den Substraten für die Luciferasen sowie Passive Lysis Buffer (PLB) waren im Dual Luciferase[®] Reporter Assay System von Promega (Madison, WI, USA) enthalten. Details sind in 2.3.4 und 2.3.5 beschrieben.

2.2 Aufarbeitung von DNA

2.2.1 Plasmide

Die bei den Transaktivierungsversuchen verwendeten Plasmide werden zur Wahrung des Zusammenhangs hier beschrieben. Details zu Sequenzen und Schnittstellen finden sich in den zitierten Arbeiten, die Bezugsquellen sind in 2.1.3 genannt.

pMSG-Luc. In diesem Konstrukt sind zwei kommerziell erhältliche Anteile kombiniert. Die cDNA für die Firefly-Luciferase [40], das eine Leuchtreaktion katalysierende Enzym des Glühwürmchens, stammt aus dem Plasmid pGEM-luc von Promega (Madison, WI, USA). Dieses 1.7-kb-Fragment ist in den Vektor pMSG von Pharmacia Biotech (Freiburg) unmittelbar downstream des Long Terminal Repeat des Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV-LTR) ligiert. Die dort enthaltenen Glukokortikoid-responsiven Elemente erzeugen die über hGR α und hMR vermittelte Induzierbarkeit der Firefly-Luciferase durch Liganden dieser Rezeptoren [73]. Das Plasmid wurde ursprünglich als pMMTV-Luc bezeichnet [58]. Gesamtlänge: 9359 bp.

pRL-SV40. Dieser Vektor enthält die cDNA für die Renilla-Luciferase [93], ein Enzym des Zoelenteraten *Renilla reniformis*, das sein Substrat unter Lichtfreisetzung oxidiert. Der vorgeschaltete SV40-Promotor führt in transfizierten CV-1-Zellen zu einer starken konstitutiven Expression dieses Proteins. Der SV40-Replikationsursprung hat in Zellen, die das große T-Antigen exprimieren (z. B. COS-7-Zellen), eine episomale Vermehrung des Plasmids zur Folge, was seiner Funktion als interne Kontrolle zuwiderläuft (vgl. 2.3.3). Gesamtlänge: 3705 bp.

pRShMR. Dieser Expressionsvektor ist aus drei Fragmenten zusammengesetzt. Neben der cDNA des humanen Mineralokortikoidrezeptors [9] sind der Long Terminal Repeat des Rous Sarcoma Virus (RSV-LTR) als Promotor, der SV40-Replikationsursprung und das auch in alle anderen Vektoren integrierte SV40-Polyadenylierungssignal enthalten. Gesamtlänge: 7278 bp.

pRShGR ist mit pRShMR bis auf die kodierende Sequenz identisch, an deren Stelle die cDNA des humanen Glukokortikoidrezeptors (α -Isotyp) tritt [72;153]. Gesamtlänge: 7373 bp.

2.2.2 Transformation kompetenter Zellen

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurden kompetente *E. coli* (siehe 2.1.3) verwendet. Für die Transformation wurden nach kurzem Auftauen und Aliquotieren der Zellsuspension à 100 μ l in 12 ml-Röhrchen je 5 ng DNA unter vorsichtigem Mischen hinzugegeben. Es folgten 30 min Inkubation auf Eis, ein anschließender Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für eine Dauer von 45 s und eine erneute Lagerung auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 900 μ l S.O.C. Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C unter Rütteln inkubiert und schließlich in mehreren Verdünnungsstufen auf LB⁺-Agarplatten ausgestrichen. Nach 12 h Inkubation bei 37 °C wurden die entstandenen Kolonien in LB⁺-Medium überführt und auf den Transformationserfolg überprüft (s. u.). Von geeigneten Klonen wurden Gefrierkulturen gemäß den Angaben des Herstellers angelegt (siehe 2.1.3).

