

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

**Einfluss von Adenosin-2'-3'-Dialdehyd  
auf das Methylierungspotential und die Genexpression  
in HepG2-Zellen  
unter normoxischen Bedingungen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Julia Eva Mattar  
aus  
Koblenz

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen  
1. Berichtstatter: Privat-Dozentin Dr. D. Kloor  
2. Berichtstatter: Professor Dr. Dr. N. Blin

*Für Flo*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Verzeichnis der Abkürzungen .....</b>	<b>III</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Bisheriger Wissensstand.....</i>	1
1.2 <i>Zielsetzung.....</i>	9
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>10</b>
2.1 <i>Versuchsobjekt .....</i>	11
2.2 <i>Kultivierung von HepG2-Zellen .....</i>	12
2.2.1 <i>Passagieren der Zellen mit Trypsin/ EDTA.....</i>	13
2.2.2 <i>Kryokonservierung und Revitalisierung der Zellen .....</i>	13
2.2.3 <i>Inkubation der Zellen mit dem SAH-Hydrolase-Hemmstoff Adenosin-2',3'-Dialdehyd.....</i>	14
2.3 <i>Bestimmung der Überlebensrate von HepG2-Zellen unter dem Einfluss von Adenosin-2',3'-Dialdehyd.....</i>	15
2.4 <i>Bestimmung von SAM, SAH und Adenosin mittels HPLC.....</i>	17
2.5 <i>Quantitative Expressionsanalyse mittels Light-Cycler-PCR.....</i>	19
2.5.1 <i>RNA-Isolation (Methode nach Chomczynski und Sacchi, 1987) .....</i>	19
2.5.2 <i>Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration.....</i>	20
2.5.3 <i>Reverse Transkription .....</i>	21
2.5.4 <i>Quantitative Expressionsanalyse mittels Lightcycler-PCR .....</i>	21
2.5.4.1 <i>Theoretischer Hintergrund zur real time PCR .....</i>	21
2.5.4.2 <i>Durchführung der Expressionsanalyse mittels real time PCR... ..</i>	22
2.5.4.3 <i>Berechnung des relativen Expressionsquotienten eines gefragten Genes .....</i>	24
2.6 <i>Quantitative Erythropoetin-Bestimmung.....</i>	25
2.7 <i>Photometrische Bestimmung der SAH-Hydrolase-Enzymaktivität .....</i>	25
2.7.1 <i>Aufbereitung der HepG2-Zellen.....</i>	25

2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	26
2.7.3 Messung der SAH-Hydrolase-Aktivität .....	26
2.8 Bestimmung der Adeninnukleotide im sauren Überstand mittels HPLC.	28
2.9 Statistik .....	29
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
3.1 Bestimmung der SAM- und SAH-Konzentrationen.....	30
3.1.1 Veränderung des Methylierungspotentials in Abhängigkeit von der Adenosin-2',3'-Dialdehyd-Konzentration .....	30
3.1.2 Veränderung des Methylierungspotentials in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit dem Hemmstoff.....	31
3.2 Auswirkungen von Ado-2',3'-Dial auf den Adeninnukleotidhaushalt der Zelle .....	32
3.3 Überlebensrate der HepG2-Zellen nach Adenosin-2',3'-Dialdehyd-Behandlung.....	34
3.4 Einfluss des Methylierungspotentials auf die Expressions ausgewählter Gene .....	35
3.5 Einfluss des Methylierungspotentials auf die Expression des Erythropoetin-Gens in Abhängigkeit von der Zeit.....	39
3.6 Protein-Expression von Erythropoetin.....	40
3.7 Auswirkung von Ado-2',3'-Dial auf die Aktivität der SAH-Hydrolase .....	41
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>42</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>55</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>56</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>66</b>
<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>67</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ado-2',3'-Dial	Adenosin-2',3'-Dialdehyd
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$	beta
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikcentimeter
Ct-Wert	cycle threshold
d	Schichtdicke
$\Delta$	delta
$\Delta$ Ct	Differenz zweier Ct-Werte
$\Delta$ E	Extinktionsdifferenz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMPC	Dimethyldicarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpm	desintegrations per minute
E	Effizienz
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
EC	energy charge = Energieladung
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
Epo	Erythropoetin
evtl.	eventuell
F	forward = vorwärts

FG	Feuchtgewicht
g	Gramm
G	Guanosin
gefr.	gefragtes
g*	Erdbeschleunigung
γ	gamma
h	Stunden
HPLC	high performance liquid chromatography
kb	Kilobasenpaare
K <sub>i</sub>	Inhibitionskonstante
KPP	Kaliumphosphatpuffer
l	Liter
m	milli
M	Mol pro Liter
mg	milligramm
MHz	Megahertz
mIU	milli-internationale Units
min	Minuten
ml	Milliliter
μ	mikro
MP	Methylierungspotential
mRNA	“messenger” RNA
n	nano
N	Nukleosid
NKS	Neugeborenen Kälberserum
nm	nanometer
p	pico
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pre-mRNA	Vorläufer der mRNA
Q	Quotient
R	reverse
ref.	Referenz

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR nach reverser Transkription
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adosylmethionin
SD	Standardabweichung
sec	Sekunden
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
tRNA	transfer RNA
U	Units
UV	Ultraviolettes Licht
usw.	und so weiter
VEGF	vascular endothelial growth factor = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
%	Prozent

# 1. Einleitung

## 1.1 Bisheriger Wissensstand

### **SAM-/ SAH-Metabolismus**

S-Adenosylmethionin (SAM), der wichtigste Methylgruppendonor in eukaryonten Zellen, wird durch die S-Adenosylmethionintransferase aus ATP und L-Methionin synthetisiert (1;2). Biologische Transmethylierungen spielen bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse eine wichtige Rolle. Als Beispiel dafür wären die posttranslationale Modifizierung von Proteinen, die posttranskriptionelle Modifikation von Nukleinsäuren und die Modifikation von Membran-Phospholipiden, die bei der Regulation der Membranfunktion beteiligt sind (3), zu nennen. Methylierungsreaktionen sind aber auch bei der Metabolisierung von biogenen Aminen wie Neurotransmittern und Hormonen, z.B. Dopamin, Norepinephrin, Epinephrin, Histamin und Melatonin (4), bei der Virusreplikation (5), sowie der Bakterien- (6) und die Leukozyten-Chemotaxis von Bedeutung (7;8).

Nach Übertragung der Methylgruppe auf einen Akzeptor wird SAM zu S-Adenoylhomocystein (SAH) umgewandelt. Da SAH eine höhere Affinität als SAM zum katalytischen Zentrum der meisten Transmethylasen aufweist, ist es ein Produktinhibitor aller SAM-abhängigen Transmethylierungsreaktionen (9;10). Deshalb ist *in vivo* ein schneller Abbau dieses Reaktionsproduktes erforderlich. SAH wird in Vertebraten nur durch die SAH-Hydrolase (EC 3.3.1.1) abgebaut und verhindert dadurch die Akkumulation von SAH (11). Die SAH-Hydrolase wurde ursprünglich als zytoplasmatisches Enzym beschrieben (12). Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* in transkriptionell aktiven Zellkernen ebenfalls SAH-Hydrolase lokalisiert ist (13).

Die Reaktion der SAH-Hydrolyse ist reversibel (Abb.1) mit einer Gleichgewichtskonstanten von etwa 1  $\mu\text{M}$ , wobei das Gleichgewicht *in vitro* auf Seite der Synthese liegt (12). Die Reaktion verläuft jedoch *in vivo* in Richtung

der Hydrolyse, weil Adenosin und Homocystein in der Zelle so schnell abgebaut werden (Abb 1). Adenosin wird durch die Adenosin-Kinase oder die Adenosin-Desaminase (ADA) und Homocystein durch die Methionin-Synthetase oder die Cystathionin- $\beta$ -Synthetase (12) abgebaut. Da Adenosin ein potenter Hemmstoff der SAH-Hydrolase *in vitro* und *in vivo* ist (14), ist die SAH-Hydrolase-Aktivität *in vivo* von der Aktivität der ADA abhängig. Dies wird dadurch gewährleistet, dass erstens durch den Abbau von Adenosin die von der SAH-Hydrolase katalysierte Reaktion in die hydrolytische Richtung gelenkt wird (15;16) und zweitens die Entstehung von Desoxyadenosin (Cordycepin) verhindert wird, das bei genetisch ADA-defizienten Patienten exzessiv im Serum akkumuliert und ein „suicid-ähnlicher“ Inaktivator der SAH-Hydrolase ist (17;18). Die Folge dieser Inaktivierung ist ein intrazellulärer SAH-Anstieg der indirekt inhibitorische Effekte auf Transmethylierungsreaktionen haben könnte. Daraus wurde die Verbindung zwischen ADA-Mangel und Hemmung von Methylierungen gezogen (19).

SAH-Hydrolase wurde in verschiedenen Geweben von Hühnern, Ratten, Hunden und Kaninchen untersucht (20). Die Enzymaktivität ist in der Leber, dem Pankreas und der Niere am höchsten, in Milz und Hoden mittelhoch und in Gehirn, Muskulatur und Herz niedrig (21). Die Beobachtung, dass Mäuse-Embryonen, denen das Gen für die SAH-Hydrolase fehlt, in Stadium der Implantation sterben (22), zeigt die biologische Bedeutung dieses Enzyms.

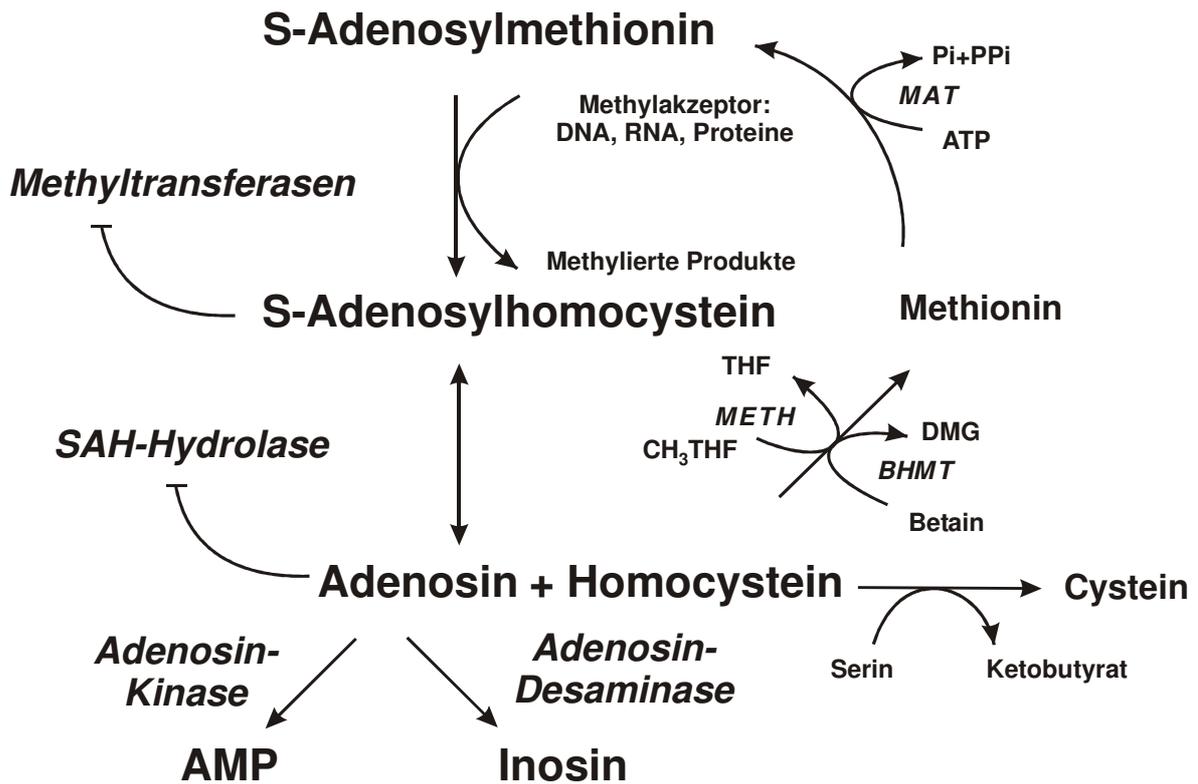


Abbildung 1: Darstellung des SAM- und SAH-Stoffwechselweges

SAM und SAH sind Substrat und Produkt von SAM-abhängigen Methylierungsreaktionen, die auf die Aktivität der Methyltransferasen modulierend wirken. Der Quotient aus SAM und SAH, auch Methylierungspotential (MP= SAM/ SAH) genannt (11;23), wird als Indikator für den Methylgruppen-Transfer von SAM auf Methylakzeptoren in einer Zelle angesehen (24).

Da die Aktivität der SAH-Hydrolase die intrazelluläre Konzentration von SAH reguliert, ist das Enzym von wachsendem pharmakologischem Interesse, weil ihre Hemmung indirekt über einen Anstieg von SAH die zelluläre Methylierung von Phospholipiden, Proteinen, kleinen Molekülen (z.B. Norepinephrin), DNA und RNA beeinflussen kann (25;26). Dabei wurde beobachtet, dass SAH-Hydrolase-Inhibitoren selbst in hohen Konzentrationen mit maximaler Inhibition der SAH-Hydrolase keine vollständige Inhibition der SAM-abhängigen Methylierung bewirken können: Ein signifikanter Anteil (40-

60%) der Lipid- und Protein-Carboxy-Methylierung in L929-Zellen von Mäusen ist resistent gegen drastische Anstiege von intrazellulärem SAH (bis zu 100  $\mu\text{M}$ ), sofern die SAM-Konzentration hoch genug ist, um Methylierung zu ermöglichen (27).

Dennoch zeigen manche Nukleoside antivirale Aktivität, die zumindest teilweise auf den SAH-Anstieg und die damit verbundene Inhibition von Reifungsvorgängen der viralen mRNA (z.B. 5'-cap-Methylierung) zurückzuführen ist (5;28). Es kann somit von einer engen Korrelation zwischen der antiviralen Potenz bestimmter Nukleosid-Analoga und deren inhibitorischen Effekt auf die SAH-Hydrolase ausgegangen werden (29). Diese Nukleosid-Analoga unterscheiden sich jedoch in ihrem Wirkungsspektrum. So reagieren Viren unterschiedlich sensibel auf die Inhibition der SAH-Hydrolase, da die SAH-Hydrolase der Viren die gleiche Affinität für Inhibitoren hat wie das zelluläre Enzym. Eine Erklärung dafür, dass die SAH-Hydrolase-Inhibitoren eine selektive antivirale Aktivität entfalten könnten, liegen darin, dass virus-infizierte Zellen eine höhere Transmethylierungsaktivität besitzen als uninfizierte Zellen und deshalb empfindlicher auf ein verändertes MP reagieren. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass es Unterschiede zwischen den Methyltransferasen virus-infizierter oder –nicht-infizierter Zellen gibt. Dies wurde durch Erforschung unterschiedlicher Viren bestätigt, die Gene für ihre eigenen Methyltransferasen enthalten (reviewed in De Clercq (28)). Diese Methyltransferasen, die häufig an der Entstehung der cap-Struktur beteiligt sind, könnten also unterschiedlich sensibel auf SAH-Anstieg reagieren.

Auch ist die SAH-Hydrolase seit kurzem eine Zielstruktur für die Entwicklung neuer immunsuppressiver oder anti-inflammatorischer Agentien (30-32). So konnte eine Abhängigkeit der Lymphozyten-Aktivierung von SAM-abhängigen Transmethylierungsreaktion gezeigt werden. Dies spiegelt sich auch im SAM-Verbrauch der Zellen wieder, der etwa 3- bis 5-mal so groß ist wie der Durchschnittsverbrauch einer nicht hepatischen Zelle (33).

Zudem bewirken SAH-Hydrolase-Inhibitoren *in vitro* eine selektive Inhibition der T-Zell-Proliferation und Interleukin-2-Produktion (32). Dabei wurde beobachtet, dass die Potenz der SAH-Hydrolase-Inhibitoren mit der Hemmung

der antiinflammatorischen Aktivität und der T-Zell-Proliferation korreliert (34). Des Weiteren ist bekannt, dass SAH die Phosphatidylinositol-Kinase hemmt, die für den Signalweg der Second-Messenger-vermittelten T-Zell-Aktivierung verantwortlich ist (35), so dass SAH auch über diesen Reaktionsweg anti-T-Zell-proliferierend wirkt.

### **Bedeutung des Methylierungspotentials für Methylierungs-Reaktionen**

Der Einfluss eines veränderten MP auf SAM-abhängige Methylierungsreaktionen wurde in verschiedenen Studien untersucht. So konnte gezeigt werden, dass die Methylierung von Phospholipiden, Proteinen, kleinen Molekülen, DNA und RNA durch ein alterniertes MP beeinflusst wird (25;26). Hoffman et al. (1980) haben in Rattenleberzellen den Einfluss eines durch Adenosin und Homocystein gesenkten MP auf die Methylierung von Histonen, DNA und Phospholipiden untersucht und festgestellt, dass bei einem MP von  $5,6 \pm 1,8$  die Histone, DNA und Phospholipide noch etwa zu 100% methyliert waren, bei einem MP von  $0,3 \pm 0,1$  die *in vivo* Methylierung von Histonen, DNA und Phospholipiden jedoch zu 90 bis 99% inhibiert war (36), wobei Histone noch zu  $10 \pm 7\%$ , DNA zu  $6 \pm 2\%$  und Phospholipide zu weniger als 1% methyliert waren.

Der Grad der Phospholipid-Methylierung hat starken Einfluss auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Zellmembran, z.B. auf ihre Viskosität und ihre elektrische Ladung (37). Eine vermehrte Phospholipid-Methylierung führte in Retikulozyten zu einer erhöhten Affinität der Adenylat-Cyclase an  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren (38) und damit zu einer Interaktion in der Signaltransduktion und einem Anstieg der  $\beta$ -adrenergen Bindungsstellen (39). Außerdem beeinflusst die Phospholipid-Methylierung die Aktivität anderer Membran-gebundener Enzyme, z.B. die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in Erythrozyten, was zu Veränderungen der Membranviskosität führt (39).

DNA-Methylierung bezieht sich v.a. auf die Methylierung des Cytosinrestes an der Carbon-5-Position in der DNA, im Speziellen auf die CpG-Dinukleotid-Methylierung, die mit der Aktivität einer Vielzahl von Genen, der körperlichen Vererbung und der Zelldifferenzierung und der X-chromosomalen

Inaktivierung (40) verbunden ist (reviewed in Chiang (26)). Die Bedeutung, die das MP für die embryonale Entwicklung hat, wurde durch verschiedene Untersuchungen gezeigt. In transkriptionell aktiven Zellen, z.B. in Oozyten, in Embryonen während der Gastrulation und in vielen differenzierten Zelltypen ist die Konzentration der SAH-Hydrolase im Nukleus höher als im Zytoplasma (41). Diese Beobachtung spricht dafür, dass das gebildete SAH vor Ort abgebaut wird und so eine Hemmung der Methyltransferasen vermieden wird (13;42). Außerdem ist bekannt, dass Mäuse-Embryonen, denen das Gen für die SAH-Hydrolase fehlt, in Stadium der Implantation sterben (22). Dennoch können sich manche Organismen, z.B. *Drosophila* (43) oder *Saccharomyces cerevisiae* (44) ohne detektierbare DNA-Methylierung entwickeln und differenzieren. In darauf folgenden Studien wurde jedoch bei „knockout-Mäusen“ ohne DNA-Methyltransferase-Gen die wichtige Rolle der DNA-Methylierung bei der Entwicklung unter Beweis gestellt (45).

DNA-Methylierung fungiert als Regulator der Transkription, wie z.B. die Methylierung des Promotors eines Gens (z.B. Erythropoetin oder p53) (reviewed in Singal und Ginder (46)), das nicht exprimiert wird.

## **RNA-Methylierung**

Ribosomale RNA und transfer RNA sind sehr stark methyliert. tRNA enthält über 30 verschiedene methylierte Nukleoside (47;48), die eine wichtige Funktion bei der Proteinsynthese auf der Ebene der Codon-Anticodon-Erkennung haben (49). Die Methylierung von rRNA und messenger RNA (mRNA) ist für die Reifung dem „Processing“ dieser RNAs nötig (50). Messenger RNA wird sowohl an der 5'-cap-Struktur als auch der internen N<sup>6</sup>-Methyladenosine (51). Die Anzahl und Lokalisation ist unterschiedlich je nach mRNA (52-54). Die biologische Bedeutung dieser internen N<sup>6</sup>-Methylierungen ist bislang ungeklärt. Sie könnten z.B. am „Processing“ der mRNA oder ihrem Transport aus dem Zellkern an die Ribosomen beteiligt sein (52;55;56).

