

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität Tübingen  
Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie  
Leiter: Professor Dr. H. Oßwald

**Lokalisation und Expression der  
S-Adenosylhomocystein-Hydrolase und des Adenosin-  
A<sub>1</sub>-Rezeptors in der Rattenniere unter Kontroll- und  
pathologischen Bedingungen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Jan Benjamin Roll  
aus  
Schwäbisch Gmünd  
2008

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. D. Kloor

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. H. Schmid

Meiner Familie

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Das Enzym S-Adenosylhomocystein-Hydrolase .....	1
1.2	Adenosin und Adenosinrezeptoren .....	6
1.3	Eigene Fragestellung .....	14
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
2.1	Untersuchungsgut.....	16
2.2	Tiermodelle .....	16
2.2.1	Modell der diabetischen Nephropathie (Experimenteller Diabetes mellitus).....	16
2.2.2	Modell der hypoxischen Nephropathie (Experimentelle systemische Hypoxie).....	17
2.2.3	Modell der Puromycin-Aminonukleosid-Nephrose (PAN; Experimentelle Glomerulonephritis).....	17
2.3	Organentnahme .....	18
2.4	Immunhistochemie .....	19
2.4.1	Färbung .....	19
2.4.2	Mikroskopie, Fotografie und Bildbearbeitung.....	23
2.5	Quantitative Analyse der Adeninnukleoside mittels HPLC .....	24
2.5.1	Gewinnung des Nierenextraktes und Aufarbeitung der Proben für die HPLC .....	25
2.5.2	Festphasenextraktion.....	26
2.5.3	HPLC-Analyse .....	27
2.6	Genexpressionsanalyse durch real-time-RT-PCR .....	29
2.6.1	RNA-Isolation.....	30
2.6.2	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration .....	30
2.6.3	Reverse Transkription.....	31
2.6.4	Real-time quantitative PCR-Analyse.....	31
2.7	Proteinbiochemische Untersuchung.....	36
2.7.1	Extraktion zytosolischer Proteine .....	36
2.7.2	Extraktion der Membranproteine.....	36

2.7.3	Proteinbestimmung .....	37
2.7.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	38
2.7.5	Western Blot .....	40
2.7.6	Photometrische Bestimmung der SAH-Hydrolase-Aktivität.....	41
2.8	Statistik .....	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
3.1	Nierengewicht .....	45
3.2	Proteinausscheidung im Urin .....	45
3.3	Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase .....	46
3.3.1	Lokalisation der SAH-Hydrolase unter physiologischen Bedingungen in der Niere der adulten Ratte .....	46
3.3.2	Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der adulten Ratte unter experimentell induziertem insulinabhängigen Diabetes mellitus (IDDM) .....	51
3.3.3	Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der adulten Ratte unter experimenteller systemischer Hypoxie .....	53
3.3.4	Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der adulten Ratte mit Puromycin-Aminonukleosid-Nephrose (PAN) .....	55
3.4	Immunhistochemische Lokalisation des Adenosin-A <sub>1</sub> -Rezeptors.....	59
3.4.1	Lokalisation des Adenosin-A <sub>1</sub> -Rezeptors unter physiologischen Bedingungen in der Niere der adulten Ratte .....	59
3.4.2	Lokalisation des Adenosin-A <sub>1</sub> -Rezeptors in der Niere der adulten Ratte unter experimentell induziertem insulinabhängigen Diabetes mellitus (IDDM) .....	62
3.4.3	Lokalisation des Adenosin-A <sub>1</sub> -Rezeptors in der Niere der adulten Ratte unter experimenteller systemischer Hypoxie .....	64
3.4.4	Lokalisation des Adenosin-A <sub>1</sub> -Rezeptors in der Niere der adulten Ratte mit Puromycin-Aminonukleosid-Nephrose (PAN).....	66
3.5	Quantitative Analyse der Adeninnukleoside und Bestimmung des Methylierungspotentials (MP).....	69
3.6	Bestimmung der Expression des SAH-Hydrolase-Gens und des Adenosin-A <sub>1</sub> -Rezeptor-Gens auf mRNA-Ebene.....	70

3.7	Bestimmung der Proteinexpression der SAH-Hydrolase und des Adenosin-A <sub>1</sub> -Rezeptors.....	72
3.7.1	Western-Blot-Analyse der SAH-Hydrolase .....	72
3.7.2	Western-Blot-Analyse des Adenosin-A <sub>1</sub> -Rezeptors .....	74
3.8	Aktivitätsbestimmung der SAH-Hydrolase .....	75
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>76</b>
4.1	Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase.....	77
4.2	Immunhistochemische Lokalisation des Adenosin-A <sub>1</sub> -Rezeptors.....	84
4.3	Quantitative Analyse der Adeninnukleoside und Bestimmung des Methylierungspotentials (MP).....	87
4.4	Bestimmung der Expression des SAH-Hydrolase-Gens und des Adenosin-A <sub>1</sub> -Rezeptor-Gens auf mRNA-Ebene.....	88
4.5	Bestimmung der Proteinexpression der SAH-Hydrolase und des Adenosin-A <sub>1</sub> -Rezeptors sowie Aktivitätsbestimmung der SAH-Hydrolase.....	90
4.6	Schlussfolgerung .....	92
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>113</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	113
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	118
7.3	Tabellenverzeichnis .....	121
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>122</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>124</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Das Enzym S-Adenosylhomocystein-Hydrolase

Die S-Adenosylhomocystein-(SAH)-Hydrolase (EC-Nummer: 3.3.1.1) wurde erstmals im Jahre 1959 von de la Haba und Cantoni in der Rattenleber als zytoplasmatisches Enzym beschrieben [43]. Sie katalysiert die reversible Thioetherbildung von S-Adenosylhomocystein (SAH) aus Adenosin und Homocystein. Das thermodynamische Gleichgewicht dieser Reaktion liegt in vitro deutlich auf Seite der Synthese, was in der Gleichgewichtskonstanten von  $K_{eq} = 10^{-6}$  M zum Ausdruck kommt. Jedoch wird unter physiologischen Bedingungen die Hydrolyse favorisiert, da die beiden Reaktionsprodukte Adenosin und Homocystein schnell und wirkungsvoll aus dem Gleichgewicht entfernt werden [28]. Im Säugetierorganismus liegt das Enzym in tetramerer Form vor, wobei jede Untereinheit als Koenzym ein Molekül  $NAD^+$  in fester Bindung enthält, das direkt an der katalytischen Wirkung des Apoenzyms beteiligt ist [110].

Die molekulare Gesamtmasse ist in der Literatur recht einheitlich mit 188000 bis 190000 Da angegeben. Für die Untereinheiten sind je nach Spezies diskrete Unterschiede beschrieben: so zum Beispiel in der Rattenleber 47000 Da [56], beim Menschen 47660 Da [38] und in der Rinderniere 47500 Da [75]. Die SAH-Hydrolase ist ein in der Evolution sehr gut konserviertes Enzym. So stimmen die Moleküle von Mensch und Ratte in ihrer Aminosäuresequenz zu 97 % überein [38]. Die Tatsache, dass Mäuseembryos nach Ausschaltung des SAH-Hydrolase-Gens versterben, zeigt die existenzielle Bedeutung des Enzyms für den Organismus [94]. Beim Menschen ist eine SAH-Hydrolase-Defizienz beschrieben [8, 9, 79], bei der es durch zwei Punktmutationen im SAH-Hydrolase-Gen zu einem starken Abfall der Enzymaktivität kommt. Leitsymptome dieser hereditären Stoffwechselerkrankung, die mit dem Leben vereinbar ist, sind eine retardierte psychomotorische Entwicklung im Kindesalter sowie multiple neurologische Auffälligkeiten. Ferner kommt es zu pathologischen Veränderungen in mehreren anderen Geweben und Organ-

systemen. Inzwischen wurde auch eine intranukleäre Lokalisation der SAH-Hydrolase nachgewiesen [117], und zwar in transkriptionell aktiven Zellkernen des Afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*), wo es zu einer Kolokalisation der SAH-Hydrolase mit der RNA-Polymerase II kommt. Dabei wird der SAH-Hydrolase eine entscheidende Rolle bei der Methylierungsreaktion der Kopfgruppe (Cap-Struktur) am 5'-Ende der mRNA zugeschrieben.

Die Bedeutung der SAH-Hydrolase erklärt sich aus ihrer zentralen Position im Intermediärstoffwechsel, die eine Verbindung zwischen dem Energie-, Methylierungs-, Transsulfurierungs- und Purinstoffwechsel herstellt (Abb. 1).

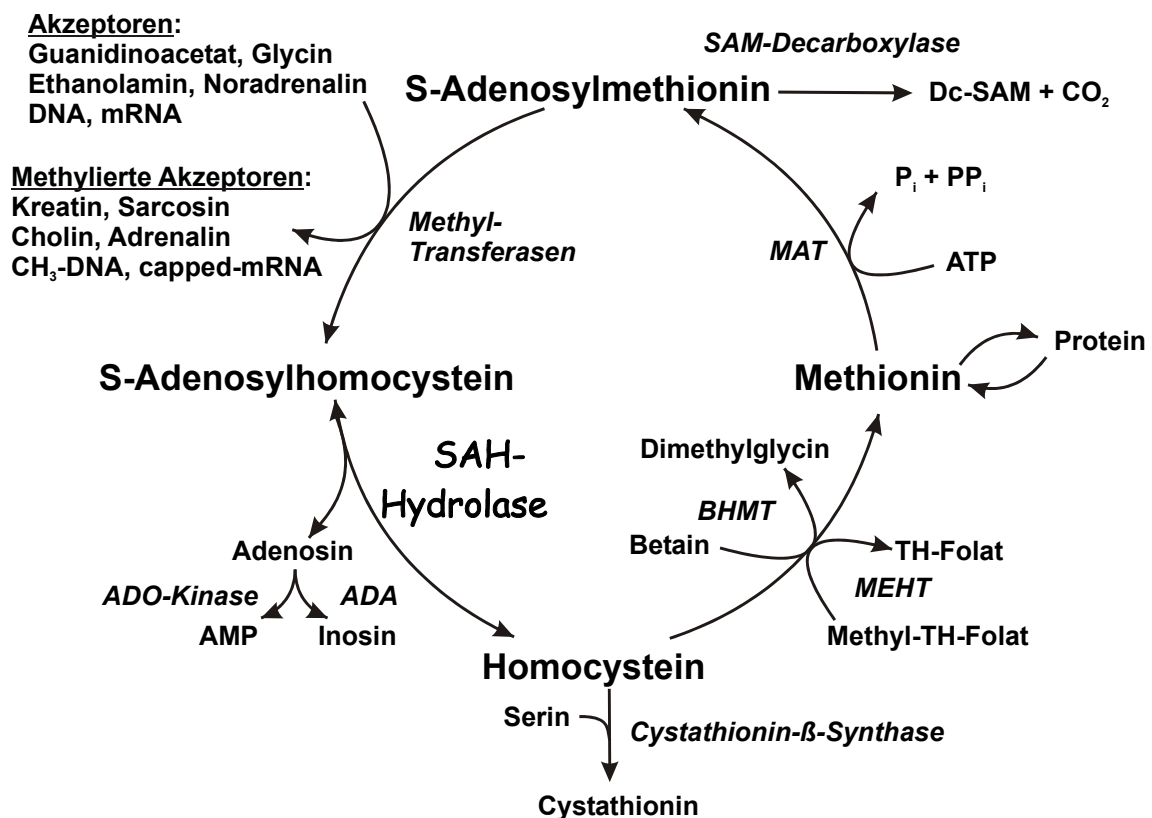


Abb. 1 Stellung der SAH-Hydrolase im Intermediärstoffwechsel (modifiziert nach Kloor).  
METH - 5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein-S-Methyltransferase; BHMT - Betain-Homocystein-S-Methyltransferase; MAT - Methionin-Adenosyl-Transferase; ADA - Adenosindesaminase



Das Substrat der SAH-Hydrolase, S-Adenosylhomocystein (SAH), entsteht im Organismus neben dem methylierten Reaktionsprodukt in S-Adenosylmethionin-(SAM)-abhängigen Methylierungsreaktionen [27]. Der Abbau durch die Hydrolase ist der bislang einzige bekannte Stoffwechselweg, über den das SAH in Vertebraten metabolisiert wird [50]. Seine Akkumulation führt sowohl in vitro [39] als auch in vivo [122] zu einer Produkthemmung vieler SAM-abhängiger Methyltransferasen im Sinne einer negativen Rückkopplung. Daher ist ein effektiver Abbau des entstehenden SAHs Grundvoraussetzung für einen effizienten Ablauf von Methylierungsreaktionen [68].

SAM wird enzymatisch aus Methionin und ATP synthetisiert [26]. Ihm kommt im Säugetierorganismus eine essentielle Bedeutung als Methylgruppendonator in den meisten Methylierungsreaktionen zu, während 5-Tetrahydrofolsäure, Methylcobalamin und Betain nur in wenigen Fällen als solcher fungieren. Darüber hinaus ist SAM der einzige Propylamingruppendonator und ist dadurch entscheidend an der Biosynthese der Polyamine beteiligt, die bedeutend sind für das zelluläre Wachstum und die zelluläre Differenzierung [29]. Das Diamin Putrescin bildet die Vorstufe der Polyamine Spermin und Spermidin, die in allen Geweben vorkommen und ihre Bezeichnung nach dem reichlichen Auftreten in der Spermaflüssigkeit erhalten haben. Bei der Biosynthese der Polyamine kondensiert Putrescin mit decarboxyliertem SAM, von dem es den Propylaminrest übernimmt, zu Spermidin. Durch Ankoppelung eines weiteren Propylaminrestes entsteht Spermin [86].

Biologische (Trans-)Methylierungen spielen bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse eine wichtige Rolle. Neben DNA, RNA und Proteinen werden auch Phospholipide sowie niedermolekulare Substanzen, wie z. B. Glycin, Noradrenalin und Guanidinoacetat, methyliert. Die DNA-Methylierung ist im Säugetierorganismus essentiell für die Regulation der Genaktivität und der Zelldifferenzierung [32]. Die Methylierung beeinflusst die Wechselwirkung der DNA mit Proteinen und kann so unter anderem die Bindungsfähigkeit für Transkriptionsfaktoren, Restriktionsenzyme und Steroidhormonrezeptoren verändern [23]. In Tumorzellen wird eine aberrante DNA-Methylierung beobachtet [135]. Nach Integration von Virusgenomen in die Chromosomen

eukaryontischer Wirtszellen gibt es eine Korrelation zwischen dem Methylierungsmuster und der Transkriptionsrate. Des Weiteren könnte eine Beziehung zwischen der Viruslatenz und der DNA-Methylierung bestehen [32]. Während die Methylierung der rRNA eine wichtige Rolle bei deren Reifung spielt [25], kann die posttranskriptionelle Methylierung der tRNA deren Resistenz gegenüber enzymatischem Verdau erhöhen [83]. Die Methylierung der Kopfgruppe (Cap-Struktur) am 5'-Ende der mRNA schützt diese ebenfalls vor Degradation und ist entscheidend beteiligt an deren Transport aus dem Zellkern, einer effizienten Translation sowie dem Spleißvorgang [118]. Ebenfalls durch Methylierungen modifiziert werden Proteine, die an der bakteriellen Chemotaxis beteiligt sind [133], sowie Signaltransduktionsproteine in eukaryontischen Zellen, wie z. B. G-Proteine und cGMP-Phosphodiesterasen [3]. Die Methylierung von Lysinresten in Histonen korreliert mit der transkriptionellen Aktivität [48]. Darüber hinaus ist die Carboxymethylierung von D-Aspartat- und L-Isoaspartat-Gruppen, die bei der spontanen Degradation im Alterungsprozess von Proteinen entstehen, für die Reparatur dieser alternden Eiweiße von Bedeutung [36]. Lange wurde der Phospholipid-Methylierung ein Einfluss auf die Viskosität der Zellmembran, die Adenylatzyklase-Aktivierung, den Kalziumtransport sowie die Signaltransduktion zugeschrieben [67], doch mittlerweile wird eher davon ausgegangen, dass es sich hierbei nur um eine alternative Synthesemöglichkeit neben der Bildung von Phosphatidylcholin aus CDP-Cholin handelt [96, 144].

Der von Cantoni und Chiang (1980) [28] formulierte Quotient aus SAM und SAH, auch Methylierungspotential (MP) genannt, gilt als sensitiver Indikator für die Methylierungsaktivität innerhalb eines Gewebes bzw. einer Zelle. Je kleiner der Quotient, desto weniger Methylgruppenübertragungen finden statt.

Da also indirekt über eine Inhibition der SAH-Hydrolase auch eine Hemmung der Methylierungsreaktionen erreicht werden kann, ist das Enzym pharmakologisch von großem Interesse. Hinsichtlich der Therapie und teilweise auch der Prophylaxe von Virus-, Autoimmun- und allergischen Erkrankungen werden große Hoffnungen mit der Entwicklung von neuen und gut verträglichen SAH-Hydrolase-Inhibitoren verbunden. Seit die SAH-Hydrolase als Zielstruktur

für antivirale Agenzien erkannt worden ist [95], wurde eine Vielzahl von Adenosin-Analoga und –Derivaten mit breiter antiviraler Aktivität durch eine Inhibition der SAH-Hydrolase beschrieben [41, 42].

Nicht nur die Virusreplikation in Wirtszellen, sondern auch die effiziente Aktivierung und Funktion von Lymphozyten hängt ganz entscheidend von Transmethylierungen ab [58]. Fu et al. (2006) [55] zeigten für den reversiblen SAH-Hydrolase-Inhibitor DZ2002 (Methyl-4-(Adenin-9-yl)-2-Hydroxybutanoat), dass er die Antigen-induzierte spezifische Immunantwort, insbesondere die durch T-Helfer-Zellen vom Typ 1 (TH1) vermittelten Reaktionen, zu unterdrücken vermag. Die Applikation der Substanz bei Mäusen mit experimenteller autoimmuner Enzephalitis (EAE), einem Tiermodell für die menschliche Multiple Sklerose (MS), führte zu einer signifikanten Verminderung der Häufigkeit und Schwere der entzündlichen Schübe, bedingt durch eine Hemmung der T-Zell-Proliferation und der Zytokinproduktion durch TH1-Zellen. Diese Ergebnisse deuten eine Einsetzbarkeit des Hemmstoffs in der Therapie der MS und anderen TH1 vermittelten entzündlichen Erkrankungen an.

Wu et al. (2005) [149] postulieren für DZ2002 darüber hinaus noch eine suppressive Wirkung auf Makrophagen und B-Lymphozyten, da sie in vitro neben einer herabgesetzten Produktion von Interleukin-12 und TNF  $\alpha$  auch eine Verminderung sowohl der zellulären als auch der humoralen Immunantwort nachweisen konnten. In vivo beobachteten sie bei Mäusen eine reduzierte Antikörperproduktion und eine Hemmung von Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ.

Die Verteilung der SAH-Hydrolase in verschiedenen Geweben der Ratte wurde von Eloranta (1977) [49] untersucht. Die höchste Enzymaktivität wurde in der Leber und im Pankreas gemessen. Die Niere enthält ebenfalls große Mengen des Enzyms; die Aktivität lag hier bei 40 % der Werte für Leber und Pankreas. Mittlere Werte fanden sich im Gehirn und eine niedrige Enzymaktivität im Herzen, im Hoden, im Muskel, der Prostata, der Milz und der Lunge [49, 51].

Eine differenziertere Untersuchung zur Verteilung der SAH-Hydrolase in der Rattenniere durch Kloor et al. (2000) [76] machte dort ein ubiquitäres Vorkommen deutlich. Die Enzymaktivität ist in den Glomerula um den

Faktor 1,5 gegenüber den Werten in den Tubuli erhöht. Mit Hilfe der Immunhistochemie konnte das Enzym in den Endothelzellen, Mesangiumzellen und Podozyten der Glomerula lokalisiert werden. Dabei zeigte sich in den Podozyten eine besonders intensive Färbung.

## **1.2 Adenosin und Adenosinrezeptoren**

Bei der Hydrolyse von SAH durch die SAH-Hydrolase entstehen Homocystein und Adenosin.

Homocystein ist eine schwefelhaltige, nichtproteinogene Aminosäure, die einerseits in den Transsulfurierungsstoffwechselweg einmünden und durch die Cystathionin- $\beta$ -Synthase zu Cystathionin metabolisiert oder andererseits über eine Remethylierung durch 5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein-S-Methyltransferase oder Betain-Homocystein-S-Methyltransferase zu Methionin umgesetzt werden kann (Abb. 1) [57]. Es kann auch in den Extrazellulärraum abgegeben werden. Das Plasmahomocystein wird vorwiegend über die Niere eliminiert; hauptsächlich durch Verstoffwechslung, aber auch durch Exkretion im Urin [145]. Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz wird regelmäßig eine Hyperhomocysteinämie beobachtet [114]. Dies ist nicht auf eine verminderte Ausscheidung mit dem Urin, sondern auf einen verlangsamten Homocysteinstoffwechsel zurückzuführen. Erhöhte Plasmaspiegel können auch bedingt durch eine herabgesetzte Enzymaktivität von im Homocysteinstoffwechsel beteiligten Enzymen als Folge von Vitaminmangel oder von Genmutationen, vorwiegend im Cystathionin- $\beta$ -Synthase- oder 5, 10-Methylen-tetrahydrofolat-Reduktase-Gen, auftreten [17, 127]. Eine Erhöhung des Homocysteinspiegels wird als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen angesehen [60, 104]. Darüber hinaus wird eine Hyperhomocysteinämie mit der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht [92] und bei Parkinsonpatienten unter Langzeittherapie mit L-Dopa gefunden [98].

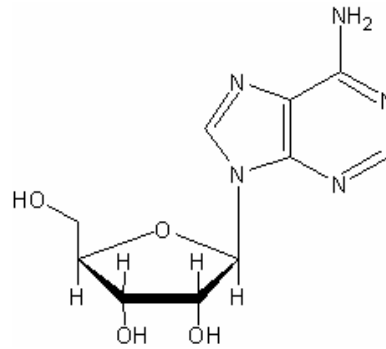


Abb. 2 Strukturformel des Adenosins (modifiziert nach Löffler und Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, 6. Auflage, 1998 [86])

Das Purinnukleosid Adenosin (Abb. 2) entsteht neben der Hydrolyse von SAH auch aus intra- und extrazellulär abgebauten Adeninnukleotiden, nämlich aus ATP, AMP und cAMP [143]. Da Adeninnukleotide ubiquitär vorkommen, sind alle Zellen eines Organismus potentielle Adenosinquellen [134]. Im Zytosol gebildetes Adenosin kann die Zellmembran mit Hilfe eines Nukleosidtransporters überqueren und ins Interstitium austreten [6]. Bei hohem Energiebedarf, wenn der ATP/ADP-Quotient, auch Phosphorylierungspotential genannt, in der Zelle abfällt, steigt der 5'-AMP-Spiegel an. Nach Dephosphorylierung des 5'-AMP durch eine 5'-Nukleotidase entsteht Adenosin. Somit ist die Adenosinproduktion direkt mit dem ATP/ADP-Zyklus als der fundamentalen Reaktionsfolge des Energiestoffwechsels verbunden. Das gebildete Adenosin kann entweder durch die Adenosindesaminase (ADA) zu Inosin, aus dem letztlich Harnsäure gebildet wird, desaminiert oder durch die Adenosinkinase (AK) wiederum zu AMP phosphoryliert werden (Abb. 3) [52].