2.2.3 Plasmidisolierung für analytische Zwecke (Minilysat)

Für die Untersuchung transformierter Bakterien erfolgte eine schnelle Gewinnung kleiner Plasmidmengen wie folgt: Eine Einzelkolonie wurde von einer LB⁺-Agarplatte in 3 ml LB⁺-Medium überführt und unter Schütteln 12 h bei 37 °C inkubiert. 1,4 ml dieser Kultur wurden 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt. Nach Resuspension in 100 μ l Puffer I und 30 min Lagerung auf Eis nach guter Durchmischung erfolgte die Lysierung der Bakterien und die alkalische Denaturierung der gesamten DNA durch vorsichtige Zugabe von 200 μ l Puffer P2. Mit 150 μ l Puffer P3 wurde die Probe unter kräftigem Mischen neutralisiert und 1 h im Eisbad gelagert. Dabei renaturierte die Plasmid-DNA, die nun im Überstand gelöst war und nach 5 min Zentrifugation bei 11000 rpm durch Dekantieren von den pelletierten Zellbestandteilen getrennt wurde. Durch Zugabe von 1 ml Isopropanol wurde sie anschließend gefällt und nach zweimaligem Waschen mit 0 °C kaltem 80 % Ethanol und Rezentrifugieren (10 min bei 12000 rpm) in 50 μ l H₂O aufgenommen.

2.2.4 Plasmidisolierung für Transfektionszwecke

Hierzu wurde das QIAfilter Plasmid Maxi Kit verwendet (siehe 2.1.3). Die Trennung der Plasmid-DNA von den ausgefällten Zellbestandteilen erfolgte durch eine Filterkartusche, die weitere Aufreinigung durch eine Anionenaustauschsäule. 500 ml LB⁺-Medium wurden mit 500 µl einer Bakterienkultur, die das gewünschte Plasmid enthielt (s. 2.2.2), inokuliert und 12-16 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation dieser Kultur bei 5000 rpm und sorgfältiger Entfernung des Überstands wurden die Bakterien in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und anschließend mit 10 ml Puffer P2 unter vorsichtigem Mischen lysiert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Neutralisation mit Puffer P3. Im entstandenen Präzipitat befanden sich (wie beim Minilysat) genomische DNA, Proteine und andere Zellüberreste. Dieses Material verblieb in der Filterkartusche, über die das Lysat nun direkt auf die zuvor mit 10 ml Puffer QBT equilibrierte Ionenaustauschsäule aufgetragen wurde. Nach dem Durchtritt der Flüssigkeit wurde die Säule zweimal mit Puffer QC gewaschen, die DNA danach mit 15 ml Puffer QF eluiert und mit 10,5 ml Isopropanol gefällt. Es folgten 30 min Zentrifugation bei 12000 rpm, bevor nach zweimaligem Waschen mit 0 °C kaltem 80% Ethanol und Rezentrifugieren (10 min bei 12000 rpm) der Überstand dekantiert und die DNA nach 10 min Trocknung unter sterilen Bedingungen in 200 µl H₂O aufgenommen wurde.

2.2.5 Restriktionsanalyse

Je 0,3 bis 0,5 µg Plasmid-DNA wurden mit 5 Einheiten einer Restriktionsendonuklease und 1 µl des zugehörigen Pufferkonzentrates versetzt, der Ansatz mit sterilem H₂O auf 10 µl aufgefüllt und 3 h im Heizblock bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 2 µl Gelladepuffer versetzt und neben 0,9 µg des Größenstandards auf ein 0,8% Agarosegel (aus 20 ml TAE-Puffer mit 160 mg Agarose und 20 µg Ethidiumbromid) aufgetragen. Nach Elektrophorese bei 75 V erfolgte die Dokumentation des Resultats mit der UV-Gelkamera.

2.3 Zellkultur und Meßverfahren

2.3.1 Kultivierung von CV-1-Zellen

CV-1-Zellen sind aus der Niere einer afrikanischen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) gewonnene, adhärent wachsende Fibroblasten [78]. Sie wurden bei 37°C und einer CO₂-Spannung von 5% in einem Volumen von 20 ml kultiviert. Als Vollmedium diente DMEM mit Zusätzen von 10% FKS, Penicillin (100 000 IU/l), Streptomycin (100 000 µg/l) und Amphotericin B (2,5 mg/l) (s. a. 2.1.3). Die bei bestimmten Versuchsschritten erforderlichen Abweichungen von diesen Kulturbedingungen sind dort besonders erwähnt.