Eine bedeutende Methylierung der mRNA ist die Methylierung der 5'-cap-Struktur. Die einzigartige methylierte 5'-terminale cap-Struktur von

Eukaryonten-mRNA unterscheidet diese deutlich von Prokaryonten-mRNA, die ungeblickte Triphosphat-Enden besitzt (57).

Für ihre Entstehung ist ein Multi-Enzym-System notwendig: Nach Beginn der RNA-Synthese trägt die mRNA am 5'-Ende eine Triphosphatgruppe, die sofort modifiziert wird. Durch Hydrolyse durch die RNA-Triphosphatase wird ein  $\gamma$ -Phosphat abgespalten. Die mRNA-Guanylyltransferase transferiert an diese Schnittstelle einen Guaninphosphatrest. Dieses charakteristische Ende wird als „cap“ bezeichnet. Nun überträgt die mRNA-(Guanin-7-)Methyltransferase eine Methylgruppe von SAM auf Position 7 des cap-Guanosin-Restes - das entstandene Produkt nennt man „cap 0“-Struktur ( $m^7GpppN_1p$ ). Die 2'-O-Methyltransferase methyliert die 2'-O-Ribose-Einheit vom  $N_1$ -Nukleotid der mRNA. Diese Struktur wird als „cap 1“ bezeichnet ( $m^7GpppN_1mpN_2p$ ). All diese Vorgänge finden im Nukleus statt (58-61). Die cap 1-Struktur kann im Zytoplasma noch durch die 2'-O-Methyltransferase an der Ribose-Einheit des  $N_2$ -Nukleotid des 5'-Endes methyliert werden und dadurch ein sogenanntes „cap 2“ ( $m^7GpppN_1mpN_2mpN_3p$ ) ergeben (61).

Die methylierte 5'-terminale cap-Struktur hat für die mRNA verschiedene biologische Bedeutungen: 1.) Both et al. (1975) haben als erste gezeigt, dass die cap-Struktur der mRNA für die effiziente Translation von vesikulärem Stomatitis-Virus- oder Reovirus-mRNA in einem zellfreien Proteinsynthesystem von Weizenkeimen erforderlich ist (62), weil sie zu Beginn der Proteinsynthese eine effiziente Bindung der mRNA an die 40S-Untereinheit von Ribosomen vereinfacht (63). Diese Beobachtung eröffnet die Möglichkeit, dass die genetische Expression auf dem Level der Translation reguliert wird (64). 2.) Eukaryonten-mRNA hat eine längere Halbwertszeit als Prokaryonten-mRNA, die bereits während der Translation schrittweise vom 5'-Ende an exonukleolytisch gespalten wird (57). Furuichi et al. (1977) injizierte Reovirus-mRNA mit cap in *Xenopus laevis*-Oozyten und beobachtete, dass sie stabiler waren als die ohne cap (65). Das lässt den Schluss zu, dass die methylierte cap-Struktur vor exonukleolytischem Abbau schützt. 3.) Während der Umwandlung von Vorläufer-Transkripten zu zytoplasmatischer mRNA bleiben die cap-Strukturen konserviert (66). Dies könnte ein Hinweis darauf

sein, dass die cap-Struktur bei einem der Umwandlungsvorgänge eine wichtige Rolle einnimmt und dadurch evtl. bei der Regulation der Gen-Expression einen modulierenden Einfluss hat.

4.) Bei HeLa-Zellextrakten hat man festgestellt, dass die methylierte cap-Struktur für den Vorgang des „Splicings“ der mRNA *in vitro* erforderlich ist (67;68).

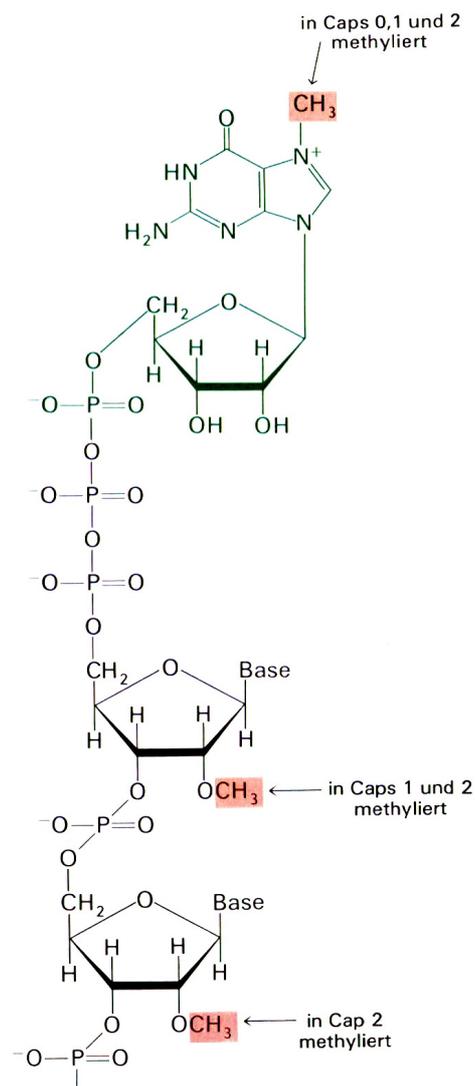


Abbildung 2: Die Strukturformel der cap-Struktur

Die Methylierung der 5'-cap-Struktur von viraler mRNA scheint außerdem Voraussetzung für die Virus-Replikation in der Wirtszelle zu sein (5).

## 1.2 Zielsetzung

Da die Aktivität der SAH-Hydrolase die SAH-Spiegel in der Zelle kontrolliert und somit Transmethylierungsreaktionen beeinflusst, sollten in dieser Arbeit folgende Fragen geklärt werden:

1. Wie hoch ist der SAM- und SAH-Spiegel, sowie das MP in HepG2-Zellen unter Kontrollbedingungen? Diese Zelllinie diene als Modellobjekt.
2. Wie verändern sich diese beiden Metabolite SAM und SAH und damit das MP nach Hemmung der SAH-Hydrolase durch Ado-2',3'-Dial? Sind diese Veränderungen konzentrationsabhängig?
3. Sind die Veränderungen der Metabolite SAM und SAH, sowie des MPs nach Hemmung der SAH-Hydrolase durch Ado-2',3'-Dial zeitabhängig?
4. Wie ändert sich die Energieladung der Zellen unter Hemmung der SAH-Hydrolase?
5. Hat der Hemmstoff Ado-2',3'-Dial einen Einfluss auf die Überlebensrate der Zellen?
6. Welchen Einfluss hat ein verändertes MP auf die Gen-Expression von Erythropoetin (Epo) und VEGF, als Beispiel für schnell aktivierbare Gene und die Expression von Cyclophilin und SAH-Hydrolase als klassische „Housekeeping“ Gene?
7. Ist diese Veränderung auch auf Proteinebene detektierbar, z.B. an der Epo-Expression?
8. Wie verhält sich die SAH-Hydrolase-Aktivität unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit Ado-2',3'-Dial?

## **2. Material und Methoden**

*Tabelle 1: Materialliste*

<b>Substanz/ Handelsname</b>	<b>Hersteller</b>
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Gibco
PBS (pH 7,2)	Gibco
Neugeborenen Kälberserum (NKS)	Gibco
Penicillin/ Streptomycin 100*	Gibco
Trypsin/EDTA 10*0,5/ 0,2%	Gibco
DMSO	Merck
Adenosin-2',3'-Dialdehyd	Sigma
Perchlorsäure	Merck
SAM, SAH und Adenosin	Sigma
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Salzsäure 37%	Merck
Ameisensäure	Merck
Zitronensäure	Merck
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (monobasisch)	Sigma
Heptansulfonat	Fluka chemika
Methanol gradient grade	Merck
Acetonitril	Merck
Extraktionsmittel	RNA pure von peqLab
Chloroform	Merck
Isopropanol (100%)	Merck
Ethanol (70%)	Merck
MgCl <sub>2</sub>	Pan
dNTPs	Eppendorf
Random Hexamers (Primer)	Promega
AMV Reverse Transkriptase	PeqLab
RNase-Inhibitor	Eppendorf
Taq-Polymerase	Pan

Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Gelladepuffer	PeqLab
Magnesiumchlorid	Merck
Primer sense für Erythropoetin, Cyclophilin, SAHH, 18S rRNA und VEGF-A	Interactive Ulm
Primer antisense für Erythropoetin, Cyclophilin, SAHH, 18S rRNA und VEGF-A	Interactiva Ulm
Protein Assay Farbstoff-Konzentrat (Phosphorsäure, Methanol)	Bio-Rad
Albumin bovine, Fraction 5 (pH 7,0)	SERVA
Xanthinoxidase	Roche
Adenosindesaminase	Roche
Nucleosidphosphatase	Sigma
S-Adenosylhomocystein	Sigma

## **2.1 Versuchsobjekt**

Bei allen durchgeführten Experimenten diente die humane Hepatomzelllinie HepG2 (69;70) als Versuchsobjekt. Die Zellen haben histologische und biochemische Charakteristika von gut differenzierten Leberparenchymzellen (69;70). Außerdem besitzen sie viele biosynthetische Fähigkeiten von normalen Hepatozyten und sezernieren 17 der wichtigsten Plasmaproteine ins Zellkultur-Medium. Diese Zelllinie ist frei von Genen des Hepatitis B-Virus und exprimiert folgende Proteine:  $\alpha$ -Fetoprotein, Albumin,  $\alpha$ 2-Makroglobulin,  $\alpha$ 1-Antitrypsin, Transferrin,  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin, Haptoglobin, Caeruloplasmin, Plasminogen, Complement C3, C4, C3-Aktivator, Fibrinogen, saures  $\alpha$ 1-Glycoprotein,  $\alpha$ 2-HS-Glycoprotein, Lipoprotein, Retinol-bindendes Protein und Erythropoetin (Epo). Die Epo-mRNA scheint ähnlich groß zu sein wie die normaler fetaler Menschenleber (71). Die Regulation der Epo-Expression auf mRNA-Ebene stimmt mit *in vivo*-Experimenten überein (72;73). Trotz der großen Ähnlichkeit mit Hepatozyten muss man vorsichtig sein, wenn

man Vergleiche ziehen will zwischen der Genexpression einer Tumorzelle und einer normalen Hepatozyte (74).

Die Bildung von Epo in Hep3B- und HepG2-Zellen steigt mit wachsender Zelldichte an. Experimente von Goldberg et al. (1987) haben jedoch ergeben, dass HepG2-Zellen in sehr hohen Zelldichten von über  $3,3 \cdot 10^5$  Zellen weniger Epo exprimieren, wenn sie Hypoxie ausgesetzt werden, als unter normoxischen Bedingungen, obwohl bei geringeren Zelldichten Hypoxie als Stimulus für die Epo-Synthese fungiert (74). Deshalb wurden bei unseren Experimenten die Zellen in geringerer Zelldichte von zwischen 5 und  $10 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät.

Die Zellen wachsen adhaerent und epithel-ähnlich als Monolayer-Kultur.

Der Vorteil der Zelllinie für die beschriebenen Experimente liegt in der durch Hypoxie induzierbaren Epo-Expression (74). Die Zellen wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig) bezogen.

## **2.2 Kultivierung von HepG2-Zellen**

Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium (Gibco) mit 10% NKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert, welches alle 2-3 Tage gewechselt wurde. Die Umgebungsluft im Brutschrank hatte eine Temperatur von 37°C und beinhaltete zusätzlich 5% Kohlenstoffdioxid, 21% Sauerstoff und 95% Luftfeuchtigkeit.

Spätestens wenn die Zellen in ihrer Zellkulturschale konfluent gewachsen waren, wurden sie unter Verdünnung 1:4 in ein neues Kulturgefäß überführt („passagiert“). Die ausgesäte Zelldichte entsprach  $5,5 - 9,5 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> für Kulturschalen mit einem Durchmesser von 5 bis 15 cm. Die Zellen wurden nur bis zur 20. Passage verwendet, weil HepG2-Zellen nach einer Vielzahl von Passagen ihre Fähigkeit zur effizienten Epo-Expression verlieren (75;76).

### **2.2.1 Passagieren der Zellen mit Trypsin/ EDTA**

Da es sich bei HepG2-Zellen um eine sehr adhaerente Zelllinie handelt, wird zum Lösen der Zellen vom Boden der Kulturschalen Trypsin/ EDTA verwendet. Um die im verwendeten NKS enthaltenen Trypsininhibitoren zu entfernen, wurde der Zellrasen der Monolayerkultur nach Absaugen des Mediums zunächst mit PBS gespült. Nach der Zugabe von Trypsin/ EDTA in einem Verhältnis von 0,05%/ 0,02% in PBS und gleichmäßiger Verteilung auf dem Zellrasen, wurden die Zellen 6 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen durch einfaches Schlagen an die Seite der Kulturflasche vom Boden gelöst, und das Trypsin durch Zugabe von serumhaltigem Medium inaktiviert. Nun wurden die Zellen mit Hilfe einer Pipette der Zellkulturflasche entnommen und durch eine Kanüle resuspendiert, um noch aneinander haftende Zellen voneinander zu trennen. Die Zellzahl wurde mittels Zählkammer nach Neubauer bestimmt, und die Zellen wurden in gewünschter Dichte ausgesät ( $5,5- 9,5 \cdot 10^4$  Zellen/  $\text{cm}^2$ ) (siehe oben). Spätestens 2 Tage nach dem Passagieren der Zellen werde das Medium der Zellen gewechselt.

### **2.2.2 Kryokonservierung und Revitalisierung der Zellen**

Zur Kryokonservierung wurden konfluent wachsende Zellen abtrypsiniert. Nach Zugabe von 10 ml Einfriermedium A aus RPMI mit 40% NKS wurden die vom Boden der Zellkulturflasche abgelösten Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 Minuten bei  $200 \times g$  zentrifugiert. Währenddessen wurden Kryoröhrchen zum Einfrieren bereitgestellt, die mit 0,5 ml Einfriermedium B aus RPMI mit 20% DMSO gefüllt auf Eis gelagert wurden, um die schädigende Wirkung des DMSO auf die Zellen einzugrenzen. Der Überstand in den Zentrifugenröhrchen wurde bis auf 0,5 ml abgesaugt, der Rest mit einer Pipette resuspendiert und in die vorbereiteten Kryoröhrchen überführt. Diese wurden in einem geschlossenen Styroporbehälter bei  $-80^\circ\text{C}$ , einige Tage später in flüssigem Stickstoff bei etwa  $-196^\circ\text{C}$  eingefroren und auf unbestimmte Zeit gelagert.

Zum Revitalisieren der Zellen wurde erst ein Auftaumedium aus RPMI mit 20% NKS und Penicillin/ Streptomycin hergestellt. Die Zellsuspension in den Kryoröhrchen wurde bei 37°C aufgetaut und in Zentrifugenröhrchen mit 8 ml Auftaumedium überführt und resuspendiert. Nach zehnminütigem Zentrifugieren bei 200\*g, wurde der Überstand bis auf 1 ml abgesaugt und die Zellsuspension wiederum mit 10 ml Auftaumedium verdünnt, resuspendiert und nun in Zellkulturflaschen ausgesät.

### 2.2.3 Inkubation der Zellen mit dem SAH-Hydrolase-Hemmstoff Adenosin-2',3'-Dialdehyd

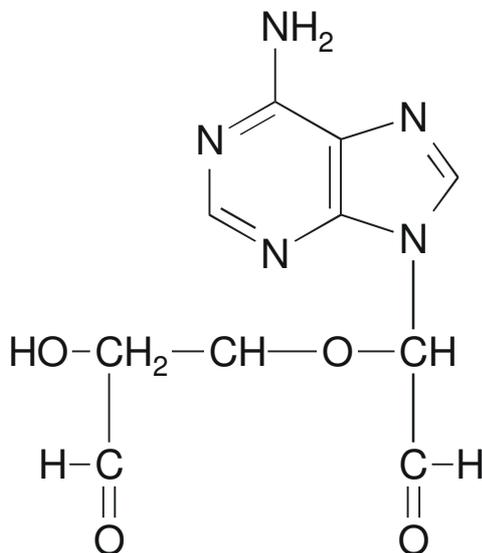


Abbildung 3: Strukturformel von Ado-2',3'-Dial

Zur Bestimmung der konzentrationsabhängigen Veränderung des MPs wurden die Zellen 24 Stunden mit dem SAH-Hydrolase-Hemmstoff Adenosin-2',3'-Dialdehyd (Ado-2',3'-Dial) in Konzentrationen von 1 bis 300 µM inkubiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Der Hemmstoff wurde mit RPMI und Penicillin/ Streptomycin ohne NKS jeweils in dem Verhältnis gemischt, so dass sich daraus die gewünschten Konzentrationen ergaben, und so auf die gewaschenen Zellrasen verteilt. Als Kontrolle wurden die Zellen lediglich in RPMI mit Antibiotika inkubiert.

Zur Bestimmung der zeitabhängigen Beeinflussung des MPs wurde gleichermaßen vorgegangen, wobei auf alle Zellen 24 h vor ihrem Abernten RPMI mit Penicillin/ Streptomycin ohne NKS aufgetragen und erst zu den Zeitpunkten 2, 4, 12 und 24 h vor dem Abernten der Zellen 30  $\mu\text{M}$  Ado-2',3'-Dial hinzugefügt wurde. Die Kontrollzellen wurden dabei einfach belassen.

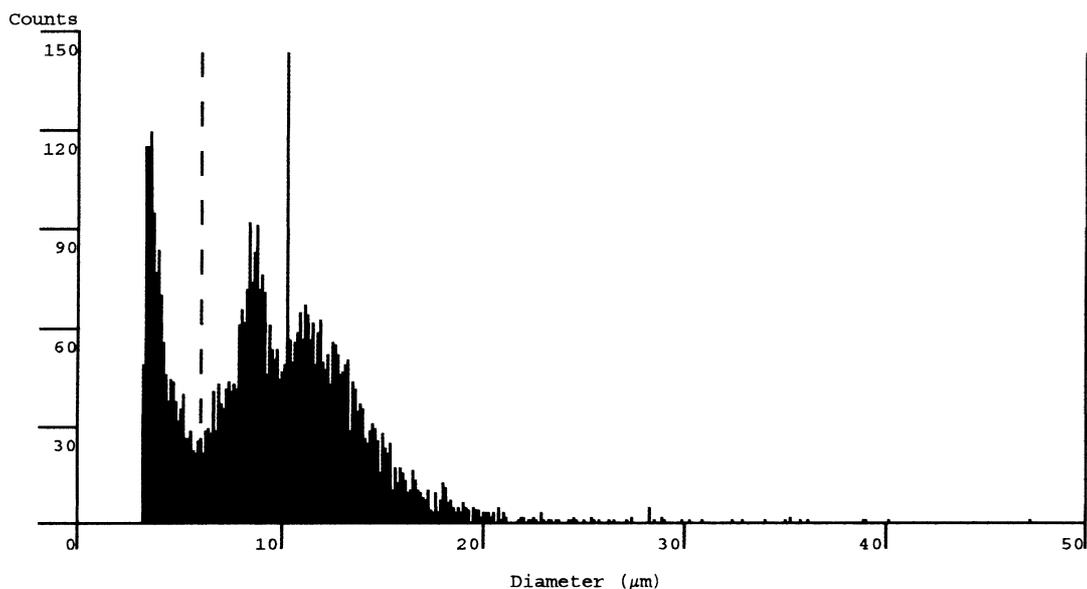
Die Inkubation mit Hemmstoff in serumfreiem Medium hat den Vorteil, dass so für die Experimente klar definierte Bedingungen geschaffen werden. Im NKS eventuell enthaltenen Komponenten könnten das Versuchsergebnis beeinträchtigen.

### **2.3 Bestimmung der Überlebensrate von HepG2-Zellen unter dem Einfluss von Adenosin-2',3'-Dialdehyd**

Um eine Aussage treffen zu können, ab welcher Dosis der SAH-Hydrolase-Hemmstoff Ado-2',3'-Dial toxisch auf HepG2-Zellen wirkt, wurde mithilfe des Zellzählgerätes „CASY Modell TT“ aus der „CASY-Technology“ von „Schärfe System“ sowohl die Anzahl der lebenden als auch die der toten Zellen in den mit unterschiedlichen Ado-2',3'-Dial-Konzentrationen behandelten Zellkulturen bestimmt. Hierzu wurden 100  $\mu\text{l}$  der mit Zellmedium auf 15 ml aufgefüllten Zellen aus einer Kulturschale mit 100 ml CASYton, einer speziell für die Zellzählung entwickelten isotonen Elektrolytlösung suspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Messpore definierter Geometrie gesaugt. Während der Messung wird über zwei Platinelektroden ein mit 1 MHz getaktetes Niederspannungsfeld an die Kapillarstrecke angelegt. Die elektrolytgefüllte Messpore stellt einen definierten elektrischen Widerstand dar. Beim Durchtritt durch die Messpore verdrängen die Zellen ein ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Da intakte Zellen in erster Näherung als Isolator betrachtet werden können, kommt es zu einer Widerstandserhöhung über die Kapillarstrecke. Diese Widerstandsänderung ist Maß für das Volumen der Zellen. Tote Zellen, bei denen die Zellmembran keine elektrische Barriere mehr darstellt, werden hingegen mit der Größe ihres Zellkerns erfasst, wodurch sie leicht von den vitalen Zellen zu unterscheiden

sind (Gebrauchsanweisung für CASY Model TT). So können gleichzeitig Zelltrümmer, tote Zellen und vitale Zellen quantifiziert werden.

