

Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
des Universitätsklinikums Tübingen  
Direktor: Professor Dr. H. Oßwald  
Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie

**Einfluss von Hypoxie und Adenosin-2',3'-Dialdehyd auf  
den S-Adenosylmethionin/S-Adenosylhomocystein-  
Quotienten in HepG2-, Sk-Hep-1-, HeLa-, MCF-7- und  
Hek-293-Zellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Sandra Christine von Hippel  
aus  
Villingen-Schwenningen

2006

**Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen**

**1. Berichtserstatter: Frau Privatdozentin Dr. D. Kloor**

**2. Berichtserstatter: Professor Dr. B. Hamprecht**

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Transmethylierungen in der Zelle.....	1
1.2. S-Adenosylmethionin und S-Adenosylhomocystein .....	4
1.3. Hypoxie als pathophysiologischer Zustand .....	7
1.4. Zielsetzung.....	11
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1. Untersuchungsgut.....	12
2.2. Kultivierung der Zelllinien .....	14
2.3. Subkultivierung der Zelllinien .....	14
2.4. Kryokonservierung und Revitalisierung der Zellen.....	15
2.5. Inkubation der Zellen mit pharmakologischen Substanzen.....	16
2.6. Bestimmung von SAM <sup>*)</sup> , SAH und Adenosin mittels HPLC .....	17
2.7. Bestimmung der Zellvitalität.....	20
2.8. Quantitative Bestimmung der Adeninnukleotide .....	21
2.9. Photometrische Bestimmung der SAH-Hydrolase-Aktivität.....	23
2.9.1.    Aufbereitung der Zellen.....	23
2.9.2.    Messung der SAH-Hydrolase-Aktivität.....	23
2.9.3.    Bestimmung der Proteinkonzentration .....	24
2.9.4.    Berechnung der spezifischen Aktivität .....	25
2.10. Berechnung und Statistik .....	25
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>26</b>
3.1. Bestimmung des Methylierungspotentials.....	26
3.1.1.    HepG2-Zellen.....	26
3.1.2.    Sk-Hep-1-Zellen.....	27
3.1.3.    HeLa-Zellen .....	30
3.1.4.    MCF-7-Zellen .....	31
3.1.5.    Hek-293-Zellen .....	33
3.2. Vitalität der untersuchten Zelllinien .....	36
3.3. Bestimmung der Adeninnukleotide AMP, ADP und ATP.....	38
3.3.1.    HepG2-Zellen.....	38

<sup>\*)</sup> Wegen Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis von S. III

3.3.2.	Sk-Hep-1-Zellen.....	39
3.3.3.	HeLa-Zellen .....	41
3.3.4.	MCF-7-Zellen .....	42
3.3.5.	Hek-293-Zellen .....	43
3.4.	Bestimmung der SAH-Hydrolase-Aktivität.....	46
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>48</b>
4.1.	SAM- und SAH-Konzentrationen, MP .....	49
4.2.	Vitalität der untersuchten Zelllinien .....	59
4.3.	Energieladung der Zellen .....	61
4.4.	SAH-Hydrolase-Aktivität.....	65
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>68</b>

---

**Abkürzungsverzeichnis**

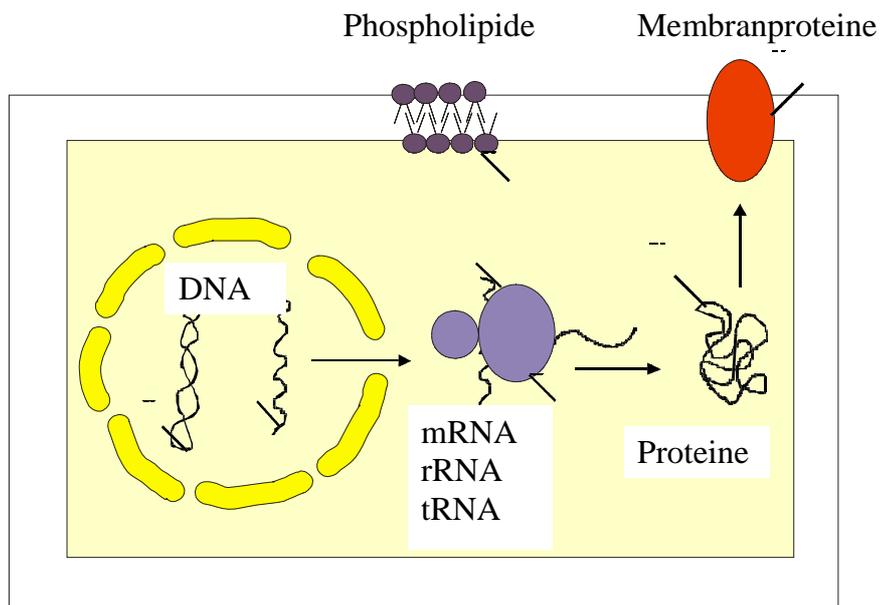
<b>ADA</b>	Adenosindesaminase
<b>Ado-Dial</b>	Adenosin-2',3'-Dialdehyd
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>AMP</b>	Adenosinmonophosphat
<b>ARNT</b>	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin ( <i>engl.: bovine serum albumin</i> )
<b>DZA</b>	3-Desazaadenosin
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>EC</b>	Energieladung ( <i>engl.: energy charge</i> )
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>engl.: ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
<b>HIF</b>	<i>Hypoxia inducible factor</i>
<b>HPLC</b>	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>engl.: high performance liquid chromatography</i> )
<b>K<sub>eq</sub></b>	Gleichgewichtskonstante
<b>K<sub>i</sub></b>	Inhibitorkonstante
<b>KPP</b>	Kaliumphosphatpuffer
<b>LM</b>	Laufmittel
<b>MAT</b>	L-Methionin S-Adenosyltransferase
<b>MP</b>	Methylierungspotential
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>iNOS</b>	induzierbare NO-Synthase
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung ( <i>engl.: phosphate-buffered saline</i> )
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion ( <i>engl.: polymerase chain reaction</i> )
<b>pVHL</b>	von Hippel-Lindau-Protein
<b>S</b>	Svedberg-Einheit
<b>SAH</b>	S-Adenosylhomocystein
<b>SAHH</b>	S-Adenosylhomocystein-Hydrolase

<b>SAM</b>	S-Adenosylmethionin
<b>SD</b>	Standardabweichung ( <i>engl.: standard deviation</i> )
<b>SEM</b>	Standardfehler des Mittelwertes ( <i>engl.: standard error of the mean</i> )
<b>SNK</b>	Serum aus neugeborenen Kälbern
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol)
<b>U</b>	Internationale Einheit für enzymatische Aktivität, $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ( <i>engl.: Units</i> )
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>VEGF</b>	Gefäßendothelialer Wachstumsfaktor ( <i>engl.: vascular endothelial growth factor</i> )
<b>VHL</b>	von Hippel-Lindau-Tumorsuppressor-Gen

# 1 Einleitung

## 1.1. Transmethylierungen in der Zelle

Die Rolle der biologischen Transmethylierungsreaktionen, die sowohl für das Zellwachstum als auch für die Zellfunktion von entscheidender Bedeutung sind, wurde 1996 von Chiang et al. (1) zusammengefasst (Abb. 1).



**Abbildung 1:** Überblick über die verschiedenen Methylierungsakzeptoren einer Zelle.  
 DNA: Desoxyribonukleinsäure; RNA: Ribonukleinsäure; rRNA: ribosomale RNA;  
 mRNA: Messenger RNA; tRNA: Transfer RNA.

Eine der wichtigsten Funktionen stellt die Methylierung von Nukleinsäuren dar. Die häufigste, noch während der Replikation stattfindende Modifikation von DNA in Eukaryonten (2), ist die Methylierung des Cytosinrests an der Position 5' des Pyrimidinrings. Sie tritt vor allem im Kontext von CpG-Dinukleotiden auf, die in der DNA unterschiedlich häufig verteilt sind. CpG-Inseln findet man meist in der 5'-Region der Gene. Sie kommen gehäuft in Promotor-Regionen von "housekeeping genes" vor (3). Vor transkriptionell aktiven Genen sind CpG-

Inseln nicht methyliert. Werden die CpG-Inseln im Promotorbereich methyliert, kann dies die Transkription des nachgeschalteten Genes verhindern, was die zelluläre Differenzierung beeinflussen kann (4). Andere Transkriptionsfaktoren wiederum verlieren dadurch nicht an Aktivität und können trotz Methylierung ihrer jeweiligen Bindungsstellen an den Promotor binden, wodurch eine Transkription nicht unterbunden wird (5).

Evolutionsgenetisch betrachtet ist die DNA-Methylierung außerdem ein „Marker“, um zwischen arteigener und artfremder DNA, vor allem in Bakterien, zu unterscheiden. Bakterien erkennen die DNA an kurzen Folgen von Nukleotiden, deren Restriktionsendonukleasen andersartig methylierte DNA spalten. Somit wird die eingedrungene Fremd-DNA zerstört, während die eigenen DNA-Sequenzen als solche erkannt werden. Diese biochemischen Modifikationen betreffen vor allem die Nukleotide Adenin und Cytosin (6).

Methylierungsvorgänge an der DNA spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und in der Entwicklung neuer Organismen sowie beim Imprinting autosomaler Gene. Dabei wird eines der elterlichen Allele methyliert und somit inaktiviert (7). Auch eines der beiden X-Chromosomen liegt in weiblichen Säugetierzellen inaktiviert als Barr-Körperchen vor. Hier sind ebenfalls viele Cytosinreste in den CpG-Inseln methyliert (6).

Der Methylierungsstatus spielt auch bei der Karzinogenese eine wichtige Rolle. So kann das instabile 5-Methylcytosin über eine spontane hydrolytische Desaminierung zu Thymin selbst mutationsauslösend wirken, während die Desaminierung der regulären Base Cytosin zu Uracil führt. Für mehr als 30 % aller Punktmutationen wird als Ursache die Transition von 5-Methylcytosin zu Thymin angenommen, was bedeuten würde, dass die Methylierung von Cytosin-Resten das Mutationspotential um den Faktor 10 erhöht (8). Auch Hypermethylierung wird mit Tumorentstehung assoziiert. So wird in Tumoren oft eine Hypermethylierung normalerweise unmethyliert vorliegender CpG-Inseln in Promotorregionen beobachtet. Als Folge wird eine verminderte Transkription von Tumorsuppressorgenen angenommen und somit eine Inaktivierung der Tumorsuppression (9). Tatsächlich konnte für die Hälfte aller Tumorsuppressorgene, so z. B. p16, VHL und p53, in Zellkulturen von Mamma-, Prostata-,

Nieren- und Kolontumoren eine CpG-Hypermethylierung nachgewiesen werden (10,11,12). Parallel zu der nachweisbaren Hypermethylierung wird jedoch eine globale Hypomethylierung der Tumorzellen-DNA beobachtet, so dass eine pauschale Aussage zum Zusammenhang zwischen Hypermethylierung und Tumorerkrankung schwer zu treffen ist (9).

Neben der DNA-Methylierung spielt auch die Methylierung der RNA eine wichtige Rolle. Die Methylierung der rRNA von Säugern ist die Voraussetzung für die Reifung des 45S rRNA-Vorläufers zu 18S und 28S rRNA (13). Sie beeinflusst die Anlagerung der rRNA an Proteine bei der Bildung der Ribosomen, den Transport ins Zytoplasma sowie die Interaktion mit Zellfaktoren (1).

Die Methylierung des 5'-terminalen Caps ist ein allgegenwärtiges Merkmal eukaryotischer hnRNA und vor allem mRNA. Es wird durch Guanyltransferasen und Methylasen zumeist im Zellkern aber auch im Zytoplasma katalysiert (14). Diese mRNA-Methylierung spielt eine wichtige Rolle für die Reifung und den Export der mRNA aus dem Zellkern sowie für die Interaktion mit Ribosomen. Somit ist die Cap-Methylierung der mRNA die Bedingung für eine wirksame Translation und dient gleichzeitig als Schutz vor Abbau durch Nukleasen (15). Da außer eukaryotischer auch virale mRNA über 5'-terminale Cap-Strukturen verfügt, kommt deren Methylierung auch hier eine große Bedeutung zu, da sie z.B. bei Reoviren deren Translation beschleunigt (16). Auch tRNA wird durch Methylierungen modifiziert. Sie beeinflusst die Proteinsynthese auf der Ebene der Codon-Anticodon Erkennung (17).

Weiterhin werden Proteine und Phospholipide methyliert. Die posttranslationale Methylierung von Proteinen steht im Zusammenhang mit Signaltransduktion (1), mit Reparaturvorgängen an der Zellmembran und mit Zellmotilität (18). Eine Stressadaption erfolgt durch die Methylierung von Hitzeschockproteinen (19).

Die Methylierung von Phospholipiden läuft über drei aufeinander folgende Methylierungen von Phosphatidylethanolamin über Phosphatidyl-N-Monomethylethanolamin zu Phosphatidylcholin, welches eines der quantitativ

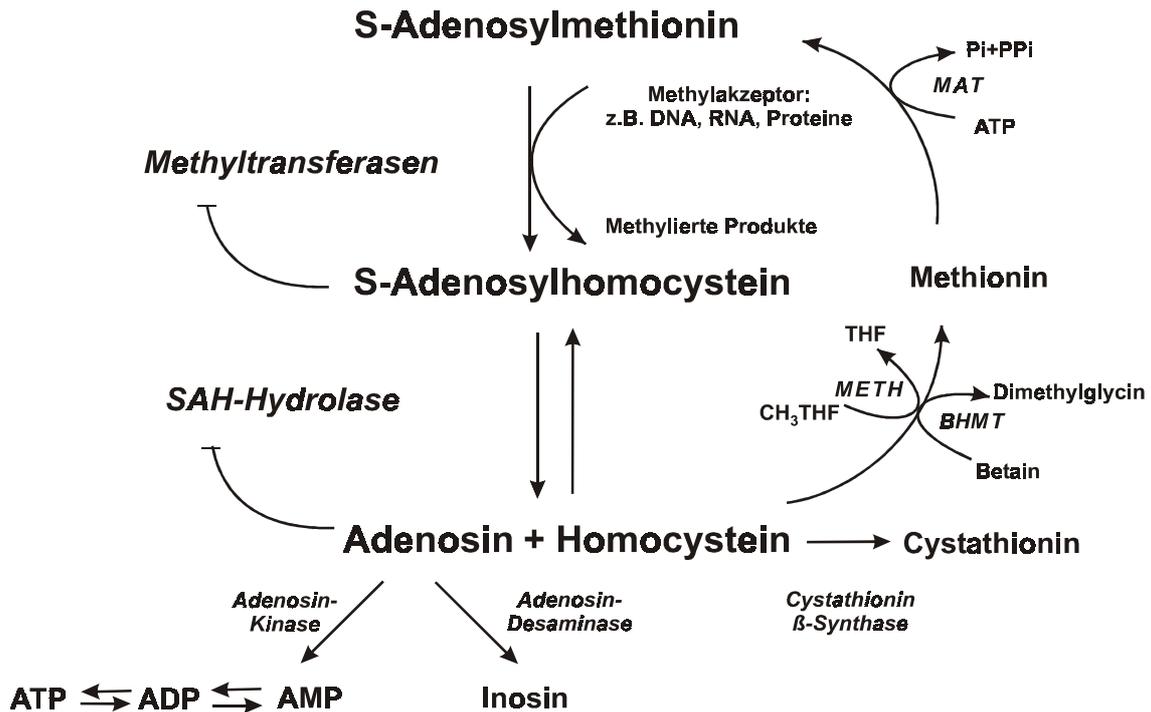
wichtigsten Phospholipide von Membranen in Vertebraten darstellt (20). Die Rolle der Methylierung von Phospholipiden wird ferner im Zusammenhang mit Zellwachstum und Karzinogenese betrachtet (1,21). Außerdem beeinflussen die Methylierung von Phospholipiden (22), wie auch die Carboxymethylierung von Proteinen (23,24) die leukozytäre Chemotaxis, welche bei Entzündungsreaktionen von Bedeutung ist.

## **1.2. S-Adenosylmethionin und S-Adenosylhomocystein**

Die Methylierung von DNA, RNA, Proteinen und Phospholipiden wird durch Methyltransferasen vermittelt, die S-Adenosylmethionin (SAM) als Substrat verwenden. SAM wurde 1952 von Cantoni entdeckt und ist heute als der wichtigste Methylgruppendedonator für den Metabolismus von Neurotransmittern und Hormonen, wie z.B. Dopamin, Histamin, Melatonin, Noradrenalin und Adrenalin bekannt (25,26).

SAM entsteht aus Methionin und ATP (Abb. 2), katalysiert durch die Methionin-Adenosyltransferase (MAT), indem der Adenosylrest von ATP auf Methionin übertragen wird (27). Zwei verschiedene Gene kodieren für die MAT. MAT 1A wird nur in der Leber, MAT 2A wird hingegen in extrahepatischem Gewebe und in der fetalen Leber exprimiert (28-30). Bei der Entstehung von Lebertumoren findet eine Umschaltung in der Expression von MAT 1A zu MAT 2A statt, was vermuten lässt, dass die MAT 2A mit schnellerem Zellwachstum in der Leber korreliert (31). Eine Inhibition der MAT mittels chemischer Agenzien ist allerdings kaum möglich (32).

SAM wird nach Transfer einer Methylgruppe im aktiven Zentrum der Methyltransferase zu S-Adenosylhomocystein (SAH) konvertiert (27). In Eukaryonten wird SAH durch die SAH-Hydrolase (SAHH) in einem reversiblen, NAD-abhängigen (33) Hydrolysevorgang zu Adenosin und Homocystein umgewandelt (34,35).



**Abbildung 2:** Überblick über den intrazellulären SAM-, SAH- und Adenosin-Metabolismus. Da SAH ein Produktinhibitor SAM-abhängiger Transmethylierungen ist, ist dessen schnelle Entfernung durch die SAHH wichtig für einen ungestörten Ablauf von Methylierungsreaktionen in der Zelle. SAH: S-Adenosylhomocystein; THF: Tetrahydrofolat; METH: 5-Methyltetrahydrofolat:Homocystein-S-Methyltransferase; DMG: Dimethylglycin; BHMT: Betain:Homocystein-S-Methyltransferase; MAT: Methionin-Adenosyltransferase; ATP: Adenosintriphosphat; P<sub>i</sub>: anorganisches Phosphat; PP<sub>i</sub>: anorganisches Pyrophosphat; AMP: Adenosinmonophosphat (36).

Das Gleichgewicht der von der SAHH katalysierten Reaktion bevorzugt die Synthese von SAH mit  $K_{eq}$  von  $10^{-6}$  M (35). Unter physiologischen Bedingungen werden jedoch beide Reaktionsprodukte schnell metabolisiert; Adenosin durch die Adenosinkinase oder durch die Adenosindesaminase, Homocystein durch die Methioninsynthase oder durch die Cystathionin-β-Synthase. Daher herrscht *in vivo* die Hydrolyse von SAH vor (35,37).

Der Quotient aus SAM und SAH wird als Methylierungspotential (MP) bezeichnet und ist ein Indikator für den zellulären Methylierungsstatus. Da SAH ein potenter Hemmstoff vieler SAM-abhängiger Methyltransferasen ist und die

Aktivität der SAHH die intrazellulären SAH-Spiegel kontrolliert (38,39), beeinflusst die SAHH indirekt Transmethylierungsprozesse.

Unter verschiedenen pathophysiologischen Umständen, wie z. B. bei Patienten mit Diabetes mellitus (40), Plazenta-Insuffizienz (41) und Gefäßerkrankungen (42), konnte ein verringertes MP nachgewiesen werden. Die Konzentration von SAH kann in der Zelle über zwei Mechanismen ansteigen: entweder durch Stimulation der Bildung oder durch Hemmung der SAHH. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass die durch Ischämie hervorgerufene Erhöhung der SAH-Konzentration über eine Hemmung der SAHH zustande kommt (36). Dabei inhibiert das vermehrt gebildete Adenosin die SAHH und führt zur Akkumulation von SAH. Der Quotient aus SAM und SAH fällt dementsprechend ab.

Eine Erhöhung der intrazellulären SAH-Konzentration kann aber auch durch exogene Zugabe der Substrate für die von der SAHH katalysierten Rückreaktion, Adenosin und Homocystein, erzielt werden. Unter diesen Bedingungen überwiegt die Synthese von SAH und führt somit zur Akkumulation und Produktinhibition (35). Auch hohe Konzentrationen an SAM lassen die SAH-Konzentration *in vitro* ansteigen (43), während dies *in vivo* nicht der Fall zu sein scheint (44).

Die SAHH kann aber auch durch synthetische Nukleosidanaloga gehemmt werden. So wurde in Hepatozyten mit 3-Desazaadenosin (DZA), einem Adenosinkinasehemmstoff, eine Hemmung der SAHH über einen Anstieg der Adenosin-Konzentration gezeigt. Da DZA nicht desaminiert wird, fungiert es gleichzeitig als Substrat der SAHH in Richtung der Synthese und wird zu S-Nukleosidylhomocystein [DZA+Homocystein $\leftrightarrow$ DZA-Homocystein] umgewandelt (45). Somit hemmt auch DZA Methylierungsreaktionen, wenn auch über einen Anstieg der S-Nukleosidylhomocystein-Konzentration.

Ein weiterer potenter Hemmstoff der SAHH ist Aristeromycin (46). Allerdings hemmt Aristeromycin auch die Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase, die für die Wiederverwendung von Hypoxanthin und Guanin zuständig ist (47). Auch Adenosin-2',3'-Dialdehyd (Ado-Dial), welcher durch Oxidation aus Adenosin gebildet wird, ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein potenter, irreversibler

Hemmstoff der SAHH (48). Da Ado-Dial keinen Effekt auf die SAM-, DNA oder RNA Synthese hat und auch nicht als Substrat dient, ist es ein brauchbares Hilfsmittel, um den Einfluss eines erhöhten SAH-Spiegels auf SAM-abhängige Transmethylierungen zu untersuchen (49). Ado-Dial bewirkt schon in nanomolarer Konzentration eine rasche und komplette Inaktivierung der SAHH, was in intakten Zellsystemen zu einem Anstieg von SAH führt. Als Konsequenz davon sind zelluläre Transmethylierungsreaktionen gestört (50).

Die SAHH als Angriffspunkt und deren Hemmung bilden die Grundlage für antivirale, immunsuppressive und anti-inflammatorische Effekte vieler azyklischer und carbozyklischer Adenosin-Analoga (51,52). Als Wirkungsmechanismus wird die Hemmung der Methylierung der 5'-Cap-Struktur viraler mRNA angenommen, die wesentlich für die Virenvermehrung und die Replikation ist (52,53). So konnte z. B. gezeigt werden, dass oberflächlich angewandtes Adenosin antivirale Reaktionen in der Herpestherapie zeigt (54). Auch diese Wirkung beruht vermutlich auf einer Erhöhung der intrazellulären SAH-Konzentration mit nachfolgender Hemmung von Methylierungsreaktionen. Hemmung der SAHH führt *in vitro* zur Hemmung der T-Zell-Proliferation (55). Als mutmaßlicher Wirkungsmechanismus wird die Hemmung der Phosphatidylinositolkinase durch SAH angenommen, einem Enzym, das an diesem Second-messenger-Signalweg in der Zelle beteiligt ist (56). Außerdem wird dieses Enzym für die T-Zell-Aktivierung benötigt (57). Die Beobachtung, dass Lymphozyten eine stärkere Abhängigkeit von Methylierungsvorgängen aufweisen als andere Zelltypen (58), rückte die SAHH als spezifisches, pharmakologisches Zielmolekül im Bereich immunsuppressiver und anti-inflammatorischer Therapie ins Licht (59).

### **1.3. Hypoxie als pathophysiologischer Zustand**

Verminderung des Sauerstoffpartialdruckes in der Umgebung zwingt verschiedene Zellen oder Gewebe in unterschiedlicher Art und Weise zur Adaption. Dies drückt sich zum Beispiel in einer veränderten Genexpression

aus, die zu erhöhter Transkriptionsrate von Angiogenesefaktoren, Hämatopoiesefaktoren und einiger metabolischer Enzyme führt (60). Die Anpassungsfähigkeit variiert zwischen verschiedenen Spezies und verschiedenen Zelltypen sehr stark (61). Zellen von Säugetieren können eher schlecht mit Sauerstoffmangel umgehen und sterben daher unter Hypoxie ab (62). Da ein verändertes MP, vermutlich über eine Hemmung der mRNA-Methylierung, die Genexpression beeinflussen kann, ist eine Untersuchung des MP unter hypoxischen Bedingungen von Interesse. Besondere Aufmerksamkeit gewinnen dabei transformierte Zellen, da diese in ihrer frühen Tumorentwicklung, vor allem bei schnell proliferierenden Tumorarten, beinahe immer ein hypoxisches Stadium durchlaufen (63). Da Hypoxie die Expression einer Vielzahl von Genen, wie z.B. des gefäßendothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) (64), glykolytischer Enzyme (65) und der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) (64-66) bewirkt, könnte ein hypoxisches Stadium im Zusammenhang mit einem erhöhten MP sogar einen Vorteil für die transkriptionelle Aktivität und schnelle Proliferation in Tumorzellen darstellen.

Ratten, die sowohl akuter (3 % O<sub>2</sub> über wenige Stunden) als auch physiologischer (10 % O<sub>2</sub> über mehrere Tage) Hypoxie ausgesetzt waren, zeigen verringerte SAM-Konzentrationen sowie verringerte MAT-mRNA-Spiegel und verringerte MAT-Aktivität (67). Besondere Bedeutung kommt der Beobachtung zu, dass Methyl-Mangelernährungen (Mangel an Methionin, Cholin, Folsäure oder Vitamin B<sub>12</sub>) spontane Hepatome in Laborratten ohne exogenes Karzinogen provozieren (68,69). Auch diese Tiere haben subnormale SAM-Werte, hypomethylierte DNA und gesteigerte Aktivitäten von tRNA-Methyltransferasen (70). Gleiche Ergebnisse liefert eine Studie, die Ratten bei einer normalen Diät, die für ausreichend ATP und Methionin sorgt, chronischer Hypoxie aussetzt (71). Allerdings taucht ein signifikanter Abfall erst nach 10 Tagen auf. Da die SAH-Konzentrationen in diesen Tieren konstant blieben, zog man den Schluss, dass der Abfall des SAM-Spiegels allein für die DNA-Hypomethylierung verantwortlich ist. Eine weitere Studie mit Rattenleberzellen in Kultur belegt diese Ergebnisse. Auch hier zeigt sich unter hypoxischen

Bedingungen ein Abfall der SAM-Konzentrationen neben gleich bleibender SAH-Konzentration. Diese Situation führt zu einem verringerten MP (72). Außerdem wurde beobachtet, dass der Spiegel von Glutathion, welches für die antioxidative Abwehr nötig ist und *in vivo* die MAT-Aktivität reguliert (73,74), unter Hypoxie erniedrigt, während iNOS erhöht ist (72). NO fungiert als starker Inhibitor der MAT in der Rattenleber und führt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zur Inaktivierung dieses Enzyms (75), was den Grund für die verringerte SAM-Konzentration liefert. Anders jedoch scheint die Hepatomzelllinie H35 resistent gegenüber Hypoxie zu sein, da deren MAT-mRNA-Expression unter Hypoxie nicht verändert ist (Übersicht in (72)). Diese Beobachtung könnte für die Selektion von Hypoxie-resistenten Subpopulationen in der Entwicklung solider Tumoren wichtig sein (76).