Zur Subkultivierung wurden die CV-1-Zellen nach Absaugen des Mediums zunächst mit 10 ml PBS gewaschen. Dieses wurde ebenfalls entfernt. Durch Zugabe von 1,5 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,25%/0,03%) und 3 min Inkubation bei 37°C wurden die Zellen abgelöst, dann in 10 ml Vollmedium aufgenommen, 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert und nach Entfernen des Überstands in 10 ml PBS resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren und Absaugen konnten sie nun in dem für die weitere Bearbeitung benötigten Kulturmedium aufgenommen werden.

Zum Anlegen von Gefrierkulturen wurde an dieser Stelle für den Inhalt je einer Kulturflasche ein Gemisch aus 900 µl Vollmedium und 100 µl Dimethylsulfoxid zugegeben. Nach Überführen der Zellsuspension in Kryoröhrchen erfolgte eine langsame Abkühlung bei -20°C für 3 h, dann bei -80°C für 24 h, bevor die Kultur in flüssigem Stickstoff eingelagert wurde.

2.3.2 Bestimmung enzymatischer Umsätze

Assay. Zur Quantifizierung einer möglichen enzymatischen Inaktivierung von Steroiden durch Oxidation in 11β-Position oder des umgekehrten Vorgangs wurde unter den Bedingungen des Transaktivierungsassays (s. 2.3.4) der Umsatz radioaktiv markierten Cortisols gemessen. Dazu wurde 24 h nach Transfektion mit pMSG-Luc, pRL-SV40 und pRShGR der Tracer (s. 2.1.3) sowohl allein als auch in Gegenwart von steigenden

Konzentrationen des unmarkierten Steroids in 500 µl des üblichen Kulturmediums zugegeben und 24 h inkubiert. Die eingesetzte Aktivität betrug je ca. 1500 Bq. Alle Ansätze wurden vierfach ausgeführt.

Analyse. 24 h nach Zugabe des Steroids wurden die einzelnen Überstände aus den Kulturplatten in Glasröhrchen mit je 3 ml eiskaltem Ethylacetat überführt und mit diesem kräftig gemischt. Die obere der nach 1 min abgegrenzten zwei Phasen (die das Ethylacetat mit den darin gelösten Steroiden enthielt) wurde abpipettiert, das Lösungsmittel mit Luft verblasen. Nach Zugabe von 40 µl Methanol, dem als Indikatoren ca. 10^{-3} M Cortisol und Cortison (beide nicht tritiiert) zugesetzt waren, wurde die Lösung tropfenweise auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte aus Kieselgel mit Fluoreszenzindikator aufgetragen und in einer Chromatographiekammer mit einem Fließmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol (Volumenverhältnis 15:1) aufgetrennt. Die im UV-Licht bei 256 nm durch Fluoreszenzlöschung sichtbaren steroidhaltigen Plattenareale wurden mit Bleistift markiert, weiträumig ausgeschnitten und 12 h in einem mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit und 1 ml Wasser gefüllten Gefäß belassen. Anschließend wurde die Radioaktivität der Proben mit einem β -Counter bestimmt.

2.3.3 Prinzip des Transaktivierungsassays

Zur Quantifizierung agonistischer und antagonistischer Eigenschaften verschiedener Steroide am Glukokortikoid- und am Mineralokortikoidrezeptor wird ein biologisches System benötigt, das nach Einwirkung einer dieser Substanzen eine möglichst einfach zu erfassende, reproduzierbare Zustandsänderung erfährt. Für ein grundlegendes Verständnis der Signaltransduktion sollten zudem die Einflüsse beider Rezeptoren unterscheidbar sein.

