

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Substanzen

Phosphat-Puffer pH 7,4

Di-Natrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat
Kalium-Dihydrogenphosphat (4,5 : 1)

Merck (Darmstadt, FRG)

Na⁺-EDTA
β-Mercaptoethanol

Sigma Chemical Co. (St. Luis, M.O., USA)

Substrate/Co-Substrate

Corticosteron, 11-Dehydrocorticosteron,
NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH

Sigma Chemical Co. (St. Luis, M.O., USA)

Radioaktive Tracer

[1,2,6,7-³H]Corticosteron
(spezifische Aktivität: 9 Gbq/mg),
[³H]11-Dehydrocorticosteron
(spezifische Aktivität: 12 Gbq/mg)

(Die radioaktiv markierten Steroidhormone wurden vor ihrer Verwendung mittels reversed-phase HPLC aufgereinigt)
Amersham Buchler (Braunschweig, FRG)

Lipide

gesättigte Fettsäuren:

Palmitinsäure (C16:0)
Palmitinsäure-Na⁺ (C16:0)
Stearinsäure (C18:0)
Stearinsäure-Na⁺ (C18:0)

ungesättigte Fettsäuren:

Ölsäure (C18:1)
Ölsäure-Na⁺ (C18:1)
Linolsäure (C18:2)
Linolsäure-Na⁺ (C18:2)

Phospholipide:

Lecithin-Phosphatidylglycerol-Na⁺
(Egg Yolk)
Distearoyl-Phosphatidylglycerol-NH₄
Dioleoyl-Phosphatidylglycerol -Na⁺

Sigma Chemical Co. (St. Luis, M.O., USA)

Szintilatonsflüssigkeiten

Instant Instillation Gel

Methanol

Ethylacetat

Packard (Frankfurt, FRG)

Baker (Deventer, NL)

Merck (Darmstadt, FRG)

Proteinbestimmung nach Smith

Bizinchonininsäure-Lösung

Cu²⁺-Sulfat-Pentahydrat-Lösung 4% (w/v)

Rinderserum-Albumin (BSA)

Sigma Chemical Co. (St. Luis, M.O., USA)

Boehringer (Mannheim, FRG)

Homogenisierungspuffer

Saccharose

Sigma Chemical Co. (St. Luis, M.O., USA)

(Alle Substanzen wurden in der höchsten zu beziehenden Reinheit erworben)

3.1.2 Geräte

HPLC-Anlage mit Autosampler,
Szintillat-Pumpe Typ 364.00,
Steuerungs- und Auswertungssoftware
(Eurochrom 2000)

Knauer (Berlin, FRG)

reversed-phase 5 µm Hypersil ODS-Säule

Berthold (Wildbad, FRG)

Durchfluss-RadioaktivitätsmonitorBerthold HPLC radioactivity monitor
LB 507 B

Berthold (Wildbad, FRG)

Homogenisierung der Organgewebe

Ultra-Turrax TP 18/10

Potter-Elvehjem (Glas-Teflon-Homogeni-
sator)

Janke & Kunkel (Staufen, FRG)

B.Braun (Melsungen, FRG)

Zentrifugen

Minifuge GL

Centrifuge 5412

Heraeus-Christ (Osterode, FRG)

Jürgens (Berlin, FRG)

UltrazentrifugeBeckman L8-70M Ultracentrifuge,
50 Ti-Festwinkelrotor

Beckman (München, FRG)

pH-Meter

Knick pH-Meter 761 Calimatic

Knick (Berlin, FRG)

Photometrie

Photometer PCP 6121

Eppendorf (Hamburg, FRG)

Pipetten, Pipetten-Spitzen, Probenröhrchen

Eppendorf (Hamburg, FRG)

Feinwaage Typ 2253

Sartorius (Göttingen, FRG)

3.2 Methoden

3.2.1 Präparation Nieren-, Lungen-, Plazenta-Gewebe

Das menschliche Nierengewebe stammt von insgesamt 5 Patienten der Abteilung für Urologie des Charité-Campus Benjamin Franklin/Berlin. Bei allen Patienten war ein Nierentumor festgestellt worden, der eine Nephrektomie nötig werden ließ.