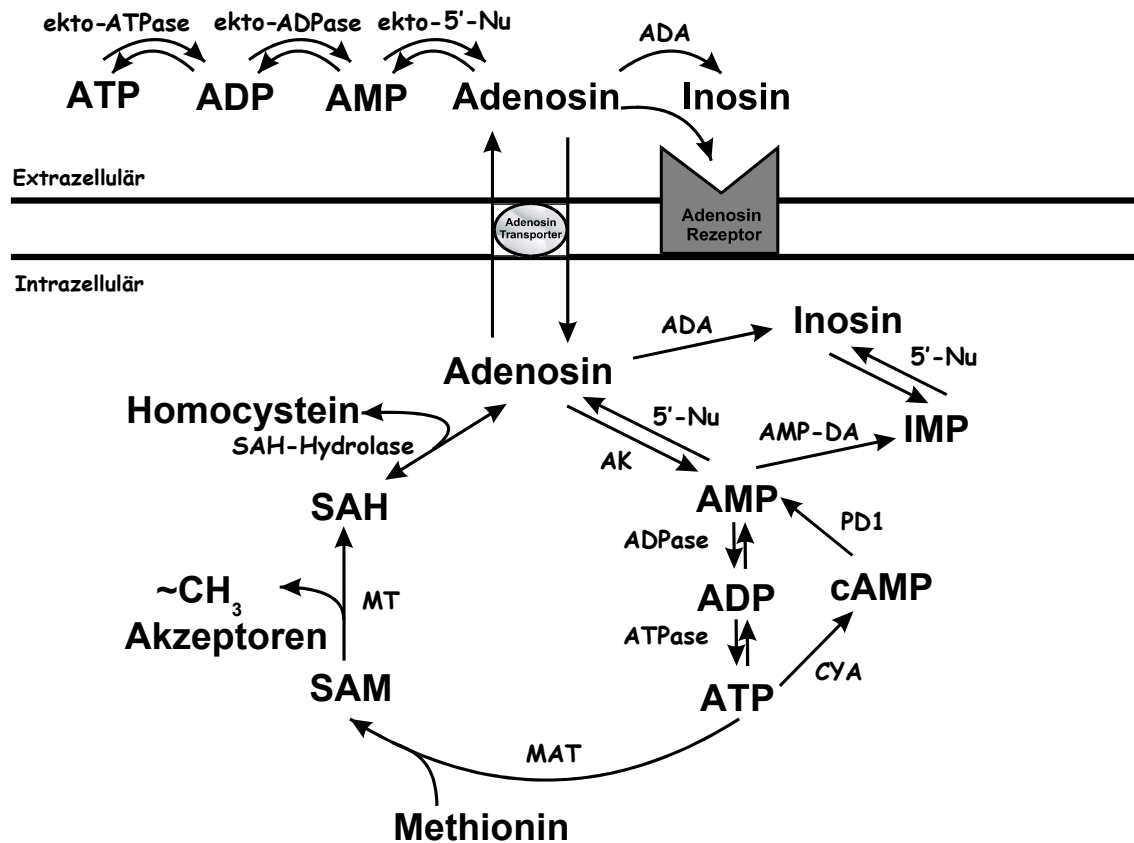


Abb. 3 Schematische Darstellung der Regulation der extra- und intrazellulären Adenosinkonzentrationen (modifiziert nach Kloor).  
 ADA: Adenosindesaminase; SAH-Hydrolase: S-Adenosylhomocystein-Hydrolase; AK: Adenosinkinase; AMP-DA: AMP-Desaminase; CYA: Adenylatzyklase; MAT: Methionin-Adenosyl-Transferase, MT: Methyltransferasen; 5'-Nu: 5'-Nukleotidase; PD1: Phosphodiesterase 1

Adenosin ist kein Neurotransmitter im eigentlichen Sinne, sondern ein sogenannter Autakoid, der seine biologische Aktivität parakrin, also nur in unmittelbarer Umgebung der sezernierenden Zelle, entfaltet. Hierzu passt auch seine sehr kurze Plasmahalbwertszeit von ein bis drei Sekunden.

Der Adenosingewebsgehalt der Rattenniere liegt unter normoxischen Bedingungen bei 5 nmol pro g Feuchtgewicht (FG) [107]. Das bedeutet, dass die Adenosinkonzentration in der Niere 5 - 6.25  $\mu\text{M}$  beträgt. Geht man von einem Anteil des Extrazellulär-raumes am Gesamtvolumen der Niere von 20 % aus, dann beliefe sich die Adenosinkonzentration in diesem Kompartiment auf etwa 25 - 30  $\mu\text{M}$ , einen Wert, der mindestens hundertfach über der hämodynamisch wirksamen Konzentration liegt [59]. Daraus kann geschlossen

werden, dass der größte Teil des Adenosins intrazellulär an Protein gebunden vorliegt. Das wichtigste bisher bekannte Adenosin-bindende Protein ist die SAH-Hydrolase, der somit eine weitere wichtige Funktion in der Sequestration des Adenosins zukommt [75, 141]. Neben der Sequestration führt die Adenosinbindung an die SAH-Hydrolase zu einer Hemmung der Enzymaktivität. Das intrazelluläre Adenosin ist also auch an der physiologischen Regulation der Enzymaktivität der SAH-Hydrolase beteiligt [78].

Die Adenosinwirkung wird über membranständige, G-Protein-gekoppelte Adenosinrezeptoren vermittelt. Bislang sind vier verschiedene Rezeptorsubtypen bekannt:  $A_1$ ,  $A_{2a}$ ,  $A_{2b}$  und  $A_3$ . Der  $A_1$ -Rezeptor ist ein integrales Membranprotein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 37 kDa und sieben Transmembrandomänen. Er ist in erster Linie an Pertussis-Toxin sensitive  $G_i$ - und  $G_o$ -Proteine gekoppelt, die die Adenylatzyklase hemmen und die Phospholipase C aktivieren. Hingegen führt die Stimulation von  $A_{2a}$ - und  $A_{2b}$ -Rezeptoren über Cholera-Toxin-sensitive  $G_s$ -Proteine zur Aktivierung der Adenylatzyklase. Die Signaltransduktionskaskade des  $A_3$ -Rezeptors scheint in ähnlicher Weise wie beim  $A_1$ -Rezeptor über inhibitorische  $G_{q/11}$ -Proteine zur Adenylatzyklase und zur Phospholipase C abzulaufen [54, 143].

Dem in den Extrazellulärraum freigesetzten Adenosin kommt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Organfunktion zu. So führt es im Gehirn durch Inhibition der Neurotransmitterfreisetzung zur Sedierung [53] und im Blut zur Hemmung der Thrombozytenaggregation [63]. Am Herzen und im Gefäßbett vieler anderer Organe bewirkt Adenosin eine Vasodilatation [61]. So kann nach dem Prinzip der metabolischen Kontrolle der Organfunktion die Sauerstoffversorgung im jeweiligen Gewebe dem Sauerstoffbedarf angepasst werden, da bei gesteigerter Arbeit und gesteigertem Energieverbrauch auch vermehrt Adenosin gebildet wird [13, 103]. Die Niere unterscheidet sich in der hämodynamischen Wirkung des Nukleosids von allen anderen Organen, da es hier an den afferenten Arteriolen der Glomerula eine Vasokonstriktion und somit eine Reduktion des renalen Blutflusses (RBF) und der glomerulären Filtrationsrate (GFR) vermittelt [106, 139]. Das Prinzip der metabolischen Kontrolle ist aber auch hier gewahrt, da der weitaus größte Teil des renalen

Sauerstoff- und Energieverbrauchs der Reabsorption des Natriums geschuldet ist. Dessen tubuläre Konzentration entscheidet also über die Höhe der von der Niere zu leistenden Arbeit. Mit einer erhöhten Durchblutung steigt auch die glomeruläre Filtration und damit die Zufuhr von Natrium ins tubuläre System. Die erhöhte Tubulusbeladung mit Natrium sowie dessen vermehrte Rückresorption haben zur Folge, dass das Phosphorylierungspotential in der Zelle abfällt und der Adenosinspiegel entsprechend ansteigt. Das gebildete Adenosin bewirkt eine präglomeruläre Vasokonstriktion und eine Absenkung der GFR [108, 132].

Entsprechend den mannigfaltigen Wirkungen des Adenosins im ganzen Körper findet man auch ein über den gesamten Säugerorganismus verteiltes Expressionsmuster der Rezeptorsubtypen [61]. Über die Lokalisation und Funktion des  $A_3$ -Rezeptors existieren bislang am wenigsten Daten. In der Nierenphysiologie scheint er nur von untergeordneter Bedeutung zu sein. Ihm wird allgemein eine wichtige Rolle für das Überleben von Zellen zugeschrieben, indem, abhängig von den pathophysiologischen Bedingungen und der Ligandenkonzentration, über seine Stimulation entweder die Zytoprotektion oder der Zelltod durch Apoptoseinduktion gefördert wird [71]. Die beschriebene Vasodilatation wird generell, also auch in der Niere, über  $A_2$ -Rezeptoren vermittelt, die in den Gefäßwänden gegenüber den anderen Subtypen an Zahl dominieren. Die Vasokonstriktion in der afferenten Arteriole der Glomerula in der Niere ist hingegen auf eine Aktivierung von  $A_1$ -Rezeptoren zurückzuführen, die hier sehr zahlreich vorkommen [61, 70]. Unter physiologischen Bedingungen verursacht endogenes Adenosin über  $A_1$ -Rezeptoren auch eine tonische Stimulation der Reabsorptionsvorgänge im proximalen Tubulus [136]. Über eine Blockade dieser Rezeptoren durch die Methylxanthine Theophyllin und Koffein kann eine Natriuresis herbeigeführt werden [54]. Mäusen, bei denen das  $A_1$ -Rezeptorgen ausgeschaltet wurde, fehlt diese natriuretische Antwort auf die genannten Pharmaka [121]. Darüber hinaus wird mittlerweile davon ausgegangen, dass die tubuloglomeruläre Rückkopplung (tubuloglomeruläres Feedback, TGF) und die Reninsekretion über  $A_1$ -Rezeptoren vermittelt bzw. moduliert werden. Das anatomische Korrelat dieser beiden Vorgänge ist der



juxtaglomeruläre Apparate, die Kontaktzone des zum Gefäßpol seines eigenen Glomerulums zurückkehrenden dicken aufsteigenden Schenkels der Henle-Schleife (= Pars recta des distalen Tubulus). Zum juxtaglomerulären Apparat (JGA, Abb. 4) gehören spezialisierte Epithelzellen der Tubuluswand (Macula densa), extraglomeruläre Mesangiumzellen (Goormaghtigh-Zellen) sowie die Myozyten und Renin-produzierende granuläre Zellen (Polkissenzellen) der glomerulären Arteriolen [7, 124].

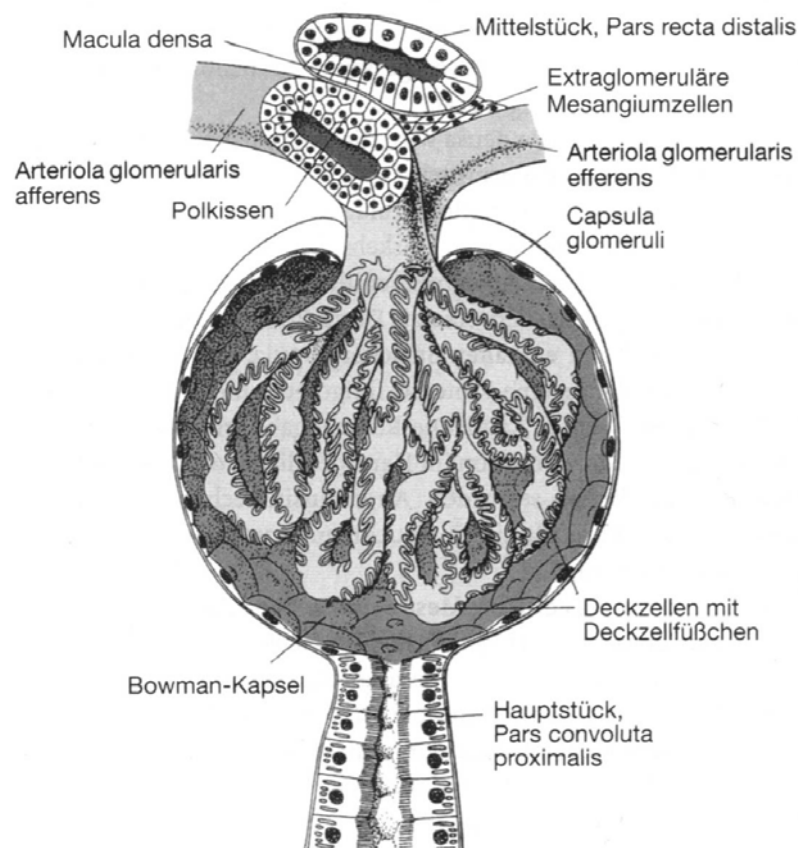


Abb. 4 Der juxtaglomeruläre Apparat (aus Schiebeler, Schmidt, Zilles, Anatomie, 8. Auflage, 1999 [123]).

Der TGF-Mechanismus ermöglicht eine Anpassung der GFR des zugehörigen Glomerulums an die NaCl-Konzentration, möglicherweise auch an die KCl-Konzentration, im distalen Tubulus über eine Konstriktion der afferenten Arteriole. Die NaCl-Konzentration wird in der Macula densa gemessen. Kommt

es dort zu einem Konzentrationsanstieg, so wird eine Vasokonstriktion in der afferenten Arteriole ausgelöst und dadurch die GFR des entsprechenden Glomerulums gesenkt [19, 119]. Durch diesen lokalen Autoregulationsmechanismus können die Flüssigkeits- und NaCl-Beladung des distalen Nephrons in bestimmten Grenzen konstant gehalten werden. Lange bestand Unklarheit darüber, wie die NaCl-Konzentrationserhöhung in der Macula densa in die Vasokonstriktion der afferenten Arteriole übersetzt wird. Es wurde eine parakrine Mediatorsubstanz gefordert, die über eine Konzentrationserhöhung im Interstitium des JGA die Funktion der Myozyten in der glatten Gefäßmuskulatur beeinflussen kann. Bereits 1982 wurde von Osswald et al. [109] Adenosin als solche vorgeschlagen, das über  $A_1$ -Rezeptoren seine Wirkung entfalten sollte. Diese Hypothese wird inzwischen durch solide experimentelle Erkenntnisse bestätigt. Unter anderem konnte mit dem selektiven  $A_1$ -Rezeptor-Antagonisten FK 838 in Mikroperfusionsversuchen mit JGA von Kaninchen *in vitro* die Gefäßantwort in der afferenten Arteriole komplett unterbunden werden [119]. Ferner wurde die Abhängigkeit des TGF von intakten  $A_1$ -Rezeptoren in unabhängigen Versuchen mit zwei verschiedenen Mausstämmen, bei denen jeweils das Rezeptorgen ausgeschaltet war (knockout-Mäuse), nachgewiesen, da in beiden Fällen die TGF-Antwort ausblieb [21, 134]. Offen bleibt die Frage nach dem exakten Ursprung des interstitiell aktiven Adenosins. Wahrscheinlich wird es in der Macula densa durch ATP-Abbau gebildet und über bidirektionale Nukleosid-Transporter nach extrazellulär befördert [124]. Alternativ oder auch zusätzlich könnte es erst extrazellulär aus freigesetztem ATP entstehen, worauf Ergebnisse von Thomson et al. (2000) [138], Bell et al. (2003) [10] und Komlosi et al. (2004) [81] hindeuten.

Eine Erhöhung der NaCl-Konzentration im Bereich der Macula densa bewirkt neben der Vasokonstriktion in der afferenten Arteriole auch eine Hemmung der Reninsekretion in den granulären Polkissenzellen in der Gefäßwand der efferenten Arteriole [129]. Neben Cyclooxygenase-2-abhängig gebildeten Prostanoiden [30] scheinen Adenosin und Adenosin- $A_1$ -Rezeptoren zentral in die Vorgänge involviert zu sein, die sich zwischen der Macula densa und den

Polkissenzellen abspielen [87]. Der inhibitorische Effekt von aktivierten  $A_1$ -Rezeptoren auf die Reninsekretion und im weiteren Sinne das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem und die Blutdruckregulation wurde *in vitro* und *in vivo* gezeigt, insofern als selektive  $A_1$ -Rezeptoragonisten die Reninsekretion unterdrücken und die pharmakologische Blockade des Rezeptors zu einer Stimulation derselben führt [2, 35]. In Versuchsansätzen, die mit erhöhten und erniedrigten NaCl-Konzentrationen an der Macula densa einhergehen, wurde ein jeweils inverses Verhalten der interstitiellen Adenosinkonzentration gemessen [128]. Versuche mit Mäusen, bei denen das  $A_1$ -Rezeptorgen ausgeschaltet wurde, deuten aber darauf hin, dass Adenosin nicht als Mediator der Reninsekretion, sondern vielmehr als Modulator dieses Prozesses fungiert, dem eine tonisch inhibitorische Funktion zukommt [21, 125]. Vallon et al. (2006) [143] bieten einen funktionellen Erklärungsansatz an, indem sie annehmen, dass cAMP, ein wichtiger intrazellulärer Stimulator der Reninfreisetzung aus Polkissenzellen, zum Teil aus diesen Zellen freigesetzt und extrazellulär in Adenosin umgewandelt werden könnte, das dann im Sinne einer negativen Rückkopplung kontrollierend oder bremsend wirkt.

Über die Lokalisation und Expression der verschiedenen Adenosin-Rezeptorsubtypen in der Niere gibt es eine Vielzahl von Studien und Veröffentlichungen. Die Datenlage in dieser Frage ist allerdings sehr heterogen. Häufig stimmen dabei die Ergebnisse aus funktionellen Untersuchungen, Untersuchungen auf mRNA- und Proteinebene nicht exakt überein. Somit kann aus einem positiven Befund in einem der genannten Bereiche nicht ohne weiteres auch ein solcher in den anderen abgeleitet werden. In einer aktuellen, systematisch angelegten Studie von Vitzthum et al. (2004) [148] wurde die Genexpression von Adenosinrezeptoren entlang des Nephrons in Mäusen und Ratten untersucht. In beiden Spezies fanden sich dabei sehr ähnliche Expressionsmuster. Entlang des Nephrons fand sich für den  $A_1$ -Rezeptor die stärkste Expression im dünnen Schenkel der Henle-Schleife, im Sammelrohrsystem und in einem geringeren Ausmaß im dicken aufsteigenden Schenkel. Auch am Gefäßpol des Glomerulums, höchstwahrscheinlich in der afferenten Arteriole, und in den Vasa recta des Nierenmarks war eine

signifikante Genexpression nachzuweisen.  $A_{2a}$ -Rezeptoren wurden in glomerulären Gefäßen und in den medullären Vasa recta exprimiert,  $A_{2b}$ -Rezeptoren vor allen Dingen im kortikalen dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife und im gewundenen Teil des distalen Tubulus, aber auch in den Vasa recta. Für  $A_3$ -Rezeptoren wurde in keinem Nierensegment mRNA nachgewiesen.

### 1.3 Eigene Fragestellung

Das zytoplasmatische Enzym SAH-Hydrolase nimmt eine zentrale Stellung im zytosolischen Metabolismus ein. Es stellt eine Verbindung zwischen Prozessen des Energie-, Transmethylierungs-, Transsulfurierungs- und Purinstoffwechsels her. Mit der pharmakologischen Beeinflussbarkeit der SAH-Hydrolase werden große Hoffnungen für die Therapie von Tumor-, Virus-, Autoimmun- und allergischen Erkrankungen verbunden. Untersuchungen auf Proteinebene zur Verteilung des Enzyms in der Rattenniere haben gezeigt, dass es dort zwar ubiquitär vorkommt, bedeutsame Mengen aber vor allem glomerulär in den Podozyten enthalten sind.

Der Adenosin- $A_1$ -Rezeptor ist ein integrales Membranprotein und gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. In der Niere vermittelt er die Vasokonstriktion in der glomerulären afferenten Arteriole im Rahmen der tubuloglomerulären Rückkopplung (tubuloglomerular feedback, TGF). Darüber hinaus wird ihm eine entscheidende Funktion in der Regulation der Reninsekretion im juxtaglomerulären Apparat (JGA) zugeschrieben. Die Datenlage über die Expression und Lokalisation des Adenosin- $A_1$ -Rezeptors in der Niere ist an manchen Stellen bisher recht uneinheitlich.

Vor diesem Hintergrund sollen in der vorliegenden Arbeit die Lokalisation und Expression des Enzyms und des Rezeptors in der Rattenniere untersucht sowie die Gewebsspiegel von SAH, SAM und Adenosin bestimmt werden. Neben Nieren von gesunden adulten Ratten werden auch solche mit verschiedenen experimentell induzierten pathologischen Zuständen untersucht, die als Tiermodelle für entsprechende Nephropathien beim Menschen herangezogen

werden können. Es soll die Frage geklärt werden, ob es im pathologisch veränderten Nierengewebe zu Veränderungen der Lokalisation und Expression der SAH-Hydrolase und des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors sowie des Methylierungspotentials (MP) kommt. Bei den Krankheitszuständen handelt es sich zum einen um Nieren nach vierwöchigem insulinpflichtigen Diabetes mellitus, zum anderen um Nieren nach vierstündiger systemischer Hypoxie und schließlich um Nieren nach drei- und elftägiger Puromycin-Aminonukleosid-Nephrose (PAN), die der fokal-sklerosierenden Glomerulonephritis des Menschen entspricht.

Angesichts dieser Fragestellung stehen folgende Themen im Mittelpunkt der Arbeit:

- Immunhistochemische Untersuchungen von Kryostatschnitten am konfokalen Laser-Scan-Mikroskop zur exakten Lokalisation beider Proteine in der Rattenniere. Dabei sollen dem reinen Fluoreszenzbild auch Transmissionsaufnahmen überlagert werden, um räumliche Beziehungen der Fluoreszenzsignale zu bestimmten Gewebsstrukturen genauer zuordnen und eine bessere Beurteilung des Gewebszustandes vornehmen zu können.
- Expressionsanalyse des SAH-Hydrolase- und Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptorgens mittels real-time-RT-PCR.
- Qualitative und quantitative Analyse der Genprodukte mittels Western Blotting.
- Quantitative Analyse der Gewebsspiegel der Metabolite SAM, SAH und Adenosin mittels HPLC. Daraus kann das MP bestimmt werden, das eine quantitative Aussage über die Methylierungsaktivität im untersuchten Gewebe ermöglicht.
- Spektralphotometrische Enzymaktivitätsbestimmung der SAH-Hydrolase mit Hilfe der MTT-Formazan-Methode.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Untersuchungsgut**

Als Untersuchungsgut dienten Nieren aus Ratten mit verschiedenen pathophysiologischen Zuständen sowie Nieren aus gesunden Ratten. Bei den Versuchstieren handelte es sich ausschließlich um männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles Rivers), deren Ausgangskörpergewicht zwischen 220 g und 250 g lag. Vor Versuchsbeginn verbrachten sie mindestens eine Woche unter Standardbedingungen als Akklimatisationsphase ungestört im Tierstall des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, bei freiem Zugang zu Futterpresslingen (Standard-Haltungsdiet 1320, Altromin) und Frischwasser. Alle Tierversuche wurden im Einklang mit den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Grundlage der Experimente war der Tierversuchsantrag mit der Versuchsnummer PH 5/01 vom 08.02.2001.