Da die Umsetzung dieser Forderungen bei Versuchen *in vivo* im allgemeinen einen großen Aufwand erfordert und durch intra- und interindividuell erheblich variierende Bedingungen erschwert wird, bieten sich hier Modellverfahren in Zellkultur an. Bei den diversen nach der Klonierung der cDNA für GR und MR des Menschen etablierten Assays wurden verschiedene Zelllinien typischerweise mit folgenden Komponenten transient transfiziert:

- (a) Expressionsvektor für den zu untersuchenden Rezeptor,
- (b) Plasmid, das einen Promotor mit hormonresponsiven Elementen (HREs) und eine nachgeschaltete cDNA für ein quantitativ leicht nachweisbares Protein enthält,
- (c) Expressionsvektor für ein steroidunabhängig konstitutiv gebildetes Protein.

Mit dem Verzicht auf stabile Transfektionen wurde dabei u.a. der Nachteil einer mit unkontrollierbaren Auswirkungen verbundenen Integration der Plasmid-DNA ins zelluläre Genom vermieden. Die auf (b) und (c) kodierten Proteine werden als *Reporter* bezeichnet. Im hier vorliegenden Assay war der hormonabhängige Reporter die Firefly-Luciferase (kodiert auf pMSG-Luc), der unabhängig exprimierte die Renilla-Luciferase (kodiert auf pRL-SV40). Der eigentliche Transaktivierungsvorgang gliedert sich in drei Phasen:

- (1) Nach der Transfektion synthetisieren die Zellen den Steroidrezeptor und den steroidunabhängigen Reporter.
- (2) Das in aufsteigenden Konzentrationen zugegebene Steroid diffundiert in die Zelle und bindet an den dort überexprimierten Rezeptor.
- (3) Der Hormon-Rezeptor-Komplex kann sich nun an die HREs anlagern und damit die zusätzliche Bildung des zweiten Reporterproteins anregen.

Die Gewinnung der intrazellulären Proteine durch Lyse der Zellen ermöglicht schließlich die Messung der Reporterproteinmengen. Als Reporter werden Enzyme verwendet, da eine Umsatzbestimmung auch bei kleinen Proteinmengen eine ausreichend genaue Quantifizierung erlaubt. Als Maß für den agonistischen Effekt kann dann der Quotient der Enzymaktivitäten bei Substratüberschuß (steroidinduziertes zu konstitutiv gebildetes Enzym) definiert werden. Dies hat den großen Vorteil einer weitgehenden Unempfindlichkeit des Assays gegen Zellzahl, Effizienz der Proteinextraktion und unterschiedliche Probenvolumina bei der Meßreaktion. Auch wird der Einfluß einer variablen Transfektionseffizienz vermindert, zumindest solange die Rezeptorkonzentration in der Zelle dadurch nicht wesentlich schwankt.

2.3.4 Transfektion und Transaktivierung

Vorbereitung. CV-1-Zellen wurden wie in 2.3.1 beschrieben aus der Kulturflasche abgelöst, gewaschen und in 10 ml DMEM ohne Zusätze aufgenommen. Nach steriler Entnahme von ca. 100 μ l erfolgte die Bestimmung der Zelldichte in einer Zählkammer nach Neubauer. In Kulturplatten (siehe 2.1.2) wurden nun $3 \cdot 10^4$ Zellen pro Vertiefung in 1 ml DMEM mit FKS (ohne weitere Zusätze) eingesät und 24 bis 48 h im Brutschrank bis zum zwischen 80 % und 90 % konfluenten Wuchs inkubiert. Alle weiter unten aufgeführten Mengenangaben beziehen sich auf *einen* solchen Ansatz, d. h. auf $5 \cdot 10^4$ bis $6 \cdot 10^4$ Zellen.

Transfektion. Das Prinzip der hier verwendeten Methode besteht in der Bildung einer Hülle aus Liposomen (LipofectAMINE Reagens) um die zu transfizierende DNA nach vorheriger Komplexbildung der Nukleinsäure mittels einer speziellen Pufferlösung (PLUS Reagens). Die Plasmidmengen wurden entsprechend Tab. 7 eingesetzt.

PLASMID	MENGE PRO ANSATZ IN μ g
pMSG-Luc	0,15
pRL-SV40	0,02
pRShGR <i>oder</i> pRShMR	0,30

Tab. 7: Verwendete Plasmidmengen.