Unmittelbar nach der chirurgischen Entnahme wurden die Organe in Eis gebettet zur Abteilung für Pathologie gebracht, wo makroskopisch nicht betroffene Anteile der Organe, die für die weitere Aufarbeitung und Befundung entbehrlich waren, abgetrennt und für unsere Experimente zur Verfügung gestellt wurden. Alle weiteren Schritte wurden unter ständiger Kühlung auf Eis vorgenommen.

Das plazentare Gewebe stammt von Patientinnen der Frauenklinik des Charité-Campus Benjamin Franklin. Nach der Austreibung und der daran anschließenden Kontrolle der Nachgeburt, wurde das Gewebe eisgekühlt in unser Labor zur weiteren Aufarbeitung gebracht.

Das verwendete Lungengewebe stammt von der Lungenfachklinik Heckeshorn Berlin. Bei den 5 Patienten war aufgrund eines diagnostizierten Lungentumors eine Teilresektion der Lunge durchgeführt worden.

Bei den Gewebeproben der Lunge wurde aus technischen Gründen ein Vorgehen gewählt, das sich von der Behandlung der übrigen Gewebe unterschied: Die Auswahl und Abtrennung des Lungengewebes wurde noch während der Operation vom Operateur direkt vorgenommen. Die Gewebeproben wurden zunächst für die Zeit von maximal 1 Woche trocken bei -30°C eingefroren und erst nach dem Wiederauftauen in unserem Labor weiter homogenisiert und zu Mikrosomensuspensionen aufgearbeitet.

3.2.2 Mikrosomenpräparation

Die Gewebstücke wurden mit eiskalter isotoner Kochsalz-Lösung abgespült um Blutreste zu entfernen, anschließend trockengetupft, kleingeschnitten und mit Succhrose-Phosphatpuffer im Verhältnis 1:5 (w:v) in einem Glas-Teflon-Potter bei 1 300 U/min im Eiswasserbad homogenisiert, wobei der Stempel des Potters 10 mal behutsam bis zum Gefäßgrund getrieben wurde. Zwischen den einzelnen Arbeitsgängen wurde eine Pause von 1 Minute eingelegt, um eine Erwärmung des Gewebes zu minimieren.

Das gewonnene Homogenat wurde anschließend 30 Minuten lang mit 750 g bei 4°C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Dadurch wurden gröbere Gewebstücke entfernt. Der Überstand wurde weitere 30 Minuten lang bei 20 000 g zentrifugiert, um die enthaltenen Mitochondrien und Zellkerne abzuscheiden. Das Pellet wurde verworfen, der inzwischen klare Überstand dekantiert, in Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt und bei 105 000 g über 60 Minuten ultrazentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, das Pellet, mit den darin enthaltenen Mikrosomen, mit Succhrose-Phosphatpuffer resuspendiert und erneut 60 Minuten lang bei 105 000 g ultrazentrifugiert. Dadurch wurde eine zusätzliche Reinigung der Mikrosomen erzielt. Das Pellet wurde erneut in Succhrose-Phosphatpuffer aufgenommen und der Proteingehalt der Suspension bestimmt (siehe Kapitel 3.2.2).

Die Mikrosomensuspension wurde schließlich auf die für unsere Versuche angestrebte Konzentration weiter verdünnt und in Eppendorf-Röhrchen aliquotiert. Die Mikrosomensuspensionen wurden bis zu ihrer Verwendung längstens 6 Wochen bei -80°C gelagert. In Voruntersuchungen war nach Ablauf dieses Zeitraumes noch der volle Erhalt der Enzymaktivität nachgewiesen worden.

3.2.3 Proteinbestimmung

- Methode

Die von uns verwendete quantitative Proteinbestimmung folgt der Methode von Smith et al. (150).

Das Prinzip dieses Nachweisverfahrens beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der Proteine im alkalischen Milieu Cu^{++} - zu Cu^+ -Ionen reduzieren. Zwei Moleküle der zugesetzten Bizinchonininsäure bilden mit dem Cu^+ -Ion einen violetten, wasserlöslichen Komplex, der bei 562 nm ein Absorptionsmaximum aufweist. Dies erlaubt eine photometrische Quantifizierung von Proteinen in wässriger Lösung.