SAM-Mangel bei hepatischer Insuffizienz wird daher als Drehpunkt in der spontanen Karzinogenese betrachtet, was durch exogene Zufuhr von SAM komplett verhindert werden kann (77). Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass die SAM-Konzentration unter bestimmten Bedingungen, wie z. B. bei alkoholischer oder viraler Leberzirrhose (78,79), septischem Schock (75) und anderen experimentellen Modellen des Leberschadens (73) vermindert ist. Dabei ist allen Bedingungen verringertes Sauerstoffangebot im hepatischen Parenchym gemeinsam. Dennoch zeigen Zirrhosepatienten im Gegensatz zum Tiermodell trotz eines 50-60 % Abfalls der hepatischen MAT-Aktivität keine veränderten SAM-Werte (73).

Sauerstoff in der Umgebung wird von den meisten Zellen durch Bindung von O<sub>2</sub> an Hämproteine wahrgenommen. Dies ist ein Signal für Transduktionsvorgänge, die zur Genexpression führen. Unterstützt wird diese Beobachtung unter anderem durch die Tatsache, dass verschiedene Übergangsmetalle, wie z. B. Cobalt, Hypoxie nachahmen können, indem sie an den Porphyrinring im Hämteil binden und Eisen substituieren. Dadurch wird es unmöglich, Sauerstoff zu binden (80). Einen Beleg dafür zeigen Untersuchungen an Hepatozyten, die mit 50 µM Cobaltchlorid (CoCl<sub>2</sub>) inkubiert waren. Diese zeigen ebenfalls verringerte MAT- und mRNA-Konzentrationen (72).

Die Transkription Hypoxie-induzierbarer Gene wird in den meisten Fällen durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 vermittelt. Dieser wird unter Hypoxie oder  $\text{CoCl}_2$  aktiviert (81). HIF-1 besteht aus zwei Untereinheiten (82): während die eine, ARNT (Aryl Hydrocarbon Rezeptor Nuklear Translokator), ständig exprimiert wird, wird die andere, HIF-1 $\alpha$ , unter Normoxie durch Ubiquitinierung mit Hilfe des von Hippel-Lindau-Proteins (pVHL) durch Proteasomen abgebaut. Diese Komplexbildung zwischen pVHL und HIF-1 $\alpha$  wird durch Hypoxie oder  $\text{CoCl}_2$  verhindert (83). Unter Hypoxie gelangt HIF-1  $\alpha$  in den Zellkern, wo er an ARNT bindet. HIF-1 induziert die Expression zahlreicher Gene, die für die Adaption an die durch Sauerstoffmangel hervorgerufene neue Situation wichtig sind, wie z. B. Glukose-Tranporter-1, VEGF und verschiedene glykolytische Enzyme (84).

Hypoxie kann Apoptose hervorrufen (85). Andererseits kann Hypoxie aber auch vor apoptotischem Zelltod schützen, der z.B. durch Chemotherapeutika induziert wird, (86). Dieser Gegensatz führt zu der Annahme, dass HIF-1 einerseits pro- andererseits antiapoptotisch wirkt.

## 1.4 Zielsetzung

In dieser Studie sollten zwei Hepatomzelllinien, HepG2 und Sk-Hep-1, zwei extrahepatische Zelllinien, HeLa und MCF-7, sowie eine embryonale Zelllinie, Hek-293 auf ihr MP untersucht werden. Zunächst wurde der physiologische Zustand der Zellen unter Kontrollbedingungen untersucht, um zu sehen, welche Abweichungen des MP mit der Aufrechterhaltung einer normalen Zellfunktion vereinbar sind. Dies wurde der Situation unter Hypoxie gegenübergestellt, da Hypoxie bei Tumorzellen von großer Bedeutung ist. Die Methylierungsaktivität sollte bei Hek-293-Zellen weiterhin im Zusammenhang mit der Wirkung von  $\text{CoCl}_2$ , einer Hypoxie-imitierenden Substanz, untersucht werden.

In einer weiteren Versuchsreihe sollte mit Hilfe von Ado-Dial die SAHH gezielt gehemmt werden. SAHH kontrolliert die intrazellulären SAH-Konzentrationen und beeinflusst somit Methylierungsreaktionen in der Zelle.

Bei diesen Experimenten wurde neben der SAHH-Aktivität auch die Überlebensfähigkeit der Zellkulturen unter den verschiedenen Bedingungen gemessen. Um zu untersuchen, ob das MP mit Änderungen des Energiemetabolismus im Zusammenhang steht, wurden auch die Konzentrationen der Adeninnukleotide bestimmt.

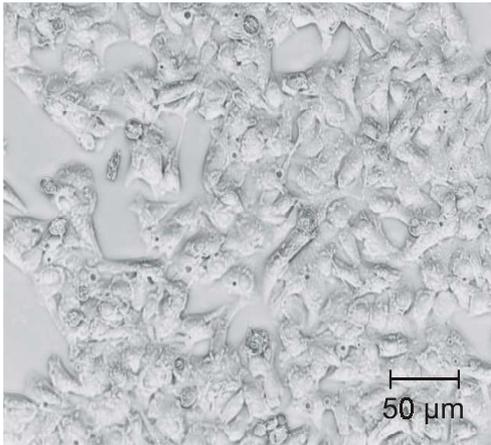
## 2 Material und Methoden

### 2.1. Untersuchungsgut

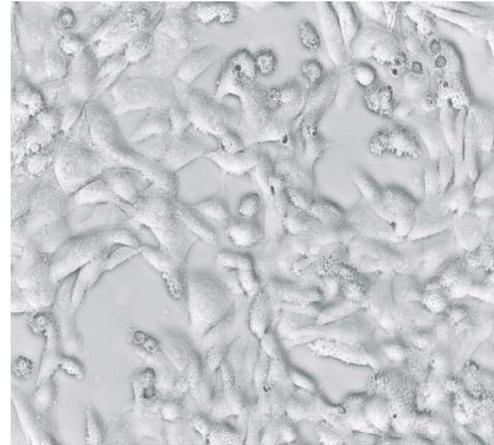
Für die durchgeführten Experimente wurden vier verschiedene humane Tumorzelllinien sowie eine humane nicht-Tumor-Zelllinie verwendet. (Tab. 1 und Abb. 3). Bei den Tumorzelllinien handelte es sich dabei um die humane Hepatomzelllinie HepG2 (87;88), die humane Leber-Adenokarzinomzelllinie Sk-Hep-1 (89-91), die humane Cervix-Karzinomzelllinie HeLa (92) sowie die humane Mamma-Adenokarzinomzelllinie MCF-7 (93). Als Beispiel für eine Nicht-Tumor-Zelllinie diente die humane embryonale Nierenzelllinie Hek-293 (94). Alle Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen.

**Table 1:** Die für die Studie verwendeten Zelllinien und ihre besonderen Merkmale

Zelllinie	Ursprung	Morphologie	Eigenschaften
HepG2	Humane Hepatomzelllinie	adhärent und epithel-ähnlich als Monolayerkultur	keine Genome des Hepatitis-B Virus; Expression einer Vielzahl von Proteinen
Sk-Hep-1	Humane Leber-Adenokarzinomzelllinie	epithel-ähnlich als Einzellschicht	
HeLa	Humane Cervix-Karzinomzelllinie	epithel-ähnlich als Einzellschicht	
MCF-7	Humane Mamma-Adenokarzinomzelllinie	epithel-ähnlich als Einzellschicht	positiv für zytoplasmatische Östrogenrezeptoren; Bildung von kuppelförmigen Zellanordnungen ( <i>domes</i> )
Hek-293	Humane embryonale Nierenzelllinie	adhärent und fibroblasten-ähnlich als Einzellschicht	durch Adenovirus Typ 5 transformiert; Risikokategorie 1



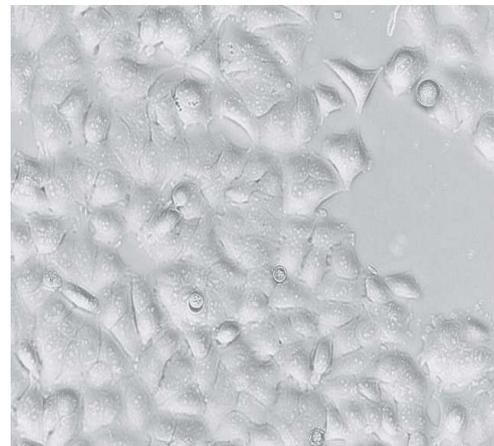
A



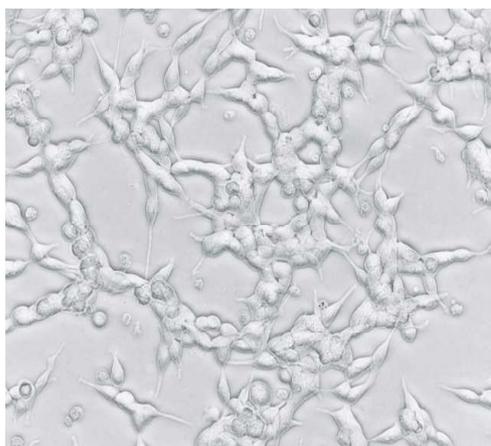
B



C



D



E

**Abbildung 3:** Mikroskopische Aufnahmen von A: HepG2-Zellen; B: Sk-Hep-1-Zellen; C: HeLa-Zellen; D: MCF-7-Zellen; E: Hek-293-Zellen. Die Zellen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop, Nikon Eclipse TE2000-U, und einem Objektiv der Vergrößerung 40 x in einer Nomarski-Optik fotografiert.

## 2.2. Kultivierung der Zelllinien

Alle Zellen wurden bei 37 °C in einem Brutschrank mit 5 % CO<sub>2</sub> und 21 % O<sub>2</sub> in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Dem jeweiligen Kulturmedium (Tab. 2) wurde 10 % hitzeinaktiviertes (1 h, 58 °C) SNK und Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml) zugesetzt. Alle 2-3 Tage wurde das Medium erneuert. Jeweils zuvor wurden die Kulturen auf mögliche Kontaminationen mikroskopiert. Da Sk-Hep-1- und Hek-293-Zellen alle 3-4 Tage subkultiviert wurden, war hier keine zusätzliche Mediuerneruerung nötig. Alle für die Kultivierung erforderlichen Medien und Substanzen wurden von Invitrogen bezogen.

**Tabelle 2:** Kultivierungsbedingungen der verschiedenen Zelllinien; RPMI: 1640 Medium, flüssig mit L-Glutamin; MEM: Minimum Essential Medium mit Earle´s Salzen, flüssig mit L-Glutamin.

Zelllinie	Medium	Verdopplungszeit (h)	Subkultivierung	
			Verfahren	Häufigkeit (pro Woche)
HepG2	RPMI	50-60	Trypsin	einmal
Sk-Hep-1	RPMI	30	Trypsin	zweimal
HeLa	MEM	48	Trypsin	einmal
MCF-7	RPMI	50	Trypsin	einmal
Hek-293	MEM	20-24	Abspülen	zweimal

## 2.3. Subkultivierung der Zelllinien

Die Zellkulturen wurden in Abhängigkeit vom Zelltyp alle 3-7 Tage, spätestens jedoch bei Erreichen der Konfluenz, unter Verdünnung aus dem alten Kulturgefäß in ein neues subkultiviert („passagiert“). Bei stark adhärent wachsenden Zellen erfolgte das Passagieren mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 % in PBS, pH 7,2). Nach Absaugen des alten Mediums wurden die Zellen zunächst mit 5 ml PBS gewaschen, um die im serumhaltigen Medium vorkommenden Trypsininhibitoren zu entfernen. Nach Zugabe von 2 ml vorgewärmter Trypsin/EDTA-Lösung und kurzem Schwanken der Kulturflasche

(250 ml, 75 cm<sup>2</sup>; Greiner) wurden die Zellen 4-6 Minuten lang bei 37 °C inkubiert, um je nach Zelllinie eine optimale Trypsinwirkung zu erreichen. Während dieser Zeit lösten sich die Zellen größtenteils vom Boden der Kulturflasche ab; nicht abgelöste Zellen konnten durch leichtes Abklopfen anschließend in Suspension gebracht werden. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium wurde die Wirkung des Trypsins abgestoppt. Nicht nur eine sofortige Inaktivierung des Trypsins wird dadurch erreicht sondern auch das zytotoxische EDTA wird gebunden. Nach sorgfältigem Abspülen des Flaschenbodens mittels einer Pipette, wurden die Zellen resuspendiert. Da die HepG2-Zellen beim Trypsinierungsprozess Zellhaufen bilden, wurden diese zusätzlich mit einer Kanüle vereinzelt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer ermittelt, so dass die Zellen in der gewünschten Dichte (0,5-1,5 x 10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup>) ausgesät werden konnten. Um den initialen Anheftungsprozess nicht zu beeinträchtigen, wurden die Zellen in den nächsten 48 Stunden nicht manipuliert. Eine frische Mediuernerneuerung erfolgte jeweils nach 2-3 Tagen.

Hek-293-Zellen, die lose an die Kulturschale (94 mm im Durchmesser, 16 mm hoch; Greiner) angeheftet sind, konnten durch mehrfaches Spülen mittels einer Pipette mit neuem Medium in Suspension gebracht und im Verhältnis 1:2 bis 1:4 neu ausgesät werden. Das Aussäen der Zellen in Kulturschalen statt -flaschen erleichterte die Gewinnung möglichst vieler Zellen durch diesen Spülvorgang.

#### **2.4. Kryokonservierung und Revitalisierung der Zellen**

Die Kryokonservierung wurde sowohl als Schutz vor Verlust der Zelllinie bei Kontamination als auch zur Aufbewahrung von Zellen angewendet. Die Lagerung in Flüssigstickstoff bei -196 °C bewahrt die Zellen vor genetischer Variabilität und bringt sowohl die Stoffwechselaktivität als auch die Zellvermehrung vollständig, aber reversibel zum Erliegen.

Als Einfriermedium diente das jeweilige Medium, welchem 20 % SNK und 10 % DMSO (Invitrogen) zugefügt wurde. DMSO schützt die Zellen

während des Einfrierens vor der irreversiblen Zerstörung durch Eiskristalle. Da DMSO bei Erwärmung über etwa 10 °C giftig wird, müssen die Präparate während des Einfriervorganges immer gut gekühlt werden.

Die Behandlung erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurden konfluent wachsende Zellen mit Hilfe von Trypsin abgelöst, durch Einfriermedium A (Medium mit 32 % SNK) vom Boden der Zellkulturflasche gespült und in Zentrifugenröhrchen suspendiert. Hek-293-Zellen wurden direkt mit Einfriermedium A abgespült. Während die Zellen bei 200 x g 10 Minuten abzentrifugiert wurden, konnte man die Kryoröhrchen mit jeweils 500 µl Einfriermedium B (Medium mit 8 % SNK und 20 % DMSO) versehen und auf Eis stellen, um die schädigende Wirkung von DMSO auf die Zellen einzuschränken. Der Überstand der abzentrifugierten Zellen wurde bis auf 500 µl abgesaugt. Die Zellen wurden dann mit Hilfe einer Pipette in die vorbereiteten Kryoröhrchen überführt. Die Zellen, die in Kryoröhrchen suspendiert waren, wurden in einem geschlossenen Styroporbehälter bei -80 °C für 24 h eingefroren. Danach wurden sie in einem Flüssigstickstoffbehälter mit -196 °C gelagert. Dieses Verfahren der Kryokonservierung hat sich für das Überleben der Zellen bewährt.

Zur Revitalisierung der Zellen wurde ein Auftaumedium mit dem benötigten Medium, 20 % SNK sowie Penicillin/Streptomycin vorbereitet. Die Zellen wurden zunächst solange bei 37 °C aufgetaut, bis gerade der letzte Eiskern verschwunden war. Anschließend wurde die Zellsuspension sofort zu 10 ml Auftaumedium pipettiert und die neue Suspension bei 200 x g 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 1 ml verworfen. Die Zellen wurden dann in Medium mit 20 % SNK resuspendiert und die Suspension auf Kulturflaschen oder -schalen verteilt.

## **2.5. Inkubation der Zellen mit pharmakologischen Substanzen**

Eine Inkubation der Zellen mit den verschiedenen Substanzen oder unter Hypoxie erfolgte für einen Zeitraum von 24 Stunden in Kulturschalen (145 mm

im Durchmesser, 20 mm hoch; Greiner). Hierfür wurde zunächst das alte Medium verworfen und der Zellrasen mit PBS gespült. Bei allen Verfahren wurde bei der 24-stündigen Inkubationszeit auf SNK verzichtet, damit die Versuche unter klar definierten und kontrollierten Bedingungen ablaufen konnten, und es nicht zu einem enzymatischen Abbau der exogen applizierten Substanzen durch im SNK eventuell enthaltenen Enzyme kam. Für jedes Experiment wurden Kontrollzellen, die mit Medium und Penicillin/Streptomycin inkubiert wurden, mit untersucht. Weiterhin wurden Zellen mit Ado-Dial (Sigma) sowie  $\text{CoCl}_2$  (Sigma) inkubiert. Zunächst wurde davon jeweils eine Stammlösung in Tris/HCl (20 mM, pH 7,4) hergestellt. Für das Experiment wurde diese mit Medium und Penicillin/Streptomycin im gewünschten Verhältnis verdünnt und auf dem Zellrasen verteilt. Für die Versuche unter Hypoxie wurden die Zellen mit dem jeweiligen serumfreien Medium in einer Atmosphäre mit 5 %  $\text{CO}_2$  und bei einem auf 0,9 kPa (1 %  $\text{O}_2$ ) gesenkten Sauerstoffpartialdruck inkubiert.

## **2.6. Bestimmung von SAM, SAH und Adenosin mittels HPLC**

Für diese Messung wurden die Zellen zunächst wiederum mit PBS (Tab. 3) gewaschen, durch Trypsin gelöst und mit neuem Medium, das Penicillin/Streptomycin enthielt, auf 15 ml aufgefüllt. Hek-293-Zellen wurden direkt mit neuem Medium abgespült und in Suspension gebracht. Je zweimal 100  $\mu\text{l}$  wurden für die Zellzahlbestimmung entnommen. Die restliche Zellsuspension wurde bei 200 x g 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 2 ml verworfen und der Zellniederschlag in ein neues Eppendorf-Röhrchen suspendiert. Dann wurde erneut eine Minute lang bei 20000 x g sedimentiert und der Zellniederschlag noch einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen unter Verwendung von 1,2 ml 0,6 M Perchlorsäure (E. Merck) durch Ultraschall aufgebrochen. Die ausgefallenen Zellbestandteile wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 20000 x g abgetrennt. Zu 1 ml saurem Überstand gab man 10  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{M}$  Methyladenosin als internen Standard sowie „Kaliumlösung“ (2 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$ /1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 9,5,

E. Merck), um einen für die Messung optimalen pH-Wert von 5,5 bis 6,5 zu erreichen. Der restliche saure Überstand wurde für die Bestimmung der Adeninnukleotide bei -80 °C gelagert.

Ein externer Standard wurde ebenfalls hergestellt. Dafür wurden zunächst 1 mM Stammlösungen von SAM, SAH, Adenosin und Methyladenosin in 20 mM Tris/HCl pH 7,4 hergestellt, so dass sich eine Konzentration von jeweils 1 mM ergab (Tab. 4). Anschließend wurden die Standards à je 10 µl in 10 ml 0,6 N Perchlorsäure verdünnt und davon 1 ml mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 M/1 M, pH 9,5) auf den erwünschten pH-Wert titriert.

**Tabelle 3:** Zusammensetzung der Lösungen für die Probenaufarbeitung zur HPLC-Bestimmung

Lösungen	Komponenten	Menge (pro l)	Konzentration (mM)
PBS pH 7,2 (pH mit NaOH eingestellt)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,21 g	1,54
	NaCl	9,00 g	154
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,48 g	2,7
Perchlorsäure	Perchlorsäure 70 %	26 ml	600
	Bidest	468 ml	
„Kaliumlösung“ pH 9,5	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	276,4 g	2000
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,1 g	1000

**Tabelle 4:** Menge zur Herstellung der Standards für die HPLC-Messung

Substanz	Einwaage (mg/10 ml)	Konzentration (mM)
SAM (-20 °C, Sigma)	4,3	1
nur 70 % rein, daher +30 %	5,6	
SAH (Sigma)	3,8	1
Adenosin (Sigma)	2,7	1
Methyladenosin (Sigma)	2,8	1

Das ausgefallene Kaliumperchlorat wurde durch Zentrifugation (5 Minuten bei 20000 x g) abgetrennt. Der gesamte Überstand konnte für die Festphasen-

extraktion über Phenylboronatsäulen verwendet werden (BondElut, ICT, Bad Homburg). Die Säulen wurden zunächst mit 0,1 M Salzsäure gespült, mit 0,1 M Ameisensäure solvatisiert und mit Tris (20 mM, pH 7,4)/Methanol (Volumen-Verhältnis 7:3) voräquilibriert, so dass anschließend eine Adsorption der Proben stattfinden konnte. Dabei werden alle Verbindungen, die zwei cis-ständige OH-Gruppen haben, gebunden. Die Metabolite wurden nach einem Waschvorgang mit 10 mM Citratpuffer (pH 8,8) mit 500 µl 0,1 M Salzsäure aus den Phenylboronatsäulen eluiert und in die HPLC (SYKAM S1000) injiziert.

Die Metabolite im Zellextrakt wurden durch Umkehr-Phase Chromatographie mit UV-Detektion in Anlehnung an Delabar et al. (95) mit den folgenden Abänderungen bestimmt. Die Säule wurde bei 30 °C mit einer Flussrate von 1 ml/min und einem niedrigen Druckgradienten durchgespült. Das Lösungssystem mit Laufmittel A (LMA) und Laufmittel B (LMB) (Tab. 5) lieferte den folgenden Gradienten. Direkt nach Injektion der Probe wurde ein linearer Gradient gestartet, um LMB auf 15 % bei einer Steigerungsrate von 1,2 %/min und auf 70 % bei einer Steigerungsrate von 7,5 %/min zu erhöhen. Danach wurde die Säule mit 70 % LMB 5 Minuten lang und vor der nächsten Probeninjektion durch einen Autosampler (Marathon, Spark Holland, Emmen, Niederlande) mit 100 % LMA 10 Minuten lang gespült, um das System erneut zu äquilibrieren. Aufgetrennt wurden die Proben mit einer Grom-Sil 120 ODS-3 CP-Säule (5 µm, 125 x 4 mm Innendurchmesser.; Grom, Herrenberg) und mit einem UV-Detektor (Modell 204, Linear Instruments, Fremont, USA) bei 254 nm nachgewiesen. Die Auftrennung der Probe war nach 30 Minuten beendet. Sowohl die automatische Probeninjektion, die Aufzeichnung der Daten und die Quantifizierung der Peakfläche wurden mit Hilfe der Peak Simple Software 3.12 (SRI Inc.) durchgeführt.

Bezogen auf den internen Methyladenosin-Standardwert wurden die SAM- und SAH-Werte ermittelt. Daraus konnte das MP (SAM/SAH) berechnet werden. Es wurden sowohl die vorher anhand einer Neubauer Zählkammer ermittelte Zellzahl wie auch die Menge des sauren Überstandes berücksichtigt.

**Tabelle 5:** Zusammensetzung der Laufmittel für die HPLC-Bestimmung der Adeninnukleoside

Lösung	Komponenten	Konzentration	Konzentration
Laufmittel A (LMA)	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma)	1,15 g/l	10 mM
	Heptansulfonat (Fluka)	0,1322 g/l	0,6 mM
	Methanol gradient grade (E. Merck)	30 ml/l	3 %
Laufmittel B (LMB)	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0575 g/500 ml	10 mM
	Heptansulfonat	0,0661 g/500 ml	0,6 mM
	Methanol gradient grade	15 ml/500 ml	3 %
	Acetonitril (E. Merck)	50 ml/500 ml	10 %

## 2.7. Bestimmung der Zellvitalität

Um die Auswirkung der verschiedenen Behandlungen auf Zellvitalität zu untersuchen, wurde die Anzahl der lebenden sowie der toten Zellen mit Hilfe eines elektronischen Zählgerätes bestimmt. Das Zellzählgerät „CASY® Modell TT“ (Schärfe System, Reutlingen) arbeitet nach dem Widerstandsprinzip.

Die Zellen einer Kulturschale (60 mm im Durchmesser, 15 mm hoch; Greiner) wurden abgeerntet, mit Medium auf 15 ml aufgefüllt, sorgfältig gemischt und durch Resuspendieren mit einer Kanüle vereinzelt. Ein aliquoter Teil von 100 µl dieser Zellsuspension wurde in 10 ml CASY®TON (einer isotonen Elektrolytlösung) pipettiert und vermischt. Diese verdünnte Lösung konnte dann direkt für die Zellzählung eingesetzt werden.