Zunächst wurde die DNA in 25 μ l DMEM ohne Zusätze aufgenommen, mit 4 μ l PLUS Reagens versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde diese Lösung mit 1 μ l LipofectAMINE Reagens, das mit 25 μ l DMEM ohne Zusätze vorverdünnt worden war, vermischt und nochmals w. o. inkubiert. Alle Mischvorgänge mußten dabei äußerst schonend vonstatten gehen, um eine mechanische Schädigung der DNA und der Liposomen zu vermeiden. In jeder Vertiefung der Kulturplatte wurde das inzwischen sorgfältig abgesaugte Medium durch 200 μ l reines DMEM ersetzt, bevor 50 μ l der die Plasmide enthaltenden Lösung unter vorsichtigem Schwenken zugegeben wurden. Es folgten 24 h Inkubation im Brutschrank, wobei sich nach 3 h das Kulturvolumen durch Hinzufügen von 250 μ l DMEM mit 20 % Nullserum auf 500 μ l erhöhte.

Steroidzugabe. 24 h nach Beginn der Transfektion wurde der Überstand abgesaugt und durch 500 µl steroidhaltiges Medium ersetzt, wonach die Zellen weitere 24 h im Brutschrank lagerten. Zuvor wurde für jedes untersuchte Steroid aus der sterilen 10^{-4} M Ausgangslösung (s. 2.1.3) eine Verdünnungsreihe in DMEM mit 10% Nullserum angelegt: ausgehend von der maximalen Steroidkonzentration – 10^{-5} M für GR-Assays, 10^{-6} M für solche mit dem MR – wurden sechs Ansätze mit je 10facher Verdünnung des vorhergehenden hergestellt, so daß das Steroid minimal als 10^{-10} M bzw. 10^{-11} M Lösung vorlag. Pro Konzentrationsstufe wurden vier Replikate angesetzt. Zur Normierung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven auf das Maximum der Referenzsubstanz (GR: Dexamethason, MR: Aldosteron) wurde von dieser ebenfalls eine vollständige Verdünnungsreihe unter sonst identischen Bedingungen getestet.

Gewinnung der Reporter. 24 h nach Zugabe des Steroids erfolgte die Lysierung der Zellen durch Zugabe von 100 µl Passive Lysis Buffer, nachdem zunächst das Medium sorgfältig entfernt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen worden waren. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Lysat, das (neben anderen intrazellulären Molekülen) die Reporterenzyme in einem für den nachfolgenden Aktivitätsassay geeigneten Milieu enthielt, in Kunststoffröhrchen überführt und bei -80°C tiefgefroren.

2.3.5 Messung der Luciferaseaktivitäten

Die Meßlösungen wurden gemäß den Angaben des Herstellers aus Trockensubstanzen angesetzt. Das Substrat für die Firefly-Luciferase (Luciferin) war in der Lösung „LAR II“ (Luciferase Assay Reagent), für die Renilla-Luciferase (Coelenterazin) in der Lösung „Stop&Glo“ enthalten. 20 µl eines nach dem Wiederauftauen auf Raumtemperatur erwärmten Lysates wurden in einem speziellen Meßröhrchen aus Kunststoff (siehe 2.1.2) zu 100 µl LAR II gegeben und 2 s geschüttelt. Sofort danach wurde die Lichtemission im Luminometer 10 s lang gemessen, das Gemisch dann entnommen, mit 100 µl Stop&Glo versetzt und erneut 2 s geschüttelt, bevor die Zahl der freigesetzten Photonen nochmals 10 s lang bestimmt wurde. Die Aktivität der Firefly-Luciferase wurde laut Herstellerangabe durch Zugabe von Stop&Glo um mindestens sieben Zehnerpotenzen reduziert, so daß die in den aufeinanderfolgenden Schritten gemessenen Lichtmengen die in der Probe herrschenden Enzymkonzentrationen nahezu selektiv repräsentierten (die Substrate waren im Überschuß vorhanden).