- Standardreihe

Zunächst wurde eine Standardreihe angefertigt. Dazu wurden, neben einer mit Aqua dest. gefüllten Leerprobe, die zur Eichung des Photometers verwendet wurde, definierte Proteinlösungen mit bovinem Serumalbumin (Stammlösung 20 mg/ml) in aufsteigender Konzentration (10, 20, 30,....100 µg Protein/100 µl) angefertigt.

Die weiteren Schritte folgen dem unten genannten Schema (siehe „Durchführung“).

Die ermittelten Extinktionswerte der Lösungen wurden gegen deren jeweilige, bekannte Konzentrationen in ein Diagramm aufgetragen.

Die Verbindung der Diagrammpunkte ergibt idealerweise eine „Standardkurve“ in Form einer Geraden, d.h. es besteht eine lineare Beziehung zwischen Proteinkonzentration und Extinktion, die eine direkte Umrechnung des

gemessenen Extinktionswertes in die zugrundeliegende Proteinkonzentration der Proben erlaubt.

- Durchführung

100 µl der Mikrosomensuspension bzw. der Standardlösungen wurden nach Zusetzen von 2 ml des Testreagenzes, welches sich aus 80,4 ml Bizinchronin-säure-Lösung und 1,6 ml Kupfer-II-Sulfatlösung 4% (w/v) zusammensetzte, auf dem Vortex gemischt und 30 Minuten lang im Wasserschüttelbad bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde 1 ml der Probe entnommen, in Eppendorf-Küvetten überführt und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen.

Nach der Bestimmung der Konzentration wurden die Mikrosomensuspensionen mit Succhrose-Phosphatpuffer auf die für unsere Versuche gewünschte Konzentration von 20 µg/50 µl verdünnt.

- Herstellung des Phosphatpuffers (nach Sörensen)

Stammlösung A: 0,1 molare Di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung 17,8 g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) auf 1 000 ml aqua bidest. (pH-Wert der Lösung ca. 9,1)

Stammlösung B: 0,1 molare Kalium-Dihydrogenphosphat-Lösung 13,6 g Kalium-Dihydrogenphosphat (KH_2PO_4) auf 1 000 ml aqua bidest. (pH-Wert der Lösung ca. 4,8)

Die Lösungen A und B wurden unter Rühren im Verhältnis 4,5:1 gemischt, danach wurde der pH der Pufferlösung mittels einem pH-Meter kontrolliert und gegebenenfalls durch weitere Zugabe der Lösung A bzw. B exakt auf einen pH-Wert von 7,40 titriert.

- Herstellung des Homogenisierungspuffers (1,25 mol/l Saccharose in 0,1 molarem Phosphatpuffer, pH 7,4)

Dazu wurden 42,8 g Saccharose in 100 ml 0,1 molarem Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst. Um die Saccharose in Lösung zu bringen, wurde der Ansatz im warmen Wasserbad angerührt.

3.2.4 Radioenzym-Assay

3.2.4.1 Radioenzym-Assay der Oxidase

Die Reaktion der oxidativen 11 β -HSD Aktivität:

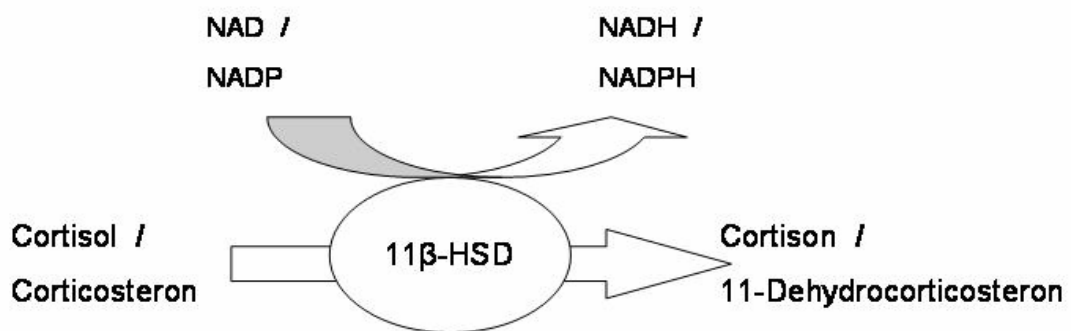


Abb. 2.1: Darstellung der oxidativen 11 β -HSD-Aktivität. Cortisol bzw. Corticosteron werden zu ihren jeweiligen Oxo-Formen Cortison und 11-Dehydrocorticosteron oxidiert. Dabei wird NAD bzw. NADP als Co-Substrat zu NADH bzw. NADPH umgewandelt.