Hierzu muss zunächst jedoch der Messbereich für die zu messende Zelllinie festgelegt werden, weil jede Zelllinie charakteristische Größenverteilungen aufweist. Dafür misst man eine Mischung aus vitalen und toten Zellen der Zelllinie (zur Herstellung die toten Zellen wurden zuvor 100  $\mu$ l Zellen mit 400  $\mu$ l Ethanol für 15 min inkubiert) und legt dann den linken (gestrichelten) Normierungscursor an die tiefsten Stelle der Größenverteilung zwischen toten Zellen und Zelldrebris, sowie den linken (durchgezogenen) Auswertecursor an die tiefste Stelle zwischen toten und vitalen Zellen. Bei HepG2-Zellen liegt der linke Normierungscursor bei 6  $\mu$ m, der linke Auswertecursor bei 10,25  $\mu$ m (Abb.4).



*Abbildung 4: Größenverteilung der HepG2-Zelllinie.*

*Messung der Größenverteilung einer Mischung aus vitalen und toten HepG2-Zellen. Links vom gestrichelt dargestellten Normierungscursor ist der Zelldebris-Peak zu erkennen. Zwischen dem linken Normierungscursor und dem durchgezogen dargestellten Auswertecursor befindet sich der Peak der toten Zellen. Rechts von diesem beginnt der Peak der vitalen Zellen.*

Voraussetzung für die Messung ist, dass die Zellen die Messpore einzeln passieren. Um dies zu gewährleisten wurden die Zellen vor der Messung durch eine feine Kanüle suspendiert. Die Überlebensrate entspricht dem Anteil lebender Zellen an der Gesamtzellzahl.

#### **2.4 Bestimmung von SAM, SAH und Adenosin mittels HPLC**

Zur Bestimmung von SAM, SAH und Adenosin wurden die Zellen abtrypsinisiert und in 15 ml Medium resuspendiert. Ein 100 µl Aliquot dieser Zellsuspension wurde für die Zellzahlbestimmung entnommen. Durch Zentrifugation bei 200\*g für 10 min wurden die Zellen sedimentiert und das Pellet noch einmal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1,2 ml 0,6 M Perchlorsäure wurden die Zellen durch Ultraschall aufgebrochen. Das ausgefallene Protein sowie Zellmaterial wurden durch 10 min Zentrifugation bei 20000\*g pelletiert. 1 ml des Überstandes wurde mit 10 µl Methyladenosin als internen Standard versetzt und mit 2 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/ 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf pH 5,5 – 6,0 titriert. Zur Kalibrierung wurde ein Standard aus SAH, SAM, Adenosin und Methyladenosin in Perchlorsäure hergestellt. Dazu wurde von allen Substanzen eine 1 mM Lösung in 20 mM Tris/HCl (pH 7,0) hergestellt und in 0,6 M Perchlorsäure 1:1000 verdünnt.

*Tabelle 2: Einwaage der Substanzen zur Herstellung des Standards für die HPLC*

<b>Substanz</b>	<b>Einwaage/ 10 ml</b>	<b>Konzentration</b>
<b>SAM</b> (-20 °C, Sigma) nur 70% rein, daher +30%	0,0043 g 0,0056 g	1 mM
<b>SAH</b>	0,0038 g	1 mM
<b>Adenosin</b>	0,0027 g	1 mM
<b>Methyladenosin</b>	0,0028 g	1 mM

Dieser Standard wurde ebenfalls mit Kaliumcarbonat und Kaliumphosphat auf pH 5,5- 6,0 titriert.

Nach der Titration wurde der Zellextrakt und der Standard durch erneute Zentrifugation vom ausgefallenen Perchlorat getrennt.

Im darauf folgenden Schritt wurde der Zellextrakt mittels Festphasenextraktion über Phenylboronatsäulen (BondElut, ICT) aufgereinigt und konzentriert: Die Säulen wurden mit Salzsäure (0,1 M) gespült, mit Ameisensäure (0,1 M) solvatiert und mit Tris-HCl/ MeOH (0,02 M) vorequibriert, bevor man nun je 1 ml Zellextrakt über die Säule laufen ließ. Bei diesem Vorgang banden Metabolite mit cis-ständigen OH-Gruppen an die Oberfläche der Phenylboronatsäulen. Nach einem Waschgang mit Citratpuffer (10 mM, pH 8) wurden die Metabolite wieder mittels 500 µl Salzsäure (0,1 M) aus den Säulen eluiert. Diese Proben wurden nun mittels HPLC aufgetrennt und analysiert. Die HPLC-Analyse wurde wie bei Delabar et al. (1999) beschrieben durchgeführt (77).

*Tabelle 3: Zusammensetzung der Laufmittel für die HPLC-Analyse*

<b>Lösung</b>	<b>Komponenten</b>	<b>Menge</b>	<b>Konzentration</b>
<b>Laufmittel A (LMA)</b>	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,15 g/ l	10 mM
	Heptansulfonat	0,132 g/ l	0,6 mM
	Methanol gradient grade	30 ml/ l	3%
<b>Laufmittel B (LMB)</b>	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,575/ 500 ml	10 µM
	Heptansulfonat	0,066 g/ 500 ml	0,6 mM
	Methanol gradient grade	15 ml/ 500 ml	3%
	Acetonitril	50 ml/ 500 ml	10%

Gemessen wurden die Metabolite Adenosin, S-Adenosylhomocystein, S-Adenosylmethionin und der interne Standard Methyladenosin. Mit Hilfe der so gewonnenen Werte von SAM und SAH wurde dann das Methylierungspotential (MP = SAM / SAH) errechnet.

Tabelle 4: Zusammensetzung von für die HPLC verwendeten Lösungen

Lösungen	Komponenten	Mengen pro Liter	Konzentration
PBS pH 7,2 (Gibco) pH mit NaOH eingestellt	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,21 g	1,54 mM
	NaCl	9,00 g	154 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	0,48 g	2,7 mM
Perchlorsäure	Perchlorsäure 70	26 ml	0,6 M
	%	468 ml	
	Bidest		
Kaliumcarbonat pH 9,5	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		2 M
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		1 M

## 2.5 Quantitative Expressionsanalyse mittels Light-Cycler-PCR

### 2.5.1 RNA-Isolation (Methode nach Chomczynski und Sacchi, 1987)

Zur RNA-Isolation wurden nicht konfluent gewachsene Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit je 1 ml RNA pure (peqLab) lysiert und die gesamte Suspension in 2-ml-Eppis überführt, dort noch einmal resuspendiert, gevortext und mindestens zehn Minuten, jedoch nicht länger als eine Stunde, bei RT inkubiert. Nach Zugabe von je 200 µl Chloroform wurden die Proben wiederum gevortext und nun fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch 15 min Zentrifugation bei 20 000 x g bilden sich drei Phasen, von denen die obere wässrige Phase die RNA enthielt. Diese Phase wurde abgehoben und in neue 1,5-ml-Eppis überführt. Durch Zugabe von einem Vol 100%igem Isopropanol, 15 min Inkubation und anschließend 15 min Zentrifugation bei 20 000 \*g wurde die RNA gefällt, der flüssige Überstand verworfen und das verbliebene RNA-Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Zuletzt ließ man das Pellet an der Luft trocknen und löste es mit 60 µl RNase-freiem Wasser.

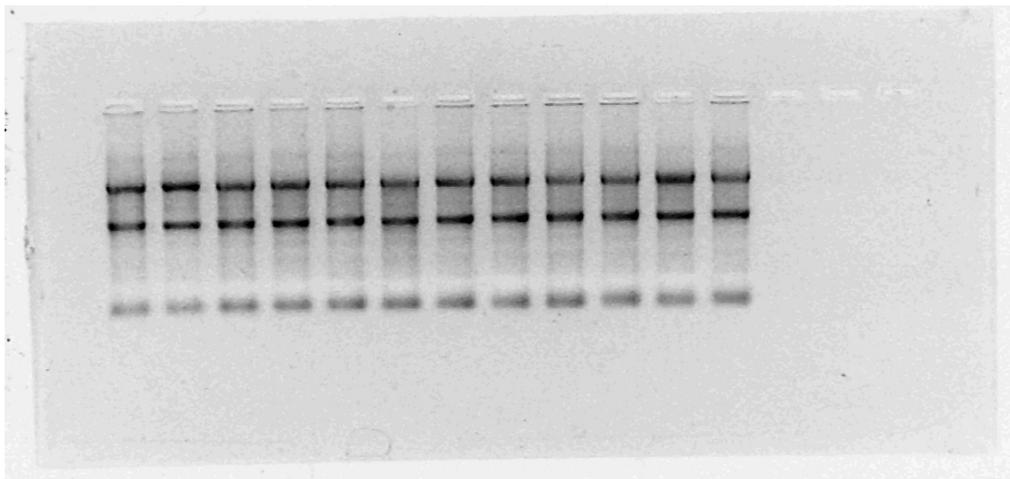
Zum Schutz vor der Einwirkung von eventueller Verunreinigung durch RNAsen wurden die RNA-Proben grundsätzlich bei –80°C gelagert und für die Versuche immer nur möglichst kurz auf Eis aufgetaut.

## 2.5.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde bei 260 nm photometrisch bestimmt. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein Extinktionswert von 1,0 einer Konzentration von 40 µg RNA/ ml (49).

Die Qualität der RNA wurde anschließend mit Hilfe der DNA-Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurden 3 µg RNA mit Loading-Dye versetzt und in einem 1,6%-Agarose-1\**TAE*-Gel in 1\**TAE*-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Nun wurde das Gel unter Einstrahlung von UV-Licht fotografiert (Abb.5).

Zur weiteren Bearbeitung wurden alle RNA-Proben mit DMPC-Wasser auf eine einheitliche Konzentration (200 oder 300 ng/µl) verdünnt.



*Abbildung 5: Gelelektrophorese zur Überprüfung der RNA-Qualität.*

*3 µg RNA wurden mit Loading-Dye versetzt und in einem 1,6%-Agarose-1\**TAE*-Gel in 1\**TAE*-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Nun wurde das Gel unter Einstrahlung von UV-Licht fotografiert.*

### **2.5.3 Reverse Transkription**

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde pro RNA-Probe ein Mix aus 11 µl DMPC-Wasser, 2 µl 10xPCR-Puffer, 2 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2µl dNTPs (10 mM), 1 µl RNase-Inhibitor, 0,5 µl Random-Primer, 0,5 µl Reverse Transkriptase und 1 µl der 300 ng/µl-konzentrierten RNA-Lösung hergestellt und nach 10 min Inkubation bei RT die Reverse Transkription bei 42°C für eine Stunde durchgeführt und zum Schluss durch 5 min Erhitzen auf 95°C abgestoppt.

Die so gewonnenen cDNA-Proben wurden bei –20°C gelagert.

### **2.5.4 Quantitative Expressionsanalyse mittels Lightcycler-PCR**

#### 2.5.4.1 Theoretischer Hintergrund zur real time PCR

Die real time PCR ist eine sehr sensitive Methode, welche den Nachweis von geringen mRNA-Mengen sowie kleiner Veränderungen in der Genexpression ermöglicht. Es gibt zwei Möglichkeiten, die Genexpression mittels RT-PCR zu quantifizieren: 1.) Eine relative Quantifizierung, bei der das gewünschte Gen mit einem Referenz-Gen verglichen wird, und 2.) eine absolute Quantifizierung angelehnt an eine interne oder eine externe Kalibrierungskurve. Bei der relativen Quantifizierung wird ein nicht reguliertes Gen, ein „Housekeeping“ Gen (Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase, Albumin, Actin, Tubulin, Cyclophilin, 18S rRNA, 28S rRNA), als Referenzgen gewonnen (78). „Housekeeping“ Gene werden in allen kernhaltigen Zellen exprimiert, weil sie für das Überleben einer Zelle unerlässlich sind. Die mRNA-Synthese dieser Gene soll selbst unter experimentellen Bedingungen konstant und in unterschiedlichen Zellenarten ähnlich hoch sein (79-81). Jedoch ist Vorsicht geboten, bei der Annahme, dass „Housekeeping“ Gene unter keinen experimentellen Bedingungen quantitativen Veränderungen unterworfen sind. Manche Autoren gehen davon aus, dass man für jedes experimentelle Vorhaben einen internen Standard sorgfältig auswählen muss (81). In den hier

durchgeführten Versuchen wurde das „Housekeeping“ Gen 18S rRNA als internen Standard zur relativen Quantifizierung verwendet.

Folgende Primer mit den für die Gene bekannten cDNA-Sequenzen wurden ausgewählt und von der Firma Interactiva in Ulm synthetisiert. Das Produkt wurde in allen Fällen für die Sequenzierung aufgereinigt und anhand der klassischen PCR durch MWG-Biotechnology sequenziert.

*Tabelle 5: Primersequenzen und Fragmentgröße der mittels real-time-PCR untersuchten Gene*

<b>Gen</b>	<b>Primersequenz (F: forward; R: reverse)</b>	<b>Fragmentgröße bp</b>
<b>Erythropoetin</b>	F: GCC AGA GGA ACT GTC CAG AG R: ATG GTA GGT GCG AAA ACA GG	206
<b>Cyclophilin</b>	F: GGG GAG AAA GGA TTT GGC TA R: ACA TGC TTG CCA TCC AGC C	256
<b>SAH-Hydrolase</b>	F: GGT ATC GGT TGA AGA ATG G R: GGT ACT TGT CTG GAT GGG TC	159
<b>VEGF-A</b>	F: GCA GAA TCA TCA CGA AGT GG R: GCA TGG TGA TGT TGG ACT CC	212
<b>18S rRNA</b>	F: CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA R: GCT GGA ATT ACC GCG GCT	187

#### 2.5.4.2 Durchführung der Expressionsanalyse mittels real time PCR

Aus je 12,6 µl DMPC-Wasser, 2,4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, jeweils 0,5 µl Primer sense und antisense (20 µM) für das jeweilige Gen und 2 µl Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) pro Probe wurde ein Mastermix hergestellt, der dann mit 2 µl der cDNA-Proben in feine Glaskapillaren eingefüllt wurde. Durch einminütige Zentrifugation wurde das Flüssigkeitsgemisch in den unteren Abschnitt der Kapillaren befördert. Das Light-Cycler-Programm lief folgendermaßen ab: Nach initialer Denaturierung für 10 min bei 95°C folgte die Amplifizierung und Quantifizierung der Gene: zunächst wurde die cDNA für 10

sec bei 95 °C denaturiert, dann wurde mittels „touch down-PCR“ bei 68 °C bis 58 °C in 0,5 °C-Schritten pro Durchgang für 10 sec das „Annealing“ durchgeführt.

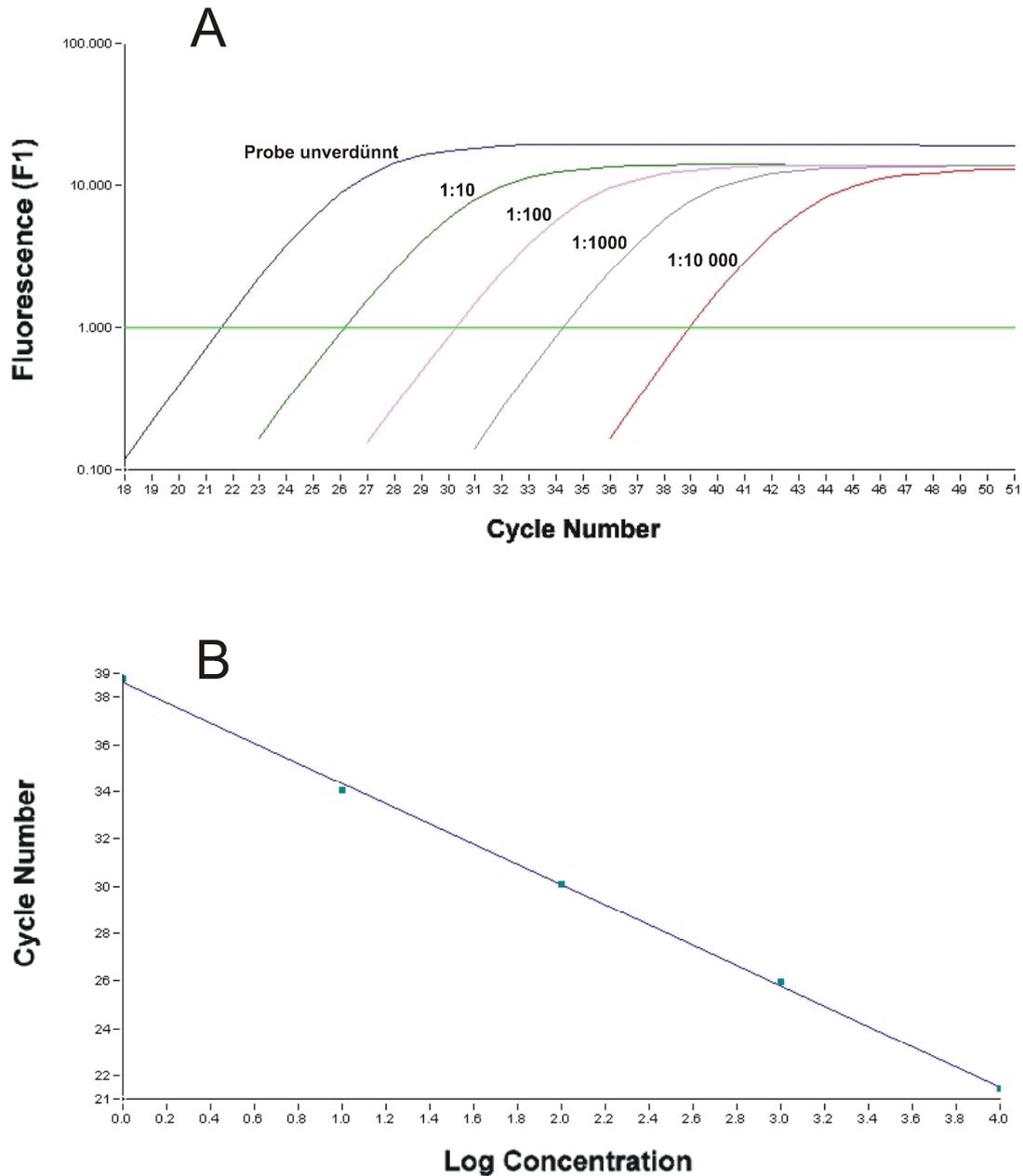


Abbildung 6: Relative Quantifizierung und Bestimmung der Effizienz.

A: Real-time-PCR SYBR® Green I Fluoreszenz einer seriell verdünnten Probe aufgetragen gegen die Zyklenzahl am Beispiel der SAH-Hydrolase. Der Ct-Wert ist der Zyklus, in dem die Fluoreszenz die parallel zur x-Achse verlaufende Gerade schneidet.

B: Auftragung der Ct-Werte der Verdünnungen gegen die relative Konzentration der Probe, zur Berechnung nach der Formel  $\text{Effizienz} = 10^{(-1/\text{Steigung})}$ .

Danach wurde der Synthese-Schritt für 16 sec bei 72°C mit einer Fluoreszenz- Messung vollzogen. Die Amplifizierung und Quantifizierung wurde 45-mal wiederholt. Anschließend erfolgte eine Schmelzkurve, wobei die cDNA unter kontinuierlicher Fluoreszenz-Messung von 65°C auf 95°C in 0,1°C/sec-Schritten erhitzt wurde. Danach wurden die Proben auf 37°C abgekühlt.

Die „Fit point method“ wurde nach der Light Cycler-Software 3.5.3 (Roche) ausgeführt.

#### 2.5.4.3 Berechnung des relativen Expressionsquotienten eines gefragten Genes

Für die relative Quantifizierung wurde eine mathematische Formel nach Pfaffl (2001) verwendet, die das gefragte Gen mit dem Referenz-Gen in Beziehung setzt (78). Der relative Expressionsquotient des gefragten Gens wurde aus der Amplifikationseffizienz und der Abweichung des Ct-Wertes einer unbekannt Probe von dem der Kontrolle ermittelt. Der Ct-Wert ist der Kreuzungspunkt, an dem die Fluoreszenz eines markierten, amplifizierten Gens nach einer zu bestimmenden Anzahl von Amplifikationsdurchgängen einen festgelegten, in der exponentiellen Phase liegenden Schwellenwert übersteigt.