### **2.2 Tiermodelle**

Die im Folgenden dargestellten Tierversuche sowie die Organentnahme wurden von Frau PD Dr. rer. nat. Doris Kloor am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen durchgeführt.

#### **2.2.1 Modell der diabetischen Nephropathie (Experimenteller Diabetes mellitus)**

Der experimentelle insulinpflichtige Diabetes mellitus (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM) wurde durch intraperitoneale Applikation von 65 mg Streptozotocin (Sigma) pro kg Körpergewicht, gelöst in 0,1 M Natriumcitrat-Puffer (pH 6,2), induziert. Streptozotocin, ein Antibiotikum aus dem Pilz *Streptomyces achromogenes*, ist in der Lage,  $\beta$ -Zellen des Pankreas selektiv zu zerstören [11]. Die Überprüfung des Blutglukosespiegels erfolgte 3 Tage nach Streptozotocininjektion mit Hilfe von Haemo-Glukotest-Teststreifen (20-800 R,

Boehringer Mannheim) und eines Glukometers (Reflolux S, Boehringer Mannheim). Tiere mit einem Blutzuckerwert unter 200 mg/dl galten als nicht diabetisiert und wurden folglich nicht untersucht. Am Tage der Präparation wurde bei allen Tieren der Versuchsgruppe die Blutzuckermessung wiederholt. Untersucht wurden letztlich die Nieren von Tieren, die 4 Wochen lang mit diabetischer Stoffwechselsituation gehalten worden waren.

### **2.2.2 Modell der hypoxischen Nephropathie (Experimentelle systemische Hypoxie)**

Die Hypoxie wurde in einem speziellen Käfig mit 1200 ppm CO in der Atemluft erzeugt. Unter diesen Bedingungen wurden die Versuchstiere für 4 h gehalten, bevor die Nieren dann präpariert wurden. Die hohe Kohlenmonoxidkonzentration erzeugt bereits nach Ablauf von 4 h erhebliche Anpassungserscheinungen. Nach dieser Zeitspanne ist jedoch noch nicht mit einer Erhöhung des Organgewichts als Folge einer hydropischen Schwellung zu rechnen.

### **2.2.3 Modell der Puromycin-Aminonukleosid-Nephrose (PAN; Experimentelle Glomerulonephritis)**

Die experimentelle Glomerulonephritis, die morphologisch der fokalsklerosierenden Glomerulonephritis (syn.: fokale und segmentale Hyalinose und Sklerose) des Menschen sehr ähnlich ist [44], wurde bei den Ratten durch einmalige intraperitoneale Injektion von Puromycin-Aminonukleosid (Sigma) in einer Dosierung von 15 mg/kg Körpergewicht ausgelöst. 3 bzw. 11 Tage nach Applikation wurden die Nieren freipräpariert und entfernt. Einen Tag vor der Organentnahme wurden die Ratten jeweils für 24 h in einem Stoffwechselkäfig bei Standardfutter und Wasser ad libidum gehalten, um eine quantitative Aussage über den erfolgten glomerulären Schaden mit Hilfe der Messung des Urinvolumens und der quantitativen Bestimmung der Proteinausscheidung treffen zu können.

### 2.3 Organentnahme

Die Betäubung der Tiere erfolgte durch intraperitoneale Verabreichung von 90 mg/kg Körpergewicht Thiopental (Trapanal, Byk Gulden), einer Dosierung, durch die die Spontanatmung nicht beeinträchtigt wird. Nach dem vollständigen Wirkungseintritt des Narkotikums wurde die Peritonealhöhle durch einen Flankenschnitt eröffnet. Anschließend erfolgte die Mobilisation der rechten Niere aus dem retroperitonealen Fettgewebe; das freigelegte Organ wurde in eine Nierenschale aufgenommen. Das Operationsfeld wurde feucht abgedeckt und mit Parafilm überzogen, um den Feuchtigkeitsverlust zu vermindern. Während der Präparation war streng darauf zu achten, dass die Niere nicht verletzt und komprimiert wurde. Dem Organ wurde nun eine Äquilibrationsphase von 25 min eingeräumt. Der Organismus sollte sich in dieser Zeit von den Beeinträchtigungen des chirurgischen Eingriffes erholen und zu einem physiologischen, ausgeglichenen Stoffwechszustand zurückfinden. Um das Phänomen des raschen postmortalen Anstiegs bestimmter Metabolite bestmöglich beherrschen zu können, wurde die Niere direkt nach der Entnahme mit der Gefrierstoppmethode, wie sie erstmals von Osswald et al. (1977) [107] im Zusammenhang mit der Bestimmung des Adenosin Gehaltes der Rattenniere beschrieben wurde, konserviert. Dabei wurde das Organ unmittelbar nach dem Absetzen am Gefäßstiel zwischen den Branchen einer bei  $-196^{\circ}\text{C}$  im Stickstoffbad vorgekühlten Wollenberger-Zange auf 1 mm Durchmesser komprimiert und sofort bis zur weiteren Verarbeitung wiederum in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Kompression durch die Wollenberger-Zange bietet den entscheidenden Vorteil, dass bei einer Durchfrierungsgeschwindigkeit von etwa 1 mm/s die Zeit von der Entnahme bis zum vollständigen Einfrieren des Gewebes nur 3-5 s beträgt. So ermöglicht der Gefrierstopp eine Momentaufnahme des metabolischen Zustandes der Zellen.

Für die immunhistochemischen bzw. die proteinbiochemischen Untersuchungen wurde anschließend auch die linke Niere entfernt, mit einer Pinzette in ein Stickstoffbad überführt, dort schockgefroren, um die Gewebsstruktur zu erhalten, und schließlich bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.



Die Tiere verstarben in Narkose durch den massiven Blutverlust.

## **2.4 Immunhistochemie**

### **2.4.1 Färbung**

Von Frau Elke Zabinsky wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mit dem Mikrotom Kryostatschnitte der Nieren von  $10\ \mu\text{m}$  Dicke angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Es folgte eine 1-stündige Trocknungsphase bei Raumtemperatur (RT'). Anschließend wurden die Schnitte 10 min lang, wiederum bei RT', in Aceton fixiert und erneut 1 h luftgetrocknet. Mit einem Fettstift (Dako) wurde ein lipophiler Ring um jeden einzelnen Gewebsschnitt auf dem Objektträger gezogen, um einer Durchmischung der im weiteren Verlauf des Färbeprozesses aufgetragenen Lösungen vorzubeugen. Danach wurde jeder Objektträger drei Mal für jeweils 10 min in TBS-Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,6) gewaschen. Die durch unspezifische Anlagerung von Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörpern entstehende Hintergrundfärbung wurde durch 1-stündige Präinkubation mit in Antikörperpuffer (AP) (1 % BSA, 2,5 % Sucrose in TBS, pH 7,6) gelöstem 5%igem Normalserum (ausgewählt entsprechend der Herkunft des jeweils verwendeten Sekundärantikörpers) bei RT' in einer feuchten Kammer reduziert. Nach Abklopfen der Pufferlösung wurde nun im nächsten Schritt zum Zwecke der Doppelmarkierung ein Gemisch aus zwei Primärantikörpern in unterschiedlicher Verdünnung mit AP aufgetragen und für 16-18 h bei RT' in feuchter Kammer inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurden die Objektträger erneut drei Mal für je 10 min in TBS gewaschen. Da die immunhistochemischen Färbungen nach der 2-Schritt-indirekten Methode durchgeführt wurden, erfolgte nun die Inkubation mit einem Gemisch der entsprechenden Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper. Hierzu wurden eben diese in AP 1:100 oder 1:200 verdünnt, die Schnitte mit dieser Lösung beschickt und 1 h lang bei RT' in feuchter Kammer stehen gelassen. Daran schloss sich ein letzter Waschgang nach oben beschriebenem Muster an. Nach erneutem Abklopfen wurden die Schnitte dann im letzten Schritt mit je 2 Tropfen

Fluorsave (Callbiochem) überschichtet und vorsichtig ein Deckglas aufgelegt. Entscheidend beim Eindeckeln war, die Entstehung von Scherkräften und das Auftreten von Luftblasen möglichst gering zu halten. Nach weiteren 3 h Lagerung im Kühlschrank bei 8°C waren die Schnitte vollständig getrocknet. Sie konnten dann entweder sofort ausgewertet oder bei -80°C eingefroren bis zur Auswertung gelagert werden.

Das Hauptaugenmerk bei den immunhistochemischen Untersuchungen lag auf der Lokalisation der SAH-Hydrolase und des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors. Zur Färbung der SAH-Hydrolase wurde ein von Kloor et al. (2000) [76] selbst hergestellter polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen in einer Verdünnung von 1:50 in AP eingesetzt. Zur Detektion des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors diente ein ebenfalls polyklonaler Antikörper (Sigma, Produktnummer (PN): A-268) aus dem Kaninchen in einer Verdünnung von 1:100 in AP.

Zur genauen Zuordnung der gewonnenen Signale zu bestimmten Zelltypen in der Niere bzw. zu bestimmten subzellulären Strukturen wurden diese je nach Fragestellung mit einem zweiten oder in einzelnen Fällen auch einem dritten Fluoreszenzsignal spezifisch angefärbt, wodurch Koloalisationen sichtbar gemacht werden sollten. Die spezifische Markierung der Podozyten geschah zum einen mit einem monoklonalen Antikörper (Santa Cruz, PN: sc-7385) der Maus gegen Wilms-Tumor-Protein (WT1), einem Podozyten-spezifischen, nukleären Protein differenzierter und undifferenzierter Zellen [111], der die Zellkörper der Podozyten perinukleär anfärbt. Zum anderen konnten die Fußfortsätze mit einem monoklonalen Antikörper (Progen, PN: 65294) der Maus gegen Synaptopodin, einem zytoplasmatischen Aktin-assoziierten Protein der Podozytenfortsätze differenzierter Podozyten [100] markiert werden. Da nach Harris et al. (1994) [62] das in der Niere konstitutionell vorhandene Enzym Cyclooxygenase 2 (Cox-2) dort vorwiegend in den Zellen der Macula densa exprimiert wird, wurde diese Zellpopulation mit einem polyklonalen Antikörper (Santa Cruz, PN: sc-1746) der Ziege gegen die Cox-2 spezifisch angefärbt. Um Endothelzellen zu kennzeichnen, wurde ein polyklonaler Antikörper (Santa Cruz, PN: sc-8068) der Ziege gegen von-Willebrand-Faktor (vWF) verwendet.

Des Weiteren wurden auch bestimmte Abschnitte des Tubulussystems spezifisch markiert. Während Aquaporin 3 (AQP3) ausschließlich in der basolateralen Membran der Epithelzellen des Sammelrohrs lokalisiert ist [69], findet sich Aquaporin 1 (AQP1) in der luminalen Membran aller wasserpermeablen Abschnitte des renalen Tubulussystems. Zur Markierung des AQP3 wurde ein polyklonaler Antikörper der Ziege, zur Markierung des AQP1 ein polyklonaler Antikörper des Kaninchens eingesetzt (beide Santa Cruz, PN: sc-9885 bzw. sc-20810).

Im Zusammenhang mit der experimentellen Hypoxie wurde die Anfärbung von Erythropoietin (Epo) durchgeführt. Dabei wurde mit zwei verschiedenen polyklonalen anti-Epo Immunglobulinen der Klasse IgG gearbeitet. Zum einen war dies ein entsprechender Antikörper des Kaninchens, zum anderen ein Immunglobulin aus der Ziege (beide Santa Cruz, PN: sc-7956 bzw. sc-1310).

Da nach unveröffentlichten Ergebnissen von Kloor et al. (Rat Expression Array 230 A, 2004) beim experimentell induzierten Diabetes mellitus die Expression der Natrium/Kalium-ATPase (Na/K-ATPase), des Makrophagen-entzündlichen-Proteins 1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ), des Glucosetransporters 2 (Glut2) und des Insulin-like-growth-factor-I Rezeptors (IGF-IR) hoch reguliert ist, wurden diese Antigene bei diesem Krankheitszustand als zusätzliche Zielstrukturen ausgewählt und angefärbt. Die Na/K-ATPase wurde mit einem polyklonalen Ziege-Antikörper (Santa Cruz, PN: sc-16043) gegen die  $\alpha$ 1-Untereinheit des Oligomers markiert. Ebenfalls aus der Ziege stammte der polyklonale Antikörper gegen MIP-1 $\beta$  (Santa Cruz, PN: sc-1387). Jeweils mit einem polyklonalen Antikörper des Kaninchens wurden der Glut2 bzw. die  $\alpha$ -Kette des IGF-IR markiert (beide Santa Cruz, PN: sc-9117 bzw. sc-7952).

Als Marker für den Entzündungsprozess bei der PAN wurden die Antigene Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor (coxsackie and adenovirus receptor, CAR), Integrin  $\beta$ 2 und Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) herangezogen, die nach Nagai et al. (2003) [101], Luimula et al. (2002) [89] bzw. Diamond und Pesek (1991) [46] in diesem Fall stärker exprimiert werden. Zur Markierung der drei Antigene wurde jeweils ein polyklonaler Antikörper der Ziege (alle Santa Cruz, PN: sc-10313, sc-1350 bzw. sc-6623) verwendet.

Die genannten zusätzlichen Primärantikörper wurden entweder in einer Verdünnung von 1:100 oder 1:200 eingesetzt. Da von den zusätzlichen Markern nur die Antikörper gegen WT1, Synaptopodin, Cox-2, AQP1 und AQP3 ein spezifisches Signal zur Darstellung brachten, wurden lediglich diese Färbungen weiterverfolgt. Das Ausbleiben der Bindung der anderen Antikörper ist vermutlich auf die spezielle Fixierung der Schnitte mit Aceton zurückzuführen, die in den Versuchen dieser Arbeit aber unumgänglich war, da nur so die SAH-Hydrolase dargestellt werden kann.

Zur Fluoreszenzmarkierung der Primärantikörper wurde mit insgesamt fünf verschiedenen Sekundärantikörpern gearbeitet, die je nach Primärantikörper und gewünschtem Anfärbemuster ausgewählt wurden. Es handelte sich dabei um ein Texas-Red-IgG der Ziege gegen Kaninchen, ein Texas-Red-IgG der Ziege gegen Maus, ein Texas-Red-IgG des Esels gegen Ziege, ein Indocarbocyanin-(Cy5)-konjugiertes IgG des Esels gegen Kaninchen und ein Cy5-IgG der Ziege gegen Kaninchen (alle Jackson). Die Anregung der beiden Texas-Red-Antikörper bei der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie erfolgte bei einer Wellenlänge von 543 nm, die beiden Cy5-Antikörper wurden mit Laserlicht der Wellenlänge 633 nm angeregt. Für die Detektion der Zellkerne wurde der Nukleinsäurefarbstoff Sytox green (Morbitec) eingesetzt, der sein Absorptionsmaximum bei Wellenlängen um 488 nm hat. Dieser Kernfarbstoff wurde im Färbeprozess behandelt wie ein Sekundärantikörper, also vor dem letzten Waschgang 1 h lang bei RT' inkubiert. Allerdings wurde er in einer Verdünnung von 1:100000 in TBS eingesetzt.

Zur Sicherung der Spezifität der eingesetzten Antikörper wurde auf jedem Objektträger eine Negativkontrolle mit angesetzt, die außer der Tatsache, dass der Primärantikörper weggelassen und nur mit AP inkubiert wurde, exakt nach dem oben erläuterten Schema behandelt wurde. Somit finden sich keine Zielstrukturen für den Sekundärantikörper mehr im Gewebe, weshalb es zu keiner spezifischen Anfärbung kommen darf.

### 2.4.2 Mikroskopie, Fotografie und Bildbearbeitung

Die angefertigten Präparate wurden am Anatomischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Dr. rer. nat. Andreas Mack mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop (LSM 410 Invert/Axiovert 135 M, Carl Zeiss) ausgewertet. Dieses Mikroskop verfügt über drei verschiedene Laser mit Wellenlängen von 488 nm, 543 nm bzw. 633 nm und erlaubt somit die gleichzeitige Detektion von bis zu drei Fluoreszenzsignalen. Überdies können auch Transmissionsaufnahmen der Gewebe gemacht und den Fluoreszenzbildern überlagert werden. Während zur Orientierung und zum Aufsuchen geeigneter Ausschnitte der Präparate auch kleinere Übersichtsvergrößerungen benutzt wurden, erfolgte die Aufzeichnung der Bilder stets mit einem 40 x 1,2 W Wasser-Immersionsobjektiv. Die aufgezeichneten Bilder wurden mit den Programmen PhotoShop (Adobe) und LSM Image Browser (Carl Zeiss) am Computer nachbearbeitet.

Prinzip der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie (aus Junqueira, Carneiro, Kelley, Histologie, 5. Auflage, 2002 [72]):

Die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie (LSM) ist vom Prinzip her eine Art Fluoreszenzmikroskopie, die als Lichtquelle einen Laser verwendet. Laserlicht ist monochromatisch (eine Wellenlänge), wodurch die Fluoreszenz der Proben optimal angeregt werden kann, ohne andere Strukturen unspezifisch zum Leuchten zu bringen. Der Laserstrahl wird über eine erste Lochblende (pinhole) gebündelt und über das Objektiv in einem sehr kleinen Lichtpunkt im Objekt konzentriert. Durch ein bewegliches Bauteil im Strahlengang kann der Lichtpunkt in einer Ebene rasterförmig (scanning) über die Probe geführt werden. Das emittierte Licht wird nach einer zweiten Lochblende durch einen Detektor (Photomultiplier) aufgenommen, verstärkt und über einen Computer weiterverarbeitet. Der Fokus im Objekt liegt konfokal zu den Lochblenden nach dem Laser und vor dem Detektor. Sie wirken als „Raumfilter“, die nur das konfokale Licht passieren lassen, während Licht aus allen anderen, nicht fokussierten Ebenen ausgeblendet wird (Abb. 5). Es ist auch möglich, über den

Fokus in verschiedene Gewebetiefen einzudringen und so Signale aus verschiedenen Schichten zu erhalten. Dadurch können die Strukturen in verschiedenen Tiefen betrachtet werden, d. h. das Objekt wird optisch „geschnitten“. Die einzelnen abgetasteten Schichten (optische Schnitte) können im Computer zu einem dreidimensionalen Bild rekonstruiert werden. Die LSM ist auch bei lebenden Geweben und Zellen einsetzbar. Außerdem können bei entsprechender Ausstattung mehrere fluoreszierende Stoffe gleichzeitig analysiert werden.

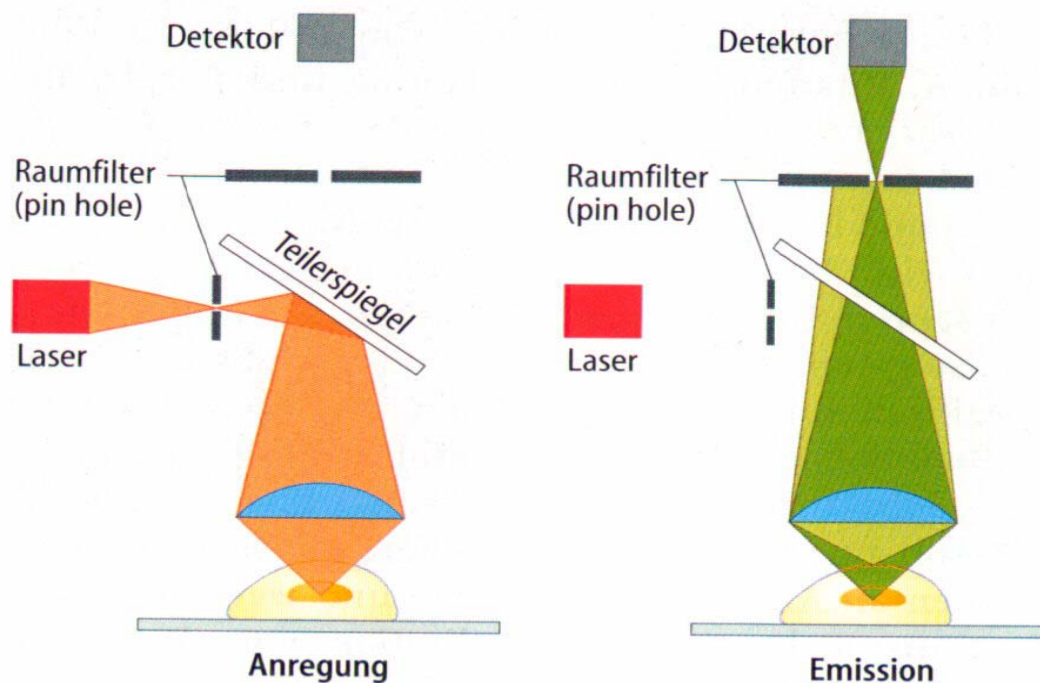


Abb. 5 Schematische Darstellung des Aufbaus eines konfokalen Laser-Scan-Mikroskops und Prinzip der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie (aus Junqueira, Carneiro, Kelley, Histologie, 5. Auflage, 2002 [72]).

## 2.5 Quantitative Analyse der Adeninnukleoside mittels HPLC

Unter dem Begriff Chromatographie werden physikalisch-chemische Trennmethode zusammengefasst, die eine Stofftrennung durch Verteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase bewirken [126]. Heute

unterscheidet man grundsätzlich zwischen Gas- und Flüssigkeitschromatographie, wobei der Phasenzustand der mobilen Phase der Einteilung zugrunde liegt. Eine besonders leistungsfähige Form der Flüssigkeitschromatographie ist die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass hochauflösende Trennungen innerhalb kurzer Analysezeiten erreicht werden können. Je nach Art der Wechselwirkung zwischen stationärer, mobiler Phase und Probe werden verschiedene Trennmechanismen unterschieden: Verteilungs-Chromatographie, Adsorptions-Chromatographie, reversed-phase-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und Gelpermeations-Chromatographie.

Zur Trennung unpolarer oder schwach polarer Substanzen wie in der vorliegenden Arbeit wird die reversed-phase-Chromatographie verwendet. Im Gegensatz zum üblichen Adsorptionssystem ist hier die stationäre Phase apolar und die mobile Phase polar. Als stationäre Phase werden dabei chemisch modifizierte Kieselgele eingesetzt, bei denen an die Silanolgruppen des Kieselgels apolare, organische Gruppen gebunden sind. Die Trennung der verschiedenen Probenkomponenten beruht auf van-der-Waalschen Anziehungskräften zwischen der apolaren stationären Phase und den apolaren Proben. Als mobile Phase dienen Gemische aus Wasser und einem zweiten Lösungsmittel (Methanol bzw. Acetonitril).

### **2.5.1 Gewinnung des Nierenextraktes und Aufarbeitung der Proben für die HPLC**

Die Extraktion der Gewebeproben aus den komprimierten Nieren wurde noch am selben Tag wie die Organentnahme durchgeführt, da selbst bei einer Lagerungstemperatur von  $-80^{\circ}\text{C}$  ein – wenn auch geringer – Abfall der SAM- und Anstieg der SAH-Konzentration beobachtet wurde [49]. Der in einem Mörser vorgelegte flüssige Stickstoff kühlte eben diesen und das Pistill auf eine Arbeitstemperatur von  $-196^{\circ}\text{C}$  vor. Die flachgepresste, tiefgefrorene Nierenscheibe wurde dem Stickstoffbad entnommen und im Mörser pulverisiert.