2.4 Berechnungen

2.4.1 Definitionen und Normierung

Die gemäß 2.3.5 ermittelten Lichtemissionen pro 10 s Meßdauer stellten die Rohwerte für die Berechnung der Steroidwirkung dar. Sei n_0 die ohne Lysatzugabe im Mittel gemessene Photonenzahl, n_{ff} der für die Firefly-Luciferase und n_{rl} der für die Renilla-Luciferase erhaltene Meßwert, so wurde der erzielte (nicht normierte) biologische Effekt η definiert als

$$\eta = \frac{n_{ff} - n_0}{n_{rl} - n_0}.$$

Um die Abhängigkeit des biologischen Effekts von der Steroidkonzentration x zu erfassen, wurde unter Berücksichtigung eines auch in Abwesenheit eines Steroids zu erwartenden geringfügigen Effekts η_0 davon ausgegangen, daß die individuellen Meßresultate bis auf zufällige Abweichungen der Beziehung

$$\eta(x) = (c - \eta_0) \cdot \frac{x^a}{b^a + x^a} + \eta_0 \quad (\text{I})$$

folgen. Hierbei handelt es sich zunächst um einen rein deskriptiven Ansatz. Die Parameter a , b und c wurden mit dem unten angegebenen Regressionsverfahren bestimmt, η_0 dagegen als Mittelwert aus einem unabhängigen Experiment. Sei nun c_r der Wert, den c für das stets mitgetestete Referenzsteroid annahm. Dann war für alle Ansätze in der jeweiligen Versuchsreihe der normierte biologische Effekt E (nachfolgend kurz *Effekt* genannt) definiert als

$$E = \frac{\eta}{c_r}. \quad (\text{II})$$

Mit den Bezeichnungen $E_{\max} = \frac{c}{c_r}$, $E_0 = \frac{\eta_0}{c_r}$

gilt entsprechend (I): $E(x) = (E_{\max} - E_0) \cdot \frac{x^a}{b^a + x^a} + E_0.$ (III)

Gleichung (III) beschreibt eine Kurve, die im Punkt $(0, E_0)$ entspringt und sich asymptotisch E_{\max} nähert, welches einen je nach eingesetztem Steroid unterschiedlichen Wert haben kann und hier als *maximaler Effekt* bezeichnet wird. Dieser muß von dem theoretischen Wert E_{∞} unterschieden werden, der eine Systemkonstante im operationalen Modell (siehe 1.3.2) darstellt. b ist gleich der pharmakologisch EC_{50} genannten Konzentration, bei der der halbmaximale Effekt eintritt. Als solcher wird hier $E_{0.5} = (E_{\max} - E_0)/2$ bezeichnet. Die Steigung der Kurve im Punkt $(b; E_{0.5})$ ist proportional zu a , das auch als *Hill-Exponent* bezeichnet wird.

Bezüglich der Transaktivierungsversuche werden die Begriffe *Effekt* und *Wirkung* in der vorliegenden Arbeit synonym verwendet.

2.4.2 Regression

Die Werte der in Gleichung (III) vorkommenden Parameter a , b und E_{\max} wurden (analog zum Prinzip der linearen Regression) so bestimmt, daß die Summe der Residuenquadrate ssr mit

$$ssr = \sum (E_i - E(x_i))^2$$

minimal war, wobei E_i den bei der Konzentration x_i gemessenen, hingegen $E(x_i)$ den mit (III) berechneten Effekt darstellt. Dabei wurde jeder Einzelwert E_i gleich gewichtet, offensichtlich grob fehlerhafte Daten wurden vorab eliminiert. Aus der Varianz der Residuen konnten Standardfehler für E_{\max} , a und $\log b$ abgeleitet werden, die die Angabe von Standardfehlern und 95%-Konfidenzintervallen für den Maximaleffekt, den Hill-Exponenten und die EC_{50} ermöglichten.* Außerdem wurden aus den in der Regel vier Replikaten auf einer Konzentrationsstufe das arithmetische Mittel des Effekts und dessen Standardfehler *SEM* bestimmt. Bei den Referenzsubstanzen wurde zudem aus allen gewonnenen *Mittelwerten* des Effektes je Konzentrationsstufe ein Datensatz gebildet und erneut nach dem oben angegebenen Schema analysiert, wobei auf eine Renormierung des Maximaleffektes verzichtet wurde. Die Berechnungen erfolgten mit dem Programm Prism[®] (Version 3.02) von GraphPad Software (San Diego, CA, USA) unter Windows XP.