Unser Standard-Assay zur Detektierung der oxidativen Aktivität der 11 β -HSD hat ein Gesamtvolumen von 600 μ l und beinhaltet 0,1 mol/l Na⁺-/K⁺-Phosphatpuffer (pH 7,4). Als Co-Enzym wurden NAD bzw. NADP in einer Konzentration von 0,1 mmol/l zugesetzt. Die Konzentration von Corticosteron und der Proteingehalt in den eingesetzten Homogenaten bzw. Mikrosomensuspensionen variierten bei den Versuchsreihen und wird für die einzelnen Versuche jeweils angegeben. Tritium-markiertes Corticosteron wurde dem Assay mit einer Aktivität von 5000 cpm, entsprechend einer Konzentration von $1,1 \cdot 10^{-10}$ mol/l, zugefügt. Da die Radiochemikalien in Methanol gelöst vorliegen, enthält der Assay maximal 1% Methanol.

3.2.4.2 Radioenzym-Assay der Reduktase

Die Reaktion der reduktiven 11 β -HSD Aktivität:

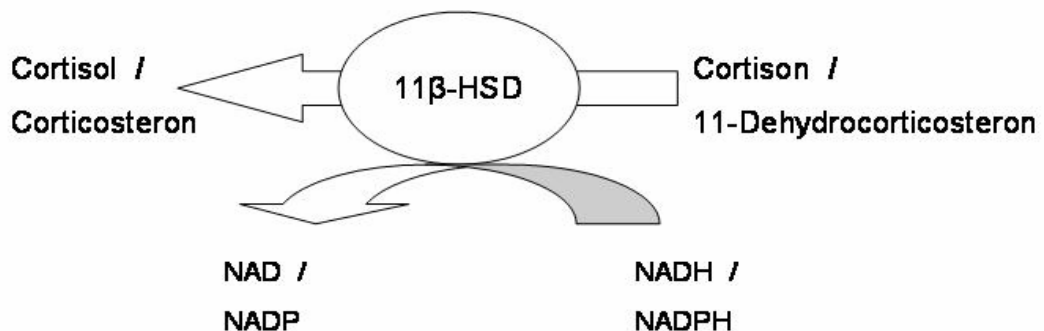


Abb. 2.2: Darstellung der reduktiven 11 β -HSD-Aktivität. Cortison und 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC) werden zu ihren jeweiligen Hydroxy-Formen Cortisol bzw. Corticosteron reduziert. Dabei wird NADH bzw. NADPH als Co-Substrat zu NAD bzw. NADP umgewandelt.

Unser Standard-Assay zur Detektierung der reduktiven Aktivität der 11 β -HSD hat ein Gesamtvolumen von 600 μ l und beinhaltet 0,1 mol/l Na⁺-/K⁺-Phosphatpuffer (pH 7,4). Als Co-Enzym wurden NADH bzw. NADPH in der Konzentration von 0,1 mol/l zugesetzt. Die Konzentration von 11-DHC und der Proteingehalt in den eingesetzten Homogenaten bzw. Mikrosomensuspensionen variierten bei den Versuchsreihen und wird für die einzelnen Versuche jeweils angegeben. Tritium-markiertes 11-DHC wurde dem Assay mit einer Aktivität von 5000 cpm, entsprechend einer Konzentration von $1,1 \cdot 10^{-10}$ mol/l, zugefügt. Da die Radiochemikalien in Methanol gelöst vorliegen, enthält der Assay maximal 1% Methanol.

3.2.5 Umsatzbestimmung mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (high pressure liquid chromatography, HPLC)

Die chromatographischen Methoden dienen dem qualitativen und quantitativen Nachweis von Molekülen und der Auftrennung und Reinigung von Substanzgemengen.

Bei der HPLC-Technik wird eine Elutionsflüssigkeit, die der „mobilen Phase“ entspricht, mit hohem Druck durch die „stationäre Phase“ der Chromatographie-Säule gepresst.