Die Effizienz in einem Amplifikationsdurchgang wurde mittels der Steigung in der exponentiellen Phase der Eichkurve nach der Formel

$$\text{Effizienz} = 10^{(-1/\text{Steigung})}$$

ermittelt. Dazu wurde für jedes Gen eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 1/100, 1/10 und 1 angefertigt, anhand der die Regressionsgerade festgelegt wurde. Zur Berechnung der Steigung wurden die Ct-Werte gegen die relative cDNA-Menge aufgetragen.

$$\text{Induktionsfaktor} = E_{\text{Ziel}}^{\Delta Ct_{\text{Ziel}} (\text{Kontrolle} - \text{Probe})} / E_{\text{Referenz}}^{\Delta Ct_{\text{Referenz}} (\text{Kontrolle} - \text{Probe})}$$

Das entspricht bei „Housekeeping“ Genen der Formel

$$\text{Induktionsfaktor} = E_{\text{Ziel}}^{\Delta Ct_{\text{Ziel}} (\text{Kontrolle} - \text{Probe})} ,$$

weil die Voraussetzung für „Housekeeping“ Gene die Übereinstimmung der Ct-Werte von jeder unter experimentellen Bedingungen entstandenen Probe und der Kontrolle ist und folglich  $\Delta Ct = 0$  ist. Die so errechneten relativen cDNA-Mengen wurden nun so genormt, dass sich für einen der Kontrollwerte ein Induktionsfaktor von 1 ergab.

*Tabelle 6: Effizienz der untersuchten Gene*

Gen für:	Effizienz:
18S rRNA	1,85 ± 0,05
Erythropoetin	2,01 ± 0,08
VEGF-A	2,01 ± 0,08
Cyclophilin	2,08 ± 0,09
SAH-Hydrolase	1,82 ± 0,10

## **2.6 Quantitative Erythropoetin-Bestimmung**

Um das Epo-Protein zu bestimmen, welches die Zellen in das Kulturmedium abgeben, wurde von jeder Zellkultur 25 µl Medium entnommen, das bis zum Test bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und ohne Verdünnung verwendet wurde. Die abgegebene Epo-Menge wurde mittels eines monoklonalen Enzymimmunoassays (medac, Diagnostika) bestimmt.

## **2.7 Photometrische Bestimmung der SAH-Hydrolase-Enzymaktivität**

### **2.7.1 Aufbereitung der HepG2-Zellen**

Für die Bestimmung der SAH-Hydrolase-Aktivität wurden die Zellen mit Trypsin abgeerntet, abzentrifugiert ( $200 \times g$ , 10 min) und mit PBS gewaschen. Dann wurden sie in 200 µl Tris (20 mM, pH 7,2) resuspendiert und mit Ultraschall aufgebrochen. Danach wurde diese Zellsuspension in zwei Schritten zentrifugiert (10 min bei  $200 \times g$ , dann 20 min bei  $50000 \times g$ ), um den

proteinhaltigen Überstand vom festen Zellmaterial zu trennen. Die so gewonnenen Proben wurden bis zum Versuch bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay nach Bradford (82). Dazu wurden zunächst die proteinhaltigen Proben im Verhältnis 1:200 mit Aqua bidest verdünnt. Zu 100  $\mu\text{l}$  Proteinlösung wurden 900  $\mu\text{l}$  Protein Assay Farbstoff-Konzentrat von Bio-Rad gegeben, das zuvor mit Aqua bidest im Verhältnis 1:5 verdünnt wurde. Außerdem wurde zur Kalibrierung stets eine Konzentrationsreihe aus BSA (Rinderalbumin) hergestellt. Mittels der gemessenen Konzentration konnte nun die jeweilige Menge Protein in dem für den Versuch verwendeten Volumen von 15  $\mu\text{l}$  errechnet werden, die zur Berechnung der Enzymaktivität benötigt wurde.

### **2.7.3 Messung der SAH-Hydrolase-Aktivität**

Die Aktivität der SAH-Hydrolase wurde in Richtung der Hydrolyse bestimmt. Dabei wurde die gebildete Harnsäure bei 292 nm detektiert. Für die Aktivitätsmessung wurde zunächst ein „Nachweis-Kit“ hergestellt, der bis auf die SAH-Hydrolase alle nötigen Enzyme für den Reaktionsweg von S-Adenosylhomocystein zu Harnsäure (Abb.4) enthielt: 1,2 U/ml Adenosindesaminase, 0,06 U/ml Nucleosidphosphorylase und 0,1 U/ml Xanthinoxidase in 50 mM KPP. Außerdem wurde eine 1 mM S-Adenosylhomocystein-Lösung in 50 mM KPP hergestellt. Nach einem Kontrolllauf mit Aqua bidest und einem mit aufgereinigter SAH-Hydrolase von Rind wurden die Proben folgendermaßen gemessen: 15  $\mu\text{l}$  Zellhomogenat mit einem Proteingehalt von etwa 10-20  $\mu\text{g}$  und 460  $\mu\text{l}$  Nachweis-Kit wurden gemischt und in eine Küvette ins Photometer gestellt. Das gleiche Mischungsverhältnis wurde als Vergleichswert in eine zweiten Küvette ins Photometer gestellt. Nach der Kalibrierung wurde die Reaktion durch Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  der 1 mM SAH-Lösung in die Proteinküvette gestartet. Die Messung der Extinktionsänderung erfolgte bei 292 nm sechs Minuten lang.

### Reaktionsweg:

**SAH**



*SAH-Hydrolase*

**Adenosin + Homocystein**



*Adenosindesaminase*

**Inosin**



*Nucleosid-Phosphorylase*

**Hypoxanthin**



*Xanthin-Oxidase*

**Harnsäure**

*Abbildung 7: Reaktionsweg des SAH-Abbaus zur Bestimmung der SAH-Hydrolase-Aktivität*

Mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes wurde dann aus der Extinktionsänderung die Konzentration der entstandenen Harnsäure ermittelt:

$$\Delta E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

$\epsilon$ : Extinktionskoeffizient;  $\epsilon_{\text{Harnsäure}} = 12,6 \cdot \text{cm}^2/\mu\text{mol}$

$c$ : Konzentration, in diesem Fall der Harnsäure

$d$ : Schichtdicke, in diesem Fall 1 cm

$$\Leftrightarrow \Delta E = 12,6 \text{ cm}^2/\mu\text{mol} \cdot 1 \text{ cm} \cdot c_{\text{Harnsäure}}$$

$$\Leftrightarrow c_{\text{Harnsäure}} = \Delta E / 12,6 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$$

Mit Hilfe der so ermittelten Konzentration der Harnsäure und der zuvor gemessenen Proteinkonzentration in der jeweiligen Probe konnte mit folgender Formel die Aktivität der SAH-Hydrolase errechnet werden:

$$\text{Aktivität (U)} = \text{Konzentrationsänderung} / \text{Proteinmenge} (\mu\text{mol} / \text{min} \cdot \text{mg})$$

## 2.8 Bestimmung der Adeninnukleotide im sauren Überstand mittels HPLC

Die intrazellulären Konzentrationen der Adeninnukleotide AMP (Adenosinmonophosphat), ADP (Adenosindiphosphat) und ATP (Adenosintriphosphat) wurden aus dem perchlorsauren Zellsuspensionsüberstand bestimmt. Nach dem Aufbrechen der Zellen durch Ultraschall wurde der saure Überstand abgehoben und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Messung wurden je  $200\ \mu\text{l}$  dieses Überstandes mit  $110\ \mu\text{l}$   $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{KH}_2\text{PO}_4$  versehen, gevortext und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Danach wurden die Proben 5 min bei  $20000 \times g$  abzentrifugiert und der Überstand mittels HPLC gemessen.

Zur Messung wurde stets ein interner Standard hergestellt, in dem jede Substanz in 1 mM in 6,6 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  gelöst wurde. Die jeweiligen Mengen zu Herstellen von 1 mM Lösungen sind in Tab. 7 angegeben.

*Tabelle 7: Einwaage der Substanzen zur Herstellung des Standards für die Adeninnukleotidbestimmung mittels HPLC*

<b>Substanz</b>	<b>Einwaage/ 10 ml</b>	<b>Konzentration</b>
AMP ( $4^{\circ}\text{C}$ )	5 mg	1 mM
ADP ( $20^{\circ}\text{C}$ )	5 mg	1 mM
ATP ( $4^{\circ}\text{C}$ )	6 mg	1 mM

Die Standards wurden mit 0,6 N Perchlorsäure auf eine Konzentration von  $25\ \mu\text{M}$  verdünnt und ebenfalls mit  $110\ \mu\text{l}$   $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{KH}_2\text{PO}_4$  titriert, gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie 5 min bei  $20000 \times g$  abzentrifugiert und der Überstand gemessen.

Die Analyse der Adeninnukleotide erfolgte mittels HPLC. Dafür wurde eine Grom-Sil 120 ODS-3 CP-Säule ( $5\ \mu\text{m}$ ,  $125 \times 4\ \text{mm}$  i.d.; Sykam, München, Germany) und ein UV-Detektor (UVIS 200; Sykam) verwendet. Detektiert wurden die Adeninnukleotide bei einer Wellenlänge von 254 nm. Die Säule wurde bei  $30^{\circ}\text{C}$  mit einer Durchflussrate von 1 ml/min und einem niedrigen Druckgradienten durchgespült.

Die Messung wurde wie bei Hambrock et al. (1999) beschrieben durchgeführt (83).

Tabelle 8: Zusammensetzung der Laufmittel für die Adeninnukleotidbestimmung mittels HPLC

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

Die Energieladung der Zelle (*energy charge, EC*) konnte nun entsprechend der Definition nach Atkinson und Walton (84) berechnet werden:

$$(\text{ATP} + \frac{1}{2} \text{ADP}) : (\text{AMP} + \text{ADP} + \text{ATP})$$

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

## 2.9 Statistik

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Computerprogramm Instat. Dabei wurden die Abweichungen in den Dateisätzen mittels statistischer Tests (t-Test für unverbundene Stichproben) auf ihre Signifikanz hin überprüft (\* =>  $p < 0,05$ ; \*\* =>  $p < 0,01$ ; \*\*\* =>  $p < 0,001$ ). Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Bestimmung der SAM- und SAH-Konzentrationen**

##### **3.1.1 Veränderung des Methylierungspotentials in Abhängigkeit von der Adenosin-2',3'-Dialdehyd-Konzentration**

*Tabelle 9: SAM, SAH, Adenosin und MP angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM aus 5 –10 Versuchen in Abhängigkeit von der Adenosin-2',3'-Konzentration: Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 24 h mit dem Hemmstoff in der angegebenen Konzentration inkubiert, abtrypsiniert und wie in „Material und Methoden“ beschrieben durch Ultraschall aufgebrochen und behandelt. Die HPLC-Analyse wurde wie bei Delabar et al. (1999) beschrieben durchgeführt. (\*  $\Rightarrow p < 0,05$ ; \*\*  $\Rightarrow p < 0,01$ ; \*\*\*  $\Rightarrow p < 0,001$ )*

<b>Ado-2',3'-Dial-Konzentration</b>	<b>SAM</b> nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	<b>SAH</b> nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	<b>Adenosin</b> nmol/10 <sup>7</sup> Zellen	<b>SAM/SAH</b>
<b>Kontrolle</b>	1,8 $\pm$ 0,2	0,04 $\pm$ 0,003	0,05 $\pm$ 0,01	57,6 $\pm$ 7,4
<b>1 <math>\mu</math>M</b>	2,6 $\pm$ 0,6	0,4 $\pm$ 0,1 *	0,07 $\pm$ 0,02	7,7 $\pm$ 1,3 ***
<b>3 <math>\mu</math>M</b>	3,4 $\pm$ 0,5 *	1,2 $\pm$ 0,3 ***	0,06 $\pm$ 0,02	3 $\pm$ 0,3 ***
<b>10 <math>\mu</math>M</b>	3 $\pm$ 0,2 **	1,7 $\pm$ 0,2 ***	0,11 $\pm$ 0,07	1,8 $\pm$ 0,2 ***
<b>30 <math>\mu</math>M</b>	3,5 $\pm$ 0,4 *	2,8 $\pm$ 0,3 ***	0,05 $\pm$ 0,02	1,2 $\pm$ 0,02 ***
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	3,1 $\pm$ 1,1	1,7 $\pm$ 0,2 ***	0,2 $\pm$ 0,08	1,8 $\pm$ 0,3 ***
<b>300 <math>\mu</math>M</b>	4,4 $\pm$ 1,2 ***	0,8 $\pm$ 0,05 ***	0,12 $\pm$ 0,06	5,9 $\pm$ 0,6 ***

Unter Kontrollbedingungen beträgt die SAM-Konzentration 1,8  $\pm$  0,2 nmol/ 10<sup>7</sup> Zellen, die von SAH hingegen nur 0,04  $\pm$  0,003. Daraus ergibt sich ein MP von über 57,6  $\pm$  7,4. Schon ab einer Ado-2',3'-Dial-Konzentration von 1  $\mu$ M steigt die SAH-Konzentration signifikant auf das zehnfache des unter Kontrollbedingungen typischen Wertes an. Die SAM-Konzentration wird dadurch nicht verändert. Daher sinkt das MP schon bei 1  $\mu$ M Ado-2',3'-Dial auf 7,7 ab. Bis zu einer Ado-2',3'-Dial-Konzentration von 30  $\mu$ M steigt die SAH-Konzentration auf 2,8 nmol/ 10<sup>7</sup> Zellen. Die SAM-Werte liegen zwischen 3 bis 3,5 nmol/ 10<sup>7</sup> Zellen und sind signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle. Dementsprechend fällt auch das MP auf 1,2  $\pm$  0,02.

Ab einer Ado-2',3'-Dial-Konzentration von 100 µM fällt die SAH-Konzentration wieder auf  $1,7 \pm 0,2$  nmol und bei 300 µM sogar auf 0,8 nmol, SAM bleibt zunächst etwa konstant mit  $3,1 \pm 1,1$  nmol bei 100 µM Ado-2',3'-Dial und steigt dann bei 300 µM Ado-2',3'-Dial an auf  $4,4 \pm 1,2$  nmol/  $10^7$  Zellen. Sowohl SAH als auch SAM sind nach wie vor signifikant erhöht gegenüber den Kontrollen. Das MP beträgt unter diesen Bedingungen  $1,8 \pm 0,3$  bei 100 µM, bzw.  $5,9 \pm 0,6$  bei 300 µM.

Die intrazelluläre Adenosinkonzentration zeigt bei Behandlung mit Ado-2',3'-Dial keine signifikanten Veränderungen.

### 3.1.2 Veränderung des Methylierungspotentials in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit dem Hemmstoff

Da bei einer Ado-2',3'-Dial-Konzentration von 30 µM das MP am stärksten reduziert war, wurde diese Konzentration zur Bestimmung der Abhängigkeit des MP von der Inkubationsdauer verwendet.

*Tabelle 10: SAM, SAH, Adenosin und MP angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM aus 4 –9 Versuchen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit Ado-2',3'-Dial: Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit einer Hemmstoffkonzentration von 30 µM inkubiert, abtrypsiniert und, wie in „Material und Methoden“ beschrieben, aufgearbeitet. Die HPLC-Analyse wurde wie bei Delabar et al. (1999) beschrieben durchgeführt. (\* =>  $p < 0,05$ ; \*\* =>  $p < 0,01$ ; \*\*\* =>  $p < 0,001$ )*

Inkubationsdauer	SAM nmol/ $10^7$ Zellen	SAH nmol/ $10^7$ Zellen	Adenosin nmol/ $10^7$ Zellen	SAM/ SAH nmol/ $10^7$ Zellen
<b>Kontrolle</b>	$1,8 \pm 0,15$	$0,04 \pm 0,03$	$0,046 \pm 0,01$	$57,6 \pm 7,4$
<b>½ h</b>	$2,7 \pm 0,4$	$1,1 \pm 0,16$ ***	$0,05 \pm 0,01$	$2,5 \pm 0,1$ **
<b>2 h</b>	$2,6 \pm 0,2$ *	$1,7 \pm 0,08$ ***	$0,03 \pm 0,01$	$1,5 \pm 0,08$ **
<b>4 h</b>	$2,9 \pm 0,4$ *	$2,4 \pm 0,3$ ***	$0,03 \pm 0,01$	$1,2 \pm 0,06$ **
<b>24 h</b>	$3,5 \pm 0,35$ **	$2,8 \pm 0,3$ ***	$0,05 \pm 0,02$	$1,2 \pm 0,02$ **

Bereits eine halbe Stunde nach Inkubation der Zellen mit 30  $\mu\text{M}$  Ado-2',3'-Dial steigt die SAH-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle  $0,04 \pm 0,03 \text{ nmol}/10^7$  Zellen auf fast das 30-fache ( $1,1 \pm 0,16$ ) an. SAM steigt an, aber nicht signifikant an auf  $2,7 \pm 0,4 \text{ nmol}/10^7$  Zellen. Somit fällt das MP auf  $2,5 \pm 0,1$  ab. Eine Verlängerung der Inkubationszeit führt zu einer Steigerung der SAH-Konzentration auf  $1,7 \pm 0,08 \text{ nmol}/10^7$  Zellen nach 2 h, auf  $2,4 \pm 0,3 \text{ nmol}/10^7$  Zellen nach 4 h und auf  $2,8 \pm 0,3 \text{ nmol}/10^7$  Zellen nach 24 h. Die SAM-Konzentration ist erst nach 24 h mit  $3,5 \pm 0,35 \text{ nmol}/10^7$  Zellen gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Daraus ergibt sich nach 2 h ein MP von  $1,5 \pm 0,08$ , nach 4 h von nur noch  $1,2 \pm 0,06$ , nach 24 h  $1,2 \pm 0,02$ .

Die Adenosin-Konzentration liegt bei der zeitlichen Abhängigkeit zwischen  $0,03$  und  $0,06 \text{ nmol}/10^7$  Zellen, unterliegt jedoch auch hier keiner signifikanten Veränderung.

### **3.2 Auswirkungen von Ado-2',3'-Dial auf den Adeninnukleotidhaushalt der Zelle**

*Tabelle 11: AMP, ADP, ATP und EC angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM aus 4-28 Versuchen in Abhängigkeit von der Adenosin-2',3'-Konzentration: Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 24 h mit dem Hemmstoff in der angegebenen Konzentration inkubiert, abtrypsiniert und wie in „Material und Methoden“ beschrieben durch Ultraschall aufgebrochen und behandelt. Die HPLC-Analyse wurde, wie bei Hambrock et al. (1999) beschrieben, durchgeführt. (\*  $\Rightarrow p < 0,05$ ; \*\*  $\Rightarrow p < 0,01$ ; \*\*\*  $\Rightarrow p < 0,001$ )*

<b>Ado-2',3'-Dial-Konzentration</b>	<b>AMP</b> nmol/ $10^7$ Zellen	<b>ADP</b> nmol/ $10^7$ Zellen	<b>ATP</b> nmol/ $10^7$ Zellen	<b>EC-Wert</b>
<b>Kontrolle</b>	$3,4 \pm 0,2$	$11,55 \pm 0,8$	$26,3 \pm 1,1$	$0,8 \pm 0,01$
<b>1 <math>\mu\text{M}</math></b>	$5,5 \pm 0,15$ ***	$17,7 \pm 2$ **	$25,05 \pm 3,4$	$0,7 \pm 0,01$ **
<b>3 <math>\mu\text{M}</math></b>	$5 \pm 0,3$ **	$16,7 \pm 1,7$ *	$24,45 \pm 2,9$	$0,7 \pm 0,01$ *
<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	$4,5 \pm 0,3$ **	$12,25 \pm 0,8$	$27,65 \pm 1,7$	$0,8 \pm 0,01$
<b>30 <math>\mu\text{M}</math></b>	$4,5 \pm 0,45$ *	$15,8 \pm 1,4$ **	$25,4 \pm 1,9$	$0,7 \pm 0,01$ *
<b>100 <math>\mu\text{M}</math></b>	$2,95 \pm 0,6$	$13,35 \pm 1,3$	$30,45 \pm 3,2$	$0,8 \pm 0,02$
<b>300 <math>\mu\text{M}</math></b>	$0,9 \pm 0,3$ ***	$9,4 \pm 0,95$	$20,6 \pm 2$	$0,8 \pm 0,02$

Bei der Kontrolle wurde für AMP ein Wert von  $3,4 \pm 0,2$  nmol/ $10^7$ Zellen, für ADP  $11,55 \pm 0,8$  nmol/ $10^7$ Zellen, für ATP  $26,3 \pm 1,1$  nmol/ $10^7$ Zellen und für den EC ein Wert von  $0,8 \pm 0,01$  gemessen. Bereits bei  $1 \mu\text{M}$  Ado-2',3'-Dial steigen AMP und ADP signifikant auf Werte von  $5,5 \pm 0,15$  nmol/ $10^7$ Zellen bzw.  $17,7 \pm 2$  nmol/ $10^7$ Zellen an. Auch bei steigender Ado-2',3'-Dial-Konzentration bis  $30 \mu\text{M}$  bleiben die beiden Adeninnukleotide AMP und ADP in den oben erwähnten Konzentrationsbereichen. Erst bei einer Ado-2',3'-Dial-Konzentration von  $300 \mu\text{M}$  kommt es zu einem signifikanten Abfall aller drei Adeninnukleotide.