* Die Größen E_{\max} , a und $\log b$ sind, als Zufallsvariablen betrachtet, normalverteilt. Für b gilt das nicht. Das Konfidenzintervall für die EC_{50} ist daher asymmetrisch.

2.4.3 Statistische Tests

Mittelwerte. Zur Beurteilung einer Konzentrationsabhängigkeit der 11 β -HSD-Aktivität mittels des in 2.3.2 beschriebenen semiquantitativen Assays kam ein zweiseitiger *t*-Test für unverbundene Stichproben mit einem Testniveau von $\alpha = 0,05$ zur Anwendung, ebenso für den Vergleich der Nulleffekte und der Effekte ohne Rezeptortransfektion (siehe 3.3.1).

Modellübereinstimmung. Um die Anwendbarkeit des in 2.4.1 angegebenen Konstrukts zu prüfen, wurde neben der Bestimmung des Korrelationskoeffizienten *R* die Abweichung der experimentell gefundenen Verteilung vom Modell anhand eines *Run*-Tests nach WALD und WOLFOWITZ [87] untersucht.[†] Da bei Kurvenverläufen ohne erkennbare Effektsättigung ein solcher Test zwar durchführbar, aber wenig sinnvoll ist, wurde in diesen Fällen auf eine entsprechende Angabe verzichtet.

Regressionsparameter. Für die Frage nach signifikanten Unterschieden von E_{max} , EC_{50} und Hill-Exponent wurden die bei den Berechnungen nach 2.4.2 verwendeten Datensätze unter Verwendung eines für die nichtlineare Regression modifizierten zweiseitigen *t*-Tests für unverbundene Stichproben auf einem Testniveau von $\alpha = 0,05$ geprüft. Es wurden also jeweils die Resultate zweier Meßreihen (mit in der Regel je 24 Datenpunkten) gegeneinander getestet. Entsprechende *p*-Werte sind in allen relevanten Fällen angegeben. Die Berechnungen hierzu erfolgten, ebenso wie die im vorherigen Absatz beschriebenen, mit dem Programm Prism[®] (Version 3.02) von GraphPad Software (San Diego, CA, USA) unter Windows XP.

[†] Bei diesem Test werden zunächst alle *y*-Werte (Effekte) nach den zugehörigen *x*-Werten (Konzentrationen) geordnet und – unter Beibehaltung dieser Reihenfolge – die Differenzen der beobachteten *y*-Werte zu den jeweils durch die Regressionsgleichung errechneten notiert. Es resultiert eine Folge aus positiven und negativen Zahlen (den *Residuen*), die Teilfolgen aus ununterbrochen nebeneinanderstehenden nur positiven oder nur negativen Zahlen enthält. Jede dieser Teilfolgen wird als *Run* bezeichnet. Es wird nun die Wahrscheinlichkeit *p* bestimmt, bei Annahme einer Gaußschen Verteilung der Residuen eine Anzahl von *Runs* zu finden, die gleich oder kleiner als die festgestellte ist. Die Nullhypothese (Meßwertverteilung entspricht der Sättigungskurve) wurde dann verworfen, wenn $p < 0,05$. Bei *gleichen x-Werten* wurden die *y*-Werte so aufgereiht, daß dem größten der kleinste, dann der zweitgrößte, der zweitkleinste usw. folgten, um eine nur durch willkürliche Anordnung bedingte Ablehnung der Nullhypothese zu vermeiden. Dies gilt nicht für die aus den Mittelwerten der Einzelversuche erstellten Referenzkurven von Dexamethason/hGR und Aldosteron/hMR, wo die Daten nach dem Zeitpunkt ihrer Gewinnung sortiert sind.