Der sich verflüchtigende Stickstoff musste durch kontinuierliches Nachgießen ersetzt werden, um ein Auftauen des Gewebes zu verhindern. Das pulverisierte Nierengewebe wurde nun zu 5 ml 0,6 N Perchlorsäure gegeben, die in einem Gefäß vorgelegt und auf 4°C vorgekühlt war. Die Perchlorsäure denaturiert die Proteine des Gewebes und verhindert so den enzymatischen Abbau der darin enthaltenen Stoffwechselmetabolite. Die Suspension wurde geschüttelt und mit Hilfe des Vortex durchmischt. An dieser Stelle wurde das FG des Nierengewebes bestimmt. Hierzu wurde das Gefäß mitsamt Suspension gewogen und das zuvor gemessene Leergewicht von Gefäß und vorgelegter Perchlorsäure subtrahiert.

Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von Methyladenosin, das als interner Standard bei der quantitativen, chromatographischen Messung diente. Um die Zielkonzentration von 5 µM zu erreichen, wurden 25 µl einer 1 mM Methyladenosin-Stammlösung hinzu pipettiert. Daraufhin wurde die Suspension durch Zugabe von K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 M, 1 M; pH 10) auf pH 5,5-6 eingestellt. Nach dem Titrationsvorgang wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (10 min, 10000 x g', 4°C) entfernt und der Überstand durch Festphasenextraktion aufkonzentriert und -gereinigt. Die so gewonnenen Proben wurden sofort in die HPLC injiziert und gemessen.

### 2.5.2 Festphasenextraktion

Die zur Festphasenextraktion verwendeten Phenylboronatsäulen (BondElut, ICT) sind in der Lage, bei pH-Werten > 5 alle Verbindungen mit zwei cis-ständigen OH-Gruppen zu binden. Die Säulen wurden zunächst mit 0,1 M HCl gespült und mit 0,1 M Ameisensäure solvatisiert, um eine kovalente Bindung der Nukleoside zu ermöglichen. Anschließend wurde die Säule mit einem Gemisch aus Tris-Puffer (0,02 M, pH 7,4) und Methanol im Verhältnis 7:3 gespült und die Probe auf die Säule gegeben. Im nächsten Schritt wurde die Säule mit 1 ml Natriumcitratpuffer (10 mM, pH 8,8) gespült. Nun erfolgte die Elution der an die Säule gebundenen Metabolite mit 500 µl 0,1 N HCl und die sofortige Injektion in die HPLC.



### 2.5.3 HPLC-Analyse

Die HPLC-Analyse wurde modifiziert nach Delabar et al. (1999) [40] durchgeführt. Als stationäre Phase diente eine Gromsil 120 ODS-3 CP-Säule 5 µm, 125 x 4 mm (Crom). Die mobile Phase setzte sich aus zwei verschiedenen Komponenten zusammen (Tab. 1) und wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min über die Säule geleitet. Dabei veränderte sich das Verhältnis der beiden Komponenten im zeitlichen Verlauf (Tab. 2), da die Elution der Säule mit Hilfe eines Gradienten erfolgte. Die Injektion der Proben erfolgte automatisch durch einen Probengeber. Das Probenvolumen betrug jeweils 30 µl. Innerhalb des Systems herrschte ein konstanter Druck von 18 mPa und eine konstante Temperatur von 30°C. Nach Auftrennung der Proben wurden die Signale der Einzelkomponenten bei einer Wellenlänge von 254 nm durch einen UV-Detektor registriert. Die Steuerung der HPLC-Apparatur sowie die Datenaufzeichnung und -verarbeitung wurde rechnergestützt mit Hilfe des Programms Peak simple 3.12 (SRI Inc.) durchgeführt.

Gemessen wurden die Metabolite SAH, SAM, Adenosin und als interner Standard Methyladenosin. Anhand der so gewonnenen Werte für SAH und SAM konnte dann das MP errechnet werden, wobei dieses dem Quotienten aus SAM und SAH entspricht ( $MP = SAM/SAH$ ). Zur Kalibrierung des Messsystems wurden 5 µM Standardlösungen der zu messenden Metabolite hergestellt. Lösungsmittel, Puffer und pH-Wert entsprachen dabei denjenigen des aufgearbeiteten Gewebeextraktes. Die Standardlösungen erlaubten zum einen die kontinuierliche Überprüfung der Funktion der Säule, zum anderen konnten mit ihrer Hilfe die Retentionszeiten der Metabolite ermittelt werden, die der Identifikation der entsprechenden Peaks im Chromatogramm dienten.

Tab. 1 Zusammensetzung der Laufmittel für die Elution der Adeninnukleoside.  
Zur Herstellung der Laufmittel wurden ausschließlich Lösungsmittel der Firma Merck verwendet, die als „gradient grade“ ausgezeichnet sind. Da das Eluent luftblasenfrei sein muss, wird es im Ultraschallbad für 5 min entgast.

Lösung	Komponenten	Menge	Konzentration
Laufmittel A (LMA)	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,15 g/l	10 mM
	(Sigma)	0,1322 g/l	0,6 mM
	Heptansulfonat (Fluka)	30 ml/l	3 %
	Methanol		
Laufmittel B (LMB)	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,575 g/500 ml	10 mM
	Heptansulfonat	0,0661 g/500 ml	0,6 mM
	Methanol	15 ml/500 ml	3 %
	Acetonitril	50 ml/500 ml	10 %

Tab. 2 Verlauf der Gradienten zur HPLC-Analyse.

	% LMB zu Beginn	Dauer in min	Steigerungs- rate in %/min	% LMB am Ende
SAM, SAH,	0	0	1,2	15
Adenosin	15	0	7,5	70
	70	5	-50	0
	0	10	0	0

## 2.6 Genexpressionsanalyse durch real-time-RT-PCR

Neben der Standard-PCR gibt es mittlerweile zahlreiche etablierte Varianten der PCR. So ist es beispielsweise mit Hilfe der RT-PCR (Reverse-Transkription-PCR) möglich, auch RNA als Ausgangsmaterial zu verwenden. Isolierte RNA wird zunächst mit der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, die dann als Ausgangsmatrize für die Amplifikation dient. Die modernste Methode der Quantifizierung von Nukleinsäuren ist die real-time quantitative PCR. Sie zeichnet sich durch ihre hohe Sensitivität aus und erlaubt sowohl eine schnelle Quantifizierung äußerst geringer Nukleinsäuremengen als auch den Nachweis kleiner Veränderungen in der Genexpression. Im Gegensatz zur konventionellen PCR werden bei diesem Verfahren DNA-Moleküle nicht nur amplifiziert, sondern auch mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs markiert, was eine kontinuierliche Detektion und somit eine direkte Beobachtung (real time) des Reaktionsverlaufs ermöglicht. Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurde als Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet. Dieser ist in der Lage, in die so genannte „kleine Furche“ doppelsträngiger DNA zu interkalieren, wodurch die Fluoreszenz messbar erhöht wird. Die Intensität des entstehenden Fluoreszenzsignals ist dabei direkt proportional zu der Zahl der vorliegenden DNA-Doppelstränge. Schematisch kann das Reaktionsprofil einer PCR in drei Abschnitte unterteilt werden: die frühe Hintergrund-Phase, die Log-Phase, in der eine exponentielle Amplifikation erfolgt, und die Plateau-Phase. Nur in der Log-Phase besteht ein nachvollziehbarer Zusammenhang zwischen Produkt- und Templatmenge, so dass nur diese sich für quantitative Aussagen eignet. Die Quantifizierung erfolgte relativ, d. h. im Verhältnis zu einem Referenz-Gen als internem Standard. Dafür wurde das 18S rRNA-Gen herangezogen, da es als so genanntes Haushaltsgen (housekeeping gene) nur geringen Schwankungen in der Expression unterworfen ist. Die Menge an spezifischem Produkt wurde dann auf dieses Haushaltsgen bezogen, dessen Menge als Konstante angesehen wurde.

### 2.6.1 RNA-Isolation

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) [33]. Hierfür wurde in einem Eppendorf-Gefäß 2 ml PeqGold RNA pure-Lösung (peqLab) vorgelegt und eine Spatelspitze des zermörsterten Nierengewebes hinzugegeben. Die Suspension wurde gevortext und 10 min bei RT' inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde die Probe wiederum gevortext und nun 5 min bei RT' inkubiert. Die anschließende Zentrifugation für 15 min bei 20000 x g' lieferte ein 3-Phasen-System, von dem ausschließlich die wässrige Oberphase entnommen und in ein weiteres Eppendorf-Gefäß überführt wurde, da diese die gelöste RNA enthielt. Durch Zugabe von einem der überführten Oberphase entsprechenden Volumen an 100%igem Isopropanol wurde die RNA gefällt, wobei zunächst 15 min bei RT' inkubiert und im Anschluss 15 min bei 20000 x g' zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abgossen, das Pellet zwei Mal mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, in RNase-freiem Wasser resuspendiert und bei -80°C gelagert.

### 2.6.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Der RNA-Gehalt wurde photometrisch durch Extinktionsmessung einer 1:50 Verdünnung der entsprechenden Probe in 2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer (pH 8,4) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein Extinktionswert von 1,0 einer Konzentration von 40 µg RNA/ml [22].

Anschließend wurde eine Qualitätskontrolle der RNA mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Je 3 µg RNA wurden dabei mit Gelladepuffer Loading-Dye (peqLab) versetzt und in einem 1,6%-Agarose-TAE-Gel (1x) in TAE-Puffer (1x) bei einer Spannung von 100 V aufgetrennt. Der TAE-Puffer (1x) wurde durch 1:50 Verdünnung eines TAE-Puffers (50x) hergestellt, der sich aus 2 M Tris, 1 M Essigsäure und 50 mM EDTA zusammensetzte. Da der Ansatz Ethidiumbromid als Nukleinsäurefarbstoff enthielt, konnte das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung unter UV-Lichteinstrahlung sichtbar gemacht und fotografiert werden.

### 2.6.3 Reverse Transkription

Die Umschreibung der RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, der sich aus 11 µl DMPC-Wasser, 2 µl 10 x PCR-Puffer (Pan), 2 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM; Pan), 2 µl dNTPs (10 mM; Eppendorf), 1 µl RNase-Inhibitor (15 U; Eppendorf), 0,5 µl Random-Hexamers (promega) als Primer, 0,5 µl Reverse Transkriptase (12,5 U; peqLab) und 1 µl der gewonnenen RNA-Lösung (300 ng/µl) zusammensetzte. Nach einer initialen 10-minütigen Inkubation bei RT' wurde die Reverse Transkription bei 42°C für 1 h durchgeführt und die Reaktion schließlich durch 5-minütiges Erhitzen auf 95°C abgestoppt. Die so gewonnenen cDNA-Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Um eine mögliche Kontamination der RNA-Präparation mit genomischer DNA auszuschließen, wurde eine Probe angesetzt und in der anschließenden RT-PCR getestet, die zwar RNA, aber keine Reverse Transkriptase enthielt.

### 2.6.4 Real-time quantitative PCR-Analyse

Die mRNA-Expression wurde für drei Gene mit der LightCycler-Technologie (Roche) untersucht. Es wurde dabei in Abhängigkeit vom zu untersuchenden Gen mit zwei unterschiedlichen LightCycler-Protokollen gearbeitet (Tab. 3). Während die Primersequenzen für die Gene des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors [34] bzw. der 18S rRNA [20] der einschlägigen Literatur entnommen werden konnten, wurde für das SAH-Hydrolase-Gen von Frau Dr. rer. nat. Marina Hermes ein passendes Oligonukleotid mit Hilfe der Software „Primer Premier“ (PREMIER Biosoft International) ausgewählt. Die Synthese dieser Primer wurde bei der Firma Thermo Electron (Ulm) in Auftrag gegeben. Die Produktgröße wurde anhand der für das jeweilige Gen publizierten Sequenz berechnet (Tab. 4).

Tab. 3 Experimentelle LightCycler-Protokolle für die verschiedenen untersuchten Gene.

<b>Untersuchte Gene</b>	<b>1.3 Protokoll</b>
SAH-Hydrolase, 18S rRNA	Initiale Denaturierung: 95°C für 10 min Denaturierung: 95°C für 10 s Annealing: 68-58°C für 10 s (0,5°C/Zyklus) Elongation: 72°C für 16 s mit einer Fluoreszenz- messung Anzahl der Zyklen: 45 Schmelzkurve: 65-95°C (0,1°C/s) und kontinuierliche Fluoreszenzmessung Kühlen der Probe: auf 37°C
A <sub>1</sub> -Rezeptor, 18S rRNA	Initiale Denaturierung: 95°C für 10 min Denaturierung: 95°C für 10 s Annealing: 62-52°C für 10 s (0,5°C/Zyklus) Elongation: 72°C für 16 s mit einer Fluoreszenz- messung Anzahl der Zyklen: 45 Schmelzkurve: 65-95°C (0,1°C/s) und kontinuierliche Fluoreszenzmessung Kühlen der Probe: auf 37°C

Tab. 4 Sequenzen der für die RT-PCR-Analysen verwendeten Primer und Größen der entstandenen Produkte in Basenpaaren (bp).

<b>Gen</b>	<b>Primersequenz (F: forward ; R: reverse)</b>	<b>Produktgröße bp</b>
SAH-Hydrolase	F: GGT ATC GGT TGA AGA ATG G R: GGT ACT TGT CTG GAT GGG TC	159
A <sub>1</sub> -Rezeptor	F: GCC ACA GAC CTA CTT CCA CA R: CCT TCT CGA ACT CGC ACT TG	304
18S rRNA	F: CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA R: GCT GGA ATT ACC GCG GCT	187

Aus 12,6 µl DMPC-H<sub>2</sub>O, 2,4 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µl Forward-Primer (20 µM) und 0,5 µl Reverse-Primer (20 µM) für das jeweils zu amplifizierende Gen und 2 µl Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche) wurde ein Mastermix vorbereitet. Vor Beginn der PCR-Analyse wurden zu diesen 18 µl Mastermix 2 µl cDNA als Template hinzugegeben, das Gemisch in eine feine Glaskapillare pipettiert und schließlich durch 1-minütige Zentrifugation bei 1000 x g' in den unteren Abschnitt der Kapillare befördert.

Die relative Quantifizierung erfolgte über ein mathematisches Verfahren nach Pfaffl (2001) [115], bei dem die Expression des zu untersuchenden Gens mit der eines Referenz-Gens in Beziehung gesetzt wird. Die einzigen beiden Größen, die in die Berechnung der relativen Expressionsrate eingehen, sind die Abweichung des C<sub>t</sub>-Wertes der Probe vom C<sub>t</sub>-Wert einer Kontrolle ( $\Delta C_t$ ) und die Effizienz E, mit der das entsprechende Gen amplifiziert wird. Somit ist keine Kalibrierungskurve zur Berechnung notwendig. Der C<sub>t</sub>-Wert (C<sub>t</sub> = cycle threshold) ist definiert als der Kreuzungspunkt der Fluoreszenzkurve und einer vorher festgelegten Geraden parallel zur Abszisse im Fluoreszenz-Reaktionszyklus-Diagramm. Konkret ausgedrückt gibt der C<sub>t</sub>-Wert die Anzahl der Amplifikationszyklen an, bei der das Fluoreszenzsignal eines zu amplifizierenden Gens einen bestimmten Schwellenwert überschreitet, sich also messbar von der so genannten Hintergrundfluoreszenz abhebt. Die C<sub>t</sub>-Werte der untersuchten Gene wurden mit Hilfe der „Fit Point Method“ der LightCycler Software 3.5.3 (Roche) ermittelt. Die Effizienz E, mit der ein Gen mit den entsprechenden Primern in der exponentiellen Phase amplifiziert wird, muss für jedes Gen mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt werden. Hierzu wurden cDNA-Proben 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt und simultan amplifiziert. Die C<sub>t</sub>-Werte wurden dann gegen den Logarithmus der relativen RNA-Menge aufgetragen, um die Steigung der Regressionsgeraden berechnen zu können (Abb. 6). Unter Zuhilfenahme folgender Formel ergaben sich nun die korrespondierenden PCR-Effizienzen (Tab. 5):

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

Schließlich konnte der so genannte Induktionsfaktor als Maß für die relative Expressionsrate eines Gens berechnet werden:

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



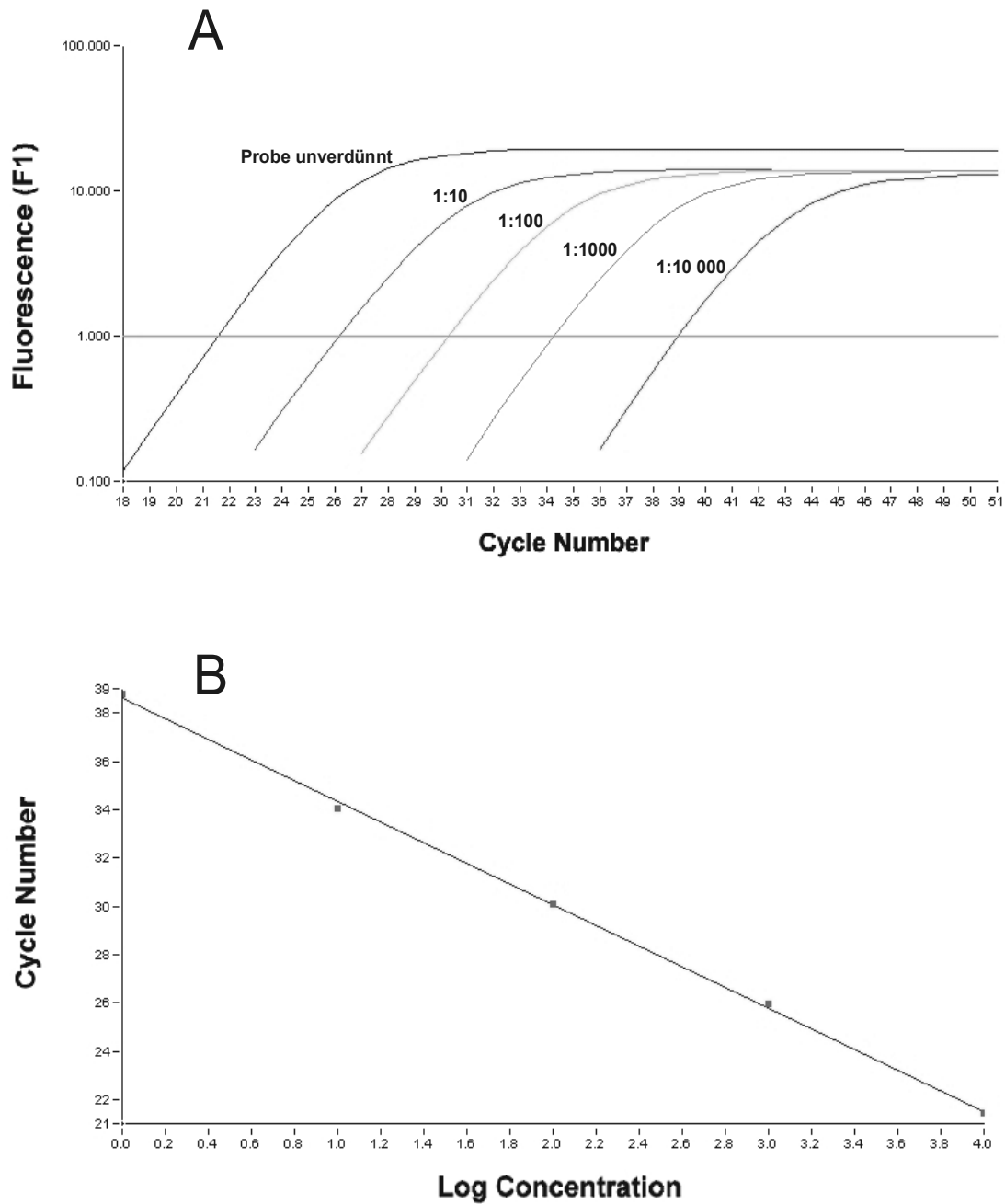


Abb. 6 Relative Quantifizierung und Bestimmung der Effizienz (nach Hermes (2004) [65]).  
 A: Real-time-PCR SYBR Green I Fluoreszenz einer seriell verdünnten Probe aufgetragen gegen die Zyklenzahl am Beispiel der SAH-Hydrolase. Der C<sub>T</sub>-Wert ist der Zyklus, in dem die Fluoreszenz die parallel zur x-Achse verlaufende Gerade schneidet.  
 B: Auftragung der C<sub>T</sub>-Werte der Verdünnungen gegen die relative Konzentration der Probe, zur Berechnung der Effizienz nach Formel  $E=10^{(-1/\text{Steigung})}$ .

Tab. 5 Effizienz der LightCycler-Amplifikation während der exponentiellen Phase.

<b>Untersuchtes Gen</b>	<b>Effizienz</b>
SAH-Hydrolase	1,87
A <sub>1</sub> -Rezeptor	2,00
18S rRNA	1,85

## 2.7 Proteinbiochemische Untersuchung

### 2.7.1 Extraktion zytosolischer Proteine

Für die Untersuchung des zytosolischen Enzyms SAH-Hydrolase wurden die zu untersuchenden Nieren nach der Entnahme und dem Wiegen mit dem Ultra-Turrax-Gerät für 2 min bei 1500 rpm in gekühltem 50 mM Kaliumphosphatpuffer (KPP) (pH 7,0) aufgeschlossen. Das Verhältnis Pufferlösung in ml zu Nierengewicht in g betrug 2:1. Anschließend wurde das Homogenat für 30 min bei 20000 x g<sup>'</sup> zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Bis zur Messung konnten die Proben so bei -80°C gelagert werden.

### 2.7.2 Extraktion der Membranproteine

Um die Expression des A<sub>1</sub>-Rezeptors auf Proteinebene zu untersuchen, wurden die Membranproteine extrahiert und in Lösung gebracht. Dies geschah durch Aufschluss des Nierengewebes in einem Homogenisationspuffer (150 mM NaCl; 1 % Tergitol NP 40; 0,5 % Natriumdeoxycholat; 0,1 % SDS; 100 µM PMSF) mit Hilfe eines Ultra-Turrax-Geräts. Natriumdeoxycholat ist ein ionisches Detergens, das aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaften Proteine aus Membranen herauszulösen vermag. Bei diesem Solubilisierungsvorgang lagern sich die Seifenmoleküle mit ihren lipophilen Anteilen an die hydrophoben Bereiche der Proteine an und können so die Phospholipide der Membran verdrängen und die Proteine aus dieser herauslösen. Phenylmethyl-

sulfonylfluorid (PMSF) ist ein Proteaseinhibitor, der Serin-Proteasen durch kovalente Bindung an deren aktives Zentrum irreversibel hemmt. So verhindert es die enzymatische Degradation der solubilisierten Membranproteine, die in Lösung empfindlicher gegenüber Proteasen reagieren.

Zu den aufgetauten Nieren wurde jeweils das Doppelte ihres Gewichtes in g an Homogenisationspuffer in ml hinzugegeben. Der Aufschluss mit dem Ultra-Turrax erfolgte unter steter Eiskühlung in einem Reagenzglas für 2 min bei 1500 rpm. Das entstandene Homogenat wurde nun für 30 min bei 4°C und 20000 x g' zentrifugiert. Die Zentrifugation lieferte einen klaren Rohextrakt als Überstand, der in frische Eppendorf-Gefäße überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert wurde. Das überwiegend Zelldetritus enthaltende Pellet wurde verworfen.