Das Probenvolumen wird mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Messkapillare definierter Geometrie gesaugt, an die eine elektrische Spannung angelegt ist. Sobald eine Zelle die Messkapillare passiert, entsteht ein elektrischer Puls. Anhand der Pulse kann die Zellzahl ermittelt werden. Zusätzlich kann durch die Pulsflächenanalyse die Größenverteilung der Zellen ermittelt werden, wobei die jeweilige Pulsfläche dem Zellvolumen proportional ist und über Volumenverdrängung in der Messkapillare bestimmt wird. Geschädigte oder tote Zellen werden wegen ihrer defekten Zellmembran, die

keine elektrische Barriere mehr darstellt, kleiner oder nur mit der Größe ihres Zellkerns dargestellt. So entsteht eine Größenverteilung, bei der vitale Zellen leicht abzugrenzen sind. Da diese Größenverteilung jedoch für jede Zelllinie anders aussieht, wurde zuvor jeweils eine Eichmessung zur Bestimmung vitaler und toter Zellen durchgeführt, um eine Richtlinie für die spätere Verteilung zu erhalten. Dazu wurden Zellen, die unter Kontrollbedingungen herangereift waren, mit PBS gewaschen und 5 Minuten lang bei 2000 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde der Zelniederschlag in 5 ml PBS resuspendiert und jeweils 100 µl dieser Suspension für die Messung entnommen. Zur Eichung der lebenden Zellen wurde 400 µl PBS hinzugegeben, zur Eichung der toten Zellen wurde 400 µl Ethanol hinzugegeben. Davon wurden jeweils 100 µl in 10 ml CASY<sup>®</sup>TON pipettiert und mit Hilfe des Zellzählgerätes gemessen. Anhand der dabei ermittelten Verteilungen der Zellen und Zelltrümmer konnten die Intervallbegrenzungen für jede Zelllinie so gelegt werden, damit später eine individuelle Aussage über die Vitalität der Zellen möglich war. Das Verhältnis der lebenden Zellen zur Gesamtzahl aller Zellen beschreibt die Überlebensrate.

## **2.8. Quantitative Bestimmung der Adeninnukleotide**

Die intrazelluläre Konzentration von Adenosinmonophosphat (AMP), Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosintriphosphat (ATP) wurde mittels HPLC im perchlorsauren Zellextrakt gemessen. Hierzu wurden von dem bei -80 °C gelagerten sauren Überstand 200 µl mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 mM/1mM) auf pH 8,0 eingestellt (Glaselektrode), mechanisch gemischt (Vortex) und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließender 5-minütiger Abzentrifugation bei 20000 x g konnte der Überstand direkt für die Messung eingesetzt werden. Für die Messung wurden interne Standards erstellt (Tab. 6). Von allen Substanzen wurde jeweils eine 1 mM Lösung in 6,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4,8) hergestellt.

**Tabelle 6:** Konzentrationen zum Herstellen der Standards für die Adeninnukleotidbestimmung

Substanz	Einwaage (mg/10 ml)	Konzentration (mM)
AMP	5	1
ADP	5	1
ATP	6,1	1

Vor der Messung wurden die Standards in 0,6 M Perchlorsäure zu einer Endkonzentration von 25 µM verdünnt. Mit 200 µl perchlorsaurem Standard wurde dieselbe Aufarbeitung durchgeführt wie oben beschrieben. Direkt nach Injektion der Probe wurde ein linearer Gradient gestartet, um LMB auf 23 % bei einer Steigerungsrate von 2,3 %/min und auf 60 % bei einer Steigerungsrate von 5,3 %/min zu erhöhen. Danach wurde die Säule mit 60 % LMB 4 Minuten lang und vor der nächsten Probeninjektion mit 100 % LMA 8 Minuten lang gespült, um das System erneut zu äquilibrieren (Tab. 7). Die Auftrennung und Detektion der Proben sowie die Auswertung der Daten erfolgte wie unter 2.6. für die Adeninnukleoside beschrieben.

**Tabelle 7:** Inhaltsstoffe der Laufmittel für die HPLC-Messung der Adeninnukleotide

Lösung	Komponenten	Konzentration	Konzentration
Laufmittel A (LMA)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (66 mM)	800 ml	52 mM
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (66 mM)	220 ml	14 mM
	Acetonitril	3 ml	0,3 %
	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (Sigma)	1,698 g	
Laufmittel B (LMB)	LMA	300 ml	60 %
	Acetonitril	200 ml	40 %

## **2.9. Photometrische Bestimmung der SAH-Hydrolase-Aktivität**

### **2.9.1. Aufbereitung der Zellen**

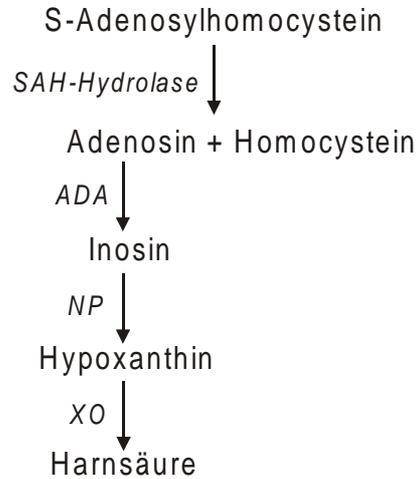
Die Zellen wurden auch hier 24 h vor dem Versuch unter Normoxie, Hypoxie und unter Verwendung von Ado-Dial in serumfreien Medium inkubiert. Nach Ablösen der stark adhärennten Zellen mittels Trypsin bzw. Abspülen der Hek-293-Zellen mit Medium wurde deren Suspension mit neuem Medium auf 15 ml aufgefüllt und bei 200 x g 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Zelleniederschlag wurde mit PBS gewaschen und bei 20000 x g zentrifugiert. Anstatt Perchlorsäure wie für die HPLC-Aufbearbeitung wurde je nach Zellmenge 300-500 µl Kaliumphosphatpuffer (KPP, 50 mM, pH 7) verwendet, um die Zellen darin durch Ultraschall aufzubrechen. Die löslichen Proteine in der Zellsuspension wurden durch zweimalige Zentrifugation (10 Minuten lang bei 20000 x g) von den unlöslichen Zellbestandteilen getrennt. Der Überstand konnte bis zum Versuch bei -20 °C aufbewahrt werden.

### **2.9.2. Messung der SAH-Hydrolase-Aktivität**

Für den Nachweis der SAHH-Aktivität in den jeweiligen Proben wurde ein Reagenz hergestellt, das bis auf die SAHH alle Enzyme enthielt, die für den Reaktionsweg von SAH zu Harnsäure nötig sind (Abb. 4). Hierzu gehören pro Ansatz 1 U ADA (Boehringer Mannheim), 0,09 U Nukleosidphosphorylase (NP; Sigma) und 0,08 U Xanthinoxidase (XO; Roche), gelöst in 864 µl 50 mM KPP. Harnsäure kann dann photometrisch bei 292 nm gemessen werden (96;97).

Um den Reaktionsweg zu starten, wurde eine 1 mM SAH-Lösung in 50 mM KPP vorbereitet. Bei der Messung diente Aqua bidest als Negativprobe, gereinigte Rinder-SAHH als Positivprobe. Anschließend wurde die SAHH-Aktivität folgendermaßen gemessen: Zu 870 µl Reagenz wurde 80 µl der jeweiligen Probe gegeben und je 475 µl in die Messküvette und in eine Referenzküvette pipettiert. Nach Abgleich wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µM SAH-Lösung in die Messküvette gestartet. Bei einer Wellenlänge

von 292 nm wurde im Abstand von 30 Sekunden die Extinktion der Probe über einen Zeitraum von 6 Minuten aufgezeichnet.



**Abbildung 4:** Prinzip des Nachweises der S-Adenosylhomocystein-Hydrolase-Aktivität über die gebildete Harnsäure. ADA: Adenosindesaminase; NP: Nukleosid-Phosphorylase; XO: Xanthin-Oxidase.

### 2.9.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung wurde nach Bradford (98) durchgeführt. Dieses Testprinzip beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliantblau G250 in saurer Lösung von 465 nm zu 595 nm durch die Bindung des Farbstoffs an Proteine (99).

Zunächst wurden die Proben im Verhältnis 1:150 und der Bio-Rad-Protein Assay als Farbkits 1:5 mit Aqua bidest verdünnt. Rinderserumalbumin (BSA) diente als Standard. Zu jeweils 100 µl Proteinlösung, Aqua bidest als Leerwert und einer definierten Verdünnungsreihe aus BSA zur Erstellung einer Eichgeraden wurden 900 µl Farbkits gegeben. Für Doppelbestimmungen wurden jeweils zweimal 200 µl in Mikrotiterplatten pipettiert. Die Extinktion der Lösungen wurden nach 30-minütiger Inkubation bei 630 nm gegen Wasser und Leerwert in einem ELISA-Reader bestimmt. Anhand der ermittelten Konzentration konnte nun die jeweilige Menge an Protein errechnet werden, die

in dem in der photometrischen Messung eingesetzten Volumen von 80  $\mu\text{l}$  enthalten war.

#### 2.9.4 Berechnung der spezifischen Aktivität

Unter Verwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes konnte die Konzentrationsänderung der Harnsäure ermittelt werden (I), und daraus wiederum in Bezug auf die zuvor errechnete Proteinmenge die SAHH-Aktivität (II). Da die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit im linearen Bereich der Kurve bestimmt werden konnte, und sowohl die Schichtdicke der Küvette als auch der molare Extinktionskoeffizient der Harnsäure bekannt sind, konnte die Konzentrationsänderung direkt aus der Extinktionsänderung berechnet werden.

$$(I) \quad \Delta E = \varepsilon \cdot \Delta c \cdot d \leftrightarrow \Delta c = \Delta E / (\varepsilon \cdot d);$$

$\Delta c$ : Konzentrationsänderung der Harnsäure [ $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{ml})$ ]

$\Delta E$ : gemessene Extinktionsänderung [1/min]

$\varepsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient der Harnsäure [ $12,6 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ ]

$d$ : Schichtdicke der Küvette: 1 [cm]

$$(II) \quad \text{Aktivität [U]} = \frac{\text{Konzentrationsänderung } [\mu\text{mol}/\text{min}]}{\text{Proteinmenge [mg]}}$$

#### 2.10. Berechnung und Statistik

Die Energieladung (Energy Charge, EC) des Adenylatsystems wurde gemäß Atkinson und Walton (100) wie folgt berechnet:

$$\frac{[\text{ATP}] + 0,5 \cdot [\text{ADP}]}{[\text{AMP}] + [\text{ADP}] + [\text{ATP}]}$$

Alle Daten werden als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) angegeben, und wurden entweder durch Student-t-Test oder Alternate-t-Test mittels des Computerprogramms InStat analysiert. Regressionsanalysen wurden anhand des Computerprogramms Origin 7G erstellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1. Bestimmung des Methylierungspotentials

Mittels HPLC des perchlorsauren Zellextrakts wurden die Konzentrationen von SAM, SAH, und Adenosin in den fünf verschiedenen Zelllinien unter Kontrollbedingungen, hypoxischen Bedingungen und nach Hemmung der SAHH ermittelt. Außerdem wurde bei Hek-293-Zellen, die besonders deutlich auf Hypoxie reagiert haben,  $\text{CoCl}_2$  verwendet, das in der Zelle einen hypoxischen Zustand nachahmt. Der Quotient aus SAM und SAH wird als MP bezeichnet.

#### 3.1.1. HepG2-Zellen

Unter Kontrollbedingungen wurde in dieser Zelllinie eine SAM-Konzentration von  $2,8 \pm 0,2 \text{ nmol}/10^7$  Zellen und eine SAH-Konzentration von  $0,05 \pm 0,00 \text{ nmol}/10^7$  Zellen ermittelt. Daraus ergibt sich unter physiologischen Bedingungen ein MP von  $67 \pm 8$  (Tab. 8). Die Adenosin-Konzentration betrug  $0,04 \pm 0,01 \text{ nmol}/10^7$  Zellen.

Hypoxie führt zu einer signifikanten Verdoppelung der SAM-Konzentration ( $5,9 \pm 0,3 \text{ nmol}/10^7$  Zellen) und einer signifikanten Halbierung der SAH-Konzentration ( $0,03 \pm 0,00 \text{ nmol}/10^7$  Zellen). Das MP steigt somit auf das 4-fache an und beträgt  $226 \pm 28$ . Die beschriebenen Werte beziehen sich auf eine Zelldichte  $<2 \times 10^5 \text{ Zellen}/\text{cm}^2$ . Die Adenosin-Konzentration bleibt unverändert bei  $0,04 \pm 0,01 \text{ nmol}/10^7$  Zellen.

Der Einfluss von Ado-Dial wurde in dieser Zelllinie nicht bestimmt, da bereits Daten von Hermes et al. (2004) dazu vorliegen (101). Dort konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation der HepG2-Zellen mit dem Hemmstoff zu einer 70-fachen Steigerung der SAH-Konzentration führt und einer 1,8-fach erhöhten SAM-Konzentration. Das MP sinkt daher auf 1,3 in Ado-Dial-behandelten Zellen. Die Adenosin-Konzentration wird dabei nicht signifikant

verändert. Die in vorliegender Arbeit ermittelten Ergebnisse für Norm- und Hypoxie sind mit denen von Hermes et al. (2004) vergleichbar. Die Studie von Hermes et al. (2004) lief unter denselben Bedingungen ab.

**Tabelle 8:** SAM-, SAH- und Adenosin-Konzentrationen und der daraus ermittelte SAM/SAH-Quotient in HepG2-Zellen. Die Zellen wurden 24 h lang unter Normoxie und Hypoxie in serumfreien Medium inkubiert. Die Zellen wurden mit Perchlorsäure extrahiert. Die Metabolite wurden dann nach Auftrennung mittels HPLC analysiert. Daten sind als MW  $\pm$  SEM bei n Bestimmungen angegeben. \*p < 0,05 vs. Kontrolle; \*\*p  $\leq$  0,001 vs. Kontrolle.

Experimentelle Bedingungen	n	SAM nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	SAH nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	Adenosin nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	MP (SAM/SAH)
Kontrolle	6-7	2,8 $\pm$ 0,2	0,05 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,01	67 $\pm$ 8
Hypoxie	7	5,9 $\pm$ 0,3**	0,03 $\pm$ 0,00*	0,04 $\pm$ 0,01	226 $\pm$ 28**

### 3.1.2. Sk-Hep-1-Zellen

Bei dieser Zelllinie beträgt unter Kontrollbedingungen die SAM-Konzentration 2,4  $\pm$  0,2 nmol/10<sup>7</sup> Zellen und die SAH-Konzentration 0,11  $\pm$  0,01 nmol/10<sup>7</sup> Zellen. Somit ergibt sich ein MP von 21,1  $\pm$  1,3 (Tab. 9).

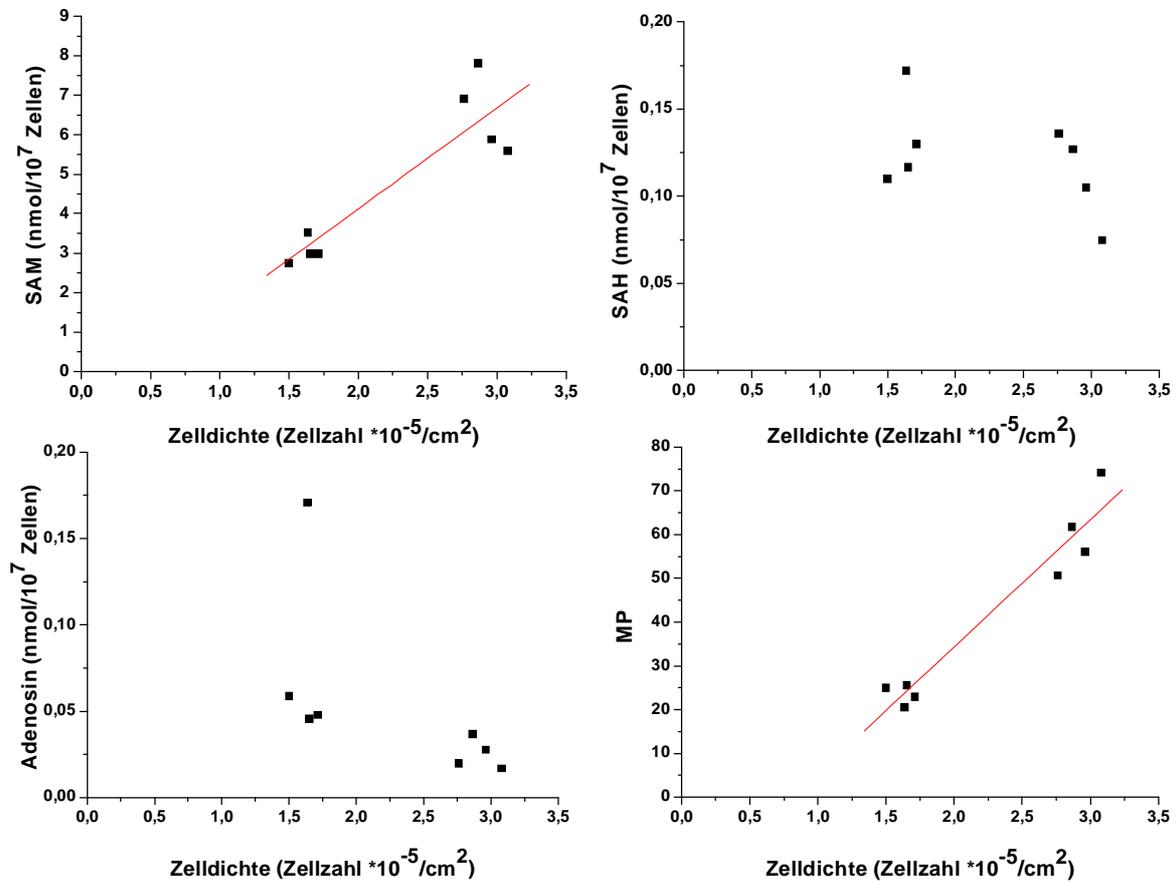
Bei der Bestimmung des MP unter Hypoxie konnte in dieser Zelllinie eine Korrelation zur Zelldichte gezeigt werden (Abb. 5). Zellen, die bei einer Zelldichte < 2,8  $\times$  10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> kultiviert wurden, weisen auch unter hypoxischen Bedingungen ein MP von 23,8  $\pm$  1,5 auf. Eine signifikante Erhöhung des MP durch Sauerstoffmangel kann erst ab einer Zelldichte von 2,8  $\times$  10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> beobachtet werden. Hier beträgt das MP 60,7  $\pm$  5,0. Auch die SAM-Konzentrationen sind bei geringer Zelldichte nicht signifikant verschieden, im Gegensatz zu dicht gewachsenen Zellen mit 6,6  $\pm$  0,5 nmol/10<sup>7</sup> Zellen (Tab. 9; Abb. 5). Die SAH-Konzentrationen zeigen keine Korrelation zur Zelldichte (Abb. 5). Die Adenosin-Konzentration liegt bei den weniger dicht gewachsenen Zellen mit 0,05  $\pm$  0,01 nmol/10<sup>7</sup> Zellen etwas über den normalen Kontrollwerten von 0,04  $\pm$  0,01 nmol/10<sup>7</sup> Zellen und bei den dicht gewachsenen etwas unter

den Kontrollwerten mit  $0,03 \pm 0,01$  nmol/ $10^7$  Zellen. Die Werte unterscheiden sich jedoch nicht signifikant (Tab. 9; Abb. 5). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Zellen bei niedriger Passagezahl ein geringeres MP bei gleicher Zellzahl besitzen als Zellen einer höheren Passage (Abb. 6).

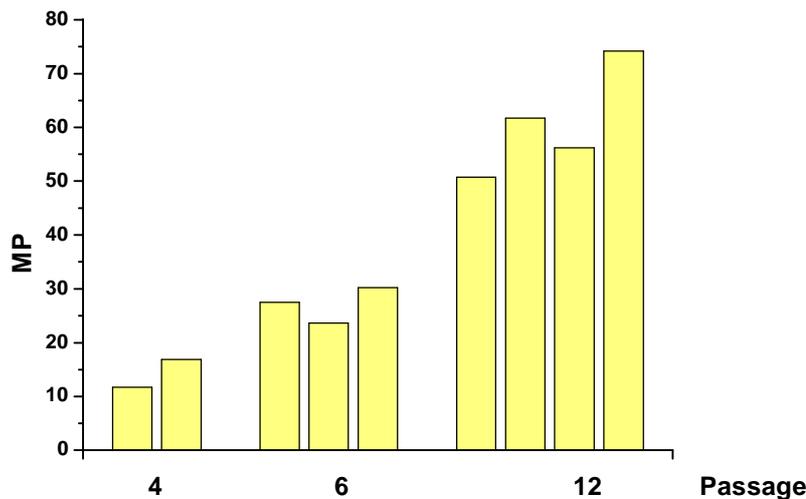
**Tabelle 9:** SAM-, SAH- und Adenosin-Konzentrationen und das daraus ermittelte MP in Sk-Hep-1-Zellen. Zellen wurden 24 h lang unter Normoxie, Hypoxie und Adenosin-2',3'-Dialdehyd (Ado-Dial) in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Perchlorsäure extrahiert. Die Metabolite wurden dann nach Auftrennung mittels HPLC analysiert. Daten sind als MW  $\pm$  SEM bei n Bestimmungen angegeben. \*p <0,05; \*\*p <0,001 vs. Kontrolle; ^p <0,05; ^^p <0,001 vs. Hypoxie  $>2,8 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>.

Experimentelle Bedingungen	n	SAM nmol/ $10^7$ Zellen	SAH nmol/ $10^7$ Zellen	Adenosin nmol/ $10^7$ Zellen	MP (SAM/SAH)
Kontrolle	9	$2,4 \pm 0,2$	$0,11 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$21,1 \pm 1,3$
Ado-Dial 30 $\mu$ M	6	$3,0 \pm 0,3$	$5,7 \pm 0,6^{**}$	$0,04 \pm 0,01$	$0,54 \pm 0,03^{**}$
Hypoxie $<2,8 \times 10^5$ Zellen/cm <sup>2</sup>	11	$3,0 \pm 0,3^{\wedge}$	$0,13 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01^{\wedge}$	$23,8 \pm 1,5^{\wedge}$
Hypoxie $>2,8 \times 10^5$ Zellen/cm <sup>2</sup>	4	$6,6 \pm 0,5^{**}$	$0,11 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$60,7 \pm 5,0^*$
Ado-Dial 30 $\mu$ M + Hypoxie	7	$3,7 \pm 0,4^*$	$5,9 \pm 0,8^{**\wedge}$	$0,02 \pm 0,00$	$0,67 \pm 0,07^{**\wedge}$

Nach der Behandlung der Sk-Hep-1-Zellen mit Ado-Dial (30  $\mu$ M) wurde ein MP von  $0,50 \pm 0,03$  gemessen. Das bedeutet eine Reduktion um 98 % (Tab. 9). Dies beruht vor allem auf dem Anstieg der SAH-Konzentration um 98 % auf  $5,7 \pm 0,6$  nmol/ $10^7$  Zellen. Wurden die Zellen mit Ado-Dial 30  $\mu$ M unter hypoxischen Bedingungen inkubiert, hatten sie ein MP von  $0,67 \pm 0,07$ . Die SAM-Konzentration betrug  $3,7 \pm 0,4$  nmol/ $10^7$  Zellen und die SAH-Konzentration  $5,9 \pm 0,8$  nmol/ $10^7$  Zellen. Die Adenosin-Konzentration wurde durch Ado-Dial weder unter normoxischen Bedingungen ( $0,04 \pm 0,01$  nmol/ $10^7$  Zellen) noch unter hypoxischen ( $0,02 \pm 0,00$  nmol/ $10^7$  Zellen) signifikant verändert.



**Abbildung 5:** Zusammenhang zwischen der Zelldichte und den Konzentrationen von SAM, SAH und Adenosin sowie des MP bei Sk-Hep-1-Zellen unter hypoxischen Bedingungen. Dargestellt wurden die Werte von nur einer Passage (P 12;  $n=8$ ). Ein Teil der Zellen wurde eine Woche, der andere Teil 11 Tage nach der letzten Subkultivierung in serumfreien RPMI 1640 24 h lang unter Hypoxie inkubiert. Die Metabolite wurden mittels HPLC des perchlorsauren Überstands bestimmt und das MP daraus errechnet. SAM:  $r=0,9$ ;  $p < 0,05$ ; MP:  $r=0,97$ ;  $p < 0,0001$ .



**Abbildung 6:** Darstellung des MP in Abhängigkeit von der Passagenzahl. Jede Säule entspricht einem Einzelversuch. Alle Kulturen zeigten nach 24 h Inkubation unter Hypoxie in serumfreien RPMI 1640 eine Zelldichte zwischen  $2,7$  und  $3,3 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und ist in den einzelnen Passageblocks jeweils aufsteigend. Das MP wurde mittels HPLC des perchlorsauren Überstands bestimmt.

### 3.1.3. HeLa-Zellen

Unter Kontrollbedingungen wurden in HeLa-Zellen eine SAM-Konzentration von  $1,82 \pm 0,25$  nmol/10<sup>7</sup> Zellen und eine SAH-Konzentration von  $0,29 \pm 0,04$  nmol/10<sup>7</sup> Zellen ermittelt. Daraus ergibt sich ein MP von  $6,6 \pm 0,7$  (Tab. 10). Die Adenosin-Konzentration betrug  $0,11 \pm 0,01$  nmol/10<sup>7</sup> Zellen.

Unter Hypoxie haben die Zellen ein MP von  $4,6 \pm 0,7$ , das allerdings keine signifikante Verringerung zur Kontrolle aufweist. Die Konzentration von SAM beträgt  $1,00 \pm 0,16$  nmol/10<sup>7</sup> Zellen, von SAH  $0,24 \pm 0,03$  nmol/10<sup>7</sup> Zellen und von Adenosin  $0,21 \pm 0,03$  nmol/10<sup>7</sup> Zellen. Da hier der Einfluss von Hypoxie keine Veränderung des MP mit sich bringt, wurden keine Untersuchungen in Abhängigkeit von der Zelldichte durchgeführt.

Eine Hemmung der SAHH durch Ado-Dial 30 µM bewirkt unter normoxischen Bedingungen einen deutlichen Anstieg von SAH auf  $4,1 \pm 0,4$

nmol/10<sup>7</sup> Zellen (Tab. 10). Da sich die Konzentration von SAM nicht signifikant erhöht, sinkt das MP auf 0,62 ± 0,03. Eine zusätzliche Inkubation der mit Ado-Dial behandelten Zellen unter Hypoxie erhöht die SAH-Konzentration deutlich auf 0,82 ± 0,13 nmol/10<sup>7</sup> Zellen. Da die SAM-Konzentration unverändert bleibt, fällt das MP auf 1,2 ± 0,1.

**Tabelle 10:** SAM-, SAH- und Adenosin-Konzentrationen und das daraus ermittelte MP in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h lang unter Normoxie, Hypoxie und Adenosin-2',3'-Dialdehyd (Ado-Dial) in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Perchlorsäure extrahiert. Die Metabolite wurden dann nach Auftrennung mittels HPLC analysiert. Daten sind als MW ± SEM bei n Bestimmungen angegeben. \*p < 0,05, \*\*p < 0,001 vs. Kontrolle; ^p < 0,05 vs. Hypoxie.