Die ATP-Konzentration verändert sich bei den untersuchten Ado-2',3'-Dial-Konzentrationen nicht signifikant. Die Energieladung der Zelle (EC-Wert) ist nur bei niedrigen Ado-2',3'-Dial-Konzentrationen von  $1$  und  $3 \mu\text{M}$  signifikant verändert.

### 3.3 Überlebensrate der HepG2-Zellen nach Adenosin-2',3'-Dialdehyd-Behandlung

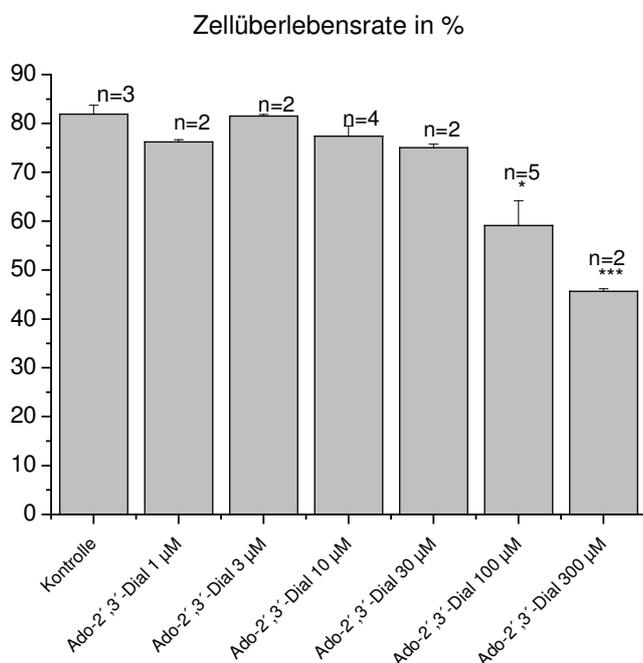


Abbildung 8: Überlebensrate der HepG2-Zellen in % unter steigender Konzentration von Adenosin-2',3'-Dialdehyd: Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 24 h mit dem Hemmstoff in angegebener Konzentration inkubiert, abtrypsiniert und mithilfe des Zellzählgeräts „CASY Modell TT“ ausgezählt (Anzahl n=2-5).

Unter Kontrollbedingungen beträgt der Anteil der vitalen Zellen an der Gesamtzellzahl 82%. Die Applikation des Hemmstoffs Ado-2',3'-Dial hat bis zu einer Konzentration von 30 µM keinen messbaren Einfluss auf die Vitalität der HepG2-Zellen. Der Anteil der vitalen Zellen an der Gesamtzellzahl beträgt in den Ado-2',3'-Dial-Konzentrationsbereichen zwischen 1 µM und 30 µM Werte zwischen 75% (bei 30 µM Ado-2',3'-Dial) und 81,5% (bei 3 µM Ado-2',3'-Dial). Im „student-t-test“ ergibt sich daraus keine signifikante Veränderung.

Erst ab einer Konzentration von 100 µM Ado-2',3'-Dial nimmt der Anteil vitaler Zellen gemessen an der Gesamtzellzahl in signifikantem Maße ab. Der Prozentsatz vitaler Zellen sinkt bei 100 µM auf 59% und bei 300 µM Ado-2',3'-

Dial auf 45,6%. Im Vergleich mit der Kontrolle bedeutet das eine signifikante Reduktion der Zahl vitaler Zellen.

Aus diesem Grund wurden alle Versuche mit einer Ado-2',3'-Dial-Konzentration von 30  $\mu$ M durchgeführt.

### **3.4 Einfluss des Methylierungspotentials auf die Expressions ausgewählter Gene**

Die Expression schnell einschaltbarer Gene wie Epo und VEGF-A sowie von Haushaltsgenen wie Cyclophilin und SAH-Hydrolase wurde unter dem Einfluss des SAH-Hydrolase- Hemmstoffs Ado-2',3'-Dial mittels real-time-PCR untersucht. Als interner Standard wurde dabei die Expression von 18S rRNA verwendet.

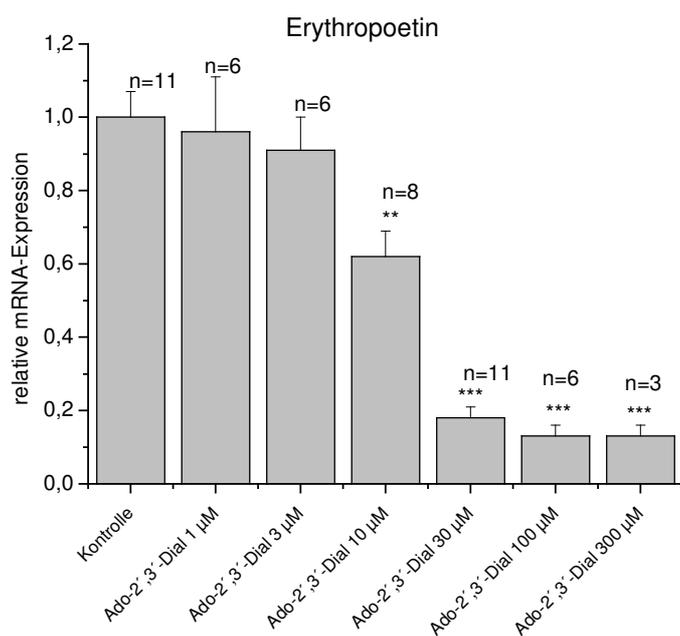


Abbildung 9: mRNA-Expression des Erythropoetin-Gens in Abhängigkeit von der Adenosin-2',3'-Dialdehyd-Konzentration. Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 24 h mit der angegebenen Hemmstoff-Konzentration inkubiert, ihre RNA nach der Methode von Chomcznski und Sacchi (1987) isoliert, zu cDNA transkribiert und diese mittels Lightcycler-PCR quantifiziert.

Die Expression der Epo-mRNA wird durch Ado-2',3'-Dial bis zu einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  nicht signifikant verändert. Ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  sinkt die Epo-Expression signifikant mit steigender Ado-2',3'-Dial-Konzentration. Bei einer Ado-2',3'-Dial-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  beträgt die Epo-Expression noch 62% des Kontrollwertes. Bei 30  $\mu\text{M}$  sinkt die Expression auf 0,2. Eine weitere Erhöhung der Ado-2',3'-Dial-Konzentration auf 100  $\mu\text{M}$  führt zu keiner weiteren Reduktion der Epo-mRNA-Expression.

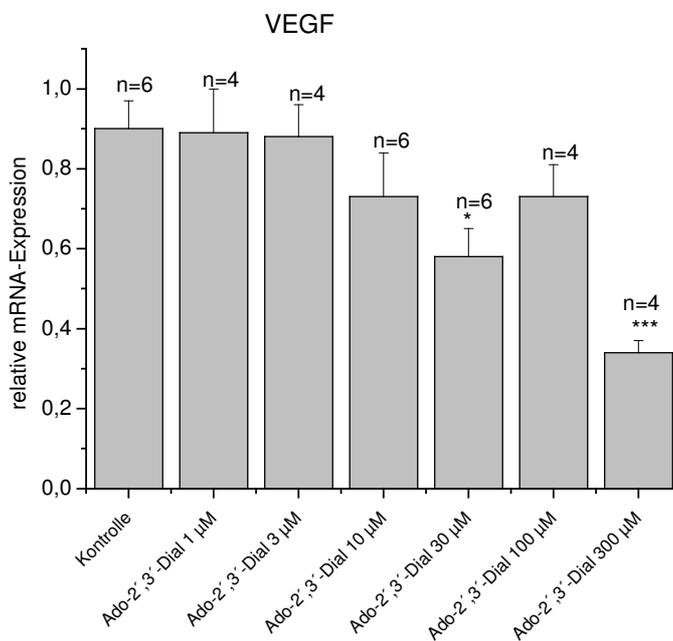


Abbildung 10: mRNA-Expression des VEGF-A-Gens in Abhängigkeit von der Adenosin-2',3'-Dialdehyd-Konzentration. Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 24 h mit der angegebenen Hemmstoff-Konzentration inkubiert, ihre RNA nach der Methode von Chomcznski und Sacchi (1987) isoliert, zu cDNA transkribiert und diese mittels Lightcycler-PCR quantifiziert.

Die Expression der VEGF-A-mRNA ist bis zu einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  unverändert. Erst bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  sinkt die Expression auf  $0,7 \pm 0,1$  ab. Bei einer Ado-2',3'-Dial-Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  sinkt die mRNA-Konzentration auf 60% des Kontrollwertes. Bei einer Konzentration von

100  $\mu\text{M}$  zeigt die Expression gleiche Werte wie unter Kontrollbedingungen. Erst bei einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  sinkt sie auf  $0,35 \pm 0,03$  ab.

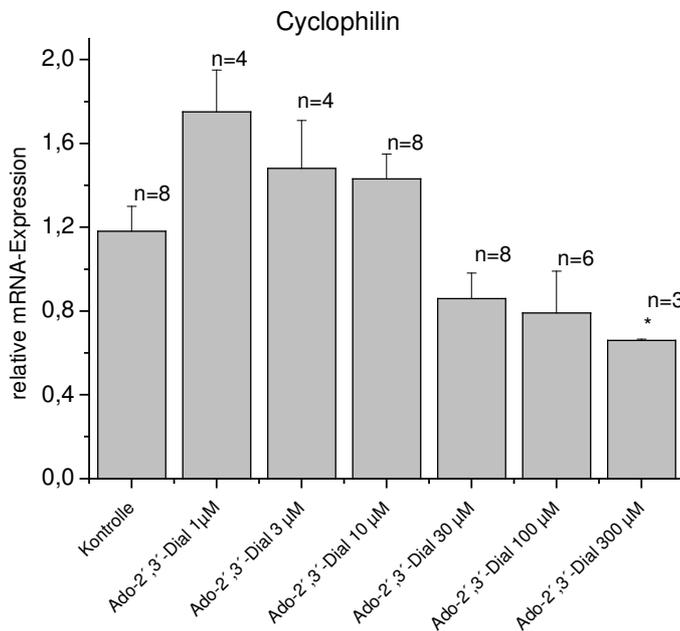
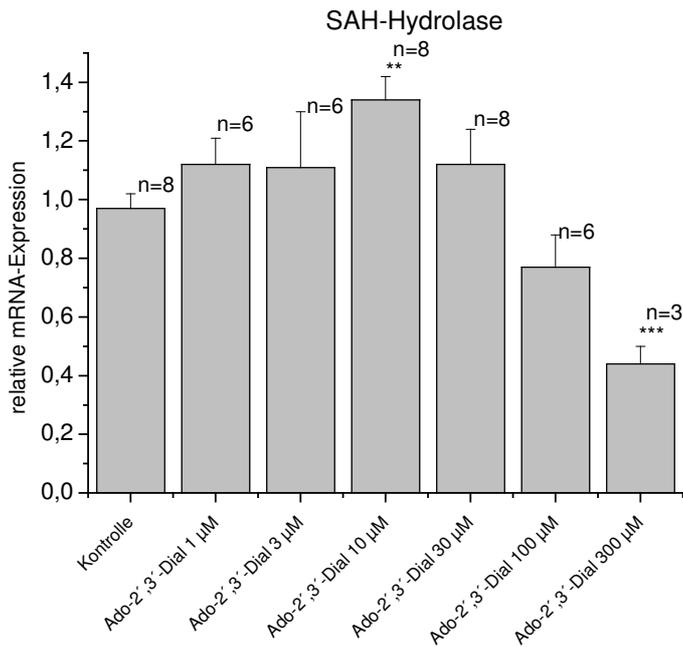


Abbildung 11: mRNA-Expression des Cyclophilin-Gens in Abhängigkeit von der Adenosin-2',3'-Dialdehyd-Konzentration. Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 24 h mit der angegebenen Hemmstoff-Konzentration inkubiert, ihre RNA nach der Methode von Chomcznski und Sacchi (1987) isoliert, zu cDNA transkribiert und diese mittels Lightcycler-PCR quantifiziert.

Die Expression von Cyclophilin-mRNA hat bei der Kontrolle einen Wert von 1,16. Dieser steigt bei einer Ado-2',3'-Dial-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  auf 1,63 an. Dieser Anstieg ist jedoch nicht signifikant, wie der „student t test“ zeigt. Bei steigender Ado-2',3'-Dial-Konzentration hat die Cyclophilin-mRNA-Expression Werte zwischen 1,4 bei 3  $\mu\text{M}$  und 0,8 bei 100  $\mu\text{M}$  Ado-2',3'-Dial und ist aber weiterhin nicht signifikant verschieden von der Kontrolle. Bei Inkubation der Zellen mit 300  $\mu\text{M}$  Ado-2',3'-Dial sinkt die relative Cyclophilin-mRNA-Expression signifikant auf die Hälfte des Wertes unter Kontrollbedingungen.



*Abbildung 12: mRNA-Expression SAH-Hydrolase-Gens in Abhängigkeit von der Adenosin-2',3'-Dialdehyd-Konzentration. Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 24 h mit der angegebenen Hemmstoff-Konzentration inkubiert, ihre RNA nach der Methode von Chomcznski und Sacchi (1987) isoliert, zu cDNA transkribiert und diese mittels Lightcycler-PCR quantifiziert.*

Die mRNA-Expression der SAH-Hydrolase wird durch Ado-2',3'-Dial bis zu einer Konzentration von 3 µM nicht verändert. Eine Konzentration von 10 µM Ado-2',3'-Dial führt zu einer signifikanten Steigerung. Bei Ado-2',3'-Dial-Konzentrationen von 100 µM bzw. 300 µM sinkt auch die SAH-Hydrolase-mRNA-Expression auf  $0,8 \pm 0,1$  bzw.  $0,45 \pm 0,06$ .

### 3.5 Einfluss des Methylierungspotentials auf die Expression des Erythropoetin-Gens in Abhängigkeit von der Zeit

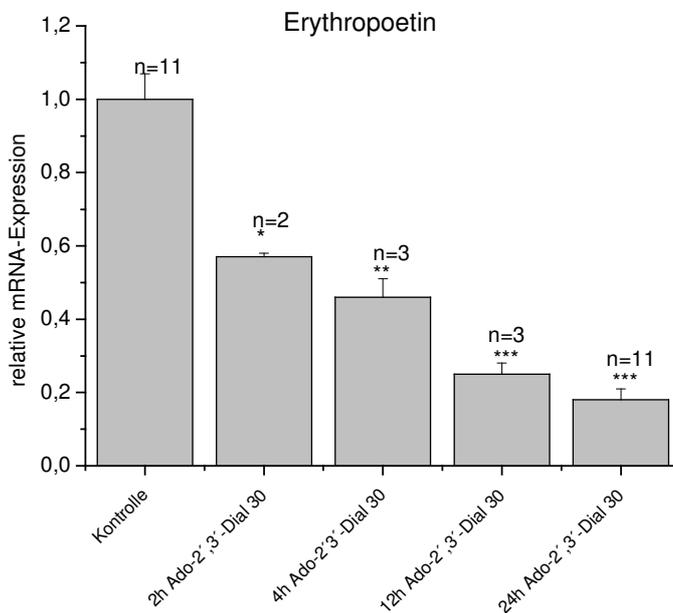


Abbildung 13: Expression der Erythropoetin-mRNA in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit einer Adenosin-2',3'-Dialdehyd-Konzentration von 30 µM. Die Zellen wurden für die jeweils angegebenen Zeiträume mit einer Hemmstoff-Konzentration von 30 µM inkubiert, ihre RNA nach der Methode von Chomcznski und Sacchi (1987) isoliert, zu cDNA transkribiert und diese mittels Lightcycler-PCR quantifiziert.

Aus der Graphik geht deutlich hervor, dass die Wirkung des SAH-Hydrolase-Hemmstoffs Ado-2',3'-Dial bereits nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden die Expression von Epo-mRNA signifikant, und zwar auf 57% der Kontroll-Menge senkt. Nach weiteren 2 Stunden nimmt die Expression um weitere 10% auf  $0,5 \pm 0,05$  ab und erreicht nach 12 Stunden einen Wert von  $0,25 \pm 0,03$ . Nach 24 Stunden Inkubation liegt der Wert bei nur noch  $0,2 \pm 0,03$ .

### 3.6 Protein-Expression von Erythropoetin

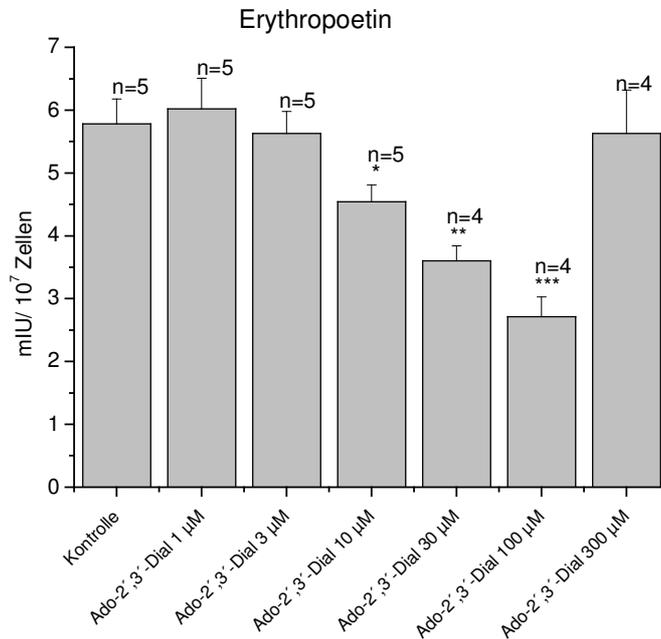


Abbildung 14: Proteinkonzentration von Erythropoetin im Zellkulturmedium nach Behandlung der HepG2-Zellen mit Adenosin-2',3'-Dialdehyd in verschiedenen Konzentrationen. Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 24 h mit den angegebenen Hemmstoffkonzentrationen inkubiert. Ein Teil des Nährmediums wurde für die Bestimmung des Epo-Proteins und für die Proteinbestimmung und die Proteinkonzentration mittels des Bio-Rad Protein Assay nach Bradford, wie in „Material und Methoden“ beschrieben, abgenommen.

Die Epo-Proteinkonzentration verändert sich bis zu einer Ado-2',3'-Dial-Konzentration von 3 µM nicht signifikant gegenüber der Kontrolle. Eine Erhöhung der Konzentration des SAH-Hydrolase-Hemmstoffs auf 10 µM führt zu einer signifikanten Reduktion des Epo-Proteins auf  $4,5 \pm 0,3$  mIU/  $10^7$  Zellen. Mit steigenden Ado-2',3'-Dial-Konzentrationen sinkt die Menge des Epos im Überstand der Zellen auf  $3,6 \pm 0,2$  mIU/  $10^7$  Zellen bei 30 µM und  $2,71 \pm 0,32$  mIU/  $10^7$  Zellen bei 100 µM. Bei einer Konzentration von 300 µM steigt die Epo-Menge wieder auf den Kontroll-Wert an ( $5,63 \pm 0,70$  mIU/  $10^7$  Zellen).

### 3.7 Auswirkung von Ado-2',3'-Dial auf die Aktivität der SAH-Hydrolase

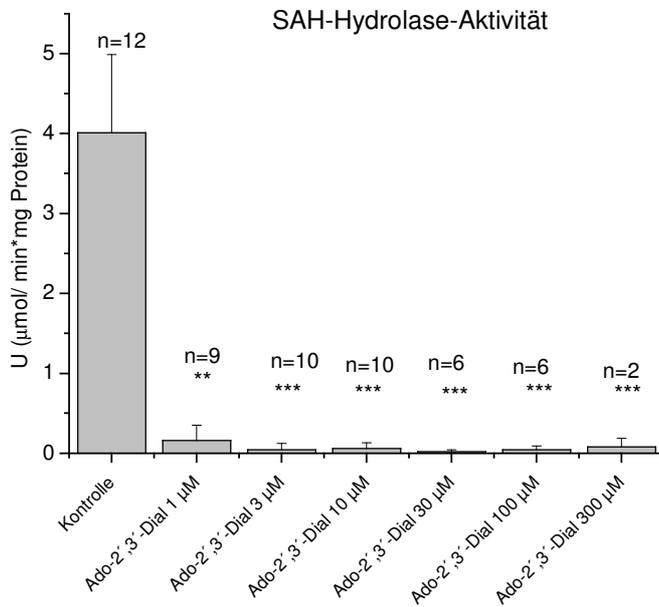


Abbildung 15: Aktivität der SAH-Hydrolase nach Behandlung mit den angegebenen Adenosin-2',3'-Dialdehyd-Konzentrationen. Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 24 h mit den angegebenen Hemmstoffkonzentrationen inkubiert, abtrypsiniert, mit Ultraschall aufgebrochen und abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde mittels photometrischer Messung die Aktivität der darin enthaltenen SAH-Hydrolase bestimmt.