### **2.7.3 Proteinbestimmung**

Der Proteingehalt der Rohextrakte wurde photometrisch mit der Methode nach Bradford (1976) [16] bestimmt. Dieses Verfahren beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie-Blau in saurer Lösung an Proteine bindet und dabei seine spektralen Eigenschaften ändert; es kommt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm. Es zeichnet sich gegenüber anderen Verfahren dadurch aus, dass es sensitiver und weniger stör anfällig ist. Bezogen wurden die Messungen auf einen Rinderserumalbumin (BSA)-Standard, der den Konzentrationsbereich von 10 µg/ml bis 200 µg/ml abdeckte. In diesem Bereich besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Extinktion bei 595 nm und der Proteinkonzentration der zu untersuchenden Lösung. Die Proben wurden zunächst mit bidestilliertem Wasser so verdünnt, dass die Proteinkonzentration im oben genannten Zielbereich lag und anhand der Eichkurve ermittelt werden konnte. Anschließend wurden zu 100 µl der verdünnten Lösung 900 µl Protein Assay Farbstoff-Konzentrat (BioRad) in einer 1:5 Verdünnung hinzugegeben, das Gemisch gut durchgemischt und 30 min bei RT' inkubiert. Nun wurden 200 µl des Ansatzes in eine Mikrotiterplatte überführt und die Extinktion bei 630 nm in einem ELISA-Reader gemessen.

#### 2.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die isolierten Proteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Laemmli (1970) [84] aufgetrennt. Ausschlaggebend für die Trennwirkung im Gel ist bei dieser Methode allein das Molekulargewicht der Proteine, da ihre Eigenladung durch das im Ladepuffer enthaltene ionische Detergens Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate, SDS) völlig überdeckt wird. Dabei ist die Zahl der resultierenden negativen Ladungen proportional zur Masse des jeweiligen Proteins [37]. Zugleich bewirkt SDS durch Auflösung der Sekundär- und Tertiärstrukturen eine Entfaltung der Proteine, so dass sich deren Form zu losen Ellipsen vereinheitlicht. Damit Disulfidbrücken diesen Entfaltungsprozess nicht behindern, werden sie mit einem Reduktionsmittel gespalten. Die Größe der Aggregate ist dann ebenfalls allein von der Kettenlänge und somit vom Molekulargewicht abhängig. In der vorliegenden Arbeit wurde als Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) verwendet, das dem Ladepuffer kurz vor Versuchsbeginn in einer Konzentration von 2 % zugesetzt wurde.

Für die elektrophoretische Auftrennung im SDS-Gel wurden 2 Teile Proteinextrakt mit 1 Teil Ladepuffer (3x) (92 mM Tris/HCl, pH 6,8; 14 % Glycerin; 5,3 % SDS; 0,01 % Bromphenolblau) versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Nach Abkühlen auf RT' wurden die Proben kurz abzentrifugiert und der Überstand in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurden Aliquots mit einem Gesamtproteingehalt von 40 bis 100 µg elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurde das Polyacrylamidgradientengel hergestellt, das aus einem 4%igen Sammelgel und einem 12%igen Trenngel bestand (Tab. 6). Durch das grobporige Sammelgel werden die Proben zunächst in einer scharfen Bande aufkonzentriert, bevor sie auf das feinporige Trenngel treffen und der Molekularsiebeffekt zum Tragen kommt.

Tab. 6 Komponenten des Trenn- und Sammelgels

	<b>Komponenten</b>	<b>verwendetes Volumen</b>	<b>End- konzentration im Gel</b>
<b>Trenngel 12 %</b>	Tris/HCl pH 8,8 (1,5 M)	2,5 ml	0,375 M
	SDS (10 %)	100 µl	0,1 %
	Acrylamid/Bisacrylamid (19:1, 40 %, Roth)	3,0 ml	12 %
	H <sub>2</sub> O	4,35 ml	
	APS (10 %)	50 µl	0,05 %
	TEMED (100 %)	5 µl	0,05 %
	<b>Sammelgel 4 %</b>	Tris/HCl pH 6,8 (0,5 M)	2,5 ml
SDS (10 %)		100 µl	0,1 %
Acrylamid/Bisacrylamid (19:1) (40 %)		1,0 ml	4 %
H <sub>2</sub> O		6,4 ml	0,1 %
APS (10 %)		100 µl	0,05 %
TEMED (100 %).		5 µl	

Zwischen zwei Glasplatten wurde zunächst das Trenngel gegossen und mit 100 % Ethanol überschichtet. Nach Auspolymerisation des Trenngels wurde der Alkohol entfernt, das Sammelgel bis zum Plattenspalt eingegossen und der Kamm zum Stechen der Taschen für die Proben in den Plattenspalt geschoben. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Gelelektrophoreseapparatur von BioRad bei 100 V in Laufpuffer (1x) (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 3,4 mM (0,1 %) SDS) über einen Zeitraum von 90 min. Neben den Proben wurden auf jedes Gel auch 15 µl eines Proteinmarkers (Prestained standards, BioRad) aufgetragen.

### 2.7.5 Western Blot

Nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine mittels Western Blot [140] auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

Der Western Blot, auch Immunoblot genannt, dient der Darstellung und Detektion gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine nach Übertragung auf eine geeignete Trägermembran mit Hilfe immunologischer Methoden. Ein wesentlicher Vorteil dieses Blots besteht darin, dass das gesuchte Molekül nicht in einem Gel verteilt, sondern auf der Oberfläche einer Membran konzentriert ist und somit wesentlich leichter detektiert werden kann. Mit Hilfe dieser Methode können unmarkierte Antigene in komplexen Gemischen nach ihrer gelelektrophoretischen Auftrennung durch spezifische Antikörper detektiert und in ihrem relativen Molekulargewicht und ihrer Quantität bestimmt werden.

Der Transfer erfolgte bei 400 mA und 100 V über einen Zeitraum von 90 min in einer BioRad-Kammer mit gekühltem Transferpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % Methanol) und einem Kühlaggregat bei 4°C. Nach dem Blotten wurde die Membran kurz mit TPBS (48 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O; 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 147 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween-20; pH 7,2) gespült. Um unspezifische Bindung des Antikörpers an die Membranoberfläche zu verhindern, wurde die Membran mit 5 % Magermilchpulver in TPBS für mindestens 3 h geblockt [64]. Im nächsten Schritt wurde die Membran für drei Mal 10 min mit TPBS gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation über Nacht bei RT' mit dem primären Antikörper. Eingesetzt wurde zum einen ein von Kloor et al. (2000) [76] selbst hergestellter polyklonaler Antikörper des Kaninchens gegen SAH-Hydrolase und zum anderen ein polyklonaler Antikörper des Kaninchens gegen den Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor (Sigma, PN: A-268), die beide kurz vor der Anwendung 1:500 in PBS (48 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O; 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 147 mM NaCl; pH 7,2) + 0,5 % BSA verdünnt wurden. Im Anschluss wurde die Membran erneut drei Mal 10 min mit TPBS gewaschen und 1 h lang bei RT' mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde in beiden Fällen ein Meerrettichperoxidase-konjugiertes IgG der Ziege gegen Kaninchen (Dako) in einer

1:1500 Verdünnung in PBS + 0,5 % BSA eingesetzt. Bevor die colorimetrische Detektion erfolgte, wurde die Membran erneut drei Mal 10 min in TPBS gewaschen. Die colorimetrische Detektion beruht auf der Oxidation von 4-Chloro-1-naphthol in Gegenwart von  $H_2O_2$ , bei der ein purpurfarbener Farbniederschlag entsteht. Zur Visualisierung wurde die Membran so lange mit der Entwicklerlösung (Tab. 7) inkubiert, bis ein dunkler Niederschlag deutlich zu erkennen war. Abschließend wurde die Membran entwässert und zwischen Filterpapier getrocknet.

Tab. 7 Zusammensetzung der Entwicklerlösung für die colorimetrische Detektion. Die Komponenten wurden erst unmittelbar vor der Detektion in 100 ml PBS verdünnt und gemischt.

Komponenten	eingesetztes Volumen	Endkonzentration
4-Chloro-1-naphthol (2 % in Polyethylenglykol)	0,2 ml	0,004 %
$H_2O_2$ (3 %)	1,0 ml	0,03 %
Orthotoluidin (gesättigt in 7 % Essigsäure)	1,0 ml	

### 2.7.6 Photometrische Bestimmung der SAH-Hydrolase-Aktivität

Die Aktivität der SAH-Hydrolase wurde spektralphotometrisch mit der MTT-Formazan-Methode nachgewiesen. Dabei wird das durch SAH-Hydrolyse entstehende Adenosin über Inosin, Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure umgewandelt. Bei dieser Methode ist die Bestimmung der SAH-Hydrolase-Aktivität an die enzymatische Aktivität der Xanthinoxidase gekoppelt, die mit Hilfe einer Farbreaktion visualisiert werden kann. Die Umwandlung des gelben Monotetrazoliumsalses MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromid) in das violette Formazan ist geknüpft an die Wirkung der Xanthinoxidase und kann bei einer Wellenlänge von 578 nm photometrisch bestimmt werden. Da im Reaktionsansatz alle Hilfsenzyme im Überschuss zugesetzt werden, stellt die SAH-Hydrolyse den geschwindigkeits-

bestimmenden Schritt der Gesamtreaktion dar. Aus dem Reaktionsschema (Abb. 7) geht hervor, dass für jedes umgesetzte Molekül SAH zwei Moleküle Formazan aus MTT entstehen. Dieses stöchiometrische Verhältnis von 1:2 muss bei der Berechnung der Enzymaktivität der SAH-Hydrolase berücksichtigt werden.

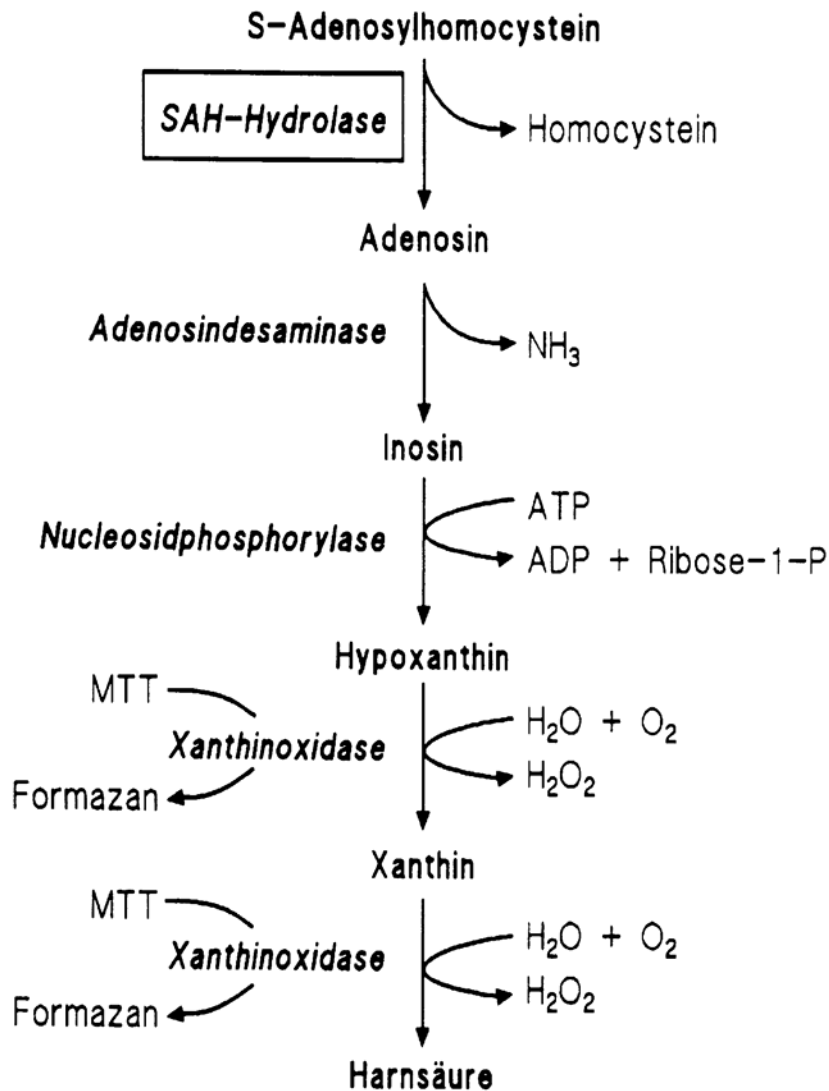


Abb. 7 Reaktionskaskade des SAH-Abbaus bei der spektralphotometrischen Aktivitätsbestimmung der SAH-Hydrolase mit Hilfe der MTT-Formazan-Methode (nach Hermes (2004) [65])



Für die Aktivitätsmessung wurde zunächst ein Reaktionsansatz hergestellt, der die einzelnen Komponenten in folgender Konzentration bzw. Aktivität enthielt: 50 mM KPP (pH 7,0), 1,2 U/ml Adenosindesaminase, 0,06 U/ml Nukleosidphosphorylase, 0,1 U/ml Xanthinoxidase, 10 mM MTT, 0,016 % Gelatine und 1,6 mM Meldolalblau. Der Zusatz von Gelatine verhindert die Ausflockung des schwer wasserlöslichen Formazans. Meldolalblau (8-Dimethylamino-2,3-benzoephinoxazin) erhöht die Geschwindigkeit der Wasserstoffübertragung auf das Tetrazoliumsalz. Außerdem wurde eine 1 mM SAH-Lösung in 50 mM KPP (pH 7,0) vorbereitet. Es wurden nun je 900 µl des Reaktionsansatzes und 50 µl des Rohextrakts in die Mess- bzw. die Referenzküvette pipettiert, gut gemischt und die Küvetten ins Photometer gestellt. Dieses Gemisch wurde für 5 min bei RT' inkubiert, um alle endogenen Substrate abreagieren zu lassen. In der Messküvette wurde anschließend durch Zugabe von 50 µl SAH-Lösung die Enzymreaktion gestartet und der zeitliche Verlauf der Extinktionsänderung bei 578 nm über einen Zeitraum von 5 min aufgezeichnet. Die Extinktionswerte der Referenz wurden bei der Messung ebenfalls registriert und als Leerwert herangezogen.

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes, das einen linearen Zusammenhang zwischen der Extinktionsänderung einer Probe und deren Stoffmengenkonzentration herstellt:

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

Bedeutung der einzelnen Größen:

$\Delta E'$ : Extinktionsänderung pro Zeiteinheit, [1/min]; gemessen im linearen Bereich der Kurve

$\epsilon$ : Molarer Extinktionskoeffizient, [ $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ ];  $\epsilon_{\text{Formazan}} = 13,0 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

$\Delta c$ : Konzentrationsänderung, [ $\mu\text{mol}/\text{ml}\cdot\text{min}$ ]; im vorliegenden Fall des Formazans

$d$ : Schichtdicke der Küvette, [cm]; im vorliegenden Fall  $d = 1 \text{ cm}$

Durch Einsetzen der bekannten Größen und Umformen der obigen Formel erhält man die Beziehung:

$$\Delta C_{\text{Formazan}} = \Delta E' / 13,0 \text{ } \mu\text{mol/ml}$$

Somit konnte die Konzentrationsänderung unmittelbar aus der gemessenen Extinktionsänderung berechnet werden. Mit Hilfe dieses Wertes und der im Vorfeld gemessenen Proteinkonzentration ( $c_{\text{Protein}}$ ) konnte nun die Spezifische Aktivität ( $A_s$ ) der SAH-Hydrolase wie folgt berechnet werden, wobei das stöchiometrische Verhältnis von 1:2 berücksichtigt wurde:

$$A_s \text{ [U]} = \Delta C_{\text{Formazan}} / c_{\text{Protein}} \cdot 2 \quad [\text{U} = \mu\text{mol/mg} \cdot \text{min}]$$

## 2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der im Rahmen der real-time quantitativen PCR- und der HPLC-Analyse erhobenen Daten erfolgte mit dem Computerprogramm InStat (Version 2.02, GraphPad Software). Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM (standard error of the means) angegeben. Die Datensätze der Versuchsgruppen wurden mit denjenigen der Kontrollgruppe verglichen und die Abweichungen mit dem Student-t-Test für unverbundene Stichproben auf ihre Signifikanz hin untersucht. Dabei wurden p-Werte  $< 0,05$  als signifikant angesehen.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Nierengewicht**

Da beide Nieren der Versuchstiere nach der Organentnahme sofort zu Versuchszwecken weiterverarbeitet wurden, konnte das Nierengewicht nicht bestimmt werden. Die rechte Niere wurde zur Metabolitenanalyse nach der Gefrierstoppmethode sofort mit der Wollenberger-Zange komprimiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die immunhistochemischen bzw. die proteinbiochemischen Untersuchungen wurde die linke Niere anschließend ebenfalls augenblicklich in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

#### **3.2 Proteinausscheidung im Urin**

Um eine quantitative Aussage über den erfolgten glomerulären Schaden treffen zu können, wurden die Tiere mit PAN einen Tag vor Injektion des Puromycins sowie einen Tag vor der Organentnahme jeweils für 24 h in einem Stoffwechsellkäfig bei Standardfutter und Wasser ad libidum gehalten und deren Gesamtproteinausscheidung im Urin gemessen. Vor Induktion des Krankheitszustandes belief sich die Proteinausscheidung durchschnittlich auf  $22,0 \pm 0,9$  mg/24 h (n=6), wobei an dieser Stelle zu bemerken ist, dass eine geringe Proteinurie bei Ratten physiologisch ist. Nach 3-tägiger PAN hatte sich dieser Parameter statistisch nicht signifikant auf  $27,8 \pm 3,9$  mg/24 h erhöht (n=3), um dann nach 11 Tagen einen statistisch signifikant erhöhten Wert von  $36,7 \pm 2,6$  mg/24 h (n=3) zu erreichen. Eine statistische Signifikanz war hier bei einem p-Wert kleiner als 0,02 im Student-t-Test gegeben.

### **3.3 Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase**

#### **3.3.1 Lokalisation der SAH-Hydrolase unter physiologischen Bedingungen in der Niere der adulten Ratte**

Die SAH-Hydrolase ist als ubiquitäres Enzym sowohl in der Nierenrinde als auch im Nierenmark lokalisiert. Es zeigte sich, dass das Enzym in den Glomerula und in sämtlichen tubulären Strukturen vorkommt. Insgesamt ist die Expression in tubulären Strukturen eher schwach, wobei einzelne Abschnitte des Tubulussystems, überwiegend im apikalen Bereich des Epithels, deutlich stärker gefärbt sind (Abb. 8). Durch eine Doppelfärbung mit Antikörpern gegen SAH-Hydrolase und AQP3, das in der basolateralen Membran von Sammelrohrzellen exprimiert wird, konnte das Sammelrohr als einer dieser Tubulusabschnitte eindeutig identifiziert werden (Abb. 9). Bei den weiteren stärker gefärbten Tubulusabschnitten handelt es sich vermutlich um proximale Tubuli, was mangels eines spezifischen Markers anhand der charakteristischen Morphologie angenommen werden kann.

Eine besonders intensive Anfärbung fiel in bestimmten Zellen der Glomerula auf, die morphologisch im Transmissionsbild am ehesten den Podozyten zu entsprechen scheinen. Mit Hilfe einer Doppelfärbung, bei der neben der SAH-Hydrolase auch die Podozyten durch einen Antikörper gegen WT1 spezifisch angefärbt wurden, konnte das Signal definitiv den Podozyten zugeordnet werden. In der Doppelfärbung mit Synaptopodin (Abb. 10) ist zu erkennen, dass die SAH-Hydrolase vorwiegend im Perikaryon der Podozyten lokalisiert ist. Zwar kommt sie auch in den Fußfortsätzen vor, allerdings nur im proximalen, also perikaryonnahen Abschnitt. In den distaleren Abschnitten, in denen es zu immer feineren Verzweigungen der dendritischen Fortsätze kommt, kann das Enzym nicht mehr nachgewiesen werden.

Die Doppelmarkierung mit dem Kernfarbstoff Sytox green zeigte, dass die SAH-Hydrolase in erster Linie perinukleär, die Zellkerne regelrecht aussparend, im Zytoplasma gelegen ist (Abb. 8 B). Vereinzelt treten jedoch auch intranukleäre

Kolokalisationen auf, vor allem im Randbereich der Zellkerne, allerdings sind diese sehr diskret ausgeprägt und auch eher die Ausnahme als die Regel.

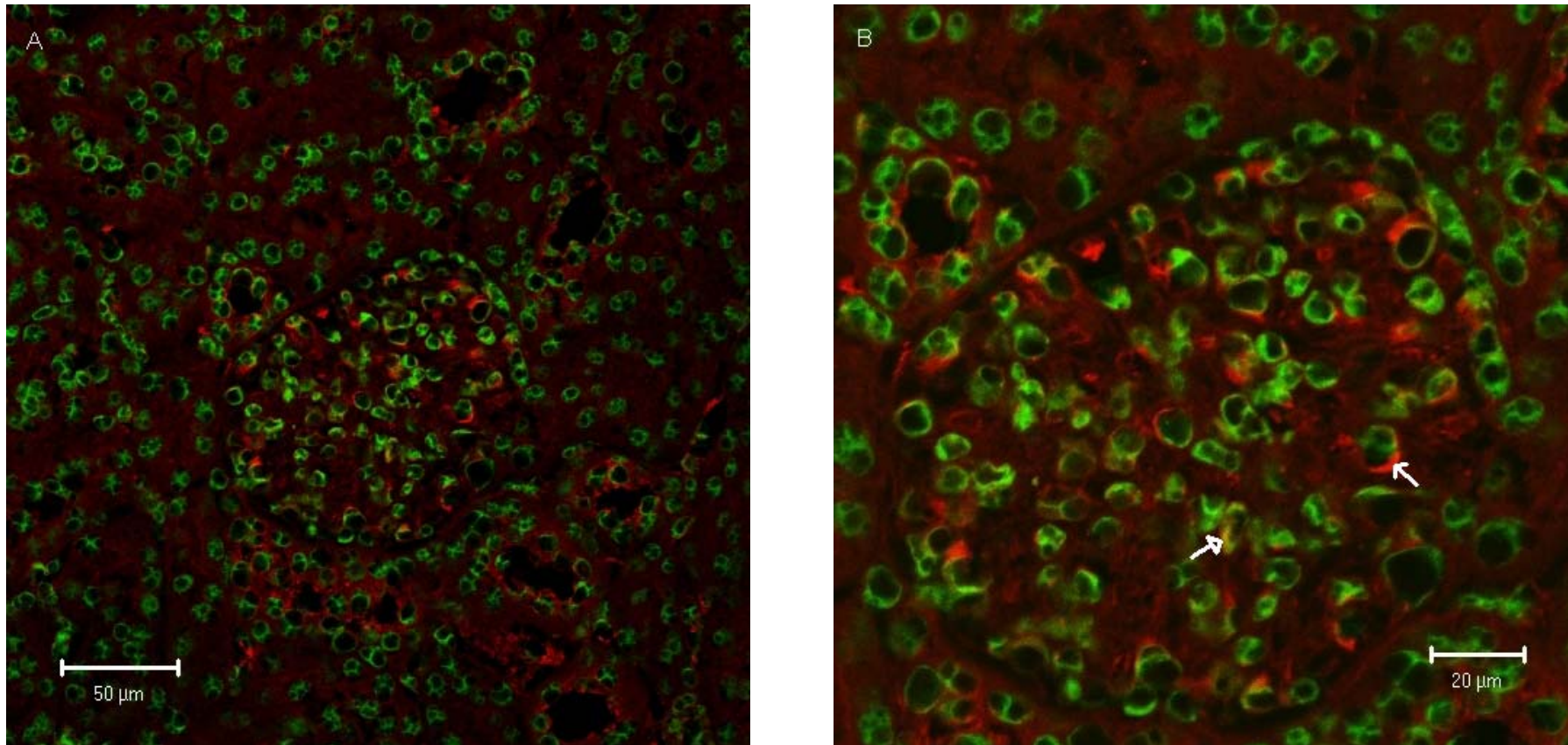


Abb. 8 Darstellung der SAH-Hydrolase (rot) mit einem polyklonalen Primärantikörper des Kaninchens (Verdünnung 1:50) und einem Texas-Red-konjugierten Sekundärantikörper der Ziege (Verdünnung 1:100) in der Niere der gesunden adulten Ratte durch Immunfluoreszenz. Zusätzlich wurde eine Zellkernfärbung (grün) mit dem Farbstoff Sytox green (Verdünnung 1:100000) durchgeführt.