Experimentelle Bedingungen	n	SAM nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	SAH nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	Adenosin nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	MP (SAM/SAH)
Kontrolle	8	1,83 ± 0,25	0,29 ± 0,04	0,11 ± 0,01	6,6 ± 0,7
Ado-Dial 30 µM	5	2,5 ± 0,2	4,1 ± 0,4**	0,06 ± 0,07	0,62 ± 0,03**
Hypoxie	8	1,00 ± 0,16*	0,24 ± 0,03	0,21 ± 0,03*	4,6 ± 0,7
Ado-Dial 30 µM + Hypoxie	3	0,92 ± 0,04*	0,82 ± 0,13**^	0,10 ± 0,03^	1,2 ± 0,1**^

### 3.1.4. MCF-7-Zellen

Unter Kontrollbedingungen zeigen die MCF-7-Zellen eine SAM-Konzentration von 2,14 ± 0,20 nmol/10<sup>7</sup> Zellen und eine SAH-Konzentration von 0,15 ± 0,02 nmol/10<sup>7</sup> Zellen. Somit ist das MP 14,4 ± 1,1. Unter hypoxischen Bedingungen verändert sich weder die SAM- noch die SAH-Konzentration signifikant. Nur die Adenosin-Konzentration fällt von 0,35 ± 0,05 nmol/10<sup>7</sup> Zellen auf 0,19 ± 0,03 nmol/10<sup>7</sup> Zellen (Tab. 11).

In Anlehnung an die Untersuchungen von Hermes et al. (2004) bei HepG2-Zellen sollte hier bei einer anderen Zelllinie das MP in Abhängigkeit von der Ado-Dial-Konzentration untersucht werden. Die Inkubation der Zellen unter

Normoxie mit dem Hemmstoff Ado-Dial zeigt ein deutlich verringertes MP. Schon bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  führt der Inhibitor zu einem Anstieg der SAH-Konzentration auf das 34-fache (Tab. 11). Auch die SAM-Konzentration ist signifikant erhöht. Das MP ist dementsprechend deutlich verringert. Die Adenosin-Konzentration ist signifikant erniedrigt. Die Erhöhung der Ado-Dial-Konzentration auf 10 bzw. 30  $\mu\text{M}$  führt zu einer weiteren Zunahme der SAH-Konzentration bei gleich bleibender SAM-Konzentration. Das hat zur Folge, dass das MP von  $0,66 \pm 0,01$  bei Ado-Dial 3  $\mu\text{M}$  auf  $0,46 \pm 0,03$  bei Ado-Dial 30  $\mu\text{M}$  abfällt. Die Adenosin-Konzentration hingegen wird durch steigende Ado-Dial-Konzentrationen nicht beeinträchtigt.

**Tabelle 11:** SAM-, SAH- und Adenosin-Konzentrationen und das daraus ermittelte MP in MCF-7-Zellen. Die Zellen wurden 24 h lang unter Normoxie, Hypoxie und Adenosin-2',3'-Dialdehyd (Ado-Dial) in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Perchlorsäure extrahiert. Die Metabolite wurden dann nach Auftrennung mittels HPLC analysiert. Daten sind als MW  $\pm$  SEM bei n Bestimmungen angegeben. \*p < 0,05; \*\*p < 0,001 vs. Kontrolle; ^p < 0,05; ^^p < 0,001 vs. Hypoxie.

Experimentelle Bedingungen	n	SAM nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	SAH nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	Adenosin nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	MP (SAM/SAH)
Kontrolle	8	2,1 $\pm$ 0,2	0,15 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,05	14,4 $\pm$ 1,1
Ado-Dial 3 $\mu\text{M}$	3	3,4 $\pm$ 0,4*	5,1 $\pm$ 0,5*	0,18 $\pm$ 0,02*	0,66 $\pm$ 0,01**
Ado-Dial 10 $\mu\text{M}$	3	3,2 $\pm$ 0,2*	6,2 $\pm$ 0,5*	0,18 $\pm$ 0,01*	0,52 $\pm$ 0,01**
Ado-Dial 30 $\mu\text{M}$	5	3,5 $\pm$ 0,4*	7,9 $\pm$ 1,0*	0,14 $\pm$ 0,02*	0,46 $\pm$ 0,03**
Hypoxie	6	1,7 $\pm$ 0,1	0,13 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,03*	12,8 $\pm$ 1,1
Ado-Dial 3 $\mu\text{M}$ + Hypoxie	3	2,9 $\pm$ 0,2*^	4,9 $\pm$ 0,2*^	0,12 $\pm$ 0,01*^	0,59 $\pm$ 0,02**^^
Ado-Dial 10 $\mu\text{M}$ + Hypoxie	3	3,1 $\pm$ 0,5*^	5,0 $\pm$ 0,1*^	0,10 $\pm$ 0,01*^	0,61 $\pm$ 0,01**^^
Ado-Dial 30 $\mu\text{M}$ + Hypoxie	3	3,3 $\pm$ 0,4*^	5,4 $\pm$ 0,2*^	0,12 $\pm$ 0,04*	0,60 $\pm$ 0,05**^^

Bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen unter Hypoxie steigen die SAH-Werte auf  $5 \text{ nmol}/10^7$  Zellen und die SAM-Werte auf  $3 \text{ nmol}/10^7$  Zellen, unabhängig von der eingesetzten Ado-Dial-Konzentration. Das MP sinkt dementsprechend bei allen drei Konzentrationen von 12,8 unter alleiniger Hypoxie auf 0,6 bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit dem SAHH-Hemmstoff.

### 3.1.5. Hek-293-Zellen

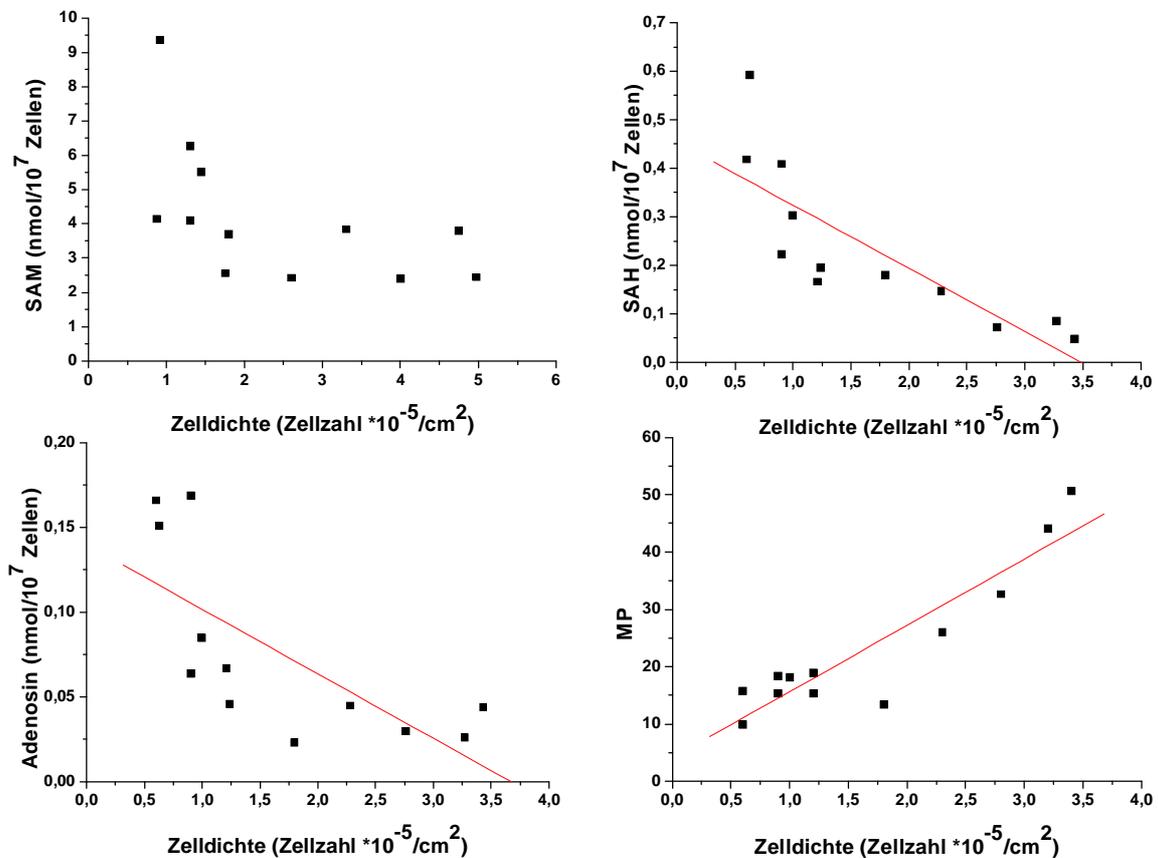
Diese Zelllinie weist unter Kontrollbedingungen eine SAM-Konzentration von  $1,3 \pm 0,1 \text{ nmol}/10^7$  Zellen auf, welche unter Hypoxie auf  $4,8 \pm 0,8 \text{ nmol}/10^7$  Zellen ansteigt. Die SAH-Konzentration beträgt unter Normoxie  $0,19 \pm 0,02 \text{ nmol}/10^7$  Zellen und steigt nicht signifikant unter Hypoxie. Das MP steigt somit von  $7,1 \pm 0,3$  auf  $15,7 \pm 1,1$  an (Tab. 12). Die Adenosin-Konzentration beträgt unter Normoxie  $0,06 \pm 0,01 \text{ nmol}/10^7$  Zellen und ist unter Hypoxie nicht signifikant erhöht. Diese Werte beziehen sich auf eine Zelldichte von 0,6 bis  $1,8 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Sind die Zellen jedoch dichter gewachsen ( $>2 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>), erhöht sich das MP auf  $38,4 \pm 5,5$ , wobei sowohl die SAM-Konzentration auf  $3,1 \pm 0,4 \text{ nmol}/10^7$  Zellen abfällt als auch die SAH-Konzentration auf  $0,09 \pm 0,02 \text{ nmol}/10^7$  Zellen vermindert ist. Hek-293-Zellen weisen unter Hypoxie wie Sk-Hep-1-Zellen eine deutliche Korrelation zwischen der Zellzahl und dem MP (Abb. 7) auf. Bei dieser Zelllinie zeigen die Metabolite SAH und Adenosin einen Zusammenhang mit der Zelldichte. SAM zeigt eine moderate, wenn auch nicht signifikante Korrelation.

Eine Behandlung der Hek-293-Zellen mit Ado-Dial  $10 \mu\text{M}$  führt zu einer nicht signifikanten Erhöhung der SAM-Konzentration auf  $1,8 \pm 0,4 \text{ nmol}/10^7$  Zellen. Da die SAH-Konzentration jedoch auf  $4,7 \pm 0,7 \text{ nmol}/10^7$  Zellen ansteigt, fällt das MP auf  $0,36 \pm 0,03$ . Die Adenosin-Konzentration bleibt unverändert (Tab. 12). Eine Erhöhung der Ado-Dial-Konzentration auf  $30 \mu\text{M}$  führt zu keiner Veränderung des MP. Dies beruht sowohl auf einer erhöhten SAM- als auch einer erhöhten SAH-Konzentration (Tab. 12). Kombiniert man diese Behandlung mit Hypoxie ( $>2 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>), fällt das MP in beiden verwendeten Ado-Dial-Konzentrationen auf 1 ab. Während sich die SAM-Konzentration bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  auf  $4,7 \pm 0,1 \text{ nmol}/10^7$  Zellen

erhöht, steigt die SAH-Konzentration von  $0,10 \pm 0,02$  nmol/ $10^7$  Zellen auf  $4,8 \pm 0,5$  nmol/ $10^7$  Zellen, also auf den 50-fachen Wert. Eine Abnahme der Adenosin-Konzentration ist bei einer Konzentration von  $30\mu\text{M}$  zu beobachten.

**Tabelle 12:** SAM-, SAH- und Adenosin-Konzentrationen und das daraus ermittelte MP in Hek-293-Zellen. Die Zellen wurden 24 h lang unter Normoxie, Hypoxie und Behandlung mit Adenosin-2',3'-Dialdehyd (Ado-Dial) in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden sie mit Perchlorsäure extrahiert. Die Metabolite wurden dann nach Auftrennung mittels HPLC analysiert. Daten sind als MW  $\pm$  SEM bei n Bestimmungen angegeben. \*p < 0,05; \*\*p < 0,001 vs. Kontrolle; ^p < 0,05 vs. Hypoxie >2 x  $10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>.

Experimentelle Bedingungen	n	SAM nmol/ $10^7$ Zellen	SAH nmol/ $10^7$ Zellen	Adenosin nmol/ $10^7$ Zellen	MP (SAM/SAH)
Kontrolle	14	$1,3 \pm 0,1$	$0,19 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,01$	$7,1 \pm 0,3$
Ado-Dial $10\mu\text{M}$	4	$1,8 \pm 0,4$	$4,7 \pm 0,7^*$	$0,07 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,03^{**}$
Ado-Dial $30\mu\text{M}$	5	$2,1 \pm 0,3$	$6,7 \pm 0,8^*$	$0,08 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01^{**}$
Hypoxie <2 x $10^5$ Zellen/cm <sup>2</sup>	8	$4,8 \pm 0,8^*$	$0,31 \pm 0,05^\wedge$	$0,10 \pm 0,02^\wedge$	$15,7 \pm 1,1^{**^\wedge}$
Hypoxie >2 x $10^5$ Zellen/cm <sup>2</sup>	4	$3,1 \pm 0,4^*$	$0,09 \pm 0,02^*$	$0,04 \pm 0,01$	$38,4 \pm 5,5^*$
Ado-Dial $10\mu\text{M}$ + Hypoxie	4	$4,7 \pm 0,1^{**^\wedge}$	$4,8 \pm 0,5^\wedge$	$0,04 \pm 0,01$	$1,0 \pm 0,1^{**^\wedge}$
Ado-Dial $30\mu\text{M}$ + Hypoxie	2	$4,7 \pm 0,4^{**}$	$4,5 \pm 0,5$	$0,01 \pm 0,00^\wedge$	$1,1 \pm 0,2^{**^\wedge}$



**Abbildung 7:** Zusammenhang zwischen der Zelldichte und den Konzentrationen von SAM, SAH und Adenosin sowie des MP bei Hek-293-Zellen unter hypoxischen Bedingungen. Dargestellt sind die Werte von Zellen unterschiedlicher Passagen ( $n = 12$ ). Die Metabolite wurden mittels HPLC des perchlorsauren Überstands bestimmt und das MP daraus errechnet. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt. SAH:  $r = -0,8$ ;  $p < 0,001$ ; Adenosin:  $r = -0,7$ ;  $p < 0,05$ ; MP:  $r = 0,9$ ;  $p < 0,0001$ .

Am Beispiel der Hek-293-Zellen sollte die Auswirkung des Hypoxie-imitierenden  $\text{CoCl}_2$  untersucht werden, da diese Zellen auch sehr deutlich auf Hypoxie reagiert haben.  $\text{CoCl}_2$  ist erst ab einer Konzentration von  $300 \mu\text{M}$  in der Lage, bei den Hek-293-Zellen, Hypoxie zu imitieren. Die SAM-, SAH- und Adenosin-

Werte sowie das MP entsprechen den Werten unter Hypoxie bei einer Zelldichte von  $<2 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Höhere CoCl<sub>2</sub>-Konzentrationen (1 mM) wirken toxisch (Tab. 13).

**Tabelle 13:** SAM-, SAH- und Adenosin-Konzentrationen und das daraus ermittelte MP in Hek-293-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h unter Normoxie und mit CoCl<sub>2</sub> in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden sie mit Perchlorsäure extrahiert. Die Metabolite wurden dann nach Auftrennung mittels HPLC analysiert. Daten sind als MW ± SEM bei n Bestimmungen angegeben. \*p < 0,05 vs. Kontrolle.

Experimentelle Bedingungen	n	SAM nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	SAH nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	Adenosin nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	MP (SAM/SAH)
Kontrolle	14	1,3 ± 0,1	0,19 ± 0,02	0,06 ± 0,01	7,1 ± 0,3
CoCl <sub>2</sub> 50 µM	2	2,0 ± 0,3*	0,29 ± 0,06*	0,11 ± 0,02	7,0 ± 0,3
CoCl <sub>2</sub> 100 µM	3	2,1 ± 0,4	0,27 ± 0,08	0,24 ± 0,10*	8,3 ± 0,9
CoCl <sub>2</sub> 300 µM	3	4,3 ± 0,6*	0,30 ± 0,07	0,13 ± 0,03	14,8 ± 2,3
CoCl <sub>2</sub> 1 mM	3	1,8 ± 0,4	0,17 ± 0,07	0,19 ± 0,08*	12,2 ± 2,4

### 3.2. Vitalität der untersuchten Zelllinien

Um die Auswirkung der Hypoxie sowie der Behandlungen mit Ado-Dial auf die Zellvitalität zu untersuchen, wurde die Anzahl der lebenden sowie der toten Zellen mit Hilfe eines elektronischen Zellgerätes bestimmt. Dabei beschreibt das Verhältnis der lebenden Zellen zur Gesamtzahl aller Zellen die Überlebensrate (Tab. 14). Dies erlaubt allerdings keine Rückschlüsse auf die zum Zeitpunkt des Aberntens vorliegende Zellzahl.

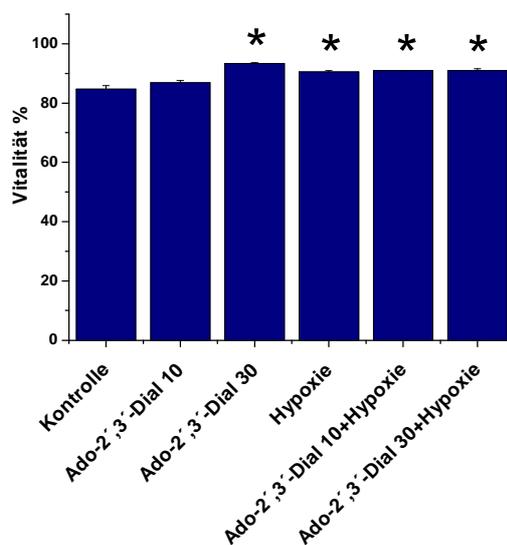
Unter Kontrollbedingungen beträgt die Lebensfähigkeit der HepG2-Zellen  $91,2 \pm 1,4$  %, unter Hypoxie  $84,1 \pm 2,8$  %. Die Behandlung der Zellen mit Ado-Dial 30 µM beeinflusst die Lebensfähigkeit dagegen nicht signifikant (102).

Bei Sk-Hep-1-Zellen, die unter Kontrollbedingungen zu  $87,5 \pm 1,3$  % überleben, verändern weder Behandlung mit Ado-Dial 30 µM noch Hypoxie die

Vitalität der Zellen. Ebenso verhält es sich bei HeLa-Zellen, die unter Normoxie eine Überlebensrate von  $86,0 \pm 1,3$  % zeigen und unter Hypoxie  $83,4 \pm 2,2$  %. Auch hier führt eine Behandlung der Zellen mit dem SAHH-Hemmstoff zu keiner signifikanten Veränderung der Vitalität.

Unter Normoxie beträgt bei MCF-7-Zellen der Anteil vitaler Zelle an der Gesamtzahl  $93,1 \pm 1,2$  %. Unter Hypoxie zeigen die Zellen eine Überlebensrate von  $87,5 \pm 2,0$  %. Eine Behandlung mit Ado-Dial  $30 \mu\text{M}$  führt weder unter normoxischen noch unter hypoxischen Bedingungen zu einer veränderten Vitalität der Zellen.

Hek-293-Zellen zeigen unter Kontrollbedingungen eine Überlebensrate von  $84,7 \pm 1,2$  % und unter Hypoxie von  $90,5 \pm 0,5$  % (Tab. 14). Eine Behandlung mit Ado-Dial 10 bzw  $30 \mu\text{M}$  führt zu einer Vitalität von  $86,9 \pm 0,7$  % bzw.  $93,3 \pm 0,3$  %, kombiniert mit Hypoxie zu 91 %. Außer nach Behandlung mit Ado-Dial  $10 \mu\text{M}$  zeigen alle Zellen einen signifikanten Anstieg der Überlebensrate (Abb. 8).



**Abbildung 8:** Die Überlebensrate von Hek-293-Zellen unter Einfluss von Norm- und Hypoxie, sowie nach Behandlung mit Ado-Dial ( $10$  und  $30 \mu\text{M}$ ). Die Zellen wurden unter den verschiedenen Versuchsbedingungen in serumfreien RPMI 1640 24 h lang inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurde die Vitalität mittels des elektronischen Zellzählgeräts CASY<sup>®</sup>TT bestimmt. Dargestellt sind MW  $\pm$  SEM bei  $n = 2-3$ ; \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

**Tabelle 14:** Übersicht über die Vitalität aller Zelllinien unter Kontrollbedingungen ( $n = 3-12$ ) sowie unter Einfluss von Hypoxie ( $n = 3-12$ ) und Behandlung mit Adenosin-2',3'-Dialdehyd (Ado-Dial) ( $n = 2-7$ ). Die Zellen wurden unter den verschiedenen Versuchsbedingungen in serumfreien RPMI 1640 24 h lang inkubiert. Nach Ablösung der Zellen wurde die Vitalität mittels des elektronischen Zellzählgeräts CASY<sup>®</sup>TT bestimmt. Daten sind als MW  $\pm$  SEM angegeben. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

Exp. Bed.	HepG2	Sk-Hep-1	HeLa	MCF-7	Hek-293
Kontrolle	91,2 $\pm$ 1,4	87,5 $\pm$ 1,3	86,0 $\pm$ 1,3	93,1 $\pm$ 1,2	84,7 $\pm$ 1,2
Hypoxie	84,1 $\pm$ 2,8*	85,2 $\pm$ 0,4	83,4 $\pm$ 2,2	87,5 $\pm$ 2,0*	90,5 $\pm$ 0,5*
Ado-Dial 30 $\mu$ M	Ø	85,2 $\pm$ 2,3	82,7 $\pm$ 0,9	94,6 $\pm$ 1,0	93,3 $\pm$ 0,3*
Ado-Dial 30 $\mu$ M + Hypoxie	Ø	86,5 $\pm$ 0,5	81,6 $\pm$ 2,3	92,2 $\pm$ 0,2	90,9 $\pm$ 0,7*

### 3.3. Bestimmung der Adeninnukleotide AMP, ADP und ATP

Da Transmethylierungsreaktionen einer Zelle mit dem Energiemetabolismus unter anderem über die SAHH verbunden sind, wurde der Einfluss von Hypoxie sowie die Hemmung der SAHH durch Ado-Dial auf die AMP-, ADP- und ATP-Konzentration untersucht. Die intrazelluläre Konzentration der Adeninnukleotide wurde mittels HPLC im perchlorsauren Zellextrakt gemessen und anhand der Formel von Atkinson und Walton (100) wurde die Energieladung der Zellen berechnet.

#### 3.3.1. HepG2-Zellen

Unter Normoxie weisen diese Zellen einen AMP-Gehalt von  $9,0 \pm 1,5$  nmol/ $10^7$  Zellen auf, der unter Hypoxie auf die Hälfte abfällt (Tab. 15). Auch die Konzentration von ADP fällt von  $23,1 \pm 0,6$  nmol/ $10^7$  Zellen unter normoxischen Bedingungen auf  $18,6 \pm 1,1$  nmol/ $10^7$  Zellen unter Hypoxie ab, während die von ATP unverändert ist ( $27,3 \pm 2,0$  nmol/ $10^7$  Zellen unter Normoxie vs.  $28,2 \pm 1,5$  nmol/ $10^7$  Zellen unter Hypoxie). Die EC beträgt unter Kontrollbedingungen  $0,65 \pm 0,02$  und steigt aufgrund der verringerten AMP- und ADP-Spiegel unter Hypoxie auf  $0,73 \pm 0,01$  an.

**Tabelle 15:** AMP-, ADP-, ATP-Konzentrationen und EC bei HepG2-Zellen. Die Zellen wurden 24 h lang unter Normoxie und Hypoxie in serumfreiem Medium inkubiert. Die Adeninnukleotide wurden mittels HPLC bestimmt. Daten sind als MW  $\pm$  SEM bei n Bestimmungen angegeben. \*p < 0,05 vs. Kontrolle.

Experimentelle Bedingungen	n	AMP nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	ADP nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	ATP nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	EC
Kontrolle	7	9,0 $\pm$ 1,5	23,1 $\pm$ 0,6	27,3 $\pm$ 2,0	0,65 $\pm$ 0,02
Hypoxie	7	4,6 $\pm$ 0,6*	18,6 $\pm$ 1,1*	28,2 $\pm$ 1,5	0,73 $\pm$ 0,01*

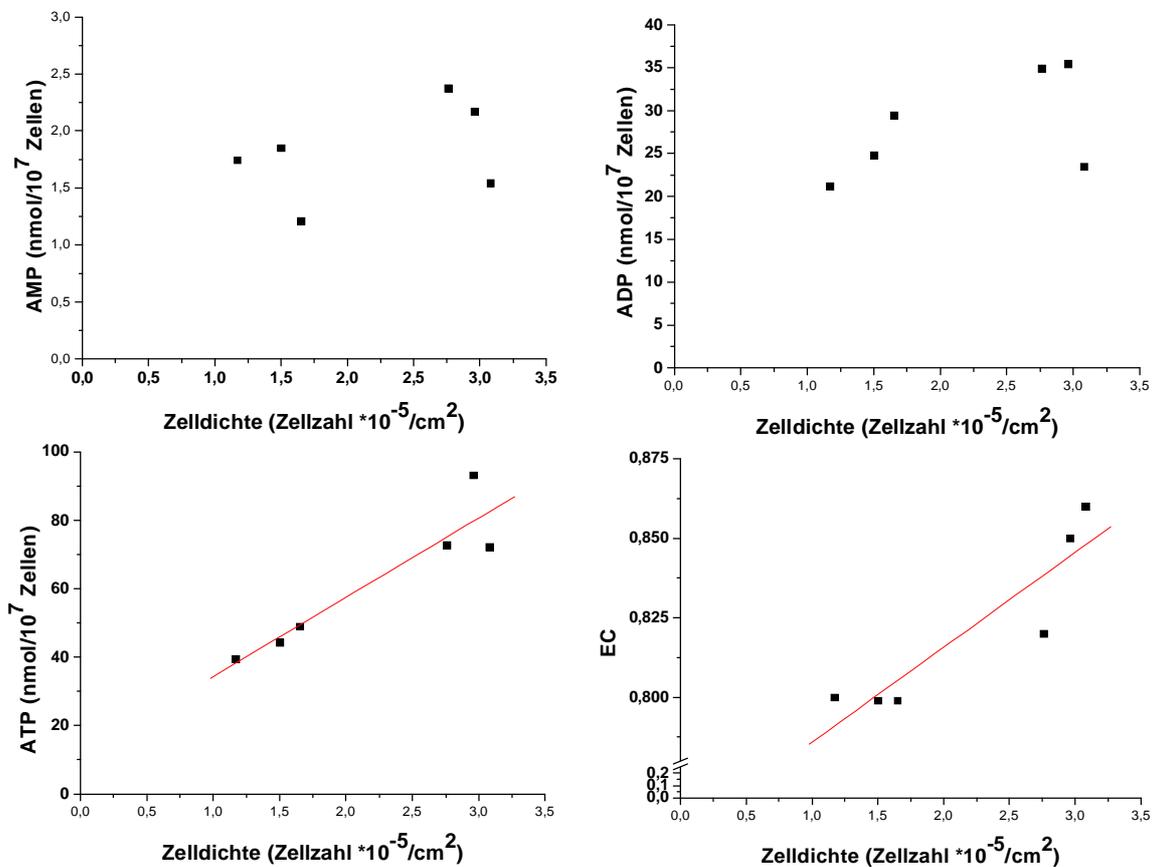
### 3.3.2. Sk-Hep-1-Zellen

Unter Normoxie beträgt der AMP-Gehalt in Sk-Hep-1-Zellen  $3,0 \pm 0,2$  nmol/10<sup>7</sup> Zellen. Hypoxie verringert den AMP-Gehalt, während die Behandlung mit Ado-Dial unter Hypoxie keinen Einfluss auf den AMP-Gehalt hat (Tab. 16). ADP und ATP verringern sich unter Hypoxie, allerdings nur wenn die Zelldichte unter  $2,8 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> bleibt. Ado-Dial führt unter Normoxie bei keinem der Adeninnukleotide zu einer Veränderung. Die EC der Sk-Hep-1-Zellen ist unter normoxischen Bedingungen  $0,81 \pm 0,01$  und verändert sich auch nicht bei Behandlung der Zellen mit Ado-Dial, obwohl die Summe der Adeninnukleotide insgesamt bei  $120$  nmol/10<sup>7</sup> liegt und damit höher als unter Kontrollbedingungen ( $106$  nmol/10<sup>7</sup>).