Die Aktivität der SAH-Hydrolase wurde nach Behandlung der Zellen mit Ado-2',3'-Dial im Gesamtzelllysat photometrisch gemessen. Bereits bei einer Konzentration von 1 µM sinkt die SAH-Hydrolase-Aktivität von 4 U bei der Kontrolle auf weniger als 0,16 U. Eine Erhöhung der Ado-2',3'-Dial-Konzentration bis 30 µM führt zu einer weiteren Reduktion der SAH-Hydrolase-Aktivität auf bis zu 0,02 U. Ab 100 µM steigt die Aktivität zunächst minimal, bei 300 µM wieder etwas stärker auf knapp 0,08 U an.

## **4. Diskussion**

Die intrazellulären SAH-Konzentrationen werden durch die Aktivität der SAH-Hydrolase kontrolliert. Da SAH ein potenter Hemmstoff vieler SAM-abhängigen Methyltransferasen ist, beeinflusst die SAH-Hydrolase-Aktivität dadurch indirekt Transmethylierungsreaktionen. Das Verhältnis von SAM und SAH, auch Methylierungspotentials (MP) genannt, ist somit ein wichtiger Indikator für die Transmethylierungsaktivität innerhalb einer Zelle.

In vielen Studien wurden die Auswirkungen eines veränderten MP auf DNA- und RNA-Methylierung in der Zelle untersucht. Welche Auswirkungen ein verändertes MP auf die Genexpression bestimmter Gene hat, wurde bislang noch nicht untersucht. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Wirkung eines veränderten MPs auf die Expression ausgewählter Gene zu untersuchen. Als Versuchsobjekt diente die käufliche hepatozelluläre Karzinomzelllinie HepG2.

Es gibt unterschiedliche Methoden, das MP und die damit verbundenen Abläufe in der Zelle zu verändern. Zum einen kann man den SAH-Spiegel durch Hemmung der SAH-Hydrolase in der Zelle ansteigen lassen. Dafür sind verschiedene Nucleosid-Analoga geeignet. Zum anderen kann man die SAM-Synthese durch Hemmung der SAM-Synthetase mit selektiven Inhibitoren wie z.B. L-2-Amino-4-Methoxy-cis-but-3-Enolsäure, einem Methionin-Analogon (24) beeinflussen. Dadurch steht weniger SAM zur Verfügung und das MP fällt.

In dieser Arbeit wurde der SAH-Hydrolase-Inhibitor Ado-2',3'-Dial verwendet. Ado-2',3'-Dial hat gegenüber anderen SAH-Hydrolase-Hemmstoffen folgende Vorteile: Es hat eine hohe Affinität (1  $\mu$ M) an die SAH-Hydrolase (85) und ist dadurch ein sehr potent Hemmstoff. Ado-2',3'-Dial ist kein Substrat der SAH-Hydrolase im Gegensatz zu 3-Deazaadenosin ein weiterer potenter SAH-Hydrolase-Hemmstoff (86) und wird auch nicht durch die Adenosin-Kinase oder Desaminase abgebaut wie Adenin-Arabinosid (87). Außerdem hemmt Ado-2',3'-Dial im Gegensatz zu Aristeromycin, einem weiteren SAH-Hydrolase-Hemmstoff, nicht die Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase, die für den Abbau von Hypoxanthin und Guanin verantwortlich ist (88;89). Auch steigert Ado-2',3'-Dial nicht wie Adenosin, das

selbst auch die SAH-Hydrolase in hydrolytischer Richtung hemmt, die renale Erythropoetin (Epo)-Sekretion über A2-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase A (90-92). Wird nach 15 min Inkubation mit 30  $\mu\text{M}$  Ado-2',3'-Dial das Medium ausgetauscht, erlangt die SAH-Hydrolase nach 16 h ihre ursprüngliche Aktivität. Das führt zu dem Schluss, dass die Bindung von Ado-2',3'-Dial an die SAH-Hydrolase zwar sehr stark, aber nach so kurzer Inkubationszeit reversibel ist (93). Schließlich bietet Ado-2',3'-Dial auch einen methodischen Vorteil. Die Retentionszeit von Ado-2',3'-Dial bei unserer HPLC-Methode interferiert nicht mit der von Adenosin, SAM oder SAH (94).

## 1. Überlebensrate

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überlebensrate der Zellen unter Ado-2',3'-Dial-Behandlung bis 30  $\mu\text{M}$  nicht signifikant verschieden von der Kontrolle ist. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die gemessenen Effekte z.B. die Genexpression verschiedener Gene bis zu dieser Konzentration nicht auf eine verringerte Überlebensrate zurückzuführen sind. Bestätigt werden diese Ergebnisse von Keller et al. (1983), die gezeigt haben, dass Ado-2',3'-Dial in Konzentrationen bis 1  $\mu\text{M}$  keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von L-929-Zellen von Mäusen, sowie auf die Synthese von SAM, RNA und DNA hat (95). Ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  fällt jedoch die Anzahl der überlebenden Zellen deutlich gegenüber der Kontrolle ab. Bei 300  $\mu\text{M}$  Ado-2',3'-Dial überleben nur 56% der Zellen. Dies kann zum einen damit zusammenhängen, dass die SAH-Hydrolase bei diesen Konzentrationen so stark gehemmt ist, dass die Zellen nicht mehr überleben können. Auch Mäuse-Embryonen, denen das Gen für die SAH-Hydrolase fehlt, sind nicht überlebensfähig und sterben in Stadium der Implantation (22). Die SAH-Hydrolase ist also für das Überleben einer Zelle unabdinglich. Vermutlich reichen wenige Moleküle des Enzyms aus, um das Überleben der Zelle zu garantieren. Zum anderen können so hohe Ado-2',3'-Dial-Konzentrationen noch weitere Enzyme unspezifisch hemmen und damit die beobachteten Effekte auf die Genexpression bei diesen Konzentrationen erklären.

## 2. Veränderung des Methylierungspotentials durch Hemmung der SAH-Hydrolase

Zur quantitativen Analyse der Nucleoside Adenosin, SAM und SAH wurde die sehr sensitive und schnelle Methode der HPLC nach Festphasenextraktion angewandt, die auch bei geringen verfügbaren Mengen biologischen Materials sehr effektiv ist. Vorteil dieser HPLC-Methode ist, dass alle Nucleoside simultan gemessen werden können.

Die untersuchten HepG2-Zellen zeigten unter Kontrollbedingungen eine SAH-Konzentration von  $0,04 \pm 0,003$  nmol/  $10^7$  Zellen, eine SAM-Konzentration von  $1,84 \pm 0,15$  nmol/  $10^7$  Zellen und eine Adenosin-Konzentration von  $0,05 \pm 0,01$  nmol/  $10^7$  Zellen. Das MP von HepG2-Zellen beträgt  $57,6 \pm 7,4$ .

*In vivo* Untersuchungen an Rattennieren hatten unter Kontrollbedingungen einen SAH-Gewebsgehalt von  $0,7 \pm 0,05$  nmol/g Feuchtgewicht (FG) und einen SAM-Gehalt von  $44,1 \pm 1,0$  nmol/g FG gezeigt (14). Daraus ergibt sich ein MP von  $65,1 \pm 5,6$ . Dieses hat in Rattennierengewebe einen ähnlichen Wert wie in HepG2-Zellen. Untersuchungen mit anderen Zelllinien haben abweichende MPs ergeben. So zeigen die HEK-293-Zellen, eine humane embryonale Nierenzelllinie ein MP von  $6,85 \pm 0,55$ , die HeLa-Zellen, eine Tumorzelllinie, hatte unter Kontrollbedingungen ein MP von  $6,5 \pm 1,0$  und die MCF-7, eine Mamma-CA-Tumorzelllinie, ein MP von  $14,5 \pm 5,3$  (96). Versuche an L929-Zellen von Mäusen haben gezeigt, dass unter Kontrollbedingungen die SAH-Konzentrationen zwischen 4 und 13  $\mu$ M lagen. Daraus wurde ein SAH/ SAM-Quotient von 0,07 bis 0,14 ermittelt, was einem SAM/ SAH-Quotienten von 7,1 bis 14,3 entspricht (93). In einer anderen Zelllinie, einer Neuroblastom-N2a-Zelllinie wurde unter Kontrollbedingungen ein SAM/ SAH-Quotient von 6,6 gemessen (97). Dies zeigt, dass das MP unter Kontrollbedingungen in Abhängigkeit vom Versuchsobjekt stark variieren kann.

Bereits Konzentrationen von 1  $\mu$ M Ado-2',3'-Dial führen zu einer Hemmung der SAH-Hydrolase und einer intrazellulären SAH-Akkumulation um das 10-fache auf  $0,4$  nmol/  $10^7$  Zellen. SAM steigt dagegen nur um 30% auf

2,6 ± 0,6 an. Eine weitere Erhöhung von Ado-2',3'-Dial auf 3 µM führt zu einer weiteren Steigerung der SAH-Konzentration auf 0,2 ± 0,3 an, während die SAM-Konzentration fast unverändert bleibt. Ramakrishnan et al. (1987) stellten bei Neuroblastom-N2a-Zellen nach 24 h Inkubation mit 2,5 µM Ado-2',3'-Dial einen Anstieg der SAH-Konzentration auf das doppelte des Kontrollwertes fest. Gleichzeitig beobachteten sie eine Reduktion von SAM auf weniger als die Hälfte und einen Abfall des MPs von 6,6 auf 1,3. Bei murinen L929-Zellen führt eine 24-stündige Inkubation mit 5 µM Ado-2',3'-Dial zu einem Anstieg der SAH-Konzentration von 4 – 13 µM (unter Kontrollbedingungen) auf 108 µM. Bei allen untersuchten Zelllinien scheint also der SAH-Hydrolase-Inhibitor einheitlich zu einer SAH-Akkumulation und damit zu einer Erniedrigung des MP zu führen. Warum die Hemmung der SAH-Hydrolase bei Neuroblastom-N2a-Zellen zu einer Reduktion der SAM führt, bleibt ungeklärt.

Bei der HepG2-Zelllinie steigt der SAH-Spiegel mit steigender Ado-2',3'-Dial-Konzentrationen, während die SAM-Konzentration nicht über 3 nmol/ 10<sup>7</sup>Zellen ansteigt. Ab 100 µM Ado-2',3'-Dial sinkt die SAH-Konzentration sogar ab, während SAM deutlich ansteigt.

Der konzentrationsabhängige Anstieg von SAH in den HepG2-Zellen ist somit eindeutig auf die Inhibition der SAH-Hydrolase durch Ado-2',3'-Dial zurückzuführen. Der SAM-Anstieg durch Hemmung SAM-abhängige Transmethylierungsreaktionen lässt sich durch SAH-Akkumulation erklären. Dieser Konzentrationsanstieg ist jedoch nicht ganz so hoch wie der von SAH. Die Beobachtung, dass SAM bei Konzentrationen von 3 bis 100 µM nicht über 3 nmol/ 10<sup>7</sup>Zellen ansteigt, könnte evtl. dadurch erklärt werden, dass Ado-2',3'-Dial selbst in hohen Konzentrationen mit maximaler Inhibition der SAH-Hydrolase keine vollständige Inhibition SAM-abhängiger Methylierung bewirkt. So konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Anteil (40-60%) der Lipid- und Protein-Carboxy-Methylierung in L929-Zellen von Mäusen resistent gegen drastische Anstiege von intrazellulärem SAH (bis zu 100 µM), sofern die SAM-Konzentration hoch genug ist, um Methylierungen zu ermöglichen (27). Außerdem besitzen Methyltransferasen unterschiedliche Affinität zu ihrem Reaktionsprodukt SAH (98). So wird z.B. die mRNA-Guanin-7-

Methyltransferase, die einen niedrigen  $K_i$ -Wert für SAH besitzt ( $K_i = 1 \mu\text{M}$ ), dennoch inhibiert.

Dass SAH bei einer Ado-2',3'-Dial-Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  nicht weiter ansteigt, lässt sich dadurch erklären, dass es, wie die Zellüberlebensrate andeutet, zu einer kompletten Inhibition der SAH-Hydrolase kommt, und daher keine weitere Steigerung von SAH auf diesem Weg möglich ist. Wollte man das MP noch weiter senken, müsste man die SAM-Synthese zusätzlich hemmen (24).

Das MP sinkt bei der HepG2-Zelllinie schon bei Konzentrationen von  $1 \mu\text{M}$  Ado-2',3'-Dial auf weniger als  $1/7$  des Kontrollwertes und fällt dann mit steigender Konzentration ( $30 \mu\text{M}$ ) bis auf einen Wert von  $1,2 \pm 0,02$ . Bei Neuroblastom-N2a-Zellen führte eine 24-stündige Inkubation mit  $2,5 \mu\text{M}$  Ado-2',3'-Dial zu einem Abfall des MP auf  $1,34$  (97), was jedoch deutlich niedriger ist als das MP von  $3 \pm 0,3$  bei HepG2-Zellen bei einer vergleichbar hohen Konzentration von Ado-2',3'-Dial ( $3 \mu\text{M}$ ). Eine Hemmung der SAH-Hydrolase mit  $5 \mu\text{M}$  Ado-2',3'-Dial führte auch in murinen L929-Zellen zu einem Abfall des MP auf  $0,92$  (93). Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass sowohl Neuroblastom-N2a-Zellen als auch murine L929-Zellen unter Kontrollbedingungen ein deutlich geringeres MP aufweisen als HepG2-Zellen. Außerdem reduziert sich das MP bei murinen L929-Zellen nur auf  $1/6$  des Kontrollwertes, wogegen das MP der HepG2-Zellen auf etwa  $1/30$  reduziert ist. Somit kann bei unserem Modell das MP über einen großen Bereich von  $1,2$  bis  $57,6$  moduliert werden, was für die hier untersuchte Fragestellung von Vorteil ist.

Bei höheren Ado-2',3'-Dial-Konzentrationen von  $100$  oder  $300 \mu\text{M}$  steigt das MP gegenüber dem bei  $30 \mu\text{M}$  Ado-2',3'-Dial gemessenen Wert an. Das liegt zum Teil daran, dass SAH ab einer kompletten SAH-Hydrolase-Inhibition nicht weiter ansteigen kann. Es liegt aber auch daran, dass aufgrund des stark gesunkenen Zellüberlebens anzunehmen ist, dass diese Ado-2',3'-Dial-Konzentrationen einen zytotoxischen Effekt auf die Zellen ausüben, so dass die Zellen stark geschädigt werden und keinen vollständig funktionierenden Stoffwechsel mehr ausführen können.

Deshalb wurden für die hier in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen 30  $\mu$ M Ado-2',3'-Dial als die optimale Konzentration zur Erforschung eines gesenkten MP auf die Genexpression eingesetzt. Bei dieser Konzentration ist das MP am niedrigsten, ohne dass die Überlebensrate der Zellen beeinträchtigt wäre.

Die Untersuchungen der Auswirkungen von Ado-2',3'-Dial in Abhängigkeit von der Zeit haben gezeigt, dass bereits nach ½ h Inkubation mit dem SAH-Hydrolase-Hemmstoff Ado-2',3'-Dial das MP von den ursprünglichen  $57,6 \pm 7,4$  auf  $2,5 \pm 0,1$  abfiel. Im weiteren Verlauf sinkt das MP nach 4 h bis auf  $1,2 \pm 0,06$  und bleibt dann bis zu einer Inkubationsdauer von 24 h ( $1,2 \pm 0,02$ ) unverändert. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen von Bartel et al.(1984) überein, die gezeigt haben, dass bereits nach 15-minütiger Inkubation mit Ado-2',3'-Dial die Inhibition der SAH-Hydrolase beginnt (93). Danach sank das MP in den L929-Zellen von 7,1 bis 14,3 schon in der 1.Stunde auf 3,6 und nach weiteren 4 h auf 1,2. Nach 48 h lag das MP in diesen Zellen zwischen 0,9 und 1,06. Auch die Arbeitsgruppe von Ramakrishnan et al. (1987) untersuchte die zeitabhängige Wirkung von Ado-2',3'-Dial auf das MP von Neuroblastom-N2a-Zellen (97). Im Gegensatz zu den hier vorgestellten Daten bzw. den Untersuchungen von Bartel und Borchard liegen über die Neuroblastom-N2a-Zellen erst ab einer Inkubation von 8 h MP-Werte vor. So sinkt das MP dieser Zelllinie nach 8 h auf 1/6 des Kontrollwertes, steigt dann allerdings bei Verlängerung der Inkubationszeit von bis zu 24 h auf 1,3 an. Nach 48 h h liegt das MP dann bei 1,24 und nach 72 h bei einen Wert von 2,3.

### **3. Einfluss des Methylierungspotentials auf die Expression ausgewählter Gene**

Die Auswirkung eines veränderten SAM/ SAH-Quotienten auf die mRNA-Spiegel von Epo und VEGF-A als Beispiele für schnell aktivierbare, exprimierte Gene, Cyclophilin als klassisches „housekeeping“ Gen und SAH-Hydrolase als Teil des SAM/ SAH-Metabolismus wurden mittels real-time-PCR gemessen.

In früheren Untersuchungen wurde die Notwendigkeit der SAM-abhängigen Transmethylierung für die effiziente Translation (62), für die Stabilität der mRNA im Sinne eines Schutzes vor exonukleolytischer Spaltung (65) und für den Splicing-Vorgang der pre-mRNA (68) beschrieben. Shatkin et al. stellte die Hypothese auf, dass die genetische Expression durch Methylierung auf dem Level der Translation reguliert werden könnte (64).

Ein bisher wenig beforschter Bereich ist der Einfluss, den das MP einer Zelle auf die Expression ihrer Gene hat. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Expression ausgewählter Gene unter einem veränderten MP untersucht.

Eines der untersuchten Gene ist das für Epo kodierende Gen. Epo ist ein Glykoprotein-Hormon mit einem Molekulargewicht von 34,4 kD, das in der fetalen Leber und der adulten Niere gebildet wird und als humoraler Regulator für die Erythrozytenproduktion fungiert. Es wird normalerweise in einem niedrigen Basallevel synthetisiert, um veraltete Erythrozyten zu ersetzen. Nach Blutverlust wird es jedoch vermehrt ausgeschüttet. Ebenso bei niedrigem Sauerstoffdruck in der Atemluft, erhöhter Sauerstoffaffinität von Hämoglobin oder anderen Stimuli, die die Sauerstofffreisetzung im Gewebe reduzieren (99). Es kann dabei bis auf das 1000-fache des normalen Plasma-Spiegels ansteigen. Epo fungiert also als Beispiel für Gene, die induzierbar sind, z.B. durch Hypoxie.

Real time-PCR-Analysen konnten zeigen, dass die Expression von Epo nach Reduktion des MP mit 1  $\mu$ M bzw. 3  $\mu$ M Ado-2',3'-Dial nicht verändert wird. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass bis zu einem MP von 3 (3  $\mu$ M Ado-2',3'-Dial) die Genexpression einer Zelle nicht beeinträchtigt wird. Erst ab einem MP von  $1,8 \pm 0,2$ , das bei einer Ado-2',3'-Dial-Konzentration von 10  $\mu$ M erreicht wird, ist die relative mRNA-Expression von Erythropoetin signifikant vermindert. Eine weitere Reduktion des MPs auf  $1,2 \pm 0,02$  führt zu einer drastischen Abnahme der Epo-mRNA-Expression, und zwar auf 18% des Kontrollwertes. Dies könnte darauf hinweisen, dass das MP erheblich reduziert sein muss, um die Genexpression zu beeinflussen. Bestimmungen der mRNA-Methylierung durch Inkorporation von  $\text{CH}_3$  aus L-(methyl- $^3\text{H}$ )-Methionin in mRNA und Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Uridin konnten zeigen, dass 30  $\mu$ M Ado-2',3'-Dial

eine Verringerung der mRNA-Methylierung bewirken (94). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die mRNA-Methylierung Ado-2',3'-Dial-konzentrationsabhängig ist mit einer maximalen Hemmung bei 100 µM. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen sprechen dafür, dass die Epo-Expression zumindest teilweise durch das MP regulierbar ist.