A: Ausschnitt aus der Nierenrinde.

B: Glomerulum mit umgebenden Tubuli aus A in stärkerer Vergrößerung. Offener Pfeil: Perinukleäres Verteilungsmuster der SAH-Hydrolase im Zytoplasma eines Podozyten. Geschlossener Pfeil: Seltene intranukleäre Lokalisation der SAH-Hydrolase.



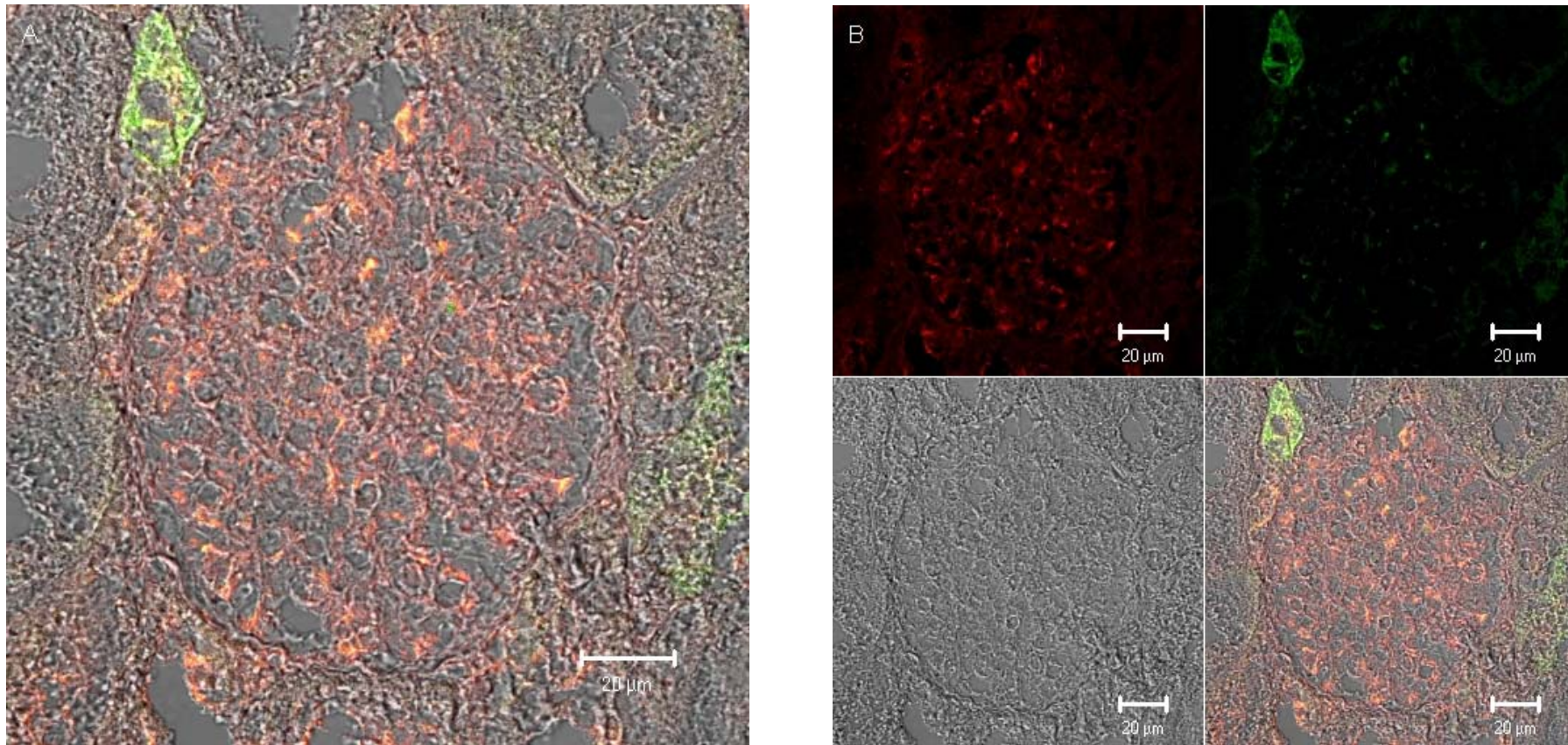


Abb. 9 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der SAH-Hydrolase (rot) in der Niere der gesunden adulten Ratte in Kombination mit einer Markierung von Sammelrohren (grün) mit einem polyklonalen Antikörper der Ziege gegen AQP3 (Verdünnung 1:100). Als Sekundärantikörper wurden ein Cy5-konjugierter Antikörper des Esels gegen Kaninchen (Verdünnung 1:100) und ein Texas-Red-konjugierter Antikörper des Esels gegen Ziege (Verdünnung 1:200) verwendet. Zusätzlich ist hier ein Transmissionsbild überlagert.  
A: Glomerulum mit umgebenden Tubuli und grün markiertem Sammelrohr.  
B: Einzeln dargestellte Farbkanäle von A.



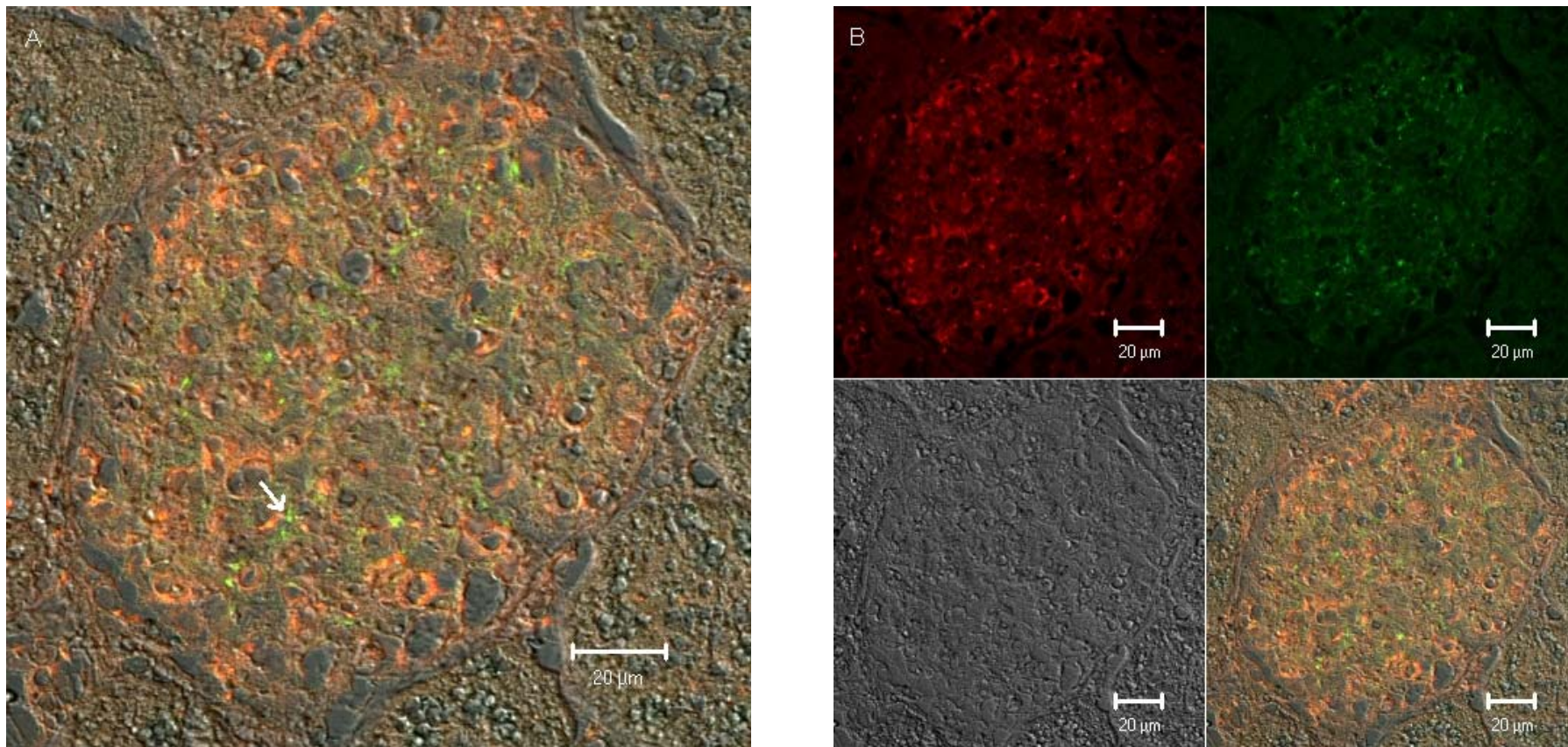


Abb. 10 Immunhistochemische Doppelmarkierung der SAH-Hydrolase (rot) und von Synaptopodin (grün), einem Protein der Podozytenfortsätze, mit überlagertem Transmissionsbild in der Niere der gesunden adulten Ratte. Der Primärantikörper gegen Synaptopodin stammte aus der Maus und wurde in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurden ein Cy5-konjugiertes IgG der Ziege gegen Kaninchen und ein Texas-Red-konjugiertes IgG der Ziege gegen Maus (Verdünnung jeweils 1:100) verwendet.  
A: Glomerulum. Pfeil: Feine, distal gelegene Verzweigung eines Fußfortsatzes, in der keine SAH-Hydrolase mehr nachzuweisen ist.  
B: Einzeln dargestellte Farbkanäle von A.



### **3.3.2 Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der adulten Ratte unter experimentell induziertem insulinabhängigen Diabetes mellitus (IDDM)**

Es wurden Nieren von Ratten untersucht, die nach 4-wöchiger diabetischer Stoffwechsellage entnommen worden waren.

Histologisch fiel zunächst die durch den Krankheitsprozess weniger deutlich gezeichnete Gewebetextur mit schlechter abgrenzbaren Zell- und Gewebsgrenzen auf. Das Gewebe nahm insgesamt mehr Hintergrundfärbung an, so dass daraus eine Färbung mit weniger Kontrast zwischen den einzelnen Strukturen resultierte. Überdies imponierten verglichen mit den Nieren der Kontrolltiere die Glomerula größer und optisch dichter; im glomerulären Gefäßkonvolut waren wesentlich weniger Lumina erkennbar. Des Weiteren zeigte sich als Folge der pathologischen Prozesse eine Schwellung der Tubuli. Hinsichtlich der Verteilung der SAH-Hydrolase ergaben sich keine Unterschiede im Vergleich mit den Kontrollnieren. Ein besonders intensives Signal zeigte sich auch hier in den Podozyten sowie in bestimmten Abschnitten des Tubulussystems, nämlich dem Sammelrohr und dem proximalen Tubulus. In der Doppelfärbung mit dem Kernfarbstoff Sytox green herrschte ebenfalls ein perinukleäres Verteilungsmuster des Enzyms vor und nur selten traten diskrete Kollokalisierungen am Rande von Zellkernen auf (Abb. 11).

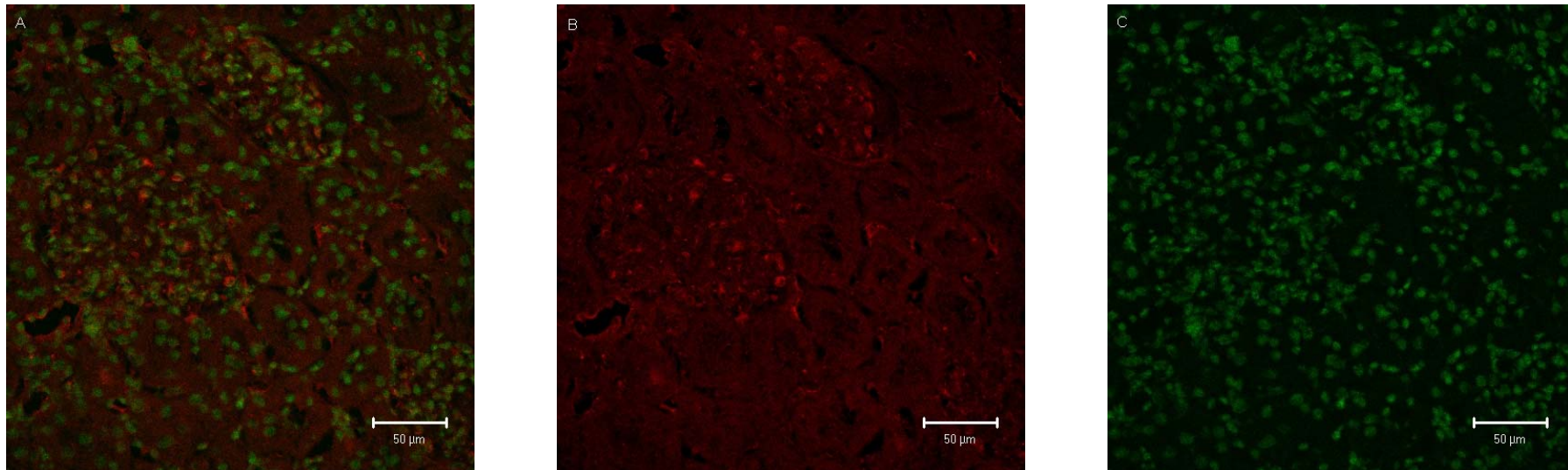


Abb. 11 Darstellung der SAH-Hydrolase (rot) mit einem polyklonalen Primärantikörper des Kaninchens (Verdünnung 1:50) und einem Texas-Red-konjugierten Sekundärantikörper der Ziege (Verdünnung 1:100) in Kombination mit einer Kernfärbung (grün) mit Sytox green (Verdünnung 1:100000) in der Niere der adulten Ratte nach 4-wöchigem IDDM.

A: Ausschnitt aus der Nierenrinde. Simultane Darstellung der SAH-Hydrolase und der Zellkerne.

B: Gleicher Ausschnitt wie in A. Hier aber alleinige Darstellung der SAH-Hydrolase.

C: Gleicher Ausschnitt wie in A. Hier alleinige Darstellung der Zellkerne.

### **3.3.3 Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der adulten Ratte unter experimenteller systemischer Hypoxie**

Unter hypoxischen Bedingungen entsprach die Verteilung der SAH-Hydrolase den Verhältnissen in der Kontrollniere.

In den Glomerula zeigte sich eine besonders deutliche Anfärbung in den Podozyten. Des Weiteren konnte auch hier ein prominentes Signal vorwiegend im apikalen Bereich des Sammelrohrepithels und des Epithels des proximalen Tubulus beobachtet werden. Auf Zellebene ergab die Doppelmarkierung mit Sytox green ebenfalls eine ganz überwiegend zytoplasmatische, perinukleäre Lokalisation des Enzyms. Selten war die Hydrolase auch intranukleär im Randbereich der Kerne lokalisiert (Abb. 12).

Als Zeichen der zellulären Hypoxie mit konsekutiver hydropischer Schwellung war eine deutliche Verengung der Lumina tubulärer Strukturen festzustellen.

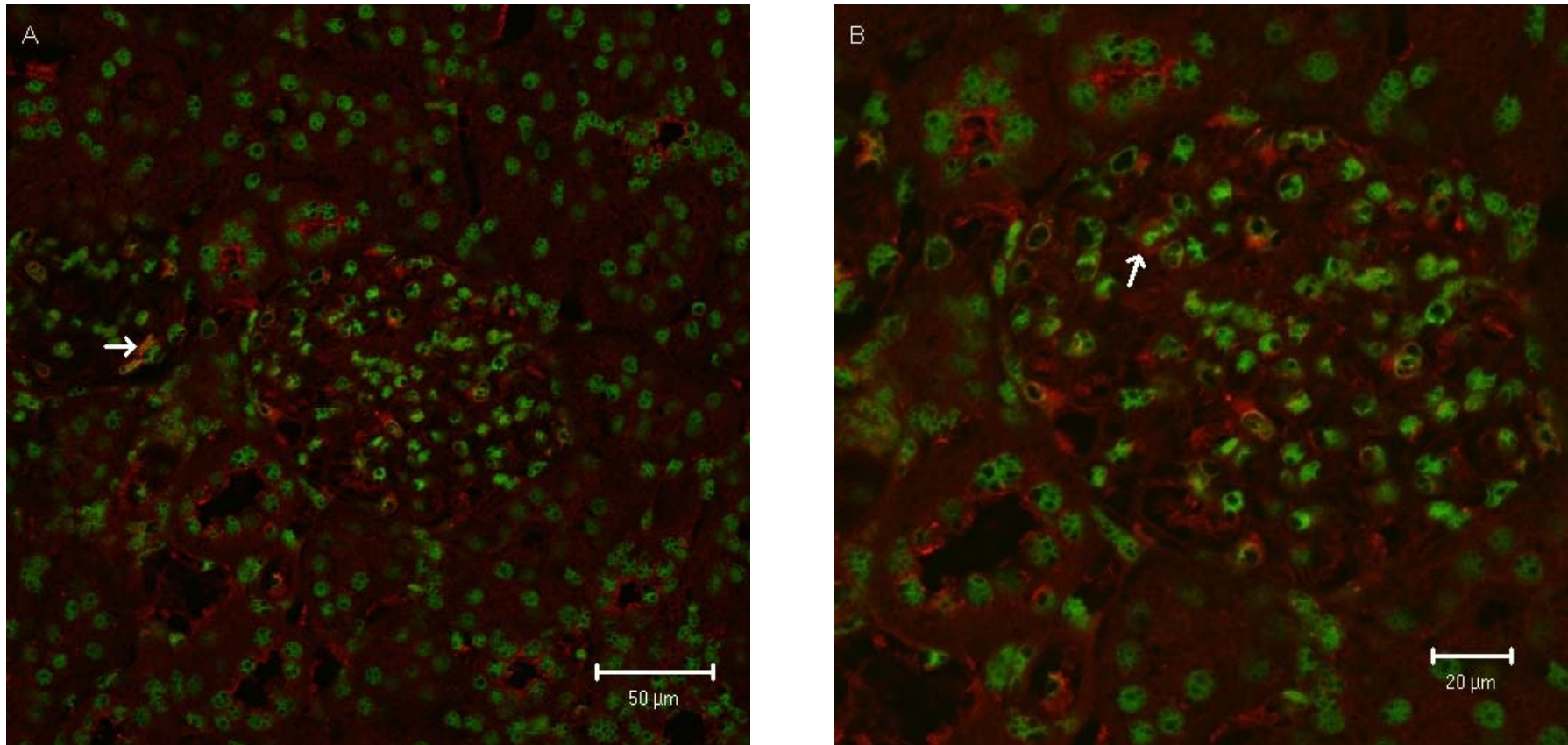


Abb. 12 Darstellung der SAH-Hydrolase (rot) mit einem polyklonalen Primärantikörper des Kaninchens (Verdünnung 1:50) und einem Texas-Red-konjugierten Sekundärantikörper der Ziege (Verdünnung 1:100) in der Rattenniere unter experimenteller Hypoxie durch indirekte Immunfluoreszenz. Zusätzlich wurde eine Zellkernfärbung (grün) mit dem Farbstoff Sytox green (Verdünnung 1:100000) durchgeführt.  
A: Ausschnitt aus der Nierenrinde. Pfeil: Intranukleäre Lokalisation der SAH-Hydrolase.  
B: Glomerulum mit umgebenden Tubuli aus A in stärkerer Vergrößerung. Pfeil: Perinukleäres Verteilungsmuster der SAH-Hydrolase im Zytoplasma eines Podozyten.

### **3.3.4 Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der adulten Ratte mit Puromycin-Aminonukleosid-Nephrose (PAN)**

Untersucht wurden Nieren von Ratten 3 bzw. 11 Tage nach intraperitonealer Injektion von Puromycin.

Nach 3-tägiger PAN zeigte sich ein durch den Entzündungsprozess sehr stark angegriffenes Gewebe. Bereits beim Schneiden am Mikrotom fiel auf, dass die Nieren von sehr bröckeliger Konsistenz waren. Mikroskopisch war zu sehen, dass das Gewebe im Vergleich zu Kontrollnieren wesentlich mehr unspezifische Hintergrundfärbung annahm und insgesamt inhomogener gefärbt war. Die Textur wirkte aufgelockerter, in den Lumina der Tubuli fand sich häufig Zelldetritus (Abb. 13 B).

Hinsichtlich der Verteilung der SAH-Hydrolase ergab sich kein Unterschied zur Kontrollniere. Auch hier war eine starke Anfärbung glomerulär in den Podozyten nachzuweisen. Darüber hinaus stellte sich ein intensives Signal im apikalen Bereich des proximalen Tubulus und des Sammelrohrs dar.

In der Doppelfärbung der SAH-Hydrolase mit dem Kernfarbstoff Sytox green war das Enzym auch hier vorwiegend perinukleär zytoplasmatisch lokalisiert.

Hingegen wurden deutliche morphologische Veränderungen im Gegensatz zur Kontrollniere in der Doppelmarkierung der SAH-Hydrolase mit Synaptopodin sichtbar. Hier kam es zu einer Verplumpung der Podozyten mit deutlicher Rarefizierung bzw. Retraktion der Fußfortsätze (Abb. 13, vergleiche auch Abb. 10). Sofern die feinen, distal gelegenen Verzweigungen der Fußfortsätze noch zu erkennen waren, konnte in ihnen die SAH-Hydrolase nicht nachgewiesen werden.

11 Tage nach Induktion der Nephrose hatte sich der Gewebeszustand wieder deutlich verbessert. Es war nicht nur weniger Hintergrundfärbung, sondern auch eine im Vergleich zum Zustand nach 3-tägiger PAN wesentlich klarer gezeichnete und weniger zerrissene Textur zu verzeichnen.

Auch hier waren im Vergleich mit der Kontrolle keinerlei Unterschiede in der Verteilung der SAH-Hydrolase nachzuweisen.

Auffällig war eine ausgeprägte, im Vergleich zur Kontrolle regelrecht überschießende Regeneration und Wiederaussprossung der Fußfortsätze der Podozyten in der Doppelmarkierung der SAH-Hydrolase mit Synaptopodin (Abb. 14, vgl. auch Abb. 10 und Abb. 13).