Unter Hypoxie bei geringer Zelldichte nimmt nicht nur die EC ab sondern auch die Summe aller drei Adeninnukleotide (Tab. 16). Nimmt die Dichte der Zellen auf  $>2,8 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> zu, steigt die Summe mit 113 auf mehr als den Ausgangswert unter Kontrollbedingungen und auch die EC erreicht einen größeren Wert. Trägt man die Adeninnukleotide und die Energieladung unter hypoxischen Bedingungen gegen die Zelldichte auf, dann ergibt sich eine positive Korrelation zwischen der ATP-Konzentration und der Zelldichte. Weder AMP noch ADP zeigen unter Hypoxie eine Abhängigkeit von der Zellzahl. Folglich korreliert auch die Energieladung der Zellen mit der Dichte (Abb. 9).

**Tabelle 16:** AMP-, ADP-, ATP-Konzentrationen und EC bei Sk-Hep-1-Zellen. Die Zellen wurden 24 h lang unter Normoxie, Hypoxie und Adenosin-2',3'-Dialdehyd (Ado-Dial) 30  $\mu$ M in serumfreiem Medium inkubiert. Die Bestimmung der Adeninnukleotide erfolgte mittels HPLC. Daten sind als MW  $\pm$  SEM bei n Bestimmungen angegeben. \*p < 0,05, \*\*p < 0,001 vs. Kontrolle; ^p < 0,05, ^^p < 0,001 vs. Hypoxie < 2,8 x 10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup>.

Experimentelle Bedingungen	n	AMP nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	ADP nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	ATP nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	EC
Kontrolle	7	3,0 $\pm$ 0,2	34,0 $\pm$ 3,1	68,5 $\pm$ 4,9	0,81 $\pm$ 0,01
Ado-Dial 30 $\mu$ M	5	3,3 $\pm$ 0,2	39,3 $\pm$ 2,5	76,9 $\pm$ 7,3	0,80 $\pm$ 0,02
Hypoxie < 2,8 x 10 <sup>5</sup> Zellen/cm <sup>2</sup>	10	2,0 $\pm$ 0,7*	25,0 $\pm$ 0,7*	44,8 $\pm$ 3,1**	0,76 $\pm$ 0,01**
Hypoxie > 2,8 x 10 <sup>5</sup> Zellen/cm <sup>2</sup>	3	2,0 $\pm$ 0,3*	31,3 $\pm$ 3,7	79,4 $\pm$ 6,9 <sup>^</sup>	0,84 $\pm$ 0,01* <sup>^^</sup>
Ado-Dial 30 $\mu$ M + Hypoxie	4-5	1,9 $\pm$ 0,2*	25,2 $\pm$ 2,5	61,4 $\pm$ 6,6 <sup>^</sup>	0,83 $\pm$ 0,01* <sup>^^</sup>



**Abbildung 9:** Korrelationen der Adeninnukleotiden und Energieladung mit der Zelldichte bei Sk-Hep-1-Zellen unter Hypoxie. Dargestellt wurden die Werte von nur einer Passage (P 12; n =6). Ein Teil der Zellen wurde eine Woche, der andere Teil 11 Tage nach der letzten Subkultivierung 24 h lang in serumfreiem RPMI 1640 unter Hypoxie inkubiert. Anschließend wurden die Metabolite mit Perchlorsäure extrahiert und mittels HPLC bestimmt. ATP:  $r=0,93$ ;  $p < 0,05$ ; EC:  $r=0,91$ ;  $p < 0,05$ .

### 3.3.3. HeLa-Zellen

Unter Kontrollbedingungen haben die Zellen einen AMP-Gehalt von  $4,3 \pm 0,5$  nmol/10<sup>7</sup> Zellen, der sich nur unter Hypoxie signifikant auf  $7,4 \pm 0,7$  nmol/10<sup>7</sup> Zellen erhöht. Die ADP-Konzentrationen zeigen dagegen keine signifikante

Abweichung zur Normoxie ( $35,4 \pm 3,9$  nmol/ $10^7$  Zellen). Dagegen fällt der ATP-Gehalt deutlich von  $49,6 \pm 5,6$  nmol/ $10^7$  Zellen unter Normoxie auf  $26,4 \pm 5,0$  nmol/ $10^7$  Zellen nach Behandlung mit Ado-Dial 30  $\mu$ M. Auch der Wert unter Hypoxie ist vermindert, allerdings nicht signifikant (Tab. 17). Die EC liegt unter Kontrollbedingungen bei  $0,75 \pm 0,01$ , fällt auf  $0,69 \pm 0,01$  wenn die Zellen mit dem SAHH-Hemmstoff behandelt wurden. Auch unter hypoxischen Bedingungen verringert sich der EC-Wert auf  $0,70 \pm 0,02$ .

**Tabelle 17:** AMP-, ADP-, ATP-Konzentrationen und EC bei HeLa-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h unter Normoxie, Hypoxie und Adenosin-2',3'-Dialdehyd (Ado-Dial) in serumfreiem Medium inkubiert. Die Bestimmung der Adeninnukleotide erfolgte mittels HPLC. Daten sind als MW  $\pm$  SEM bei n Bestimmungen angegeben. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

Experimentelle Bedingungen	n	AMP nmol/ $10^7$ Zellen	ADP nmol/ $10^7$ Zellen	ATP nmol/ $10^7$ Zellen	EC
Kontrolle	8	$4,3 \pm 0,5$	$35,4 \pm 3,9$	$49,6 \pm 5,6$	$0,75 \pm 0,01$
Ado-Dial 30 $\mu$ M	5	$4,3 \pm 1,0$	$26,5 \pm 4,8$	$26,4 \pm 5,0^*$	$0,69 \pm 0,01^*$
Hypoxie	5	$7,4 \pm 0,7^*$	$30,4 \pm 3,5$	$38,0 \pm 4,9$	$0,70 \pm 0,02^*$

### 3.3.4. MCF-7-Zellen

Bei dieser Zelllinie nimmt die AMP-Konzentration unter Normoxie einen Wert von  $6,6 \pm 0,6$  nmol/ $10^7$  Zellen, die ADP-Konzentration einen Wert von  $25,7 \pm 3,4$  nmol/ $10^7$  Zellen und die ATP-Konzentration einen Wert von  $46,9 \pm 6,6$  nmol/ $10^7$  Zellen an. Unter allen anderen Bedingungen sind keine signifikanten Veränderungen der Adeninnukleotid-Spiegel festzustellen (Tab. 18). Die EC steigt jedoch von  $0,75 \pm 0,01$  unter Normoxie auf  $0,79 \pm 0,01$  unter Hypoxie an, obwohl die Summe aller drei Adeninnukleotide insgesamt von  $79$  nmol/ $10^7$  Zellen auf  $72$  nmol/ $10^7$  Zellen verringert ist.

**Tabelle 18:** AMP-, ADP-, ATP-Konzentrationen und EC bei MCF-7-Zellen. Die Zellen wurden 24 h lang unter Normoxie, Hypoxie und Adenosin-2',3'-Dialdehyd (Ado-Dial) in serumfreiem Medium inkubiert. Die Bestimmung der Adeninnukleotide erfolgte mittels HPLC. Daten sind als MW  $\pm$  SEM bei n Bestimmungen angegeben. \*p < 0,05 vs. Kontrolle.

Experimentelle Bedingungen	n	AMP nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	ADP nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	ATP nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	EC
Kontrolle	8	6,6 $\pm$ 0,6	25,7 $\pm$ 3,4	46,9 $\pm$ 6,6	0,75 $\pm$ 0,01
Ado-Dial 3 $\mu$ M	3	6,6 $\pm$ 0,9	27,0 $\pm$ 7,3	47,0 $\pm$ 11,9	0,75 $\pm$ 0,01
Ado-Dial 10 $\mu$ M	3	7,3 $\pm$ 1,2	27,7 $\pm$ 5,9	46,5 $\pm$ 8,7	0,74 $\pm$ 0,01
Ado-Dial 30 $\mu$ M	4	6,2 $\pm$ 1,9	28,6 $\pm$ 4,5	52,6 $\pm$ 7,6	0,77 $\pm$ 0,02
Hypoxie	6	5,6 $\pm$ 0,8	18,7 $\pm$ 1,5	47,5 $\pm$ 3,6	0,79 $\pm$ 0,01*
Ado-Dial 3 $\mu$ M + Hypoxie	3	4,9 $\pm$ 0,9	18,8 $\pm$ 2,0	51,5 $\pm$ 6,6	0,81 $\pm$ 0,01*
Ado-Dial 10 $\mu$ M + Hypoxie	3	5,1 $\pm$ 0,8	21,7 $\pm$ 1,6	45,1 $\pm$ 4,5	0,76 $\pm$ 0,02
Ado-Dial 30 $\mu$ M + Hypoxie	3	5,1 $\pm$ 1,3	21,1 $\pm$ 0,1	53,7 $\pm$ 2,7	0,80 $\pm$ 0,02*

### 3.3.5. Hek-293-Zellen

In dieser Zelllinie ist die AMP-Konzentration unter Kontrollbedingungen  $16,8 \pm 1,4$  nmol/10<sup>7</sup> Zellen. Unter Hypoxie bei geringer Zelldichte erhöht sich die AMP-Konzentration auf  $23,4 \pm 2,3$  nmol/10<sup>7</sup> Zellen, während sie bei hoher Zelldichte auf  $6,7 \pm 1,9$  nmol/10<sup>7</sup> Zellen abfällt (Tab. 19). Die ADP-Konzentration beträgt unter Normoxie  $22,9 \pm 2,0$  nmol/10<sup>7</sup> Zellen und die ATP-Konzentration  $18,7 \pm 2,0$  nmol/10<sup>7</sup> Zellen. Ab einer Zellzahl von  $>2 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> fallen beide Spiegel unter hypoxischen Bedingungen ab. Die Auftragung der einzelnen Adeninnukleotid-Konzentrationen sowie der EC gegen die Zellzahl zeigt, wie schon bei den Sk-Hep-1-Zellen beobachtet, eine deutliche Korrelation unter Hypoxie (Abb. 10).

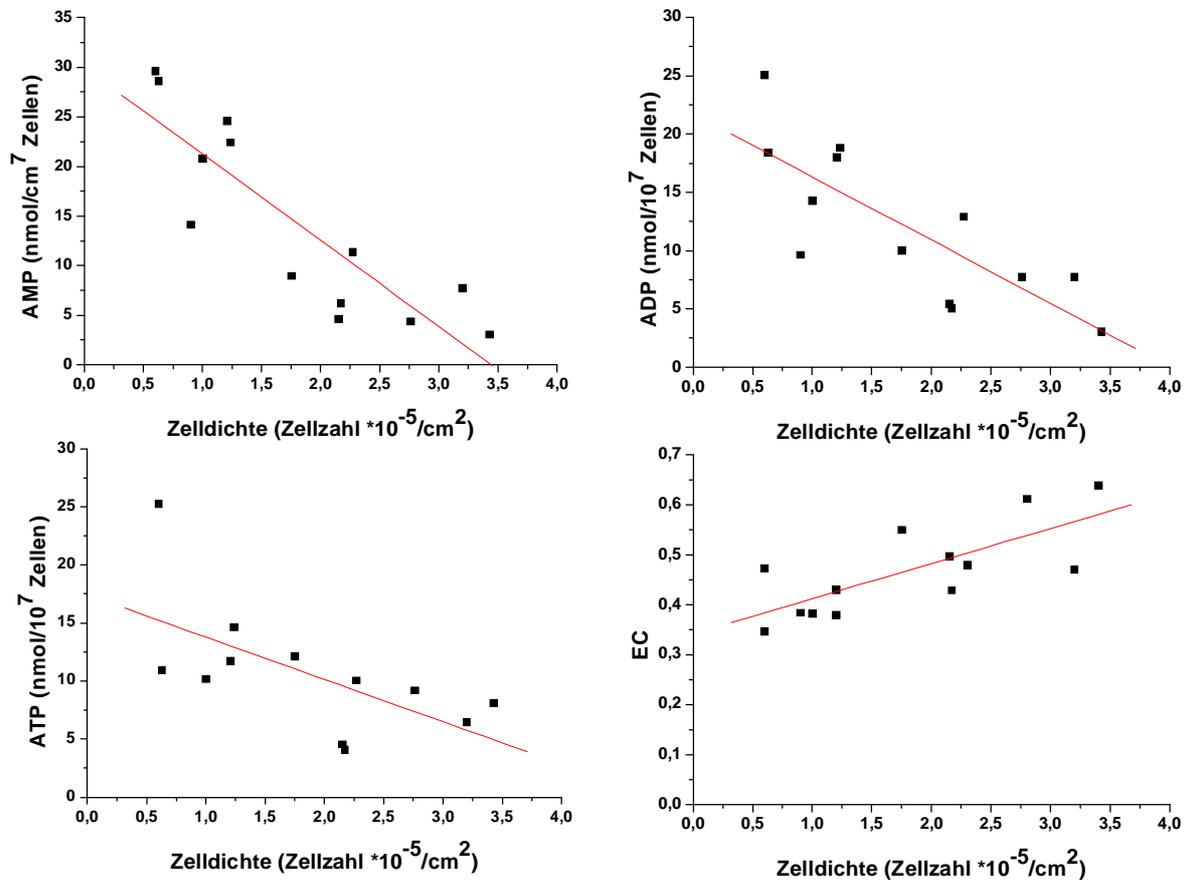
Nach Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> verändern sich die ATP- und ADP-Konzentration bei einer CoCl<sub>2</sub>-Konzentration von 300  $\mu$ M (Tab. 20). Bei einer

CoCl<sub>2</sub>-Konzentration von 1 mM beträgt die Summe der drei Nukleotide 13 nmol/10<sup>7</sup> Zellen, nur noch knapp 1/5 der Summe unter Kontrollbedingungen. Ein ähnliches Ergebnis zeigen die Zellen unter Hypoxie bei hoher Zelldichte. Hier beträgt die Summe aller drei Nukleotide 24 nmol/10<sup>7</sup> Zellen. Die Behandlung mit CoCl<sub>2</sub> 50 µM und 100 µM führt zur Erhöhung aller drei Adeninnukleotid-Konzentrationen. Die Energieladung der Zellen ist unter diesen Bedingungen allerdings gegenüber der Kontrolle unverändert. Nur unter Hypoxie und einer Zelldichte von <2 x 10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> fällt die Energieladung der Zellen signifikant auf 0,4 ± 0,02 ab.

Die Behandlung mit Ado-Dial führt unter Normoxie zu keiner Veränderung der Adeninnukleotid-Konzentrationen (Tab. 19).

**Tabelle 19:** AMP-, ADP-, ATP-Konzentrationen und EC bei Hek-293-Zellen. Die Zellen wurden 24 h lang unter Normoxie, Hypoxie und Adenosin-2',3'-Dialdehyd (Ado-Dial) in serumfreiem Medium inkubiert. Die Bestimmung der Adeninnukleotide erfolgte mittels HPLC. Daten sind als MW ± SEM bei n Bestimmungen angegeben. \*p <0,05, \*\*p <0,001 vs. Kontrolle; ^p <0,05, ^^p <0,001 vs. Hypoxie <2 x 10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup>.

Experimentelle Bedingungen	n	AMP nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	ADP nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	ATP nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	EC
Normoxie	14	16,8 ± 1,4	22,9 ± 2,0	18,7 ± 2,0	0,51 ± 0,02
Ado-Dial 10 µM	5	16,9 ± 2,5	20,9 ± 5,2	17,8 ± 4,8	0,50 ± 0,03
Ado-Dial 30 µM	5	18,0 ± 1,9	19,7 ± 1,7	17,6 ± 3,1	0,49 ± 0,03
Hypoxie <2 x 10 <sup>5</sup> Zellen/cm <sup>2</sup>	6	23,4 ± 2,3*	17,4 ± 2,1	13,3 ± 2,6	0,40 ± 0,02**
Hypoxie >2 x 10 <sup>5</sup> Zellen/cm <sup>2</sup>	4	6,7 ± 1,9*^^	9,0 ± 1,3*^	8,5 ± 0,8**	0,55 ± 0,04^
Ado-Dial 10 µM + Hypoxie	3	6,1 ± 0,6**^^	9,2 ± 1,5*^	9,4 ± 1,2	0,57 ± 0,01*^^
Ado-Dial 30 µM + Hypoxie	2	15,6 ± 10,5	18,9 ± 6,7	13,3 ± 2,6	0,51 ± 0,09



**Abbildung 10:** Korrelationen der Adeninnukleotiden und Energieladung mit der Zelldichte bei Hek-293-Zellen unter Hypoxie ( $n = 12-13$ ). Die Zellen wurden unter Normoxie kultiviert und dann 24 h lang in serumfreiem Medium unter Hypoxie inkubiert. Anschließend wurden die Metabolite mit Perchlorsäure extrahiert und mittels HPLC bestimmt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt. AMP:  $r = -0,8$ ;  $p < 0,001$ ; ADP:  $r = -0,8$ ;  $p < 0,001$ ; ATP:  $r = -0,03$ ;  $p < 0,05$ ; EC:  $r = 0,75$ ;  $p < 0,05$ .

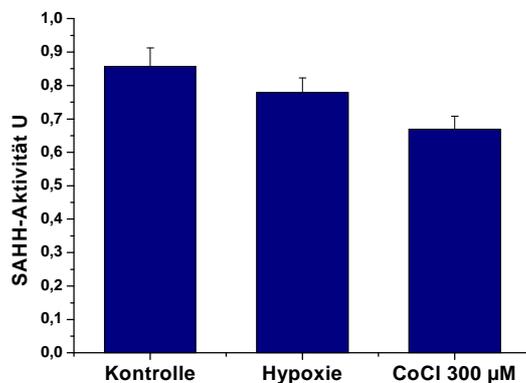
**Tabelle 20:** AMP-, ADP-, ATP-Konzentrationen und EC bei Hek-293-Zellen. Die Zellen wurden 24 h lang unter Normoxie und CoCl<sub>2</sub> in serumfreiem Medium inkubiert. Die Bestimmung der Adeninnukleotide erfolgte mittels HPLC. Daten sind als MW ± SEM bei n Bestimmungen angegeben. \*p < 0,05, \*\*p < 0,001 vs. Kontrolle.

Experimentelle Bedingungen	n	AMP nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	ADP nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	ATP nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	EC
Kontrolle	14	16,8 ± 1,4	22,9 ± 2,0	18,7 ± 2,0	0,51 ± 0,02
CoCl <sub>2</sub> 50 µM	2	28,0 ± 10,0	35,1 ± 6,3*	24,3 ± 5,5	0,49 ± 0,03
CoCl <sub>2</sub> 100 µM	3	21,4 ± 8,2	34,3 ± 4,1*	26,0 ± 1,4	0,54 ± 0,06
CoCl <sub>2</sub> 300 µM	3	16,6 ± 1,1	45,6 ± 15,5	54,9 ± 25,5	0,69 ± 0,02*
CoCl <sub>2</sub> 1 mM	3	3,6 ± 0,9**	6,5 ± 2,0*	2,8 ± 0,6**	0,50 ± 0,01

### 3.4. Bestimmung der SAH-Hydrolase-Aktivität

Die SAHH-Aktivität wurde mittels eines Photometers bestimmt. Dabei wurde die Extinktionen der Harnsäure bei 292 nm gemessen. HepG2-Zellen haben unter Normoxie eine SAHH-Aktivität von 2,9 ± 0,3 U. Diese verringert sich unter Hypoxie auf 1,6 ± 0,5 U (Tab. 21). Bei Sk-Hep-1-Zellen ist die SAHH-Aktivität mit 0,56 ± 0,05 U unter Normoxie bedeutend geringer als bei HepG2-Zellen. Unter Hypoxie verringert sich die Aktivität, jedoch nicht signifikant. Nach der Behandlung mit Ado-Dial 30 µM konnte mit der verwendeten Methode keine SAHH-Aktivität mehr gefunden werden (Tab. 21). HeLa-Zellen zeigen unter Normoxie eine SAHH-Aktivität von 0,66 ± 0,07 U. Auch bei diesen Zellen führt Hypoxie zu einer Reduktion der Aktivität, die jedoch nicht signifikant ist (Tab. 21). Signifikant verringert ist die SAHH-Aktivität dagegen nach Zugabe von Ado-Dial 30 µM auf 0,05 ± 0,03 U. Unter Kontrollbedingungen haben die MCF-7-Zellen eine SAHH-Aktivität von 0,59 ± 0,04 U, die sich nach Hypoxie nicht signifikant verändert hat. Die Hemmung der SAHH mit Ado-Dial 30 µM führt zu einer 10-fachen Verringerung der Aktivität auf 0,06 ± 0,04 U (Tab. 21). Hek-293-Zellen haben unter Normoxie eine SAHH-Aktivität von 0,86 ± 0,06 U. Bei dieser Zelllinie verringert sich die Aktivität sowohl unter Hypoxie als auch nach Inkubation mit CoCl<sub>2</sub> 300 µM nicht signifikant (Abb. 11). Wurden die Zellen mit

Ado-Dial 30  $\mu$ M behandelt, dann sank die SAHH-Aktivität auf  $0,16 \pm 0,03$  U (Tab. 21).



**Abbildung 11:** Photometrische Bestimmung der SAHH-Aktivität von Hek-293-Zellen unter Normoxie, Hypoxie und  $\text{CoCl}_2$  (300  $\mu$ M). Die Zellen wurden 24 h lang unter den jeweiligen Bedingungen in serumfreiem Medium inkubiert. Die SAHH-Aktivität wurde im Gesamtzellextrakt photometrisch bestimmt. Dabei wird das durch die SAHH entstehende Adenosin zu Harnsäure umgewandelt, welche bei 292 nm gemessen werden kann. Daten sind als MW  $\pm$  SEM angegeben (n =3-10).

**Tabelle 21:** Übersicht der verschiedenen SAHH-Aktivitäten aller Zelllinien nach Inkubation unter Normoxie (n =3-10), Hypoxie (n =3-8) und nach Hemmung der SAHH (n =3) für 24 h in serumfreiem Medium. Die SAHH-Aktivität wurde im Gesamtzellextrakt photometrisch bestimmt. Dabei wird das durch die SAHH entstehende Adenosin zu Harnsäure umgewandelt, welche bei 292 nm gemessen werden kann. Daten sind in Units und als MW  $\pm$  SEM angegeben. \*p <0,05; \*\*p <0,001 vs. Kontrolle.

Exp. Bed.	HepG2	Sk-Hep-1	HeLa	MCF-7	Hek-293
Kontrolle	2,9 $\pm$ 0,3	0,56 $\pm$ 0,05	0,66 $\pm$ 0,07	0,59 $\pm$ 0,04	0,86 $\pm$ 0,06
Hypoxie	1,6 $\pm$ 0,5*	0,41 $\pm$ 0,03	0,51 $\pm$ 0,03	0,47 $\pm$ 0,09	0,78 $\pm$ 0,04
Ado-Dial 30 $\mu$ M	Ø	0 (*Ø auswertbar)	0,05 $\pm$ 0,03*	0,06 $\pm$ 0,04**	0,16 $\pm$ 0,03**

## 4 Diskussion

Der Quotient aus den intrazellulären Konzentrationen von SAM und SAH wird als Methylierungspotential (MP) bezeichnet und gibt Auskunft über den Methylgruppentransfer von SAM auf einen Akzeptor (37). Da SAH als kompetitiver Inhibitor mit einer höheren Affinität an SAM-abhängige Methyltransferasen bindet als SAM selbst (103), vermag ein hoher intrazellulärer SAH-Spiegel das MP stärker und effektiver zu senken als verminderte SAM-Konzentrationen. Das MP liefert wichtige Informationen über die Transmethylierungsvorgänge einer Zelle, wobei ein Abfall dieses Quotienten verminderte zelluläre Methylierungsaktivität bedeutet (104,105).

In dieser Studie wurde das MP von fünf verschiedenen Zelllinien untersucht. Um das MP zu bestimmen, wurde eine sensitive HPLC-Methode zur gleichzeitigen Messung der Konzentrationen von SAM, SAH und Adenosin benutzt. Da die SAHH die intrazellulären SAH-Spiegel kontrolliert, wurde das MP gezielt durch Hemmung dieses Enzyms mit Hilfe des potenten und selektiven Hemmstoffes, Ado-Dial (106), verändert. Außerdem wurde der Einfluss von Hypoxie und  $\text{CoCl}_2$  als Hypoxie-Imitator (80) auf diese Zelllinien untersucht.