Aus Untersuchungen von Yin et al. (2000) ist bekannt, dass die Epo-Expression durch die Promotormethylierung reguliert wird. Die Methylierung der CpG-Stellen im Epo-Promotor ist danach bei Epo-produzierenden und –nicht produzierenden Zellen unterschiedlich. Durch Inhibition der Bildung von DNA-Bindungskomplexen und durch die Bindung von inhibitorischen Methyl-CpG-Bindungsproteinen und dadurch unterdrückter Transkription könnte die Methylierung zur Gewebe-spezifischen Aktivität des Epo-Promotors beitragen (100). DNA-Methylierung, im Speziellen der Promotor-Sequenz, führt also eher zu einer Inhibition der Epo-Expression. Da jedoch die DNA-Methylierung während der Zellteilung abläuft und in den hier dargestellten Versuchen die Zellen nur 24 h mit dem SAH-Hydrolase-Hemmstoff inkubiert wurden, ist es eher unwahrscheinlich, dass sich die Inhibition in bedeutsamem Ausmaß auf die DNA-Methylierung auswirkt. Hermes et al. (2004) konnten mittels Cytosin-Extension-Assay nachweisen, dass nach Behandlung von HepG2-Zellen mit 30 µM Ado-2',3'-Dial für 24 h keine signifikante Veränderung der DNA-Methylierung gegenüber der Kontrolle zu beobachten ist (94).

Hoffman et al. (1980) haben den Einfluss eines durch Adenosin und Homocystein gesenkten MPs auf die Methylierung von Histonen, DNA und Phospholipiden untersucht und gezeigt, dass bei einem MP von  $5,6 \pm 1,8$  die Histone, DNA und Phospholipide noch zu 100% methyliert waren, bei einem MP von  $0,3 \pm 0,1$  die Methylierung von Histonen, DNA und Phospholipiden jedoch zu 90 bis 99% inhibiert war (36). Dies stimmt mit den hier vorgestellten Ergebnissen überein, dass das MP von 57 auf 3 reduziert sein kann, ohne dass die Genexpression beeinträchtigt wird. Das MP kann also in den HepG2-Zellen in weiten Bereichen schwanken ohne Veränderungen der Genexpression zu bewirken. Diese Beobachtung erklärt auch, warum andere Zelllinien, die unter Kontrollbedingungen ein sehr viel niedrigeres MP haben, wie z.B. murinen

L929-Zellen mit einem MP von 7,1 bis 14,3 (93) oder Neuroblastom-N2a-Zellen mit einem MP von 6,6 (97) überlebens- und teilungsfähig sind.

Ein weiteres durch Hypoxie induzierbares Gen (101), das im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, ist das VEGF-A-Gen („vascular epithelial growth factor“). Die Hemmung der SAH-Hydrolase durch Ado-2',3'-Dial führte erst bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten Reduktion der RNA-Expression auf 60% des Kontrollwertes. Bei dieser Ado-2',3'-Dial-Konzentration ist das MP am niedrigsten, ohne dass die Überlebensrate der Zellen signifikant verändert ist. Es kann geschlossen werden, dass auch das VEGF-A-Gen durch das MP der Zelle reguliert wird, wenn auch nicht so eindrucksvoll wie Epo. Bei einer Ado-2',3'-Dial-Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  sinkt die VEGF-A-Expression noch deutlicher ab. Allerdings ist bei so hohen Konzentrationen die Überlebensrate der HepG2-Zellen bereits stark reduziert, so dass hier zytotoxische Effekte mit einer Rolle spielen könnten.

Das klassische „Housekeeping“ Gen Cyclophilin zeigt unter der Behandlung mit Ado-2',3'-Dial bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  keine signifikanten Veränderungen. Erst bei 300  $\mu\text{M}$  Ado-2',3'-Dial ist die Expression signifikant reduziert, doch auch hier gilt das gleiche wie bei VEGF-A, dass aufgrund der geringen Überlebensrate und zytotoxischen Effekte dieses Ergebnis nicht auszuwerten ist. Cyclophilin verhält sich also wie ein „housekeeping“ Gen. Dennoch wurde Cyclophilin nicht als Standard ausgewählt, da vor Durchführung der Experimente nicht klar war, ob auch dessen Expression durch eine verringerte mRNA-Methylierung beeinflusst wird. Zudem hat sich bei Cyclophilin unter Hypoxie ein veränderter Ct-Wert im Vergleich zur Kontrolle gezeigt (102), weshalb es als Standard im Falle einer Messung der Epo-mRNA-Expression ungeeignet ist. Die 18S rRNA reagiert auf Veränderungen des MP unsensitiv und ist als interner Standard besser geeignet (103). Außerdem sind bisher keine Veränderungen in der Expression von ribosomaler RNA bei unterschiedlichen Geweben bzw. experimentellen Behandlungen verzeichnet worden (104;105).

Eine Verringerung des MP auf  $1,8 \pm 0,2$  führt beim SAH-Hydrolase-Gen zu einer gesteigerten Genexpression und sinkt dann bis 100  $\mu\text{M}$  Ado-2',3'-Dial

nicht mehr signifikant ab. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte in der Zunahme der SAH-Konzentration in der Zelle liegen. Wie aus der Literatur bekannt ist, korreliert der SAH-Gewebsgehalt mit der Aktivität der SAH-Hydrolase (v. Hippel, 2004). Steigt nun nach Hemmung der SAH-Hydrolase der SAH-Spiegel in der Zelle, reagiert die Zelle mit einer gesteigerten SAH-Hydrolase-mRNA-Expression, um das vermehrt anfallende SAH zu metabolisieren. Weitere Untersuchungen müssen folgen, um die Expression der SAH-Hydrolase nach Hemmung mit Ado-2',3'-Dial über einen längeren Zeitraum zu untersuchen, um mehr Hinweise über die Regulation der SAH-Hydrolase zu erhalten.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen haben gezeigt, dass verschiedene Gene auf Veränderungen im MP unterschiedliche Sensitivität aufweisen. Es kann davon ausgegangen werden, dass ein erhöhter SAH-Spiegel diese Veränderungen herbeiführt, denn ein verändertes MP hat einen Einfluss auf die Methylierung der mRNA (94).

Ob ein vermindertes MP auch einen Einfluss auf die Transkriptionsrate hat, müssen weitere Untersuchungen klären.

#### **4. Adeninnukleotid- und Energie-Haushalt**

Nachdem in anderen Studien ein Zusammenhang zwischen dem Energie-Metabolismus und Transmethylierungsreaktionen postuliert wurde (14), wurde auch in dieser Studie untersucht, ob das veränderte MP mit einem veränderten Energiestoffwechsel einhergeht. Die Energieladung der Zelle (EC) drückt das Verhältnis zwischen energetisch hohen und niedrigen Adenylatphosphaten aus und ist definiert als

$$\text{(ATP + 1/2 ADP) : (AMP + ADP + ATP) (84).}$$

Unter Kontrollbedingungen ist die Energieladung von HepG2-Zellen mit einem Wert von  $0,78 \pm 0,01$  ähnlich der Energieladung, die *in vivo* bei verschiedenen Ratten- und Menschengeweben gemessen wurden (14;106). Die Energieladung verändert sich jedoch unter pathophysiologischen Bedingungen wie z.B. bei Ischämie (14). Ado-2',3'-Dial in Konzentrationen von

1 und 3  $\mu\text{M}$  führt zu einem leichten Abfall der Energieladung, der jedoch signifikant ist. Höhere Ado-2',3'-Dial-Konzentrationen haben keinen Einfluss auf die Energieladung der Zellen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass ein vermindertes MP den Energiestoffwechsel der Zelle nicht beeinflusst.

## **5. Einfluss des Methylierungspotentials auf die Expression des Erythropoetin-Gens in Abhängigkeit von der Zeit**

Bei der Untersuchung des Einflusses von Ado-2',3'-Dial auf die Epo-Expression in Abhängigkeit von der Zeit zeigten sich bereits nach 2 h Inkubation eine auf 43% des Kontrollwertes reduzierte Epo-Expression. Dieses Ergebnis korreliert mit der Beobachtung, dass das MP ebenfalls schon zu diesem frühen Zeitpunkt auf  $1,5 \pm 0,08$  gesenkt ist. Nach 4 h Inkubation und einem MP von  $1,2 \pm 0,06$  ist die Epo-mRNA-Expression auf 46% und nach 12 h auf 25% des Kontrollwertes gesunken. Bei Verlängerung der Inkubationsdauer auf 24 h bleibt das MP konstant ( $1,2 \pm 0,02$ ) während die Expression der Epo-mRNA auf 18% des Ausgangswertes sinkt. Daraus wird ersichtlich, dass die Reduktion des MPs durch 30  $\mu\text{M}$  Ado-2',3'-Dial von 58 bei der Kontrolle auf 1,5 nach 2 h Inkubation zu einer massiven Senkung der Epo-mRNA-Expression führt. Auch wenn sich das MP nach 24 h nur noch geringfügig verändert, so reduziert sich die Epo-mRNA-Expression auf 1/5 des Ausgangswertes. Das bedeutet, dass der Zeitfaktor für die Epo-Expression entscheidend ist.

## **6. Protein-Expression von Erythropoetin**

Um zu überprüfen, ob die verringerte mRNA-Expression auch eine verminderte Epo-Synthese zur Folge hat, wurde die Epo-Protein-Konzentration im Überstand des Zellmediums bestimmt. Auch die Menge des synthetisierten Epos ist bis zu einer Ado-2',3'-Dial-Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  praktisch unverändert. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Ado-2',3'-Dial und damit einem MP von  $1,2 \pm 0,02$  und einer relativen Epo-mRNA-Expression von 62% des Kontrollwertes verringert sich die Epo-Proteinmenge signifikant. Bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  Ado-2',3'-Dial, einem MP von  $1,2 \pm 0,02$  und einer

relativen mRNA-Expression von 18% des Kontrollwertes beträgt die Epo-Proteinmenge nur noch etwa 2/3 des Kontrollwertes. Dies spricht also für einen unmittelbaren Effekt, den die reduzierten mRNA-Spiegel auf die Proteinsynthese haben. Wäre allein die Proteinsynthese reduziert, würde das dafür sprechen, dass allein die erschwerte Bindung der mRNA an die Ribosomen für die Reduktion von Epo verantwortlich ist. Da jedoch auch die mRNA-Spiegel reduziert sind, liegt die Ursache der Reduktion zumindest teilweise auch in einer verminderten mRNA-Methylierung.

## 7. Bestimmung der SAH-Hydrolase-Aktivität

Parallel zur Ermittlung des MPs wurde auch die Aktivität der SAH-Hydrolase in den mit Ado-2',3'-Dial behandelten Zellen mittels photometrischer Messung ermittelt. Die SAH-Hydrolase hat unter Kontrollbedingungen eine Aktivität von  $4 \pm 0,3$  U. In Neuroblastom-N2a-Zellen hingegen wurde eine SAH-Hydrolase-Aktivität von  $0,05$  U ( $45-55$  pmol/ min\*mg Protein) gemessen (97). Einen Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte zum einen in der Nachweismethode liegen, zum anderen aber auch in den Zellen. Es ist bekannt, dass die Aktivität der SAH-Hydrolase in Leberzellen erheblich höher ist als in Nervenzellen (21).

Bereits bei einer Ado-2',3'-Dial-Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  ist die Aktivität der SAH-Hydrolase auf  $1/25$  des Kontrollwertes ( $0,16$  U) reduziert. Auch Bartel et al. (1984) haben bei dieser Konzentration eine Reduktion der SAH-Hydrolase-Aktivität um mehr als 95% verzeichnet. Bei dieser Ado-2',3'-Dial-Konzentration beträgt das MP jedoch  $7,7 \pm 1,3$ . Dies ist darauf zurückzuführen, dass nicht nur SAH durch Inhibition der SAH-Hydrolase akkumuliert, sondern auch die SAM-Konzentration durch den inhibitorischen Effekt, den SAH auf alle SAM-abhängigen Transmethylierungsreaktionen ausübt, ansteigt und damit der SAM/ SAH-Quotient nicht im gleichen Ausmaß abfällt wie die SAH-Hydrolase-Aktivität. Bei weiterer Erhöhung der Ado-2',3'-Dial-Konzentration bis  $30 \mu\text{M}$  ist die SAH-Hydrolase-Aktivität nach 24 h Inkubation mit unserer Methode kaum noch messbar. Aufgrund der Ergebnisse bei der Ermittlung der Überlebensrate der Zellen, die ergeben haben, dass der Anteil vitaler Zellen an der

Gesamtzellzahl bis zu einer Ado-2',3'-Dial-Konzentration von 30  $\mu$ M nicht gesunken ist, ist anzunehmen, dass dennoch bis zu dieser Ado-2',3'-Dial-Konzentration Aktivität besteht, die jedoch mit unserer Nachweismethode nicht detektierbar ist. Die Tatsache, dass nach Hemmung des Enzyms durch Ado-2',3'-Dial fast keine SAH-Hydrolase-Aktivität nachweisbar ist, spricht dafür, dass Ado-2',3'-Dial nach 24 h Inkubation fest und irreversibel an die SAH-Hydrolase bindet. Diese Beobachtung wurde auch von anderen Arbeitsgruppen gemacht (107).

## **5. Zusammenfassung**

In der dargelegten Arbeit wurde das Methylierungspotential (MP) der HepG2-Zellen, einer humanen hepatozellulären Tumorzelllinie verändert und der Einfluss dessen auf die Expression ausgewählter Gene untersucht. Die Untersuchungen brachten folgende Ergebnisse:

1. HepG2-Zellen haben unter Kontrollbedingungen ein MP von  $57,6 \pm 7,4$ , einen SAH-Spiegel von  $0,04 \pm 0,003$  nmol/ $10^7$ Zellen und einen SAM-Spiegel von  $1,8 \pm 0,15$  nmol/ $10^7$ Zellen.
2. Adenosin-2',3'-Dialdehyd (Ado-2',3'-Dial), ein potenter SAH-Hydrolase-Hemmstoff vermindert das MP in den HepG2-Zellen konzentrationsabhängig von 57,6 (Kontrolle) auf 1,2 (30  $\mu$ M Ado-2',3'-Dial).
3. Die inhibitorische Wirkung von 30  $\mu$ M Ado-2',3'-Dial auf das MP ist zeitabhängig: Das MP sinkt bereits nach  $\frac{1}{2}$  h Inkubation von den ursprünglichen  $57,6 \pm 7,4$  auf  $2,5 \pm 0,1$  und erreicht nach einer Inkubationsdauer von 24 h einen Wert von  $1,2 \pm 0,02$ .
4. Die Energieladung der HepG2-Zellen wird durch ein verändertes MP nicht beeinflusst.
5. Ado-2',3'-Dial hat bis zu einer Konzentration von 30  $\mu$ M keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen.
6. Mittels real time-PCR-Analysen wurde gezeigt, dass ein verändertes MP die Expression der ausgewählten Gene unterschiedlich beeinflusst. Während ein MP von 1,2 die Erythropoetin- (Epo) und VEGF-A-mRNA-Expression signifikant senkt, bleibt die Expression der SAH-Hydrolase und von Cyclophilin unverändert.
7. Auf Proteinebene konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Epo-mRNA-Expression mit einer verminderten Epo-Proteinsynthese einhergeht.
8. Die Aktivität der SAH-Hydrolase von HepG2-Zellen hat unter Kontrollbedingungen einen Wert von  $4 \pm 0,3$  U. Bereits bei einer Ado-2',3'-Dial-Konzentration von 1  $\mu$ M ist die Aktivität auf 0,16 U reduziert.

## **6. Literaturverzeichnis**

1. SCHLENK, F. and DEPALMA, R. E. The Formation of S-Adenosylmethionine in Yeast. *J Biol.Chem.* 1957;229(2):1037-50.
2. Hoffman, D. R., Cornatzer, W. E., and Duerre, J. A. Relationship Between Tissue Levels of S-Adenosylmethionine, S-Adenosylhomocysteine, and Transmethylation Reactions. *Can.J.Biochem.* 1979;57(1):56-65.
3. Borchardt, R. T. S-Adenosyl-L-Methionine-Dependent Macromolecule Methyltransferases: Potential Targets for the Design of Chemotherapeutic Agents. *J Med.Chem.* 1980;23(4):347-57.
4. Borchardt RT. N- and O-Methylation. Jakoby WB. *Enzymatic Basis of Detoxification.* New York: Academic Press; 1980. pp.43-62.
5. Jacquemont, B. and Huppert, J. Inhibition of Viral RNA Methylation in Herpes Simplex Virus Type 1-Infected Cells by 5' S-Isobutyl-Adenosine. *J Virol.* 1977;22(1):160-7.
6. Kort, E. N., Goy, M. F., Larsen, S. H., and Adler, J. Methylation of a Membrane Protein Involved in Bacterial Chemotaxis. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* 1975;72(10):3939-43.
7. O'Dea, R. F., Viveros, O. H., Axelrod, J., Aswanikaumar, S., Schiffmann, E., and Corcoran, B. A. Rapid Stimulation of Protein Carboxymethylation in Leukocytes by a Chemotactic Peptide. *Nature* 30-3-1978;272(5652):462-4.
8. Pike, M. C., Kredich, N. M., and Snyderman, R. Requirement of S-Adenosyl-L-Methionine-Mediated Methylation for Human Monocyte Chemotaxis. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* 1978;75(8):3928-32.
9. Ueland, P. M. Pharmacological and Biochemical Aspects of S-Adenosylhomocysteine and S-Adenosylhomocysteine Hydrolase. *Pharmacol.Rev.* 1982;34(3):223-53.
10. Hoffman, D. R., Haning, J. A., and Cornatzer, W. E. Microsomal Phosphatidylethanolamine Methyltransferase: Inhibition by S-Adenosylhomocysteine. *Lipids* 1981;16(8):561-7.
11. Cantoni, GL; Chiang, PK. The role of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase in the control of biological methylations. Cavalli, D. and Gaull, G. and Zappia V. *Natural sulfur compounds: novel biochemical and structural aspects.* New York: Plenum Press; 1980. pp.67-80.

12. de la Haba, G and Cantoni, GL. The Enzymatic Synthesis of S-Adenosyl-L-Homocysteine From Adenosine and Homocysteine. *J Biol Chem* 1959;234:606-8.
13. Radomski, N., Kaufmann, C., and Dreyer, C. Nuclear Accumulation of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase in Transcriptionally Active Cells During Development of *Xenopus Laevis*. *Mol Biol.Cell* 1999;10(12):4283-98.
14. Kloor, Doris, Delabar, Ursula, Muhlbauer, Bernd, Luippold, Gerd, and Osswald, Hartmut. Tissue Levels of S-Adenosylhomocysteine in the Rat Kidney: Effects of Ischemia and Homocysteine. *Biochemical Pharmacology* 15-2-2002;63(4):809-15.
15. Kredich, N. M. and Martin, D. V., Jr. Role of S-Adenosylhomocysteine in Adenosinemediated Toxicity in Cultured Mouse T Lymphoma Cells. *Cell* 1977;12(4):931-8.
16. Kredich, N. M. and 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(5):2450-4.
17. Hershfield, M. S. Apparent Suicide Inactivation of Human Lymphoblast S-Adenosylhomocysteine Hydrolase by 2'-Deoxyadenosine and Adenine Arabinoside. A Basis for Direct Toxic Effects of Analogs of Adenosine. *J Biol.Chem.* 10-1-1979;254(1):22-5.
18. Hershfield, M. S., Kredich, N. M., Ownby, D. R., Ownby, H., and Buckley, R. In Vivo Inactivation of Erythrocyte S-Adenosylhomocysteine Hydrolase by 2'-Deoxyadenosine in Adenosine Deaminase-Deficient Patients. *J Clin.Invest* 1979;63(4):807-11.
19. Kredich, N. M. and 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(5):2450-4.
20. Walker, R. D. and Duerre, J. A. S-Adenosylhomocysteine Metabolism in Various Species. *Can.J Biochem.* 1975;53(3):312-9.
21. 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* 15-9-1977;166(3):521-9.
22. Miller, M. W., Duhl, D. M., Winkes, B. M., Arredondo-Vega, F., Saxon, P. J., Wolff, G. L., Epstein, C. J., Hershfield, M. S., and Barsh, G. S. The Mouse Lethal Nonagouti (a(x)) Mutation Deletes the

S-Adenosylhomocysteine Hydrolase (Ahcy) Gene. EMBO J 15-4-1994;13(8):1806-16.