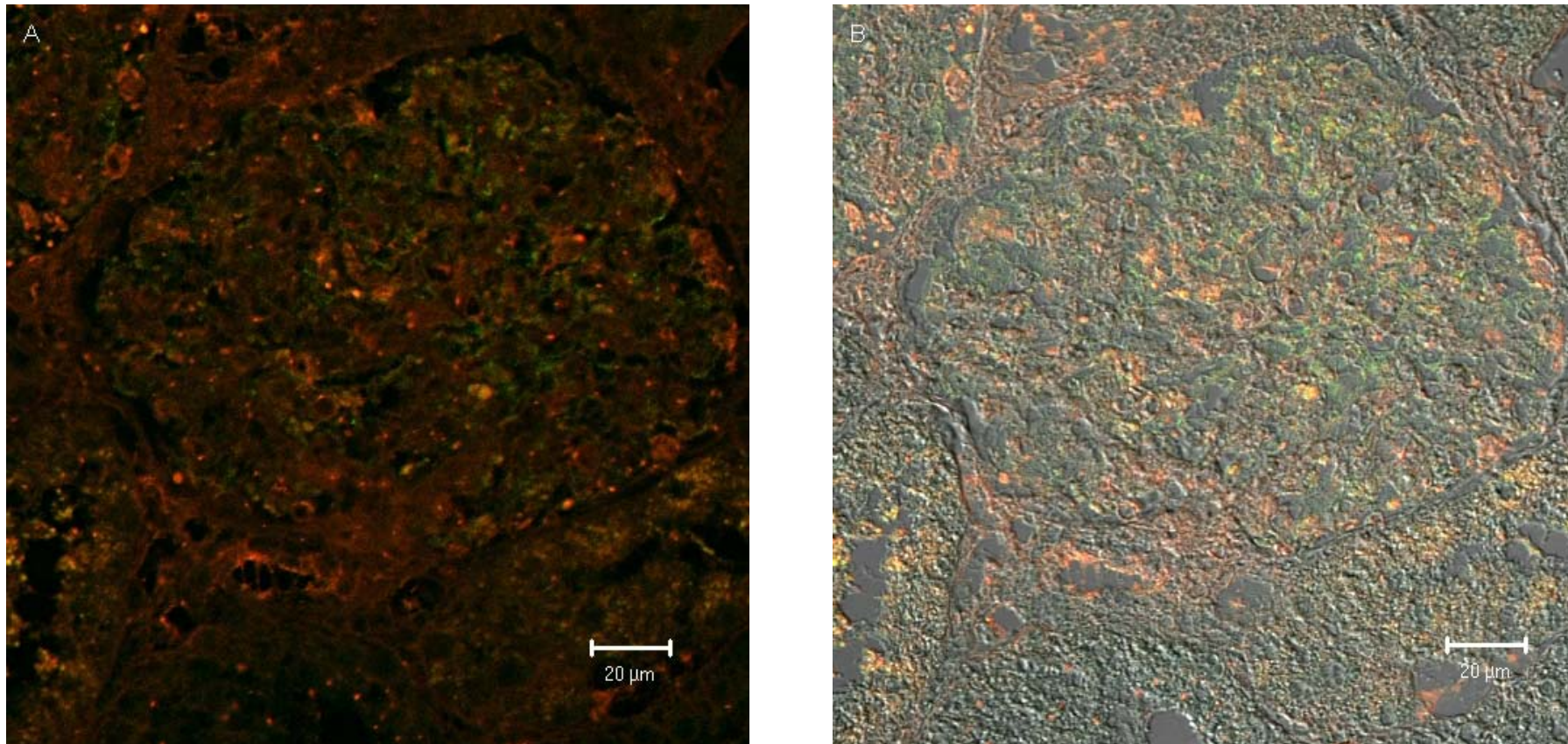


Abb. 13 Immunhistochemische Doppelmarkierung der SAH-Hydrolase (rot) und von Synaptopodin (grün), einem Protein der Podozytenfortsätze, in der Niere der adulten Ratte nach 3-tägiger PAN. Der Primärantikörper gegen Synaptopodin stammte aus der Maus und wurde in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurden ein Cy5-konjugiertes IgG der Ziege gegen Kaninchen und ein Texas-Red-konjugiertes IgG der Ziege gegen Maus (Verdünnung jeweils 1:100) verwendet.

A: Glomerulum.

B: Glomerulum aus A mit überlagertem Transmissionsbild.



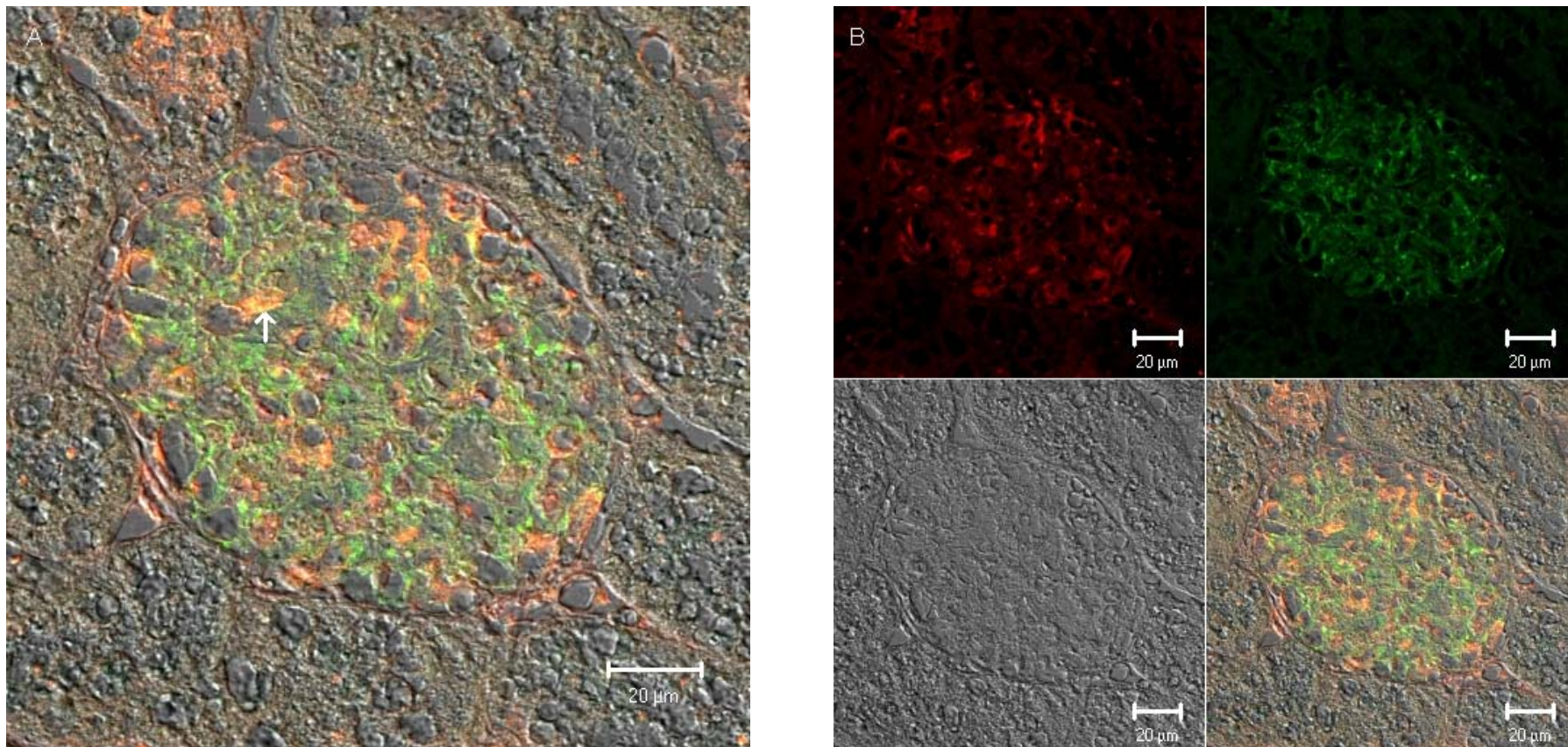


Abb. 14 Immunhistochemische Doppelmarkierung der SAH-Hydrolase (rot) und von Synaptopodin (grün), einem Protein der Podozytenfortsätze, mit überlagertem Transmissionsbild in der Niere der adulten Ratte nach 11-tägiger PAN. Der Primärantikörper gegen Synaptopodin stammte aus der Maus und wurde in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurden ein Cy5-konjugiertes IgG der Ziege gegen Kaninchen und ein Texas-Red-konjugiertes IgG der Ziege gegen Maus (Verdünnung jeweils 1:100) verwendet.  
 A: Glomerulum. Pfeil: Perikaryonaher Abschnitt eines Fußfortsatzes mit einer Kolokalisation von SAH-Hydrolase und Synaptopodin.  
 B: Einzeln dargestellte Farbkanäle von A.



### **3.4 Immunhistochemische Lokalisation des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors**

#### **3.4.1 Lokalisation des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors unter physiologischen Bedingungen in der Niere der adulten Ratte**

Der immunhistochemische Nachweis des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors ergab ein umschriebenes, intensives spezifisches Signal in direkter Umgebung des Glomerulums. Dieses war zwar streng extraglomerulär, also außerhalb der Bowmanschen Kapsel, aber in unmittelbarer räumlicher Beziehung zu dieser lokalisiert (Abb. 15). Ebenfalls in direkter Umgebung hierzu fand sich ein Abschnitt des Tubulussystems, der morphologisch als distaler Tubulus zu identifizieren war. Dieser Sachverhalt legte die Vermutung nahe, dass es sich bei dem beschriebenen Areal um den JGA am Gefäßpol des Nierenkörperchens handelt. Da im JGA mit den Polkissenzellen, der Macula densa und den extraglomerulären Mesangiumzellen drei verschiedene Zelltypen auf engstem Raum vorkommen, wurde eine gleichzeitige Anfärbung des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors mit Cox-2 durchgeführt, um eine genauere Zuordnung des Signals zu den genannten Zellpopulationen vornehmen zu können. Cox-2 soll in der Niere in besonders hohem Maße in den Zellen der Macula densa exprimiert werden. Die Doppelmarkierung ergab eine eindeutige Kolokalisation des Rezeptors mit Cox-2 (Abb. 16). Aus Abb. 16 geht jedoch auch hervor, dass es nicht notwendigerweise zu einer Kolokalisation kam; vielmehr traten auch Bereiche auf, in denen sehr wohl Cox-2, aber kein Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor nachgewiesen werden konnte.

In der Doppelfärbung mit dem Kernfarbstoff Sytox green wurde eine streng extranukleäre Lokalisation des Rezeptors deutlich (Abb. 15 B).

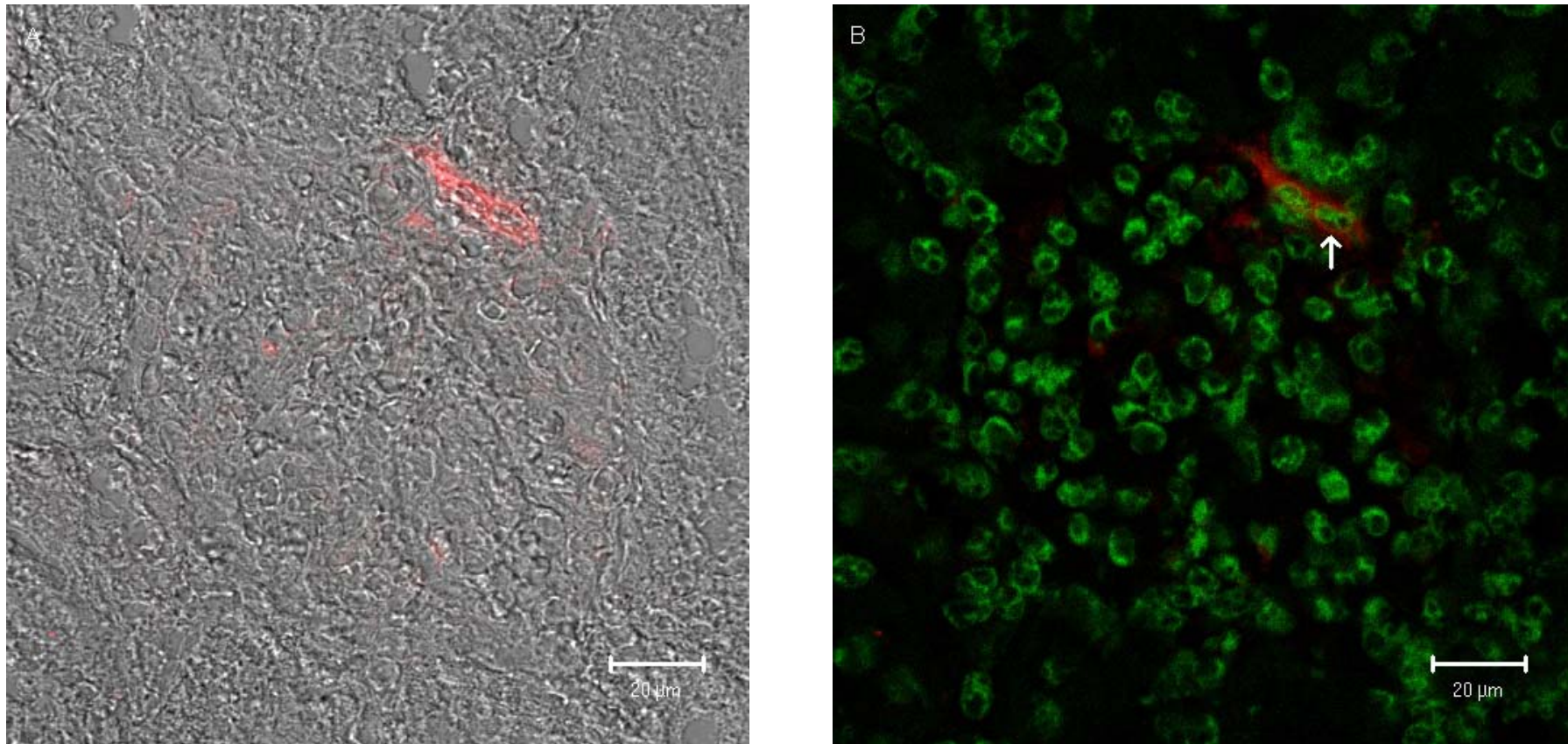


Abb. 15 Darstellung des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors (rot) mit einem polyklonalen Primärantikörper des Kaninchens (Verdünnung 1:100) und einem Cy5-konjugierten Sekundärantikörper der Ziege (Verdünnung 1:100) in der Niere der gesunden adulten Ratte durch Immunfluoreszenz.  
A: Transmissionsbildüberlagerung. Extraglomerulär gelegene, Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor positive Struktur in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem quer angeschnittenen distalen Tubulus.  
B: Doppelmarkierung mit dem Kernfarbstoff Sytox green (Verdünnung 1:100000). Pfeil: Streng extranukleäre Lokalisation des Rezeptors.

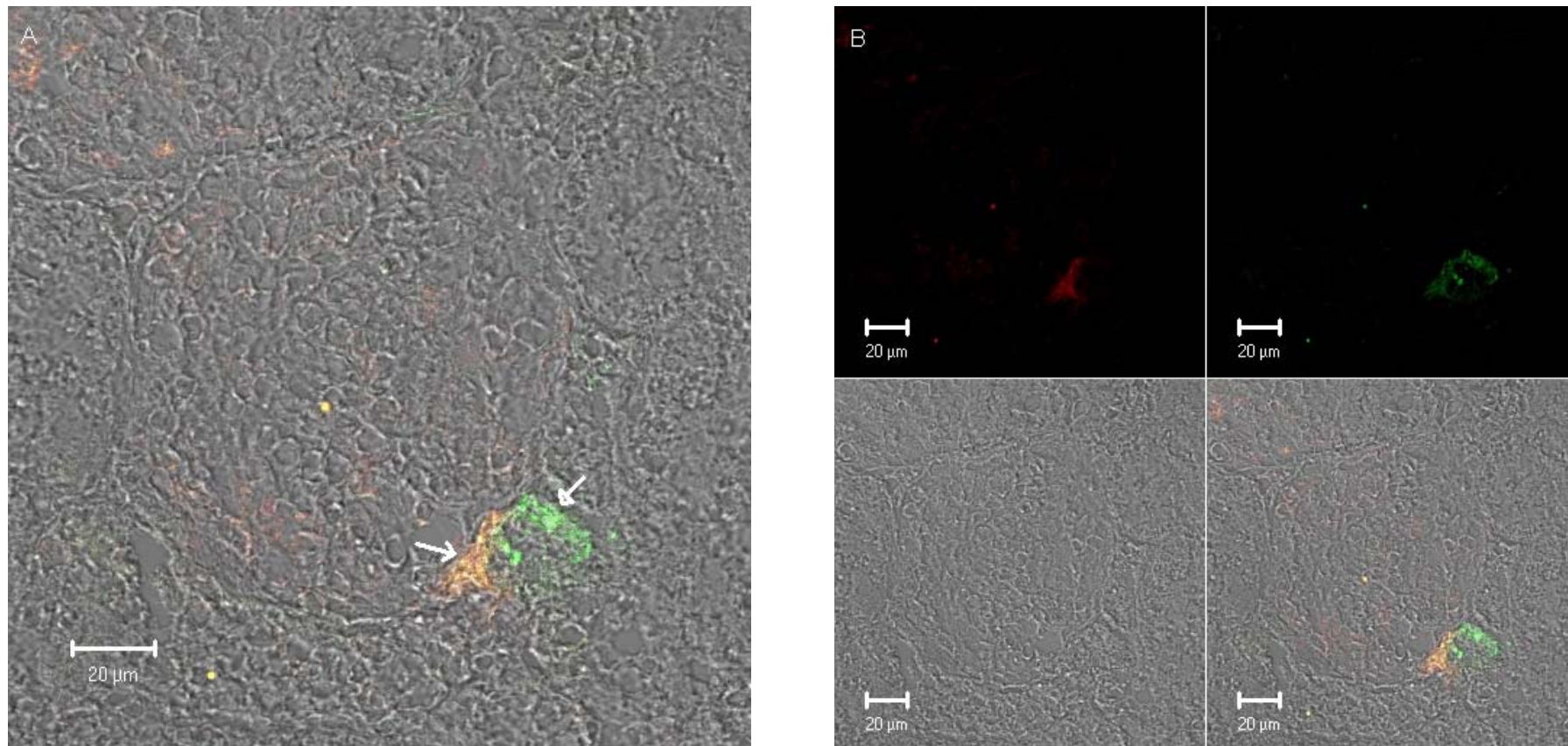


Abb. 16 Immunhistochemische Darstellung des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors (rot) mit gleichzeitiger zusätzlicher Markierung der Macula densa (grün) mit einem polyklonalen Antikörper der Ziege (Verdünnung 1:50) gegen Cox-2 und überlagertem Transmissionsbild. Zur Fluoreszenzmarkierung der Primärantikörper wurden ein Cy5-konjugiertes IgG des Esels gegen Kaninchen (Verdünnung 1:100) und ein Texas-Red-konjugiertes IgG des Esels gegen Ziege (Verdünnung 1:200) eingesetzt.

A: Glomerulum. Offener Pfeil: Kolokalisation des Rezeptors mit Cox-2. Geschlossener Pfeil: Cox-2 positiver Bereich ohne Nachweis des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors

B: Einzeln dargestellte Farbkanäle aus A.

### **3.4.2 Lokalisation des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors in der Niere der adulten Ratte unter experimentell induziertem insulinabhängigen Diabetes mellitus (IDDM)**

Untersucht wurden Nieren von adulten Ratten nach 4-wöchigem IDDM.

Zuallererst fiel der durch den Krankheitszustand verursachte schlechte Gewebszustand mit zahlreichen Rissen sowie eine im Vergleich mit der Kontrolle verstärkte Hintergrundfärbung auf.

Unter diabetischen Bedingungen fanden sich hinsichtlich Lokalisation und der Anzahl der nachzuweisenden Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptoren keine Unterschiede zur Kontrollniere. Auch hier stellte sich ein umschriebenes, zwar streng extraglomerulär, aber ganz dicht beim Glomerulum gelegenes Signal dar, das darüber hinaus in direkter Nachbarschaft zu einem distalen Tubulus lokalisiert war (Abb. 17).

Die Doppelfärbung des Rezeptors mit Cox-2 zeigte auch in diesem Falle eine eindeutige Kolo-kalisation, also ein Vorkommen des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors in den Zellen der Macula densa, wobei auch Bereiche vorzufinden waren, in denen zwar Cox-2, aber kein Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor nachzuweisen war (Abb. 17).

Analog zu den unter Kontrollbedingungen gehaltenen Tieren wurde in der Doppelfärbung mit dem Kernfarbstoff Sytox green eine streng extranukleäre Lokalisation des Rezeptors deutlich.



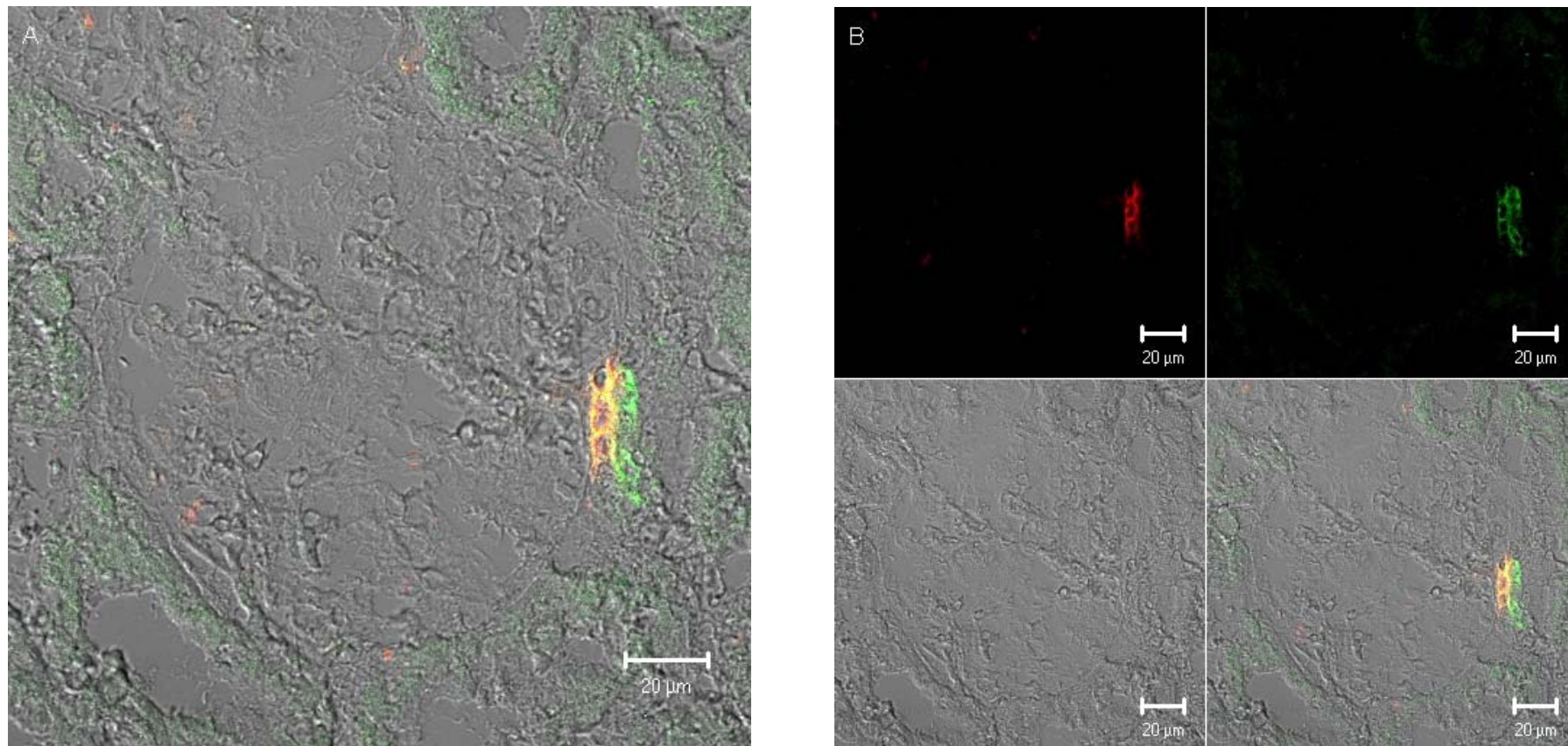


Abb. 17 Immunhistochemischer Nachweis des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors (rot) mit einem polyklonalen Primärantikörper des Kaninchens (Verdünnung 1:100) in der Niere der diabetischen adulten Ratte. Gleichzeitig wurden die Zellen der Macula densa (grün) mit einem polyklonalen Antikörper der Ziege (Verdünnung 1:50) gegen Cox-2 angefärbt und das Transmissionsbild überlagert. Zur Detektion der Primärantikörper dienen ein Cy5-konjugiertes IgG des Esels gegen Kaninchen (Verdünnung 1:100) und ein Texas-Red-konjugiertes IgG des Esels gegen Ziege (Verdünnung 1:200).