Ausgewählt wurden Zelllinien mit verschiedenen Merkmalen und Eigenschaften. Der Hauptunterschied besteht in ihrer Gewebeherkunft. Es wurden humane Tumorzelllinien aus der Leber (HepG2- und Sk-Hep-1-Zellen), aus der Gebärmutter (HeLa-Zellen), aus dem Brustgewebe (MCF-7-Zellen) und eine embryonale Nierenzelllinie (Hek-293-Zellen) verwendet. Da HepG2-Zellen schon in vielen Studien untersucht wurden, dienten sie als Referenz für die angewendeten Mess- und Auswertungsmethoden. Außerdem ist bekannt, dass das MP dieser Zelllinie unter Hypoxie ansteigt, und ein Zusammenhang des MP mit der Expression verschiedener Gene besteht (101,107).

Ein weiterer Unterschied besteht in der Verdoppelungszeit. Während sich die Tumorzellen HepG2, HeLa und MCF-7 innerhalb von 50 Stunden teilen,

verdoppelt sich die Tumorzelllinie Sk-Hep-1 innerhalb von 30 Stunden. Hek-293-Zellen, die embryonaler Herkunft sind, wachsen ähnlich schnell wie Sk-Hep-1-Zellen (Verdopplungszeit: 20-24 Stunden).

In dieser Studie sollte untersucht werden, ob sich Zelllinien, die zwar unterschiedlicher Herkunft sind, aber ähnliche Teilungsraten haben, in ihrem MP unterscheiden, und ob das ermittelte MP Rückschlüsse auf die Stoffwechsellage der Zellen zulässt. Darüber hinaus sollte der Einfluss von Hypoxie, Ado-Dial und  $\text{CoCl}_2$  auf das MP untersucht werden. Dabei wurde die SAHH-Aktivität unter den jeweiligen Bedingungen genauso berücksichtigt wie die Überlebensrate und der Energiemetabolismus der einzelnen Zelllinien.

#### **4.1. SAM- und SAH-Konzentrationen, MP**

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigen, dass das MP der verschiedenen Zelllinien bereits unter Kontrollbedingungen stark variiert. Diese Variabilität wird vor allem durch die signifikanten Unterschiede der SAH-Konzentrationen bedingt und weniger durch die SAM-Werte, die in den verschiedenen Zellkulturen weitgehend ähnlich sind. Da unter Kontrollbedingungen die Überlebensrate der hier untersuchten Zelllinien keine starken Abweichungen aufweist, lässt diese Beobachtung den Schluss zu, dass ein MP zwischen 6,6 und 67 den normalen physiologischen Zustand einer Zelle widerspiegelt. Dies steht in Übereinstimmung mit der Literatur, in der Werte für das MP von 5 bei murinen N2a-Neuroblastomzellen (106), bis zu 65 bei der Rattenniere (36) oder 80 bei humanen HL-60-Zellen (108) angegeben sind. Weitere Studien berichten für Nagetiere ein physiologisches MP von 3-10 (109) und ein Abfall der meisten Methyltransferasen erst ab einem MP von weniger als 2 (44,110).

HepG2-Zellen weisen mit  $67,0 \pm 8,3$  das mit Abstand höchste MP auf, gefolgt von Sk-Hep-1-Zellen mit  $21,1 \pm 1,3$  und MCF-7-Zellen mit  $14,4 \pm 1,1$ . Die niedrigsten MP-Werte wurden bei HeLa- und Hek-293-Zellen beobachtet ( $6,6 \pm$

0,7 und  $7,1 \pm 0,3$ ). Neben einer etwas höher als bei den übrigen Zellkulturen liegenden SAM-Konzentration besitzen HepG2-Zellen eine sehr geringe SAH-Konzentration. Ähnliche SAM- und SAH-Konzentrationen von  $2,2 \text{ nmol}/10^7$  Zellen bzw.  $0,03 \text{ nmol}/10^7$  Zellen wurden auch in der humanen HL-60-Zelllinie gemessen (108). Ein Grund für die niedrigen SAH-Werte bei den HepG2-Zellen könnte die hohe SAHH-Aktivität von  $2,9 \pm 0,3 \text{ U}$  sein, die dafür sorgt, dass SAH nicht akkumuliert, sondern schnell weiter zu Adenosin und Homocystein hydrolysiert wird (35). Unter normalen physiologischen Bedingungen ist die SAHH für die intrazelluläre SAH-Konzentration verantwortlich (103,110). Ein anderer Mechanismus, die SAH-Konzentration im Zytosol zu beeinflussen, scheidet aus, da SAH die Plasmamembran nicht passieren kann. Auch sind keine SAH-Transporter bekannt (111,112).

Sk-Hep-1-Zellen, deren SAM-Konzentration 20-mal höher ist als die SAH-Konzentration, zeichnen sich durch eine besonders geringe SAHH-Aktivität von  $0,56 \pm 0,05 \text{ U}$  aus. Sie beträgt nur ein Fünftel der bei HepG2-Zellen beobachteten. Das wäre ein Hinweis dafür, dass SAH hier nicht so schnell entfernt wird wie in HepG2-Zellen. Da in beiden Zelllinien Adenosin in gleicher Konzentration vorliegt, kann auch nicht angenommen werden, dass das Reaktionsgleichgewicht in Richtung der Synthese verschoben ist. Aus dem Ergebnis lässt sich der Schluss ziehen, dass die SAH-Konzentration in der Zelle mit der SAHH-Aktivität negativ korreliert.

Bei HeLa-Zellen liegt die Adenosin-Konzentration etwa 2,5-mal, bei MCF-7-Zellen sogar 9-mal so hoch wie in HepG2-Zellen, und beide verfügen nur über geringe SAHH-Aktivität. Wie man weiß, führt vermehrtes Adenosin als Produktinhibitor der SAHH zur Akkumulation von SAH und zur vermehrten Synthese von SAH aus Adenosin und Homocystein (35,36). Darin könnte also der Grund für die hohen SAH-Werte bei gleichzeitig niedrigen SAM-Werten in diesen beiden Zelllinien liegen. Ursächlich für die niedrigen Adenosin-Konzentrationen in den anderen Zelllinien könnte eine hohe Aktivität der Adenosindesaminase sein, die das anfallende Adenosin weiter verstoffwechselt (34,35).

---

Es wird also deutlich, dass das MP nicht allein durch die SAHH-Aktivität bestimmt wird. Hek-293-Zellen zum Beispiel haben bei niedrigem MP eine vergleichsweise hohe Aktivität von  $0,86 \pm 0,06$  U, und Sk-Hep-1-Zellen weisen bei einem eher hohen MP nur eine Aktivität von  $0,56 \pm 0,05$  U auf. Offensichtlich sind es mehrere Faktoren in der Zelle, die in diesen Zyklus eingreifen und das MP kontrollieren.

Auch zeigen die Ergebnisse der Hek-293-Zellen besonders anschaulich, dass ein erniedrigtes MP nicht unbedingt auf eine niedrige Stoffwechselaktivität hindeutet, da diese Zellen trotz einer sehr hohen Teilungsrates (94) ein sehr niedriges MP haben. Fraglich bleibt, ob das MP in Zelllinien mit hoher Methylierungsaktivität nun auf einen extrem niedrigen Wert gesenkt werden muss, um Veränderungen der Transmethylierungsaktivität zu sehen, oder ob für verschiedene Zelllinien die prozentuale Reduktion ausschlaggebend ist.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die verschiedenen Werte, die das MP annehmen kann, könnte im Ursprung der Zelllinien liegen, d. h. aus welchem Gewebe sie stammen. Die beiden Leberzellarten HepG2 und Sk-Hep-1 liegen mit ihrem MP deutlich über den anderen Zelllinien, die nicht aus der Leber stammen. Weiterhin könnte dem Differenzierungsgrad eine größere Bedeutung zukommen. Hoffman et al. konnten 1979 (103) einen Zusammenhang zwischen dem MP und der Aktivität der Phosphatidylethanolamin-Methyltransferase in der Rattenleber feststellen. Während die Enzymaktivität in den ersten 50 Tagen am höchsten ist, ist auch das MP mehr als doppelt so hoch als danach, wenn sich auch die Aktivität auf einem niedrigeren Niveau einstellt. Das zeigt den Bezug von Zellaktivitäten zu dem jeweiligen Entwicklungsgrad in Zellkulturen und wie diese sich im Laufe der Reifung und Differenzierung ändern können.

Der Untersuchung, wie sich Hypoxie auf das MP in den Zelllinien auswirkt, kam eine besondere Bedeutung zu, da Hypoxie bekanntlich im Frühstadium einer Tumorentwicklung auftritt (63) und zur Expression verschiedener Gene führt (64-66). Da ein erhöhtes MP für die rasche Proliferation von Vorteil sein könnte,

---

erschien es interessant zu beobachten, wie Sauerstoffmangel in den hier verwendeten Kulturen wirkt.

Interessant war die Beobachtung, dass die Zelllinien auch auf Hypoxie sehr unterschiedlich reagierten. Die Kultivierung von MCF-7-Zellen unter hypoxischen Bedingungen hat keinerlei Einfluss auf das MP. Bei HeLa-Zellen fällt das MP dagegen moderat, wenn auch nicht signifikant. Dabei ist die intrazelluläre SAM-Konzentration unter Hypoxie deutlich gesenkt.

Ein Abfall des MP unter Hypoxie wird in der Literatur bereits beschrieben, nicht dagegen ein Anstieg. In der vorliegenden Studie allerdings konnte unter O<sub>2</sub>-Mangel auch ein Anstieg des MP der Zellen gezeigt werden. Das MP von HepG2- und Sk-Hep-1-Zellen steigt unter Hypoxie auf ca. 300 % des typischen Werts unter Kontrollbedingungen und bei Hek-293-Zellen sogar um mehr als 500 %. Die Veränderungen bei HepG2-, Sk-Hep-1- und Hek-293-Zellen sind abhängig von der Zelldichte und treten erst auf, wenn diese  $>2 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> beträgt (113). Bei allen drei Zelllinien ergibt sich eine positive Korrelation zwischen der Zelldichte und dem MP. Warum bei manchen Zelllinien das MP unter Hypoxie erst ab einer bestimmten Dichte erhöht ist, liegt vermutlich daran, dass sich der Sauerstoffmangel ab einer bestimmten Zellzahl drastisch verstärkt, und perizellulär ein viel niedrigerer Sauerstoffpartialdruck vorliegt, als im Inkubationsgas in der konfluenten Einzellschicht herrscht (114).

Während bei HepG2- und Hek-293-Zellen (Abb. 7) das unter Hypoxie erhöhte MP auf eine von der Zelldichte abhängigen Reduktion der SAH-Konzentration zurückzuführen ist, beruht es bei Sk-Hep-1-Zellen auf dem mit der Zelldichte korrelierenden Anstieg der SAM-Konzentration (Abb. 5). Aufgrund der gleichzeitig erhöhten SAM-Konzentrationen in HepG2- und Hek-293-Zellen kann davon ausgegangen werden, dass unter Hypoxie die Transmethylierungsrate in der Zelle abnimmt. Dafür spricht auch die geringe SAHH-Aktivität von  $1,6 \pm 0,5$  U bzw.  $0,78 \pm 0,04$  U, die an den erniedrigten SAH-Spiegel angepasst ist. Diese Beobachtung stimmt mit der Studie von Hermes et al. (2004) überein, in der gezeigt werden konnte, dass Hypoxie den

Spiegel der SAHH-mRNA in HepG2-Zellen reduziert (101). Das bedeutet jedoch, dass ein erhöhtes MP nicht notwendigerweise mit vermehrten Transmethylierungen einhergeht, sondern dass diese unter bestimmten Bedingungen sogar reduziert sein können.

Obwohl das MP von HepG2-Zellen unter Kontrollbedingungen mit dem MP in Rattennieren übereinstimmt, führt eine 30-minütige Ischämie in der Rattenniere zu einem verringerten MP (36). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass eine Ischämie nicht nur zu einer Sauerstoffunterversorgung führt, sondern vielmehr dem Gewebe auch eine Versorgung mit Glukose entzogen wird. ATP fällt dann drastisch ab (115) und steht einer weiteren SAM-Synthese nicht mehr zur Verfügung. Außerdem steigt unter Ischämie in der Rattenniere das Adenosin auf Konzentrationen an, die eine Hemmung der SAHH bewirken können, da Adenosin *in vitro* die SAHH mit einem  $K_i$  von 3  $\mu\text{M}$  hemmt (97).

Interessanterweise stellte sich bei Sk-Hep-1-Zellen, bei denen die SAM-Konzentration abhängig von der Zelldichte ansteigt und die SAH-Konzentration unbeeinflusst bleibt, eine gleichzeitige positive Korrelation zwischen ATP und zunehmender Zelldichte unter Hypoxie heraus. Obwohl die ATP-Konzentration unter leichter Hypoxie erst einmal signifikant vermindert ist, steigt sie bei zunehmender Zellzahl und damit stärkerer Hypoxie wieder an. Die SAM-Synthese aus ATP scheint somit bei Sk-Hep-1-Zellen unter Hypoxie stimuliert zu sein, während bei allen anderen Zelllinien eher ein Abfall der ATP-Konzentrationen zu sehen ist.

Bei HeLa-Zellen beobachtet man unter Hypoxie keine signifikante Veränderung der SAH-Konzentration, während SAM sogar im Gegensatz zu den anderen Zelllinien vermindert ist. Verminderte SAM-Werte, begleitet von einem geringeren MP, wurden auch in der Rattenleber und in einer Primärkultur von Rattenhepatozyten gefunden, die Hypoxie ausgesetzt waren (67,71,72). Die Studie von Avila et al. (72) zeigte unter Hypoxie einen Abfall des MP von 4,2 auf 2,6, eine Reduktion des MAT-mRNA-Spiegels sowie der MAT-Aktivität bereits nach 6 h. Da Hypoxie die ATP-Konzentration in HeLa-Zellen nicht signifikant verändert, kann ausgeschlossen werden, dass eine erniedrigte

Konzentration der Substrate ATP und Methionin für den verminderten SAM-Gehalt dieser Zelllinien verantwortlich war, sondern dass tatsächlich die von Avila et al. demonstrierte Reduktion des MAT-mRNA-Spiegels unter Hypoxie ausschlaggebend ist.

Eine zusätzliche Untersuchung, die des Einflusses von mit  $\text{CoCl}_2$  auf die Methylierungsaktivität, wurde in Hek-293-Zellen durchgeführt. Das SAM steigt konzentrationsabhängig bis auf 3-fache Werte bei 300  $\mu\text{M}$  an. Da auch die ADP- und ATP-Konzentrationen konzentrationsabhängig ansteigen, liegt nahe, dass vermehrte Synthese von SAM die Ursache ist. Insgesamt ist auch das MP konzentrationsabhängig, wenn auch nicht signifikant erhöht. Auffallend ist, dass ab einer Konzentration von 1 mM  $\text{CoCl}_2$  sowohl die Konzentration von SAM als auch die von SAH wieder fällt. Da auch die Konzentrationen der Adeninnukleotide bei dieser  $\text{CoCl}_2$ -Konzentration abfallen, kann davon ausgegangen werden, dass  $\text{Co}^{2+}$  in derart hoher Konzentration die Zelle schädigt und somit zum Zelltod führt. Diese Ergebnisse stimmen mit einer Studie überein, in der Alveolarepithelzellen mit  $\text{CoCl}_2$  inkubiert wurden und man zu einer  $\text{LD}_{50}$  von 1,1 mM kam, die Konzentration bei der nur noch 50 %ige Zellvitalität zu beobachten ist (116). Bis zu dieser Konzentration bleibt die Vitalität jedoch konstant, so dass man für die vorliegende Studie keinen toxischen Effekt bei 300  $\mu\text{M}$  erwarten muss.

Adenosin ist bei dieser Zelllinie nach Behandlung mit  $\text{CoCl}_2$  in nicht toxischen Konzentrationen das einzige Mal signifikant erhöht. Ein Zusammenhang könnte mit den hierbei vorkommenden höheren Konzentrationen der Adeninnukleotide bestehen. Da die Aktivitäten von ATPasen, ADPasen und AMPasen sehr hoch sind (117), so dass Adeninnukleotide schnell zu Adenosin konvertiert werden, kann das der Grund für akkumuliertes Adenosin sein.

$\text{CoCl}_2$  scheint wie schwache Hypoxie zu wirken, da sowohl die Werte von SAM, SAH als auch für das MP denen unter Hypoxie bei einer Zelldichte  $< 2 \times 10^5$  Zellen/ $\text{cm}^2$  entsprechen. Vor allem bei einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  wird diese Übereinstimmung deutlich. In den Experimenten bei hoher Zelldichte

wurde perizellulär ein viel niedrigerer Sauerstoffdruck als im Inkubationsgas angenommen, was zur verstärkten Hypoxie führt. Unter Einfluss von  $\text{CoCl}_2$  ist allerdings nicht klar, wie viel davon tatsächlich an den Porphyrinring im Hämteil diverser Häm-Proteine gebunden vorliegt, und so verhindert, dass Sauerstoff gebunden werden kann (80). Wie stark also der hypoxische Effekt ausfällt, ist nicht feststellbar. Eine stärkere Hypoxie durch  $\text{CoCl}_2$  nachzuahmen, ist aufgrund der Toxizität des Stoffes nicht möglich. Somit bleibt auch fraglich, ob es sich bei dem von  $\text{CoCl}_2$  ausgelösten Effekt tatsächlich um denselben Mechanismus handelt wie bei Hypoxie.

Bei all den Experimenten, in denen Veränderungen intrazellulärer Methylierungsvorgänge untersucht wurden, stellt sich die Frage, ob Langzeitveränderungen oder Veränderungen über einen kurzen Zeitraum die Methylierungsaktivität beeinträchtigen. Chawla et al. (71) setzten Ratten einer physiologischen Hypoxie von 10 %  $\text{O}_2$  aus und konnten erst nach 10 Tagen Veränderungen feststellen. Ein intrazellulärer SAM-Verlust führte dabei zu hypomethylierter DNA und gesteigerter Aktivität der tRNA-Methyltransferase. Eine akute Hypoxie mit 3 %  $\text{O}_2$  führte dagegen schon nach 6 h zu einer Veränderung in Rattenhepatozyten (72).

Die Auswirkungen eines veränderten MP unter hypoxischen Bedingungen auf Methylierungsreaktionen sind ebenfalls beispielhaft an verschiedenen Modellen untersucht worden. So wurde mittels Real-Time-PCR-Analyse gezeigt, dass Erythropoietin-Expression bei HepG2-Zellen unter Hypoxie gesteigert war (101). Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach Behandlung mit  $\text{CoCl}_2$  gefunden (107). Die Genexpression der SAHH hingegen ist signifikant vermindert, während die des HIF-1 $\alpha$  von der Sauerstoffkonzentration unabhängig ist. Auch hier kommt man zu dem Schluss, dass kurzzeitige Veränderungen des MP sich also unterschiedlich auf die mRNA-Spiegel verschiedener Gene auswirken (101).

Ein wichtiges Kriterium bei den vorliegenden Untersuchungen spielt der tumorale bzw. embryonale Ursprung der Zellen. Dass die Anpassung an

Hypoxie zwischen verschiedenen Zelltypen stark variiert (61), und dass manche Zellen sogar leicht durch Sauerstoffmangel geschädigt werden (62), ist in der Literatur beschrieben. Auf der anderen Seite besteht aber auch die Annahme, dass Hypoxie bei schnell proliferierenden Tumorarten (63) durch die Induktion verschiedener Gene (64-66) ein Vorteil darstellen kann. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Studie könnte man folgern, dass diejenigen Zelllinien, die mit einem erhöhten MP auf Hypoxie reagieren (HepG2-, Sk-Hep-1- und Hek-293-Zellen), an Sauerstoffmangel adaptiert sind, während die anderen Zellen ebenso wie Primärkulturen, nicht in dem Umfang adaptieren können oder ihr Adaptionsvermögen bereits verloren haben. Es liegt nahe, dass adaptierte Zellen eine solche Situation schneller erkennen und wie in einer Stresssituation ihr System hochfahren, um die intrazellulären Methylierungen konstant zu halten.

Durch die Inhibition der SAHH mittels Ado-Dial konnte in allen Zelltypen eine verstärkte Akkumulation von intrazellulärem SAH und einem dadurch drastisch verringertem MP erreicht werden. Bei Sk-Hep-1-Zellen führte die Behandlung mit Ado-Dial 30  $\mu\text{M}$  unter normoxischen Bedingungen zu einer 40-fachen Reduktion des MP, wobei die Konzentration von SAM unverändert blieb und die des SAH auf das 50-fache anstieg. Auch eine 40-fache Reduktion des MP wurde in der Studie von Hermes et al. für HepG2-Zellen nach Inkubation der Zellen mit Ado-Dial 30  $\mu\text{M}$  erzielt (101). Unter hypoxischen Bedingungen fällt das MP noch drastischer. Bei diesen Versuchen stellte sich kein bedeutender Einfluss der Zelldichte auf die Ergebnisse heraus, so dass sich dieser Mittelwert auf die gesamte Breite der Zelldichten bezieht. Die beiden Leberzellarten HepG2 und Sk-Hep-1 zeigen deutliche Ähnlichkeiten in ihrem Verhalten. Auch wenn sie nicht über dieselben Ausgangskonzentrationen unter Kontrollbedingungen verfügen, stimmen sie in ihrer Reaktion und ihrer prozentualen Abweichung nicht nur im MP überein, sondern auch bei den SAHH-Aktivitäten.

Auch bei Hek-293-Zellen fällt das MP nach Behandlung der Zellen mit Ado-Dial unter Hypoxie stärker (35-fach) als unter Normoxie (24-fach). Die

SAH-Konzentrationen steigen auf das 45-fache bzw. auf das 34-fache an. Das MP bei MCF-7-Zellen fällt nach Hemmung der SAHH mit Ado-Dial 30  $\mu\text{M}$  unter Normoxie auf ein Dreißigstel bzw. unter Hypoxie auf ein Zwanzigstel ab.

Bei HeLa-Zellen lässt sich das MP unter Normoxie nur auf ein Zehntel reduzieren und nur auf ein Viertel unter Hypoxie. Auffallend bei dieser Zelllinie ist die geringe SAH-Akkumulation, die nur 14-fache Werte unter Normoxie erreicht. Unter Hypoxie steigt SAH sogar nur auf das 3-fache, und SAM fällt im Gegensatz zu den anderen Zelllinien sogar ab. Beachtlich ist, dass in dieser Zelllinie unter sämtlichen Bedingungen das MP nur geringe Abweichungen zeigt, während andere eine Spanne von bis zu 130-fachen Werten (Hek-293-Zellen) zeigen.

Bei den Zelllinien MCF-7 und Hek-293 wurde ein konzentrationsabhängiger Abfall des MP durch Inhibition der SAHH mittels Ado-Dial gezeigt. Dabei wurde der Hemmeffekt von Konzentrationen zwischen 3 und 30  $\mu\text{M}$  untersucht und der stärkste Hemmeffekt bei 30  $\mu\text{M}$  festgestellt. Ursache ist eine zunehmend verstärkte SAH-Akkumulation in der Zelle. Diese Konzentrationsabhängigkeit steht in Übereinstimmung mit der von Hermes et al. (101) beobachteten Hemmung bei HepG2-Zellen. In Phäochromozytomzellen der Ratte konnte bereits bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$ , allerdings bei einer Inkubation über 3 Tage, ein maximaler Effekt auf das MP beobachtet werden (118). Auch immunologische Methoden zum Nachweis nativer SAHH bestätigen, dass nach Inkubation der Zellen mit Ado-Dial keine native SAHH mehr nachzuweisen ist, im Gegensatz zu Kontroll- oder Hypoxiebedingungen (101). Der Grund liegt in der Konformationsänderung des Enzyms nachdem Ado-Dial gebunden wurde (119). Diese Bindung des kompetitiven Antagonisten ist irreversibel und führt dazu, dass das Enzym in die geschlossene Form übergeht und in dieser verharrt. Eine noch höhere Konzentrierung scheint erwiesenermaßen nicht sinnvoll, da keine gesteigerte Wirkung zu erwarten ist (101). Cory und Mansell zeigten, dass Ado-Dial bei einer Konzentration von 630  $\mu\text{M}$  die Ribonukleotidreduktase-Aktivität in Tumoren um 57 % senkt (120). Bei der hier verwendeten Konzentration von maximal 30  $\mu\text{M}$  ist dieser Effekt nicht zu

---

erwarten. Im Gegensatz zu anderen Inhibitoren der SAHH, wie z.B. DZA (45), dient Ado-Dial als nicht umsetzbares Substratanalogon für die SAHH und ist deshalb ein wirkvoller Hemmstoff, um SAM-abhängige Transmethylierungen zu untersuchen. Zudem interferiert es nicht mit der Bestimmung von Adenosin und SAH mittels HPLC, weil es eine andere Retentionszeit hat (101).

Untersuchungen über die Auswirkungen eines verringerten MP auf Methylierungsreaktionen wurden in der Literatur beschrieben. Eine Studie berichtet von verminderter Expression von Erythropoietin und verringertem VEGF-A-mRNA-Spiegel unabhängig von der Sauerstoffkonzentration. Die Konzentrationen von SAHH- und HIF-1 $\alpha$ -mRNA waren kaum durch Hemmung der SAHH beeinflussbar, was zum einen an der längeren Halbwertszeit dieser mRNA liegen kann, zum anderen mit der Beobachtung übereinstimmt, dass HIF-1 $\alpha$  durch posttranskriptionelle Modifikation reguliert wird (121). Auch Bartel und Borchardt konnten das MP mit Ado-Dial 5  $\mu$ M auf 90 % senken, was zu partiell verminderter Lipidmethylierung, Proteincarboxylierung und RNA-Methylierung geführt hat (50). Andere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass in HepG2- und HeLa-Zellen die Methylierung der gesamten mRNA reduziert war, jedoch kein Effekt auf die DNA-Methylierung existierte. Letztere taucht allerdings auch nur während der S-Phase des Zellzyklus auf (101,122) und ist somit vermutlich erst nach längerer Zeit beeinflussbar. In menschlichen Lymphozyten führten dagegen bereits 2-fach erhöhte SAH-Werte zu DNA-Hypomethylierung (123), und auch in Geweben von Mäusen, die für die Cystathionin- $\beta$ -Synthase heterozygot sind (124), konnte bei verringertem MP globale DNA-Hypomethylierung festgestellt werden. Eine weitere Ursache für den ungleichen Effekt eines veränderten MP auf intrazelluläre Vorgänge könnten die unterschiedlich reagierenden Methyltransferasen sein. So konnte gezeigt werden, dass manche empfindlicher auf den inhibitorischen Effekt von SAH reagieren als andere (125).