Beim Durchtritt durch die Säule treten zwischen den Molekülen des Substanzgemenges, die in der mobilen Phase gelöst sind und der stationären Phase, entsprechend ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften, unterschiedliche Adsorptionskräften auf. Diese bewirken bei den verschiedenen Molekülsorten eine spezifische Verminderung der Durchflussgeschwindigkeit und dadurch einen fraktionierten Austritt aus der Säule. Die Durchtrittsgeschwindigkeit eines Moleküls hängt einerseits von dessen Löslichkeit im Elutionsmittel und andererseits vom Auftreten von Adsorptionskräften beim Passieren der stationären Phase ab.

Dabei spielen Molekülgröße, Ladungskräfte und unspezifische hydrophobische Wechselwirkungen, die vor allem bei der reversed-phase HPLC zum Tragen kommen, für die Auftrennung des Molekülgemisches eine Rolle.

Bei der normal-phased-HPLC kommt eine stationäre Phase zum Einsatz, die eine hohe Polarität aufweist. Die mobile Phase ist hingegen relativ unpolar. Bei der reversed-phased-HPLC sind die Verhältnisse umgekehrt. Diese Variante der HPLC wird bevorzugt bei der Bestimmung und Differenzierung von unpolaren Stoffen eingesetzt.

Wir verwendeten die reversed-phase-HPLC mit einem Laufmittel bestehend aus 61% Methanol/H₂O (v:v), das kontinuierlich mit Helium begast wurde, um Luftblasen auszutreiben. Der angelegte Druck über der Säule betrug 17 mPa bei einer Flussgeschwindigkeit von 1,3 ml/min.

3.2.6 Enzym-Assay

Unser Standard-Assay mit einem Gesamtvolumen von 600 µl setzte sich zusammen aus:

- Phosphatpuffer 0,1 mol/l, pH 7,4 450 µl
- Substrate
Corticosteron, 11-DHC
Endkonzentration variierend 10 µl
- Tracer
[³H]Corticosteron, [³H]11-DHC
Aktivität 5000 cpm entsprechend einer
Konzentration von $1,1 \cdot 10^{-10}$ mol/l 10 µl
- Co-Substrat
NAD, NADH, NADP oder NADPH
Endkonzentration 10^{-4} mol/l 10 µl

- Homogenat/Mikrosomen-Suspension
Endkonzentration variierenden
(wird bei den jeweiligen Versuchen
angegeben) 50 µl
- Aqua bidest. 70 µl

Die gelösten Lipide, die abhängig von ihrer Polarität in Methanol oder Chloroform gelöst vorlagen, wurden zunächst in die Eppendorf-Röhrchen eingebracht und unter kontinuierlicher Stickstoff-Begasung eingetrocknet. Anschließend wurden die Lipide auf dem Vortex mit dem zugegebenen Phosphatpuffer gelöst. Die übrigen Bestandteile des Assays, mit Ausnahme der Mikrosomen, wurden zupipettiert und im Wasserschüttelbad bei 37°C vorinkubiert.

Da die Steroidhormone in Methanol gelöst sind beinhaltet der Assay maximal 1% Methanol. Voruntersuchungen zeigten, dass bei dieser Konzentration keine Beeinträchtigung der Aktivität beider Isoenzymen der 11β-HSD auftritt.

Die Reaktion wurde durch die Zugabe der Mikrosomensuspension gestartet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml eisgekühlten Ethylacetat gestoppt.

Die Proben wurden auf dem Vortex über 2 Minuten gründlich gemischt, anschließend bei 2 000 U/min. 10 Minuten lang zentrifugiert und schließlich der Überstand mit den enthaltenen Steroiden vorsichtig in Eppendorf-Röhrchen umpipettiert. Die in Vorversuchen ermittelte Wiederfindungsrate der verwendeten Steroide lag bei etwa 80-90%.

Die Proben wurden im Stickstoff-Strom eingetrocknet, der Rückstand in 220 µl 61% Methanol/H₂O (v:v), dem Laufmittel der HPLC-Anlage entsprechend, wieder aufgenommen und anschließend in der HPLC-Anlage ausgemessen.

3.2.7 Statistische Verfahren

Die Ergebnisse werden als Mittelwert zusammen mit der Standardabweichung der Mittelwerte (SEM) angegeben. Die Mittelwerte werden mit Hilfe des ungepaarten t-Testes verglichen. Abweichungen von $p < 0,05$ wurden als signifikant (*), Abweichungen von $p < 0,005$ als hochsignifikant (**) betrachtet.