23. Hoffman, D. R., Cornatzer, W. E., and Duerre, J. A. Relationship Between Tissue Levels of S-Adenosylmethionine, S-Adenosylhomocysteine, and Transmethylation Reactions. *Can.J.Biochem.* 1979;57(1):56-65.
24. Kramer, D. L., Porter, C. W., Borchardt, R. T., and Sufrin, J. R. Combined Modulation of S-Adenosylmethionine Biosynthesis and S-Adenosylhomocysteine Metabolism Enhances Inhibition of Nucleic Acid Methylation and L1210 Cell Growth. *Cancer Res.* 1-7-1990;50(13):3838-42.
25. Banerjee, A. K. 5'-Terminal Cap Structure in Eucaryotic Messenger Ribonucleic Acids. *Microbiol.Rev.* 1980;44(2):175-205.
26. Chiang, P. K., Gordon, R. K., Tal, J., Zeng, G. C., Doctor, B. P., Pardhasaradhi, K., and McCann, P. P. S-Adenosylmethionine and Methylation. *FASEB J* 1996;10(4):471-80.
27. Cantoni GL, Richards HH Chiang PK. Inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase and their role in the regulation of biological methylation. Usdin E, Borchardt RT Creveling CR. Transmethylation. New York: Elsevier/North-Holland; 1979. pp.155-64.
28. De Clercq, E. S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Inhibitors As Broad-Spectrum Antiviral Agents. *Biochem.Pharmacol.* 15-8-1987;36(16):2567-75.
29. De Clercq, E. and Cools, M. Antiviral Potency of Adenosine Analogues: Correlation With Inhibition of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 31-5-1985;129(1):306-11.
30. Yuan, CS, Saso, Y, Lazarides, E, Borchardt, RT, and Robins, MJ. Recent Advances in S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase Inhibitors and Their Potential Clinical Applications. *Exp Opin Ther patents* 1999;9:1197-206.
31. Wolos, J. A., Frondorf, K. A., and Esser, R. E. Immunosuppression Mediated by an Inhibitor of S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase. Prevention and Treatment of Collagen-Induced Arthritis. *J Immunol.* 1-7-1993;151(1):526-34.
32. Wolos, J. A., Frondorf, K. A., Davis, G. F., Jarvi, E. T., McCarthy, J. R., and Bowlin, T. L. Selective Inhibition of T Cell Activation by an

Inhibitor of S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase. *J Immunol.* 15-4-1993;150(8 Pt 1):3264-73.

33. German, D. C., Bloch, C. A., and Kredich, N. M. Measurements of S-Adenosylmethionine and L-Homocysteine Metabolism in Cultured Human Lymphoid Cells. *J Biol.Chem.* 25-9-1983;258(18):10997-1003.
34. Saso, Yoshihisa, Conner, Elaine M., Teegarden, Bradley R., and Yuan, Chong Sheng. S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase Inhibitor Mediates Immunosuppressive Effects in Vivo: Suppression of Delayed Type Hypersensitivity Ear Swelling and Peptidoglycan Polysaccharide-Induced Arthritis. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 1-1-2001;296(1):106-12.
35. Pike, M. C. and DeMeester, C. A. Inhibition of Phosphoinositide Metabolism in Human Polymorphonuclear Leukocytes by S-Adenosylhomocysteine. *J Biol.Chem.* 15-3-1988;263(8):3592-9.
36. Hoffman, D. R., Marion, D. W., Cornatzer, W. E., and Duerre, J. A. S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocystein Metabolism in Isolated Rat Liver. Effects of L-Methionine, L-Homocystein, and Adenosine. *Journal of Biological Chemistry* 25-11-1980;255(22):10822.
37. Hirata, F. and Axelrod, J. Enzymatic Methylation of Phosphatidylethanolamine Increases Erythrocyte Membrane Fluidity. *Nature* 21-9-1978;275(5677):219-20.
38. Hirata, F., Strittmatter, W. J., and Axelrod, J. Beta-Adrenergic Receptor Agonists Increase Phospholipid Methylation, Membrane Fluidity, and Beta-Adrenergic Receptor-Adenylate Cyclase Coupling. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* 1979;76(1):368-72.
39. Strittmatter, W. J., Hirata, F., and Axelrod, J. Increased Ca<sup>2+</sup> -ATPase Activity Associated With Methylation of Phospholipids in Human Erythrocytes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 14-5-1979;88(1):147-53.
40. Riggs, A. D. and Pfeifer, G. P. X-Chromosome Inactivation and Cell Memory. *Trends Genet.* 1992;8(5):169-74.
41. Dreyer, C. Differential Accumulation of Oocyte Nuclear Proteins by Embryonic Nuclei of *Xenopus*. *Development* 1987;101(4):829-46.
42. Radomski, Norbert, Barreto, Guillermo, Kaufmann, Christine, Yokoska, Jun'ichi, Mizumoto, Kiyohisa, and Dreyer, Christine. Interaction of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase of *Xenopus Laevis* With

MRNA(Guanine-7-)Methyltransferase: Implication on Its Nuclear Compartmentalisation and on Cap Methylation of HnRNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 12-6-2002;1590(1-3):93-102.

43. Urieli-Shoval, S., Gruenbaum, Y., Sedat, J., and Razin, A. The Absence of Detectable Methylated Bases in *Drosophila Melanogaster* DNA. *FEBS Lett.* 6-9-1982;146(1):148-52.
44. Proffitt, J. H., Davie, J. R., Swinton, D., and Hattman, S. 5-Methylcytosine Is Not Detectable in *Saccharomyces Cerevisiae* DNA. *Mol.Cell Biol.* 1984;4(5):985-8.
45. Li, E., Bestor, T. H., and Jaenisch, R. Targeted Mutation of the DNA Methyltransferase Gene Results in Embryonic Lethality. *Cell* 12-6-1992;69(6):915-26.
46. Singal, R. and Ginder, G. D. DNA Methylation. *Blood* 15-6-1999;93(12):4059-70.
47. Nishimura, S. Minor Components in Transfer RNA: Their Characterization, Location, and Function. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* 1972;12:49-85.
48. Nau, F. The Methylation of TRNA. *Biochimie* 1976;58(6):629-45.
49. Pope, W. T., Brown, A., and Reeves, R. H. The Identification of the TRNA Substrates for the SupK TRNA Methylase. *Nucleic Acids Res.* 1978;5(3):1041-57.
50. Maden, B. E. and Salim, M. The Methylated Nucleotide Sequences in HELA Cell Ribosomal RNA and Its Precursors. *J Mol.Biol.* 5-9-1974;88(1):133-52.
51. Backlund, P. S., Jr., Carotti, D., and Cantoni, G. L. Effects of the S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Inhibitors 3-Deazaadenosine and 3-Deazaaristeromycin on RNA Methylation and Synthesis. *Eur.J Biochem.* 15-10-1986;160(2):245-51.
52. Horowitz, S., Horowitz, A., Nilsen, T. W., Munns, T. W., and Rottman, F. M. Mapping of N6-Methyladenosine Residues in Bovine Prolactin MRNA. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* 1984;81(18):5667-71.
53. Kane, S. E. and Beemon, K. Precise Localization of M6A in Rous Sarcoma Virus RNA Reveals Clustering of Methylation Sites: Implications for RNA Processing. *Mol.Cell Biol.* 1985;5(9):2298-306.

54. Finkel, D. and Groner, Y. Methylations of Adenosine Residues (M6A) in Pre-mRNA Are Important for Formation of Late Simian Virus 40 MRNAs. *Virology* 1983;131(2):409-25.
55. Stoltzfus, C. M. and Dane, R. W. Accumulation of Spliced Avian Retrovirus mRNA Is Inhibited in S-Adenosylmethionine-Depleted Chicken Embryo Fibroblasts. *J Virol.* 1982;42(3):918-31.
56. Camper, S. A., Albers, R. J., Coward, J. K., and Rottman, F. M. Effect of Undermethylation on mRNA Cytoplasmic Appearance and Half-Life. *Mol.Cell Biol.* 1984;4(3):538-43.
57. Adams JM. Messenger RNA. Stewart PR, Letham DS. The ribonucleic acids. New York: Springer-Verlag; 1977. pp.81-128.
58. Perry, R. P., Kelley, D. E., Friderici, K., and Rottman, F. The Methylated Constituents of L Cell Messenger RNA: Evidence for an Unusual Cluster at the 5' Terminus. *Cell* 1975;4(4):387-94.
59. Rottman, F. M., Desrosiers, R. C., and Friderici, K. Nucleotide Methylation Patterns in Eukaryotic mRNA. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* 1976;19:21-38.
60. Friderici, K., Kaehler, M., and Rottman, F. Kinetics of Novikoff Cytoplasmic Messenger RNA Methylation. *Biochemistry* 30-11-1976;15(24):5234-41.
61. Langberg, S. R. and Moss, B. Post-Transcriptional Modifications of mRNA. Purification and Characterization of Cap I and Cap II RNA (Nucleoside-2'-)-Methyltransferases From HeLa Cells. *J Biol.Chem.* 10-10-1981;256(19):10054-60.
62. Both, G. W., Banerjee, A. K., and Shatkin, A. J. Methylation-Dependent Translation of Viral Messenger RNAs in Vitro. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* 1975;72(3):1189-93.
63. Both, G. W., Furuichi, Y., Muthukrishnan, S., and Shatkin, A. J. Ribosome Binding to Reovirus mRNA in Protein Synthesis Requires 5' Terminal 7-Methylguanosine. *Cell* 1975;6(2):185-95.
64. Shatkin, A. J. Capping of Eucaryotic MRNAs. *Cell* 1976;9(4 PT 2):645-53.
65. Furuichi, Y., LaFiandra, A., and Shatkin, A. J. 5'-Terminal Structure and mRNA Stability. *Nature* 17-3-1977;266(5599):235-9.
66. Darnell, J. E., Jr. Transcription Units for mRNA Production in Eukaryotic Cells and Their DNA Viruses. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* 1979;22:327-53.

67. Edery, I. and Sonenberg, N. Cap-Dependent RNA Splicing in a HeLa Nuclear Extract. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* 1985;82(22):7590-4.
68. Ohno, M., Sakamoto, H., and Shimura, Y. Preferential Excision of the 5' Proximal Intron From mRNA Precursors With Two Introns As Mediated by the Cap Structure. *Proc.Natl.Acad Sci U.S.A* 1987;84(15):5187-91.
69. Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., and Knowles, B. B. Controlled Synthesis of HBsAg in a Differentiated Human Liver Carcinoma-Derived Cell Line. *Nature* 6-12-1979;282(5739):615-6.
70. Knowles, B. B., Howe, C. C., and Aden, D. P. Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Secrete the Major Plasma Proteins and Hepatitis B Surface Antigen. *Science* 25-7-1980;209(4455):497-9.
71. Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S. D., Kaufman, R. J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S. S., Hewick, R., Fritsch, E. F., and . Isolation and Characterization of Genomic and CDNA Clones of Human Erythropoietin. *Nature* 28-2-1985;313(6005):806-10.
72. Bondurant, M. C. and Koury, M. J. Anemia Induces Accumulation of Erythropoietin mRNA in the Kidney and Liver. *Mol.Cell Biol.* 1986;6(7):2731-3.
73. Beru, N., McDonald, J., Lacombe, C., and Goldwasser, E. Expression of the Erythropoietin Gene. *Mol.Cell Biol.* 1986;6(7):2571-5.
74. Goldberg, M. A., Glass, G. A., Cunningham, J. M., and Bunn, H. F. The Regulated Expression of Erythropoietin by Two Human Hepatoma Cell Lines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987;84(22):7972-6.
75. Wenger, R. H., Marti, H. H., Bauer, C., and Gassmann, M. Optimal Erythropoietin Expression in Human Hepatoma Cell Lines Requires Activation of Multiple Signalling Pathways. *Int.J Mol.Med.* 1998;2(3):317-24.
76. Nielsen, O. J., Schuster, S. J., Kaufman, R., Erslev, A. J., and Caro, J. Regulation of Erythropoietin Production in a Human Hepatoblastoma Cell Line. *Blood* 1987;70(6):1904-9.
77. Delabar, U., Kloor, D., Luippold, G., and 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.* 19-3-1999;724(2):231-8.

78. Pfaffl, M. W. A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 1-5-2001;29(9):e45.
79. Marten, N. W., Burke, E. J., Hayden, J. M., and Straus, D. S. Effect of Amino Acid Limitation on the Expression of 19 Genes in Rat Hepatoma Cells. *FASEB J* 1994;8(8):538-44.
80. Foss, D. L., Baarsch, M. J., and Murtaugh, M. P. Regulation of Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and Beta-Actin mRNA Expression in Porcine Immune Cells and Tissues. *Anim Biotechnol.* 1998;9(1):67-78.
81. Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., and Heinen, E. Housekeeping Genes As Internal Standards: Use and Limits. *J Biotechnol.* 8-10-1999;75(2-3):291-5.
82. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal.Biochem.* 1976;72:248-54.
83. Hambrock A, Löffler-Walz C Kloor D Delabar U Horio Y Kurachi Y Quast U. ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channel Modulator Binding to Sulfonylurea Receptors SUR2A and SUR2B: Opposite Effects On MgADP. *Mol.Pharmacol.* 1999;55:832-40.
84. Atkinson, D. E. and Walton, G. M. Adenosine Triphosphate Conservation in Metabolic Regulation. Rat Liver Citrate Cleavage Enzyme. *J Biol.Chem.* 10-7-1967;242(13):3239-41.
85. Borchardt, R. T., Wu, Y. S., and Wu, B. S. Affinity Labeling of Histamine N-Methyltransferase by 2',3'-Dialdehyde Derivatives of S-Adenosylhomocysteine and S-Adenosylmethionine. Kinetics of Inactivation. *Biochemistry* 3-10-1978;17(20):4145-52.
86. Chiang, P. K., Richards, H. H., and Cantoni, G. L. S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase: Analogues of S-Adenosyl-L-Homocysteine As Potential Inhibitors. *Molecular Pharmacology* 1977;13(5):939-47.
87. Helland, S. and Ueland, P. M. Interaction of 9-Beta-D-Arabinofuranosyladenine, 9-Beta-D-Arabinofuranosyladenine 5'-Monophosphate, and 9-Beta-D-Arabinofuranosyladenine 5'-Triphosphate With S-Adenosylhomocysteinase. *Cancer Res.* 1981;41(2):673-8.

88. Hill, D. L., Straight, S., Allan, P. W., and Bennett, L. L., Jr. Inhibition of Guanine Metabolism of Mammalian Tumor Cells by the Carbocyclic Analogue of Adenosine. *Mol.Pharmacol.* 1971;7(4):375-80.
89. Bennett, L. L., Jr., Brockman, R. W., Rose, L. M., Allan, P. W., Shaddix, S. C., Shealy, Y. F., and 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(6):666-75.
90. Fisher, J. W. Pharmacologic Modulation of Erythropoietin Production. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 1988;28:101-22.
91. Paul, P., Rothmann, S. A., and Meagher, R. C. Modulation of Erythropoietin Production by Adenosine. *J Lab Clin.Med.* 1988;112(2):168-73.
92. Nakashima, J., Brookins, J., Beckman, B., and Fisher, J. W. Increased Erythropoietin Secretion in Human Hepatoma Cells by N6-Cyclohexyladenosine. *Am J Physiol* 1991;261(3 Pt 1):C455-C460.
93. Bartel, R. L. and Borchardt, R. T. Effects of Adenosine Dialdehyde on S-Adenosylhomocysteine Hydrolase and S-Adenosylmethionine-Dependent Transmethylations in Mouse L929 Cells. *Molecular Pharmacology* 1-5-1984;25(3):418-24.
94. Hermes, M., Osswald, H., Mattar, J., and Kloor, D. Influence of an Altered Methylation Potential on mRNA Methylation and Gene Expression in HepG2 Cells. *Exp.Cell Res.* 1-4-2004;294(2):325-34.
95. Keller, B. T. and Borchardt, R. T. Adenosine Dialdehyde: a Potent Inhibitor of Vaccinia Virus Multiplication in Mouse L929 Cells. *Mol.Pharmacol.* 1987;31(5):485-92.
96. S. von Hippel, M. Hermes H. Osswald D. Kloor. Methylation potential in four different cell lines. *Archives of Pharmacology* 369[1], R14. 11-3-2004.
97. Ramakrishnan, V and Borchardt, RT. Adenosine Dialdehyde and Neplanocin A: Potent Inhibitors of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase in Neuroblastoma N2a Cells. *Neurochem Int* 1987;10:423-31.

98. Clarke S, Banfield K. S-Adenosylhomocysteine-dependant Methyltransferases. Carmel R, Jacobsen D. Homocysteine in Health and Disease. Cambridge: Cambridge University Press; 2001. pp.63-78.
99. Ebert, Benjamin L. and Bunn, H. Franklin. Regulation of the Erythropoietin Gene. *Blood* 15-9-1999;94(6):1864.
100. Yin, H. and Blanchard, K. L. DNA Methylation Represses the Expression of the Human Erythropoietin Gene by Two Different Mechanisms. *Blood* 1-1-2000;95(1):111-9.
101. Gleadle, J. M., Ebert, B. L., Firth, J. D., and Ratcliffe, P. J. Regulation of Angiogenic Growth Factor Expression by Hypoxia, Transition Metals, and Chelating Agents. *Am J Physiol* 1995;268(6 Pt 1):C1362-C1368.
102. Zhong, H. and Simons, J. W. Direct Comparison of GAPDH, Beta-Actin, Cyclophilin, and 28S RRNA As Internal Standards for Quantifying RNA Levels Under Hypoxia. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 16-6-1999;259(3):523-6.
103. Goidin, D., Mamessier, A., Staquet, M. J., Schmitt, D., and Berthier-Vergnes, O. Ribosomal 18S RNA Prevails Over Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and Beta-Actin Genes As Internal Standard for Quantitative Comparison of mRNA Levels in Invasive and Noninvasive Human Melanoma Cell Subpopulations. *Anal.Biochem.* 1-8-2001;295(1):17-21.
104. de Leeuw, W. J., Slagboom, P. E., and Vijg, J. Quantitative Comparison of mRNA Levels in Mammalian Tissues: 28S Ribosomal RNA Level As an Accurate Internal Control. *Nucleic Acids Res.* 11-12-1989;17(23):10137-8.
105. Bhatia, P., Taylor, W. R., Greenberg, A. H., and Wright, J. A. Comparison of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and 28S-Ribosomal RNA Gene Expression As RNA Loading Controls for Northern Blot Analysis of Cell Lines of Varying Malignant Potential. *Anal.Biochem.* 1994;216(1):223-6.
106. Veech, R. L., Lawson, J. W., Cornell, N. W., and Krebs, H. A. Cytosolic Phosphorylation Potential. *J Biol.Chem.* 25-7-1979;254(14):6538-47.
107. Hoffman, J. L. The Rate of Transmethylation in Mouse Liver As Measured by Trapping S-Adenosylhomocysteine. *Arch.Biochem.Biophys.* 1980;205(1):132-5.

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich meinen Betreuerinnen PD Dr. Doris Kloor und Dipl.-Biol. Marina Hermes für ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und Geduld danken. Ohne sie wäre mir eine so schnelle Einarbeitung und Durchführung meiner Arbeit nicht möglich gewesen und hätte mir weit weniger Freude bereitet. Auch für die Vergabe des interessanten Themas bedanke ich mich sehr.

Ein ganz großer Dank geht an Renate Riehle, die mir in allen „Notsituationen“ ausgeholfen hat, immer für ein nettes Schwätzchen zu haben ist und im Labor eine sehr heimelige Atmosphäre verbreitet.

Herrn Prof. Dr. H. Oßwald danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die guten Arbeitsbedingungen im Institut.

Bei Julia Kirschler, Eva Hätschel, Sandra von Hippel, Benjamin Roll und Martina Tete bedanke ich mich für die fröhliche Labor-Atmosphäre.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Florian Thulmann, der mir bei meinen Schwierigkeiten am Computer stets zur Seite stand und mich immer wieder motivieren konnte.

Außerdem bedanke ich mich bei Sandra Haug, die mir bereitwillig ihren Computer zur Verfügung gestellt hat, um diese Arbeit schreiben zu können.

Bei meinen Eltern und Schwestern bedanke ich mich für ihre liebevolle Unterstützung und Motivation.

## Curriculum vitae

**Name:** M a t t a r , Julia  
**Adresse:** Hochstr. 145, 56070 Koblenz  
**Geburtsort:** Koblenz  
**Geburtstag:** 13. November 1979  
**Familienstand:** ledig  
**Nationalität:** deutsch

**Ausbildung:** 1986 – 1990: Grundschule, Koblenz  
1990 – 1999: Görres-Gymnasium, Koblenz  
1999 – 2001: Studium der Medizin, Universität des Saarlandes, davon  
2000 – 2001: zwei Semester Auslandsstudium in Großbritannien, University of Leicester  
2001 – 2006: Studium der Medizin, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

**Prüfungen:** 17. 06. 1999: Abitur  
07. 09. 2001: Ärztliche Vorprüfung  
29. 08. 2002: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04. 04. 2005: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
09. 05. 2006: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

---

Julia Mattar