Neue Studien berichten von einem Menschen mit einem SAHH-Mangel, der mit 150-fach erhöhten SAH-Plasmaspiegel und dem sehr niedrigen MP von

0,6 einhergeht. Obwohl dies zu biochemischen und physiologischen Abnormalitäten führt, ist es mit dem Leben vereinbar (126).

Manche Zellen besitzen demnach viele Möglichkeiten, ihr MP unter den verschiedenen Bedingungen über eine große Spanne zu regulieren, während andere zwar auch reagieren, die Werte für das MP aber nur gering schwanken. Inwieweit dadurch eine Veränderung der DNA- und RNA-Methylierung oder eine Veränderung der Genexpression bewirkt wird, bleibt unklar. Die Tatsache, dass kurzzeitige Änderung des MP die Expression einer Reihe von Genen verändert, stellt die generelle Bedeutung des MP für sämtliche Zellen in Frage. Es ist mehr ein genereller Indikator innerhalb eines bestimmten Zelltyps, als dass er eine allgemeine Aussage über die Transmethylierungsaktivität zulässt.

#### **4.2. Vitalität der untersuchten Zelllinien**

Die Überlebensrate der Zellen wurde bestimmt, um den Einfluss von Hypoxie oder Hemmung der SAHH durch Ado-Dial auf die Vitalität der Zellen zu zeigen. Eine Studie von Hoffman (109) zeigt, dass die Methyltransferasen nach dem Zelltod noch einige Zeit lang aktiv sind, während die SAHH ihre Aktivität verliert. SAH steigt somit in den ersten 20 Sekunden nach dem Absterben erst einmal an, SAM dagegen nimmt intrazellulär ab, da kein ATP mehr für die Neusynthese zur Verfügung steht.

Sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie liegen die einzelnen Werte für die Vitalität der Zellen zwischen 82 und 93 %, was in Übereinstimmung mit der Literatur steht. Auch Rattenhepatozyten zeigen nach 6 h Inkubation unter Hypoxie keine Einschränkung der Vitalität (88,5 % der Kontrolle), allerdings wurde bei dieser Studie der Sauerstoffpartialdruck nur auf 3 % reduziert, während bei der vorliegenden Studie die Zellen für 24 h bei 1 % O<sub>2</sub> inkubiert worden waren (72). Die Fähigkeit der untersuchten Zelllinien, sich an niedrige O<sub>2</sub>-Konzentrationen zu adaptieren, könnte somit auf den tumoralen Ursprung zurückzuführen sein. Unterstützt wird diese Annahme durch Untersuchungen

---

bei einer Art des Nierenzellkarzinoms (127), welches mit einer vererbten Mutation des VHL-Gens assoziiert ist. Der Verlust an pVHL bewirkt hier, dass HIF-1 wie unter hypoxischen Bedingungen nicht mehr abgebaut werden kann, und somit zur Aggressivität des Tumorwachstums beiträgt (128). Hypoxie scheint dementsprechend nicht unbedingt zum Wachstumsstillstand zu führen, sondern besitzt unter anderem auch eine Schlüsselrolle im Tumorwachstum und der Angiogenese (129).

Da Ado-Dial zytostatische und zytotoxische Wirkungen auf verschiedene Zellen ausübt (49,108,130,131), war es für die vorliegenden Experimente wichtig, bei einer Konzentration zu arbeiten, die zum einen hoch genug ist, um die SAHH-Aktivität zu reduzieren, zum anderen jedoch nicht so hoch ist, dass sie die Überlebensrate der Zellen beeinflusste.

Bei keiner der hier verwendeten Kulturen kam es durch 24-stündige Inkubation mit Ado-Dial bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  zum Zellsterben. Bei Phäochromozytomzellen der Ratte bewirkt Ado-Dial in Konzentrationen ab 10  $\mu\text{M}$  zwar Hemmung des Wachstums, beeinträchtigte aber nicht die Vitalität, selbst bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  über drei Tage hinweg. Der Zelltod trat erst zu einem späteren Zeitpunkt (>4 Tage) ein (118). Wahrscheinlich bleibt eine geringe, für das weitere Überleben aber ausreichende Restaktivität des Enzyms bestehen. Bei der SAHH-*knock-out*-Maus wurde nämlich beobachtet, dass Fehlen der SAHH embryonale Letalität zur Folge hat (132). Hinzu kommt, dass die Zellen in dieser Studie normalerweise über ungestörte SAHH-Aktivität verfügen, und die durch den Dialdehyd hervorgerufenen Änderungen der Stoffwechselprozesse nicht lang genug andauern, um die Zellen sterben zu lassen.

Die Ergebnisse vorliegender Studie sind eindeutig auf die Wirkung von Ado-Dial, Hypoxie und  $\text{CoCl}_2$  zurückzuführen, da unter keinen Bedingungen die Überlebensfähigkeit der Zellen eingeschränkt war.

### 4.3. Energieladung der Zellen

Da ein Zusammenhang des Energiemetabolismus mit Transmethylierungsreaktionen über die SAHH vermutet wird (36), wurden in vorliegender Studie die Konzentrationen der Adeninnukleotide unter den jeweiligen Bedingungen gemessen und daraus auch die Energieladung (EC) berechnet. Diese gibt das Verhältnis von ATP-Gewinn und -Verbrauch wieder, wodurch der Energiestatus einer Zelle kontrolliert wird (133).

Die Zelllinie Sk-Hep-1 weist von allen untersuchten Zelllinien die geringste AMP- und die höchste ATP-Konzentration auf, was zu der sehr hohen EC von 0,81 führt und mit physiologischen Werten aus *in vivo*-Experimenten mit verschiedenen Menschen- und Rattengeweben übereinstimmt (36,134). Ebenso liegt die Summe der Konzentrationen der drei Nukleotide mit  $106 \text{ nmol}/10^7$  Zellen weit über den Werten der übrigen Zelllinien. Hek-293-Zellen haben unter normoxischen Bedingungen die geringste EC (0,52). Dennoch ist diese geringe Energieladung problemlos mit normaler Zellfunktion vereinbar, wie auch frühere Studien zeigten (135). Da nicht die geringen ATP-Werte für die niedrigen EC-Werte verantwortlich sind, sondern vielmehr die hohen AMP-Werte, zeigt, dass die der Zelle zur Verfügung stehende Energie nicht weniger ist als bei anderen Zelllinien. Die Summe aller drei Adeninnukleotide ist mit  $58 \text{ nmol}/10^7$  Zellen genauso hoch wie die der HepG2-Zellen, deren EC mit 0,65 aber höher liegt.

Die Energiegewinnung durch ATP läuft in sauerstoffhaltiger Umgebung in den Mitochondrien in Form einer oxidativen Phosphorylierung ab. Unter Hypoxie benutzt die Zelle den Weg der anaeroben Glykolyse im Zytosol. Obwohl dieser Weg nicht so viel ATP pro Mol Glukose hervorbringt wie der der aeroben Glykolyse, kann ausreichende ATP-Produktion durch erhöhte glykolytische Aktivität aufrecht erhalten werden (136,137). Bereits Mitte des 20. Jahrhunderts zeigte Otto Warburg (138), dass sich Tumorzellen, die sich notwendigerweise an hypoxische Zustände im Gewebe adaptieren müssen, von normalen Zellen durch verstärkte anaerobe Glykolyse unterscheiden. In den Tumoren findet man

demnach erhöhte Expression glykolytischer Enzyme und erhöhte maximale Geschwindigkeit für diesen Stoffwechselweg (139,140). Somit kam der Untersuchung der verwendeten Tumorzellen auf ihre Adeninnukleotide unter Hypoxie ein besonderes Interesse zu.

Die EC bei Sk-Hep-1-Zellen hängt unter Hypoxie von der Zellzahl ab. Während die Konzentration des AMP sowohl bei hoher als auch bei niedriger Zelldichte auf zwei Drittel der normoxischen Kontrollwerte reduziert ist, sind die Konzentrationen von ADP und ATP nur jeweils bei Kulturen mit geringer Zelldichte vermindert. Das führt zu einer reduzierten EC bei geringer Zelldichte, allerdings zu einer erhöhten bei hoher Zelldichte. ATP und EC korrelieren positiv mit der Zellzahl (Abb. 9). Ebenso verhält es sich mit der Summe der Konzentrationen aller drei Nukleotide, die bei Zelldichten  $>2,8 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> sogar über dem unter Normoxie gefundenen Wert liegt (113 nmol/10<sup>7</sup> Zellen). Bei allen anderen Zelllinien ist die Summe unter Hypoxie gegenüber Normoxie verringert, selbst bei HepG2- und MCF-7-Zellen, deren Energieladung unter Sauerstoffmangel ansteigt. Dies beruht vor allem auf einer Abnahme der niedrig energetischen Adeninnukleotide, während die ATP-Konzentration nicht signifikant höher wird.

Bei HeLa-Zellen führt Inkubation unter hypoxischen Bedingungen zum Abfall der Energieladung und auch zur Abnahme der Summe der Konzentrationen aller drei Adeninnukleotide. Dabei fällt auf, dass die AMP-Konzentration ansteigt, während die Konzentrationen von ADP und ATP leicht abfallen, wenn auch nicht signifikant. Dieselbe Situation findet man bei Hek-293-Zellen, die bei geringer Zelldichte gewachsen sind. Betrachtet man die Werte für die Zellen, die bei hoher Zelldichte gewachsen sind, findet man eine deutliche Reduktion aller drei Adeninnukleotide auf 40 % der bei niedrigen Zelldichten gefundenen Werte. Wie auch bei der Zelllinie Sk-Hep-1 weisen die Hek-293-Zellen unter Hypoxie eine positive Korrelation zwischen EC und Zelldichte auf. Abweichend zu der Sk-Hep-1-Zelllinie, bei der auch die ATP-Konzentration positiv korreliert, zeigen hier alle Adeninnukleotide eine negative Korrelation, wobei AMP am meisten abfällt (Abb. 10). Diese Ergebnisse zeigen,

dass Sauerstoffmangel in Hek-293-Zellen zu einem vermindertem ATP-Spiegel führt, während dieser in Sk-Hep-1-Zellen ansteigt.

In kultivierten Zellen ist der rapide Abfall der ATP-Konzentration, der auf eine hypoxische Phase folgt, genau bekannt, obwohl von unterschiedlichen Graden der nachfolgenden Erniedrigung der Adeninnukleotid-Konzentrationen berichtet wurde (141,142). Die vorliegenden Experimente führen jedoch zu der Annahme, dass hypoxische Zellen z. T. mit reduzierter funktioneller Kapazität reagieren, damit die Aktivität von ATP verbrauchenden Enzymen verringert wird, und somit der ATP-Gehalt in der Zelle vor einem Abfall bewahrt wird (143).

Verschiedene Studien haben den Einfluss von Hypoxie auf den Energiemetabolismus untersucht. Die Situation, dass sowohl der Verbrauch als auch die Produktion von ATP gleichzeitig reduziert sind, und sich somit nichts am Energiestatus einer Zelle ändert, herrscht bei anoxischen Eizellen von Chinesischen Hamstern (Streifenhamstern) vor, die dann ihr ATP aus der Glykolyse beziehen und ihren ATP-Gehalt über eine große Breite der Sauerstoffkonzentration für mindestens 6 Stunden aufrecht erhalten können. Wird diesen Zellen jedoch Glukose entzogen, nimmt schon nach kurzer Zeit die höchste Energieform ATP ab, während ADP und AMP zunehmen. Die EC ist dabei auf die Hälfte vermindert. Hält dieser Zustand des Glukosemangels allerdings an, steigt sie wieder fast auf Ausgangswerte, kompensiert durch das Ansteigen von ADP. Somit wird deutlich, dass Glukoseentzug schon unter normoxischen Bedingungen einen größeren Einfluss auf den ATP-Gehalt und die EC einer Zelle hat als Hypoxie allein, und dass der Energiestatus einer Zelle und die Sauerstoffkonzentration nicht notwendigerweise in Verbindung stehen (115). Unveränderte ATP-Konzentrationen unter Hypoxie (1 %) über 24 h konnten auch bei Epithelzellen beobachtet werden. Eine Reduktion der ATP-Werte trat erst später, nach 48 h, ein (144).

In den vorliegenden Experimenten konnte zum einen kein derartiger Kompensationsmechanismus über ADP festgestellt werden. Allerdings ist auch

---

nicht der Verlauf betrachtet worden, sondern erst der Zustand, der nach 24 h in der Zelle herrschte. Zum anderen wurde aber auch der Glukosegehalt der Zellen weder verändert noch gemessen.

Unter verschiedenen Zuständen, die mit reduziertem Sauerstoffgehalt einhergehen, wie z.B. alkoholischer oder viraler Leberzirrhose (78,79) und septischem Schock (75), ist die Synthese von SAM vermindert. Für diese Synthese, katalysiert durch die Methionin-Adenosyltransferase (MAT), wird ATP benötigt (27). Ist die ATP-Konzentration also verringert, dann kann weniger SAM gebildet werden. Allerdings könnte verringerte MAT-Aktivität, wie sie unter Hypoxie bei Ratten vorkommt (67), auch von Vorteil sein, um den zellulären ATP-Vorrat aufrecht zu erhalten. Diese Vermutung wird durch eine Studie an Eizellen Chinesischer Hamster unterstützt, in denen eine Überexpression von MAT 1A einen 50 %igen Verlust von ATP bewirkt (145).

Die Notwendigkeit von Sauerstoff für die ATP-Produktion via oxidativer Phosphorylierung, die den effizientesten Weg für die Energiegewinnung darstellt, ließ erwarten, dass Hypoxie zu einem verringerten Energiestatus führt. Diese Erwartung wurde in dieser Studie nur zum Teil erfüllt. Vielmehr wurde bestätigt, dass der Energiehaushalt einer Zelle durch die verschiedensten Mechanismen aufrechterhalten werden kann.

Behandlung mit Ado-Dial unter Normoxie hat außer bei den HeLa-Zellen bei keiner Zelllinie eine Konsequenz für die Adeninnukleotide, und somit auch nicht für die EC. Bei HeLa-Zellen sinkt die EC unter normoxischen Bedingungen. Dieser Abfall kommt durch die beinahe auf die Hälfte verringerte ATP-Konzentration zustande, während die Konzentration von ADP leicht aber nicht signifikant abfällt und die des AMP gleich bleibt. Somit ist auch die Summe aller drei Nukleotide verringert. Allerdings sterben die Zellen unter diesen Bedingungen auch nicht ab.

Hek-293-Zellen zeigen nur bei einer Konzentration von Ado-Dial 10  $\mu\text{M}$  Abweichungen, während bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  keine

Veränderungen auftreten. Die Konzentration von ADP ist dabei auf die Hälfte, die des AMP sogar um mehr als die Hälfte verringert, was insgesamt eine höhere EC ergibt. Da die Wirkungen von Hypoxie und Ado-Dial gegensätzlich sind, vermindert Erhöhung der Konzentration des Hemmstoffes den Einfluss von Hypoxie.

#### 4.4. SAH-Hydrolase-Aktivität

Da SAH ein starker Inhibitor SAM-abhängiger Methyltransferasen ist, ist es wichtig, das gebildete SAH in der Zelle durch die SAHH möglichst schnell und effektiv zu entfernen, damit ein MP von  $>10$  erreicht werden kann, wie es für die meisten Zellen und Gewebearten berichtet wird (36,37,106,146).

Unter Kontrollbedingungen zeigen die einzelnen Zelllinien unterschiedliche SAHH-Aktivität. HepG2-Zellen besitzen die höchste Aktivität mit  $2,9 \pm 0,3$  U, gefolgt von Hek-293-Zellen mit  $0,86 \pm 0,06$  U, während die übrigen nur ca. ein Fünftel der Enzymaktivitäten von HepG2-Zellen aufweisen. Die SAH-Aktivität korreliert somit mit der gemessenen SAH-Konzentration in den verschiedenen Zelllinien. Eine Bestätigung für diese Korrelation zeigen auch die Versuche unter Hypoxie. Ein Grund für die sehr hohe Enzymaktivität der HepG2-Zellen könnte ihr hepatozellulärer Ursprung sein, was in Übereinstimmung mit anderen Studien stünde, die zeigen konnten, dass die spezifische SAHH-Aktivität in der Leber am höchsten ist (147,148). Warum Sk-Hep-1-Zellen, die ja ebenfalls hepatozellulären Ursprungs sind, nicht diese hohen Enzymaktivitäten aufweisen, bleibt unklar.

Bei den übrigen Kulturen zeigte sich die SAHH-Aktivität unter Hypoxie unbeeinflusst, bei Hek-293-Zellen sind sogar noch 90 % der unter Normoxie gemessenen Aktivität vorhanden. Auch die Behandlung der Hek-293-Zellen mit  $\text{CoCl}_2$  führte zu keiner Veränderung der SAHH-Aktivität.

Nach Behandlung der Zellen mit Ado-Dial  $30 \mu\text{M}$  sinkt die Aktivität bei allen Zelllinien signifikant gegen 0 ab. Dies beruht auf der irreversiblen Hemmung des Enzyms. Auch Ramakrishnan und Borchardt (106) konnten die

Reduktion der Enzymaktivität auf nahezu 0 schon bei einer Ado-Dial-Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  in Neuroblastomzellen beobachten. Weiterhin konnte eine maximale SAH-Akkumulation bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  nach bereits einem Tag festgestellt werden. Inkubation über längere Zeit führt hingegen wieder zu einem Abfall der SAH-Konzentration, da Ado-Dial vermutlich einem spontanen Abbau oder zellulären Metabolismus unterliegt, und die SAHH-Aktivität sich schnell wieder erholt (118).

## 5 Zusammenfassung

Der Quotient aus SAM und SAH (Methylierungspotential, MP) gilt als sensitiver Indikator für die Methylierungsaktivität innerhalb eines Gewebes. Je kleiner der Quotient, desto stärker werden Methylgruppenübertragungen gehemmt. Ziel dieser Studie war, das MP in unterschiedlichen Zelllinien unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Unter Normoxie weisen die untersuchten Zelllinien beachtliche Unterschiede in ihrem MP auf. Das MP der untersuchten Zellen variiert unter normoxischen Bedingungen abhängig von der Gewebeherkunft und nicht von der Zellteilungsrate. Unter Normoxie liegt die Überlebensrate der Zellen zwischen 85 und 93 %.
2. Hypoxie verändert das MP der Zellen HepG2, Sk-Hep-1 und Hek-293 in Abhängigkeit von der Zelldichte, während HeLa- und MCF-7-Zellen keine Veränderungen des MP unter Hypoxie zeigen. Unter Hypoxie liegt die Überlebensrate der Zellen zwischen 83 und 91 %.
3.  $\text{CoCl}_2$  bewirkt bei einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  einen Hypoxie-ähnlichen Zustand in Hek-293-Zellen. Bei höheren Konzentrationen wirkt die Substanz toxisch auf die Zellen.
4. Hemmung der SAHH durch Ado-Dial 30  $\mu\text{M}$  führt immer zu einer Reduktion der Enzymaktivität gegen null, folglich nimmt das MP in allen Zelllinien durch die SAH-Akkumulation ab. Die Überlebensfähigkeit der Zellen bleibt dabei unverändert.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Chiang, P. K., Gordon, R. K., Tal, J., Zeng, G. C., Doctor, B. P., Pardhasaradhi, K. und McCann, P. P. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.* 1996;10:471-480.
2. Singal, R. und Ginder, G. D. DNA methylation. *Blood* 1999;93:4059-4070.
3. Cross, S. H. und Bird, A. P. CpG islands and genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1995;5:309-314.
4. Szyf, M. The DNA methylation machinery as a target for anticancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 1996;70:1-37.
5. Tate, P. H. und Bird, A. P. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1993;3:226-231.
6. Knippers, R. *Molekulare Genetik*. 7. Aufl. Stuttgart: Thieme Verlag; 1997;373.
7. Baylin, S. B. Tying it all together: Epigenetics, genetics, cell cycle, and cancer. *Science* 1997;277:1948-1949.
8. Rideout, W. M., III, Coetzee, G. A., Olumi, A. F. und Jones, P. A. 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and P53 genes. *Science* 1990;249:1288-1290.
9. Laird, P. W. und Jaenisch, R. DNA methylation and cancer. *Hum. Mol. Genet.* 1994;3:1487-1495.
10. Merlo, A., Herman, J. G., Mao, L., Lee, D. J., Gabrielson, E., Burger, P. C., Baylin, S. B. und Sidransky, D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of tumour suppressor P16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat. Med.* 1995;1:686-692.
11. Herman, J. G., Merlo, A., Mao, L., Lapidus, R. G., Issa, J. P., Davidson, N. E., Sidransky, D. und Baylin, S. B. Inactivation of the CDKN2/P16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res.* 1995;55:4525-4530.

12. Schroeder, M. und Mass, M. J. CpG methylation inactivates the transcriptional activity of the promoter of the human P53 tumor suppressor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;235:403-406.
13. Alix, J.-H. Relationship between methylation and maturation of ribosomal RNA in prokaryotic and eukaryotic cells. Borchardt, R. T., Creveling, C. R. und Ueland, P. M. (Hrsg.). *Biological Methylation and Drug Design*. New York: Humana Press; 1986,175-187.
14. Perry, R. P., Kelley, D. E., Friderici, K. und Rottman, F. The methylated constituents of L cell messenger RNA: Evidence for an unusual cluster at the 5' terminus. *Cell* 1975;4:387-394.
15. Banerjee, A. K. 5'-Terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* 1980;44:175-205.
16. Shatkin, A. J. Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell* 1976;9:645-653.
17. Pope, W. T., Brown, A. und Reeves, R. H. The identification of the tRNA substrates for the supK tRNA methylase. *Nucleic Acids Res.* 1978;5:1041-1057.
18. Hrycyna, C. A. und Clarke, S. Modification of eukaryotic signaling proteins by C-terminal methylation reactions. *Pharmacol. Ther.* 1993;59:281-300.
19. Wang, C., Lin, J. M. und Lazarides, E. Methylations of 70,000-Da heat shock proteins in 3T3 cells: Alterations by arsenite treatment, by different stages of growth and by virus transformation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992;297:169-175.
20. White, D. A. The phospholipid composition of mammalian tissues. *In* Form and Function of Phospholipids. Ansell, G. B., Hawthorne, J. N. und Dawson, R. M. C. (Hrsg.). Elsevier, Amsterdam, 1973;441-482.
21. Cui, Z., Houweling, M. und Vance, D. E. Suppression of rat hepatoma cell growth by expression of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-2. *J. Biol. Chem.* 1994;269:24531-24533.
22. Hirata, F., Corcoran, B. A., Venkatasubramanian, K., Schiffmann, E. und Axelrod, J. Chemoattractants stimulate degradation of methylated phospholipids and release of arachidonic acid in rabbit leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1979;76:2640-2643.

23. O'Dea, R. F., Viveros, O. H., Axelrod, J., Aswanikaumar, S., Schiffmann, E. und Corcoran, B. A. Rapid stimulation of protein carboxymethylation in leukocytes by a chemotatic peptide. *Nature* 1978;272:462-464.
24. Pike, M. C., Kredich, N. M. und Snyderman, R. Requirement of S-adenosyl-L-methionine-mediated methylation for human monocyte chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1978;75:3928-3932.
25. Borchardt, R. T. S-adenosyl-L-methionine-dependent macromolecule methyltransferases: Potential targets for the design of chemotherapeutic agents. *J. Med. Chem.* 1980;23:347-357.
26. Borchardt, R. T. N- and O-methylation. Jacoby, W. B.(Hrsg.). *Enzymatic Basis of Detoxication*. New York: Academic Press 1980; 43-62.
27. Cantoni, G. L. Biological methylation: Selected aspects. *Annu. Rev. Biochem.* 1975;44:435-451.
28. Kotb, M. und Geller, A. M. Methionine adenosyltransferase: structure and function. *Pharmacol. Ther.* 1993;59:125-143.
29. Kotb, M., Mudd, S. H., Mato, J. M., Geller, A. M., Kredich, N. M., Chou, J. Y. und Cantoni, G. L. Consensus nomenclature for the mammalian methionine adenosyltransferase genes and gene products. *Trends Genet.* 1997;13:51-52.
30. Torres, L., Avila, M. A., Carretero, M. V., Latasa, M. U., Caballeria, J., Lopez-Rodas, G., Boukaba, A., Lu, S. C., Franco, L. und Mato, J. M. Liver-specific methionine adenosyltransferase MAT1A gene expression is associated with a specific pattern of promoter methylation and histone acetylation: Implications for MAT1A silencing during transformation. *FASEB J.* 2000;14:95-102.
31. Shimizu-Saito, K., Horikawa, S., Kojima, N., Shiga, J., Senoo, H. und Tsukada, K. Differential expression of S-adenosylmethionine synthetase isozymes in different cell types of rat liver. *Hepatology* 1997;26:424-431.
32. Chiang, P. K. S-adenosylhomocysteine hydrolase: measurement of activity and use of inhibitors. *Methods Pharmacol.* 1985;6:127-145.
33. Palmer, J. L. und Abeles, R. H. The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *J. Biol. Chem.* 1979;254:1217-1226.

34. Ueland, P. M. Pharmacological and biochemical aspects of S-sadenosylhomocysteine and S-sadenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol. Rev.* 1982;34:223-253.
35. de la Haba, G. und Cantoni, G. L.. The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine. *J. Biol. Chem.* 1959;234:606-608.
36. Kloor, D., Delabar, U., Muhlbauer, B., Luippold, G. und Osswald, H. Tissue levels of S-adenosylhomocysteine in the rat kidney: effects of ischemia and homocysteine. *Biochem. Pharmacol.* 2002;63:809-815.
37. Cantoni, G. L.; Chiang, P. K. The role of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase in the control of biological methylations. Cavalli, D., Gaull, G. und Zappia, V. (Hrsg.) *Natural sulfur compounds: novel biochemical and structural aspects.* New York: Plenum Press 1980;67-80.
38. Kredich, N. M. und Hershfield, M. S. S-adenosylhomocysteine toxicity in normal and adenosine kinase-deficient lymphoblasts of human origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1979;76:2450-2454.
39. Ueland, P. M. und Helland, S. Binding of adenosine to intracellular S-adenosylhomocysteine hydrolase in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 1983;258:747-752.
40. Longnecker, D. S. Abnormal methyl metabolism in pancreatic toxicity and diabetes. *J. Nutr.* 2002;132:2373S-2376S.
41. MacLennan, N. K., James, S. J., Melnyk, S., Piroozi, A., Jernigan, S., Hsu, J. L., Janke, S. M., Pham, T. D. und Lane, R. H. Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one-carbon metabolism and histone acetylation in IUGR rats. *Physiol. Genomics* 2004;18:43-50.
42. Castro, R., Rivera, I., Struys, E. A., Jansen, E. E. W., Ravasco, P., Camilo, M. E., Blom, H. J., Jakobs, C. und Tavares de Almeida, I. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clin. Chem.* 2003;49:1292-1296.
43. Finkelstein, J. D., Harris, B. Methionine metabolism in mammals: synthesis of S-adenosylhomocysteine in rat tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 1973;159:160-165.

44. Hoffman, D. R., Marion, D. W., Cornatzer, W. E. und Duerre, J. A. S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocystein metabolism in isolated rat liver. Effects of L-methionine, L-homocystein, and adenosine. *J. Biol. Chem.* 1980;255:10822-10827.
45. Chiang, P. K., Richards, H. H. und Cantoni, G. L. S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase: Analogues of S-adenosyl-L-homocysteine as potential inhibitors. *Mol. Pharmacol.* 1977;13:939-947.
46. Shealy, Y. F. und Clayton, J. D. Synthesis of carbocyclic analogs of purine ribonucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* 1969;91:3075-3083.
47. Bennett, L. L., Brockman, R. W., Rose, L. M., Allan, P. W., Shaddix, S. C., Shealy, Y. F. und Clayton, J. D. Inhibition of utilization of hypoxanthine and guanine in cells treated with the carbocyclic analog of adenosine. phosphates of carbocyclic nucleoside analogs as inhibitors of hypoxanthine (guanine) phosphoribosyltransferase. *Mol. Pharmacol.* 1985;27:666-675.
48. Borchardt, R. T.; Patel, U. G. und Bartel, R. L. Adenosine dialdehyde: a potent inhibitor of S-adenosylmethionine hydrolase. Usdin, E., Borchardt, R. T. und Creveling, C. R. (Hrsg.). *Biochemistry of S-adenosylmethionine and related compounds*. London: Macmillan Press; 1982;645-652.
49. Keller, B. T. und Borchardt, R. T. Adenosine dialdehyde: a potent inhibitor of vaccinia virus multiplication in mouse L929 cells. *Mol. Pharmacol* 1987;31:485-492.
50. Bartel, R. L. und Borchardt, R. T. Effects of adenosine dialdehyde on S-adenosylhomocysteine hydrolase and S-adenosylmethionine-dependent transmethylations in mouse L929 cells. *Mol. Pharmacol.* 1984;25:418-424.
51. Cools, M., Balzarini, J. und De Clercq, E. Mechanism of antiviral and cytotoxic action of (+/-)-6' beta-fluoroaristeromycin, a potent inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Mol. Pharmacol.* 1991;39:718-724.
52. De Clercq, E. S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors as broad-spectrum antiviral agents. *Biochem. Pharmacol.* 1987;36:2567-2575.
53. Muthukrishnan, S., Moss, B., Cooper, J. A. und Maxwell, E. S. Influence of 5'-terminal cap structure on the initiation of translation of vaccinia virus mRNA. *J. Biol. Chem.* 1978;253:1710-1715.

54. Osswald, H. Topical composition for treating herpes with adenosine. 1991; in den USA zugelassenes Patent (USP, 5,034,382).
55. Saso, Y., Conner, E. M., Teegarden, B. R. und Yuan, C. S. S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitor mediates immunosuppressive effects in vivo: suppression of delayed type hypersensitivity ear swelling and peptidoglycan polysaccharide-induced arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001;296:106-112.
56. Pike, M. C. und DeMeester, C. A. Inhibition of phosphoinositide metabolism in human polymorphonuclear leukocytes by S-adenosylhomocysteine. *J. Biol. Chem.* 1988;263:3592-3599.
57. Desai, D. M., Newton, M. E., Kadlecsek, T. und Weiss, A. Stimulation of the phosphatidylinositol pathway can induce T-cell activation. *Nature* 1990;348:66-69.
58. German, D. C., Bloch, C. A. und Kredich, N. M. Measurements of S-adenosylmethionine and L-homocysteine metabolism in cultured human lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* 1983;258:10997-11003.
59. Yuan, C. S., Saso, Y., Lazarides, E., Borchardt, R. T. und Robins, M. J. Recent advances in S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitors and their potential clinical applications. *Exp. Opin. Ther.* 1999;9:1197-1206.
60. Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *J. Lab. Clin. Med.* 1998;131:207-214.
61. Hochachka, P. W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 1986;231:234-241.
62. Stevens, T., Rodman, D. M. The effect of hypoxia on endothelial cell function. *Endothelium* 1995;3:1-11.
63. Gatenby, R. A., Kessler, H. B., Rosenblum, J. S., Coia, L. R., Moldofsky, P. J., Hartz, W. H. und Broder, G. J. Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1988;14:831-838.
64. Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D. und Semenza, G. L. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell Biol.* 1996;16:4604-4613.

65. Ebert, B. L., Gleadle, J. M., O'Rourke, J. F., Bartlett, S. M., Poulton, J. und Ratcliffe, P. J. Isoenzyme-specific regulation of genes involved in energy metabolism by hypoxia: similarities with the regulation of erythropoietin. *Biochem. J.* 1996;313:809-814.
66. Melillo, G., Musso, T., Sica, A., Taylor, L. S., Cox, G. W. und Varesio, L. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J. Exp. Med.* 1995;182:1683-1693.
67. Chawla, R. K. und Jones, D. P. Abnormal metabolism of S-adenosyl-L-methionine in hypoxic rat liver. Similarities to its abnormal metabolism in alcoholic cirrhosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1994;1199:45-51.
68. Ghoshal, A. K. und Farber, E. The induction of liver cancer by dietary deficiency of choline and methionine without added carcinogens. *Carcinogenesis* 1984;5:1367-1370.
69. Mikol, Y. B., Hoover, K. L., Creasia, D. und Poirier, L. A. Hepatocarcinogenesis in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis* 1983;4:1619-1629.
70. Wainfan, E. und Poirier, L. A. Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. *Cancer Res.* 1992;52:2071S-2077S.
71. Chawla, R. K., Watson, W. H. und Jones, D. P. Effect of hypoxia on hepatic DNA methylation and tRNA methyltransferase in rat: similarities to effects of methyl-deficient diets. *J. Cell. Biochem.* 1996;61:72-80.
72. Avila, M. A., Carretero, M. V., Rodriguez, E. N. und Mato, J. M. Regulation by hypoxia of methionine adenosyltransferase activity and gene expression in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1998;114:364-371.
73. Mato, J. M., Alvarez, L., Corrales, F. J., Pajares, M. A. S-adenosylmethionine and the liver. Arias, I. M., Boyer, J. L., Fausto, N., Jakoby, W. B., Schachter, D. A. und Shafritz, D. A. *The Liver: Biology and Pathobiology*. 3. Aufl. New.York.: Raven; 1994; 461-470.
74. Mato, J. M., Alvarez, L., Ortiz, P., Mingorance, J., Duran, C. und Pajares, M. A. S-adenosyl-L-methionine synthetase and methionine metabolism deficiencies in cirrhosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1994;368:113-117.
75. Avila, M. A., Mingorance, J., Martinez-Chantar, M. L., Casado, M., Martin-Sanz, P., Bosca, L. und Mato, J. M. Regulation of rat liver S-

- adenosylmethionine synthetase during septic shock: role of nitric oxide. *hepatology* 1997;25:391-396.
76. Graeber, T. G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D. E., Koch, C. J., Lowe, S. W. und Giaccia, A. J. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996;379:88-91.
  77. Pascale, R. M., Marras, V., Simile, M. M., Daino, L., Pinna, G., Bennati, S., Carta, M., Seddaiu, M. A., Massarelli, G. und Feo, F. Chemoprevention of rat liver carcinogenesis by S-adenosyl-L-methionine: a long-term study. *Cancer Res.* 1992;52:4979-4986.
  78. Cabrero, C., Duce, A. M., Ortiz, P., Alemany, S. und Mato, J. M. Specific loss of the high-molecular-weight form of S-adenosyl-L-methionine synthetase in human liver cirrhosis. *Hepatology* 1988;8:1530-1534.
  79. Martin-Duce, A., Ortiz, P., Cabrero, C. und Mato J. M. S-adenosyl-L-methionine synthetase and phospholipid methyltransferase are inhibited in human cirrhosis. *Hepatology* 1988;8:65-68.
  80. Goldberg, M. A., Dunning, S. P. und Bunn, H. F. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 1988;242:1412-1415.
  81. Wang, G. L. und Semenza, G. L. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 1993;82:3610-3615.
  82. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. und Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1995;92:5510-5514.
  83. Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R. und Ratcliffe, P. J. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399:271-275.
  84. Semenza, G. L. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1999;15:551-578.
  85. Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J. M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C. J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R. K., Collen, D., Keshert, E.

- und Keshet, E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998;394:485-490.
86. Alvarez-Tejado, M., Naranjo-Suàrez, S., Jiménez, C., Carrera, A. C., Landazuri, M. O. und del Peso, L. Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt cell survival pathway in PC 12 cells. *J. Biol. Chem.* 2001;276:22368-22374.
87. Aden, D., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. und Knowles, B. Controlled synthesis of HbsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979;282:615-616.
88. Knowles, B. B., Howe, C. C. und Aden, D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 1980;209:497-499.
89. Fogh, J., Wright, W. C. und Loveless, J. D. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 1977;58:209-214.
90. Heffelfinger, S. C., Hawkins, H. H., Barrish, J., Taylor, L. und Darlington, G. J. SkHep-1: a human cell line of endothelial origin. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 1992;28A:136-142.
91. Fogh, J., Fogh, J. M. und Orfeo, T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 1977;59:221-226.
92. Scherer, W. F., Syverton, J. T. und Gey, G. O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* 1953;97:695-710.
93. Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. und Brennan, M. A Human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 1973;51:1409-1416.
94. Graham, F. L., Smiley, J., Russel, W. C. und Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 1977;36:59-72.
95. Delabar, U., Kloor, D., Luippold, G. und Muhlbauer, B. Simultaneous determination of adenosine, S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine in biological samples using solid-phase extraction

- and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1999;724:231-238.
96. Bergmeyer, H. U., *Methoden der enzymatischen Analyse*. Verlag Chemie: Weinheim; 1970;1885.
97. Kloor, D., Kurz, J., Fuchs, S., Faust, B. und Osswald, H. S-adenosylhomocysteine-hydrolase from bovine kidney: enzymatic and binding properties. *Kidney Blood Press. Res.* 1996;19:100-108.
98. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:248-254.
99. Read, S. M. und Northcote, D. H. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 1981;116:53-64.
100. Atkinson, D. E. und Walton, G. M. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver cleavage enzyme. *J. Biol. Chem.* 1967;242:3239-3241.
101. Hermes, M., Osswald, H., Mattar, J. und Kloor, D. Influence of an altered methylation potential on mRNA methylation and gene expression in HepG2 cells. *Exp. Cell. Res.* 2004;294:325-334.
102. Hermes, M., *Die Rolle der S-Adenosyl-L-homocystein-Hydrolase bei der Regulation der DNA- und RNA-Methylierung sowie der Genexpression und Apoptose*. Tübingen: 2004.(Dissertation).
103. Hoffman, D. R., Cornatzer, W. E. und Duerre, J. A. Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and transmethylation reactions. *Can. J. Biochem.* 1979; 57:56-65.
104. Perna, A. F., Ingrosso, D., Castaldo, P., Galletti, P. und de Santo, N. G. Homocysteine and transmethylation in uremia. *kidney. Int. Suppl.* 2001;78:230S-233S.
105. Ingrosso, D., Cotticelli, M. G., D'Angelo, S., Buro, M. D., Zappia, V. und Galletti, P. Influence of osmotic stress on protein methylation in released erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 1997;244:918-922.
106. Ramakrishnan, V. und Borchardt, R. T. Adenosine dialdehyde and neplanocin A: potent inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase in neuroblastoma N2a cells. *Neurochem. Int.* 1987;10:423-431.

- 
107. Goldberg, M. A., Glass, G. A., Cunningham, J. M. und Bunn, H. F. The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1987;84:7972-7976.
  108. Pilz, R. B., Van den Berghe, G. und Boss, G. R. Adenosine dialdehyde and nitrous oxide induce HL-60 differentiation. *Blood* 1987;70:1161-1164.
  109. Hoffman, D. R., Haning, J. A. und Cornatzer, W. E. Microsomal phosphatidylethanolamine methyltransferase: inhibition by S-adenosylhomocysteine. *Lipids* 1981;16:561-567.
  110. Eloranta, T. O. Tissue distribution of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in the rat. Effect of age, sex and methionine administration on the metabolism of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and polyamines. *Biochem. J.* 1977;166:521-529.
  111. Kerins, D. M., Koury, M. J., Capdevila, A., Rana, S. und Wagner, C. Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001;74:723-729.
  112. Aarbakke, J. und Ueland, P. M. Interaction of S-adenosylhomocysteine with isolated rat hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* 1981;19:463-469.
  113. von Hippel, S., Hermes, M., Osswald, H. und Kloor, D. Methylation potential in four different cell lines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2004;369:R14.
  114. Wolff, M., Fandrey, J. und Jelkmann, W. Microelectrode measurements of pericellular PO<sub>2</sub> in erythropoietin-producing human hepatoma cell cultures. *Am. J. Physiol.* 1993;265:C1266-C1270.
  115. Gerweck, L. E., Seneviratne, T. und Gerweck, K. K. Energy status and radiobiological hypoxia at specified oxygen concentrations. *Radiat. Res.* 1993;135:69-74.
  116. Cross, D. P., Ramachandran, G. und v.Wattenberg, E. Mixtures of nickel and cobalt chlorides induce synergistic cytotoxic effects: implications for inhalation exposure modeling. *Ann. occup. Hyg.* 2001;45:409-418.
  117. Gordon, E. L., Pearson, J. D. und Slakey, L. L. The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by cultured endothelial cells from pig aorta. Feed-forward inhibition of adenosine production at the cell surface. *J. Biol. Chem.* 1986;261:15496-15507.

- 
118. Johnson, B. A., Najbauer, J. und Aswad, D. W. Accumulation of substrates for protein L-isoaspartyl methyltransferase in adenosine dialdehyde-treated PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 1993;268:6174-6181.
119. Hu, Y., Komoto, J., Huang, Y., Gomi, T., Ogawa, H., Takata, Y., Fujioka, M. und Takusagawa, F. Crystal structure of S-adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver. *Biochemistry* 1999;38:8323-8333.
120. Cory, J. G. und Mansell, M. M. Studies on mammalian ribonucleotide reductase inhibition by pyridoxal phosphate and the dialdehyde derivatives of adenosine, adenosine 5'-monophosphate, and adenosine 5' triphosphate. *Cancer Res.* 1975;35:390-396.
121. Kallio, P. J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J. und Poellinger, L. Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1997;94:5667-5672.
122. Araujo, F. D., Knox, J. D., Ramchandani, S., Pelletier, R., Bigey, P., Price, G., Szyf, M. und Zannis-Hadjopoulos, M. Identification of initiation sites for DNA replication in the human Dnmt1 (DNA-methyltransferase) locus. *J. Biol. Chem.* 1999;274:9335-9341.
123. Yi, P., Melnyk, S., Pogribna, M., Pogribny, I. P., Hine, R. J. und James, S. J. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J. Biol. Chem.* 2000;275:29318-29323.
124. Caudill, M. A., Wang, J. C., Melnyk, S., Pogribny, I. P., Jernigan, S., Collins, M. D., Santos-Guzman, J., Swendseid, M. E., Cogger, E. A. und James, S. J.. Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine {beta}-synthase heterozygous mice. *J. Nutr.* .2001;131:2811-2818.
125. Clarke, S.; Banfield, K. S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. Carmel, R. and Jacobsen, D. W. (Hrsg.) *Homocysteine in Health and Disease.* Cambridge University Press; 2001;63-78.
126. Baric, I., Fumic, K., Glenn, B., Cuk, M., Schulze, A., Finkelstein, J. D., James, S. J., Mejaski-Bosnjak, V., Pazanin, L., Pogribny, I. P., Rados, M., Sarnavka, V., Scukanec-Spoljar, M., Allen, R.H., Stabler, S., Uzelac, L., Vugrek, O., Wagner, C., Zeisel, S. und Mudd, S. H. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: a genetic disorder of methionine metabolism. *Proc. Natl. Acad. of Sci.* 2004;101:4234-4239.

- 
127. Maranchie, J. K., Vasselli, J. R., Riss, J., Bonifacino, J. S., Linehan, W. M. und Klausner, R. D. The contribution of VHL substrate binding and HIF1-alpha to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 2002;1:247-255.
  128. Bottaro, D. P. und Liotta, L. A. Cancer: out of air is not out of action. *Nature* 2003;423:593-595.
  129. Semenza, G. L. Hypoxia, clonal selection and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2000;35:71-103.
  130. Liteplo, R. G. und Kerbel, R. S. Periodate-oxidized adenosine induction of murine thymidine kinase: role of DNA methylation in the generation of tumor cell heterogeneity. *Cancer Res.* 1986;46:577-582.
  131. Mirkin, B. L., O'Dea, R. F. und Hogenkamp, H. P. Cytotoxic action of adenosine nucleoside and dialdehyde analogues on murine neuroblastoma in tissue culture: structure-activity relationships. *Cancer Res.* 1987;47:3650-3655.
  132. Miller, M. W., Duhl, D. M., Winkes, B. M., Arredondo-Vega, F., Saxon, P. J., Wolff, G. L., Epstein, C. J., Hershfield, M. S. und Barsh, G. S. The mouse lethal nonagouti (a(x)) mutation deletes the S-adenosylhomocysteine hydrolase (Ahcyl) gene. *EMBO J.* 1994;13:1806-1816.
  133. Gerweck, L. E., Urano, M., Koutcher, J., Fellenz, M. P. und Kahn, J. Relationship between energy status, hypoxic cell fraction, and hyperthermic sensitivity in a murine fibrosarcoma. *Radiat. Res* 1989;117:448-458.
  134. Veech, R. L., Lawson, J. W., Cornell, N. W. und Krebs, H. A. Cytosolic phosphorylation potential. *J. Biol. Chem.* 1979;254:6538-6547.
  135. Barrette, W. C., Hannum, D. M., Wheeler, W. D. und Hurst, J. K. Viability and metabolic capability are maintained by *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus lactis* at very low adenylate energy charge. *J. Bacteriol.* 1988;170:3655-3659.
  136. Lehninger, A. L., Cox, M. M. und Nelson, D. L., *Principles of Biochemistry*. 2 Aufl. New York: Worth Publishers; 1993;467-484.
  137. Stryer, L., *Biochemie*. 4 Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 1995;507-533.

- 
138. Warburg, O. H., Ideen zur Fermentchemie der Tumoren. Berlin: Akademieverlag; 1947;3.
  139. Rodriguez-Enriquez, S. und Moreno-Sanchez, R. Intermediary metabolism of fast-growth tumor cells. Arch. Med. Res 1998;29:1-12.
  140. Weinhouse, S. The Warburg Hypothesis fifty years later. Z. Krebsforsch. Klin. Onkol. Cancer Res. Clin. Oncol. 1976;87:115-126.
  141. Fujii, T., Otsuki, T., Moriya, T., Sakaguchi, H., Kurebayashi, J., Yata, K., Uno, M., Kobayashi, T., Kimura, T., Jo, Y., Kinugawa, K., Furukawa, Y., Morioka, M., Ueki, A. und Tanaka, H. Effect of hypoxia on human seminoma cells. Int. J. Oncol. 2002;20:955-962.
  142. Bunn, H. F. und Poyton, R. O. Oxygen sensing and molecular adaption to hypoxia. Physiol. Rev. 1996;76:839-885.
  143. Aw, T. Y., Shan, X., Sillau, A. H. und Jones, D. P. Effect of chronic hypoxia on acetaminophen metabolism in the rat. Biochem. Pharmacol. 1991;47:1029-1038.
  144. Taylor, C. T., Lisco, S. J., Awtrey, C. S. und Colgan, S. P. Hypoxia inhibits cyclic nucleotide-stimulated epithelial ion transport: role for nucleotide cyclases as oxygen sensors. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1998;284:568-575.
  145. Sánchez-Góngora, E., Pastorino, J. G., Alvarez, L., Pajares, M. A., García, C, Viña, J. R., Mato, J. M. und Farber, J. L. Increased sensitivity to oxidative injury in chinese hamster ovary cells stably transfected with rat liver S-adenosylmethionine synthetase cDNA. Biochem. J. 1996;319:767-773.
  146. Pilz, R. B., van de Berghe, G. und Boss, G. R. Induction of HL-60 differentiation by starvation for a single essential amino acid but not by protein synthesis inhibitor. J. Clin. Invest. 1987;79:1006-1009.
  147. Walker, R. D. und Duerre, J. A. S-adenosylhomocysteine metabolism in various species. Can. J. Biochem. 1975;53:312-319.
  148. Schatz, R. A., Vunnam, C. R. und Sellinger, O. Z. Species and tissue differences in the catabolism of S-adenosyl-L-homocysteine: a quantitative, chromatographic study. Life Sci. 1977;20:375-383.

## Danksagung

Vielen lieben Dank an alle, die mich während dieser Zeit unterstützt und begleitet haben. Für die vielen netten Gespräche und für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Frau PD Dr. Doris Kloor möchte ich für die herzliche Betreuung meiner Doktorarbeit und für die jederzeit hilfreiche Unterstützung danken. Besonders dankbar bin ich für die Möglichkeit des eigenständigen Arbeitens und für die Förderung meines Posters beim Pharmakologenkongress 2004 in Mainz. Danke auch, dass Du mich hast meine Reise machen lassen.

Herrn Prof. Dr. Hartmut Oßwald möchte ich für die Bereitstellung des Themas danken. Des Weiteren auch für die vielen Informationen über das von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgen und die Anregung, in meiner Familiengeschichte nachzuforschen.

Im Labor gilt mein besonderer Dank Marina Hermes, die mir während der ganzen Zeit mit viel Geduld zur Seite stand und die ganz besonders zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Für die vielen Stunden, die sie mit mir vor dem Computer verbracht hat, um meiner Arbeit ein anständiges Format zu geben und für die Einarbeitung in sämtliche Programme.

Herrn Prof. Dr. Hamprecht möchte ich herzlich für die Mühe, die er sich im Rahmen der Zweitkorrektur dieser Arbeit gemacht hat, danken. Es war ein sehr interessantes und lehrreiches Gespräch für mich.

Des Weiteren möchte ich Renate Riehle danken, die stets für eine nette Atmosphäre im Labor gesorgt hat, und die mir durch ihre Mitarbeit in vielen Dingen ein schnelleres Arbeiten ermöglicht hat.

Bei Julia Mattar möchte ich mich bedanken. Nicht nur im Rahmen dieser Doktorarbeit, sondern vielmehr für ihre Freundschaft.

Ebenso möchte ich allen anderen Mitarbeitern im Labor danken, Julia Kirschler, Eva Häntschel, Benjamin Roll und Martina Tete – es hat sehr viel Spaß gemacht! Anja Jarmer danke ich für die Hilfe beim Fotografieren meiner Zellen und Roland Jäger für die Lösung einiger technischer Computerprobleme.

Von ganzem Herzen möchte ich meinen Eltern danken, die immer für mich da sind. Für die Bereitstellung von Kost und Unterkunft am Wochenende, wonach oft das ganze Wohnzimmer chaotisch mit meiner Doktorarbeit verziert war.

Meiner Schwester, die mir oft weite Fußmärsche erspart hat.

Und Domi, mit dem alles angefangen hat...

---

## Lebenslauf

**Name:** von Hippel  
**Vorname:** Sandra Christine  
**Geburtsdatum:** 9. Mai 1979  
**Geburtsort:** Villingen-Schwenningen

### Schulbildung:

1985 – 1989 Eichendorffschule, Rottweil  
1989 – 1998 Droste-Hülshoff-Gymnasium, Rottweil; Abschluss: Abitur

### Studium:

1999 – 2005 Studium der Humanmedizin, Universität Tübingen  
10.09.2001 Ärztliche Vorprüfung  
29.08.2002 Erstes Staatsexamen  
30.03.2005 Zweites Staatsexamen  
2005 – 2006 Praktisches Jahr im Schwarzwald-Baar Klinikum Villingen-Schwenningen, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Freiburg (Wahlfach: Anästhesie)  
11.05.2006 Drittes Staatsexamen

### Famulaturen:

März 2002 Gastroenterologie, St. Hedwig Krankenhaus Berlin  
September 2002 Dermatologie, Universitätsklinik Freiburg  
Februar 2003 Gynäkologie, Universitätsklinik Tübingen  
März 2004 Pädiatrie, Siddhi Memorial Hospital, Bhaktapur Nepal  
August 2004 Gynäkologie, Praxis Dr. Rumpf Reutlingen

### Doktorarbeit:

2003/2004 Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Tübingen, Direktor Prof. Dr. Hartmut Oßwald; Betreuung durch PD Dr. Doris Kloor.

Thema: „Einfluss von Hypoxie und Adenosin-2',3'-  
Dialdehyd auf den S-Adenosylmethionin /S-  
Adenosylhomocystein-Quotienten in HepG2-, Sk-Hep-1-,  
HeLa-, MCF-7- und Hek-293-Zellen.“

**Kongress und Publikation:**

Die Daten und Ergebnisse der vorliegenden Forschungsarbeit wurden bei der 45. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) in Mainz 2004 vorgestellt und publiziert.

Abstract-Publikation: von Hippel, S., Hermes, M., Osswald, H., and Kloor, D.  
Methylation potential in four different cell lines.  
Naunyn-Schmiedeberg`s Arch.Pharmacol. 2004;369:R14.

Publikation: Hermes, M., von Hippel, S., Osswald, H., and Kloor, D.  
S-adenosylhomocysteine metabolism in different cell lines:  
Effect of hypoxia and cell density.  
Cell. Physiol. Biochem. 2005;15:233-244.

**Teilzeitjobs:**

1999	4-monatiges Praktikum, Wittum-Schule-Sulgen (Schule für geistig und körperlich behinderte Kinder)
1999	2-monatiges Krankenpflegepraktikum, Kreiskrankenhaus Rottweil
2001	Pflegeaushilfskraft Gynäkologie, Kreiskrankenhaus Rottweil
2003	Nachtwache Klinische Pharmakologie, Universitätsklinik Tübingen

**Auslandreisen:**

2003	Nepal, Nordindien
2004	Nepal, Birma, Südindien