A: Glomerulum mit umgebenden Tubuli.  
B: Einzeln dargestellte Farbkanäle aus A.

### **3.4.3 Lokalisation des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors in der Niere der adulten Ratte unter experimenteller systemischer Hypoxie**

Die experimentelle systemische Hypoxie führte ebenso zu keiner Veränderung der Lokalisation des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors. Eine intensive spezifische Anfärbung stellte sich auch hier im JGA dar. Dort war das entsprechende Signal extraglomerulär zwischen der Bowmanschen Kapsel und einem distalen Tubulus zu detektieren.

Bei der gleichzeitigen Anfärbung des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors und der Cox-2 konnte zweifelsfrei eine Kolo-kalisation der beiden Proteine nachgewiesen werden (Abb. 18). Obwohl Abb. 18 eine komplette Kolo-kalisation zeigt, war diese häufig auch nur partiell zu beobachten, d. h. es traten Bereiche auf, in denen sowohl der Rezeptor als auch die Cox-2 nachgewiesen werden konnten, und, unmittelbar benachbart, auch Bereiche, in denen nur Cox-2, aber kein Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor erkennbar war.

In der Doppelfärbung mit einem Antikörper gegen den A<sub>1</sub>-Rezeptor und dem Kernfarbstoff Sytox green wurde deutlich, dass die Zellkerne von der Anfärbung durch den Antikörper ausgespart blieben, der Rezeptor also nicht im Zellkern vorkam.

Die zelluläre Hypoxie hatte eine hydropische Zellschwellung zur Folge, was sich in einer Verminderung des Durchmessers der Tubuluslichtungen äußerte.

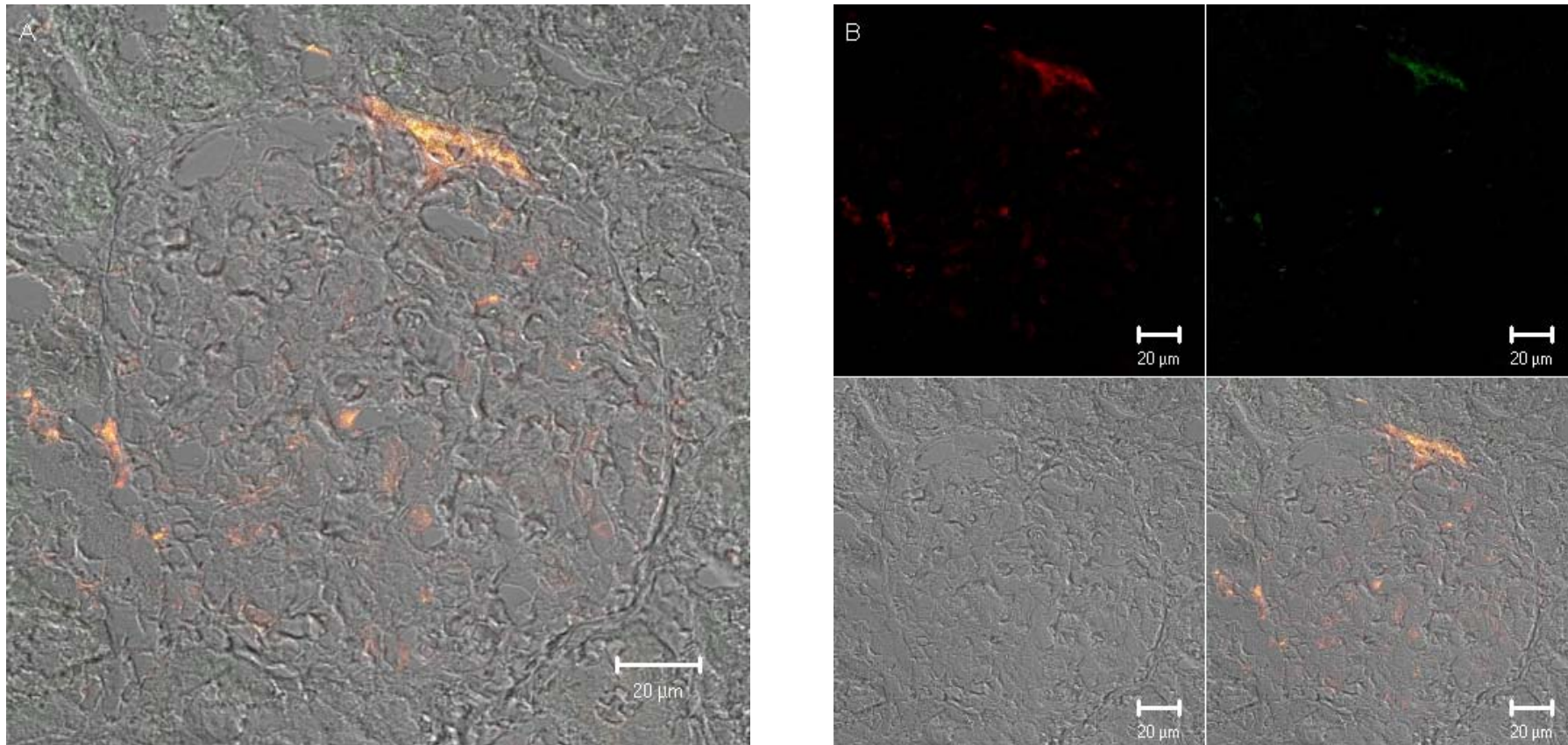


Abb. 18 Immunhistochemische Darstellung des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors (rot) mit einem polyklonalen Primärantikörper des Kaninchens (Verdünnung 1:100) in der Niere der unter Hypoxie gehaltenen adulten Ratte. Gleichzeitig wurden die Zellen der Macula densa (grün) mit einem polyklonalen Antikörper der Ziege (Verdünnung 1:50) gegen Cox-2 angefärbt und das Transmissionsbild überlagert. Zur Detektion der Primärantikörper dienten ein Cy5-konjugiertes IgG des Esels gegen Kaninchen (Verdünnung 1:100) und ein Texas-Red-konjugiertes IgG des Esels gegen Ziege (Verdünnung 1:200).

A: Glomerulum mit umgebenden Tubuli.

B: Einzeln dargestellte Farbkanäle aus A.

#### **3.4.4 Lokalisation des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors in der Niere der adulten Ratte mit Puromycin-Aminonukleosid-Nephrose (PAN)**

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an Nieren vorgenommen, die 3 bzw. 11 Tage nach Induktion der PAN entnommen worden waren.

Der Entzündungsprozess führte zu einer Verschlechterung des Gewebszustandes nach 3-tägiger PAN, was vor allem in den Transmissionsaufnahmen sichtbar war. Dies äußerte sich in weniger klar konturierten Strukturen, reichlich Zelldetritus in den Tubuluslichtungen und einem verstärkten Auftreten von Rissen im Gewebe, die vermutlich durch die bröckelige Konsistenz beim Schneiden am Mikrotom verursacht wurden. Überdies nahm das Gewebe generell wesentlich mehr Hintergrundfärbung an als die Kontrollnieren. Nach 11-tägiger PAN kam es zu einer deutlichen Rückbildung der beschriebenen Vorgänge, wobei noch nicht wieder der Zustand unter physiologischen Bedingungen erreicht war.

In beiden Fällen zeigte sich wiederum keine Veränderung der Lokalisation des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors im Vergleich mit den Untersuchungen unter Kontrollbedingungen. Die Färbungen ergaben ein kräftiges umschriebenes Signal im JGA.

Mit Hilfe der Doppelmarkierung mit dem Kernfarbstoff Sytox green konnte eine streng extranukleäre Lokalisation des Rezeptors auch hier bestätigt werden (Abb. 19).

Die gleichzeitige Anfärbung des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors mit Cox-2 zeigte eine eindeutige Kolo-kalisation in der Macula densa, wobei auch hier Bereiche auftraten, die Cox-2 positiv, aber Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor negativ waren (Abb. 20).



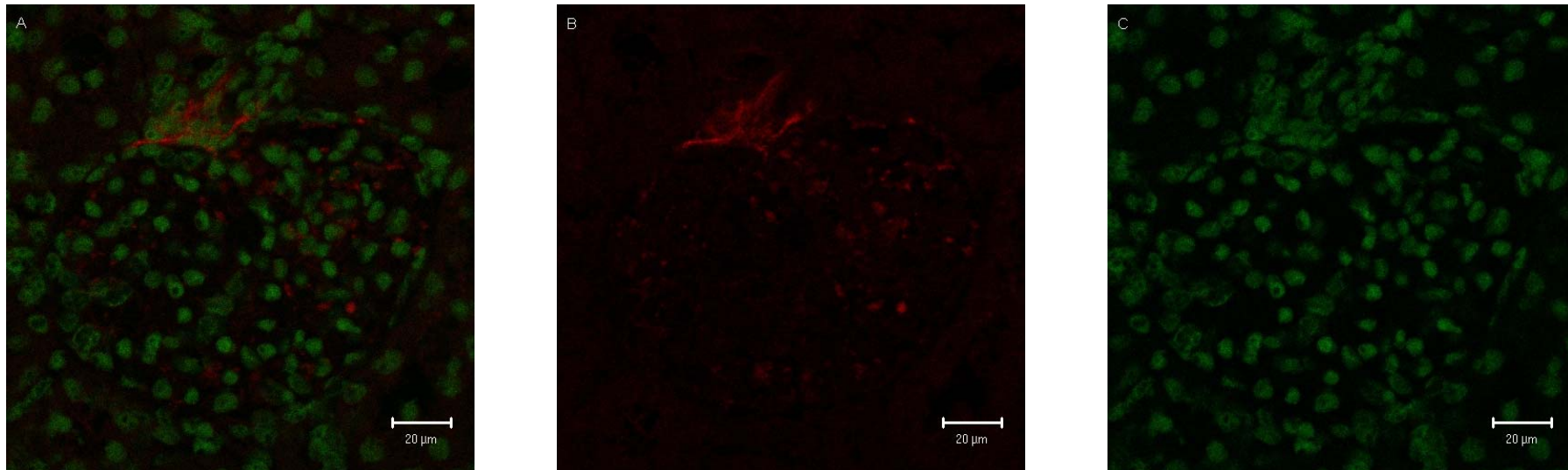


Abb. 19 Immunhistochemischer Nachweis des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors (rot) nach 3-tägiger PAN in der Niere der adulten Ratte mit einem polyklonalen Antikörper des Kaninchens (Verdünnung 1:100) und einem Texas-Red-konjugierten Sekundärantikörper der Ziege (Verdünnung 1:100). Zusätzlich wurde hier eine Kernfärbung (grün) mit Sytox green (Verdünnung 1:100000) durchgeführt.  
A: Doppelmarkiertes Glomerulum.  
B: Glomerulum aus A. Alleinige Darstellung des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors.  
C: Glomerulum aus A. Alleinige Darstellung der Zellkerne.

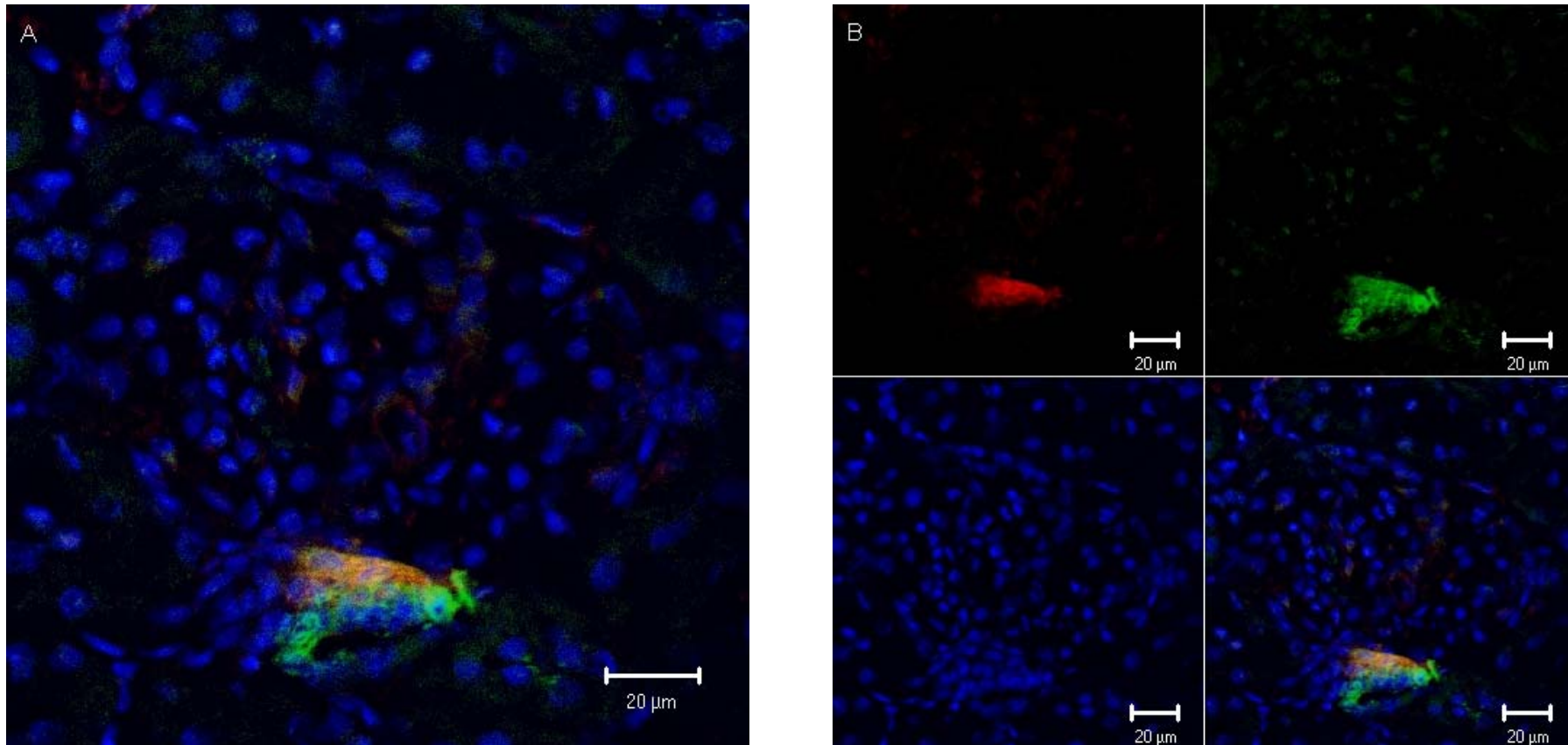


Abb. 20 Nachweis des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors (rot) nach 11-tägiger PAN in Verbindung mit einer Anfärbung der Macula densa (grün) durch einen polyklonalen Antikörper der Ziege gegen Cox-2 (Verdünnung 1:50) und einer Kernfärbung (blau) mit Sytox green (Verdünnung 1:100000). Als Sekundäntikörper wurden ein Cy5-konjugiertes IgG des Esels gegen Kaninchen (Verdünnung 1:100) und ein Texas-Red-konjugiertes IgG des Esels gegen Ziege (Verdünnung 1:200) eingesetzt.  
A: Dreifachmarkiertes Glomerulum.  
B: Einzeln dargestellte Farbkanäle aus A.

### 3.5 Quantitative Analyse der Adeninnukleoside und Bestimmung des Methylierungspotentials (MP)

Der Gewebsgehalt der Nieren an den Adeninnukleosiden SAH, SAM und Adenosin wurde mittels HPLC quantitativ bestimmt und die Ergebnisse unter Kontroll- sowie verschiedenen pathologischen Bedingungen verglichen. Bei den Krankheitszuständen handelte es sich einerseits um eine experimentell induzierte Glomerulonephritis (PAN; 3 bzw. 11 Tage nach Applikation), andererseits um eine experimentell herbeigeführte hypoxische Nephropathie und schließlich um einen experimentell induzierten, insulinpflichtigen Diabetes mellitus.

Unter Kontrollbedingungen betrug die SAH-Konzentration im Nierengewebe  $0,65 \pm 0,07$  nmol/g FG, diejenige an SAM  $35,4 \pm 2,7$  nmol/g FG und der Gewebsgehalt an Adenosin  $4,5 \pm 0,3$  nmol/g FG. Nach 3-tägiger PAN zeigten sich Konzentrationen der Metabolite von  $1,4 \pm 0,3$  nmol/g FG für SAH,  $23,7 \pm 0,4$  nmol/g FG für SAM und  $7,0 \pm 0,3$  nmol/g FG für Adenosin (alle drei signifikant verändert). Ebenfalls signifikante Veränderungen zeigten die gemessenen Werte für SAH (erhöht), SAM (erniedrigt) und Adenosin (erhöht) nach 11-tägiger PAN mit  $2,5 \pm 0,3$  nmol/g FG,  $26,0 \pm 1,0$  nmol/g FG bzw.  $10,7 \pm 1,9$  nmol/g FG. Unter Hypoxie sank der Wert für SAH auf  $0,54 \pm 0,06$  nmol/g FG und der für SAM signifikant auf  $24,3 \pm 0,8$  nmol/g FG, während der Wert für Adenosin signifikant auf  $7,6 \pm 0,5$  nmol/g FG stieg. Nach 4-wöchigem insulinpflichtigem Diabetes mellitus wurden Gewebskonzentrationen von  $0,27 \pm 0,05$  nmol/g FG für SAH,  $23,8 \pm 1,6$  nmol/g FG für SAM und  $5,7 \pm 0,7$  nmol/g FG für Adenosin gemessen.

Aus den angegebenen Werten ließ sich dann das jeweilige MP bestimmen, das als Quotient aus der SAM- und der SAH-Konzentration definiert ( $MP = SAM/SAH$ ) und eine dimensionslose Größe ist. Das MP unter Kontrollbedingungen betrug  $54,5 \pm 3,0$ . Im Falle der PAN fiel es nach 3 Tagen signifikant auf  $16,0 \pm 2,0$ , nach 11 Tagen sogar signifikant auf  $11,3 \pm 0,8$ . Unter Hypoxie zeigte sich ebenfalls eine Verringerung, und zwar auf  $47,1 \pm 5,0$ ; hingegen stieg das MP unter diabetischen Bedingungen auf  $88,2 \pm 4,0$ .

Tab. 8 Gewebskonzentration der Adeninnukleoside SAH, SAM und Adenosin unter Kontroll- und pathologischen Bedingungen sowie das jeweils resultierende MP. Die entnommenen Nieren wurden wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben aufgearbeitet und der Gewebsextrakt modifiziert nach Delabar et al. (1999) mittels HPLC untersucht. Alle angegebenen Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n unabhängigen Versuchswiederholungen. (\* $p < 0,05$  versus Kontrolle)

Untersuchtes Gewebe	n	SAH [nmol/g FG]	SAM [nmol/g FG]	Adenosin [nmol/g FG]	MP (= [SAM]/[SAH])
Kontrolle	4	0,65 $\pm$ 0,07	35,4 $\pm$ 2,7	4,5 $\pm$ 0,3	54,5 $\pm$ 3,0
PAN 3 Tage	3	1,4 $\pm$ 0,3 *	23,7 $\pm$ 0,4 *	7,0 $\pm$ 0,3 *	16,9 $\pm$ 2,0 *
PAN 11 Tage	3	2,5 $\pm$ 0,3 *	26,0 $\pm$ 1,0 *	10,7 $\pm$ 1,9 *	11,3 $\pm$ 0,8 *
Hypoxie	7	0,54 $\pm$ 0,06	24,3 $\pm$ 0,8 *	7,6 $\pm$ 0,5 *	47,1 $\pm$ 5,0
Diabetes	4	0,27 $\pm$ 0,05 *	23,8 $\pm$ 1,6 *	5,7 $\pm$ 0,7	88,2 $\pm$ 4,0 *

### 3.6 Bestimmung der Expression des SAH-Hydrolase-Gens und des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Gens auf mRNA-Ebene

Die SAH-Hydrolase- und die Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Genexpression wurden auf mRNA-Ebene mittels real-time-RT-PCR untersucht. Zielstellung war, die Expression der genannten Gene in der Niere unter Kontroll- und den verschiedenen pathologischen Bedingungen zu vergleichen. Als interner Standard bei der Genexpressionsanalyse wurde in allen Fällen die Expression der 18S rRNA verwendet. Die erhobenen Daten sind als Induktionsfaktoren angegeben (Tab. 9), die als Maß für die relative Expressionsrate eines Gens herangezogen werden können.

Unter Kontrollbedingungen ergab sich für die mRNA-Expression des SAH-Hydrolase-Gens ein Induktionsfaktor von  $0,92 \pm 0,2$ . Im Gegensatz dazu sank der Wert nach 3-tägiger PAN in statistisch signifikantem Maße um den Faktor 1,67 auf  $0,55 \pm 0,03$  ab, um sich dann aber nach 11-tägiger PAN wieder zu erholen bzw. sich sogar auf  $1,17 \pm 0,3$  zu erhöhen, was jedoch keiner statistischen Signifikanz entspricht. Auch unter Hypoxie wurde eine signifikante Veränderung der relativen Genexpressionsrate beobachtet. Hier lag der Wert bei  $0,29 \pm 0,05$ ; dies bedeutet ein Absinken um den Faktor 3,17 gegenüber der

Kontrolle. Unter diabetischen Bedingungen erhöhte sich der Induktionsfaktor nur geringfügig auf  $0,99 \pm 0,4$ .

Für den Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor ergab sich unter Kontrollbedingungen ein Induktionsfaktor von  $0,86 \pm 0,1$ . Unter keinem der experimentell induzierten Krankheitszustände zeigte sich eine statistisch signifikante Veränderung der Expression des Rezeptormoleküls. Nach 3-tägiger PAN war der Wert auf  $0,7 \pm 0,17$  abgesunken, um sich dann nach 11 Tagen wieder nahe dem Kontrollwert bei  $0,82 \pm 0,1$  einzupendeln. In hypoxischen und diabetischen Nieren beliefen sich die Werte auf  $0,61 \pm 0,07$  bzw.  $0,74 \pm 0,1$ .

Tab. 9 Induktionsfaktoren der mRNA-Expression des SAH-Hydrolase-Gens und des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Gens bei der real-time-RT-PCR unter Kontroll- und pathologischen Bedingungen als Maß für die relative Expressionsrate des entsprechenden Gens. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des mathematischen Verfahrens nach Pfaffl (2001) [115]. Als interner Standard diente die Expression der 18S rRNA. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n unabhängigen Versuchswiederholungen. (\*p<0,05 versus Kontrolle)

<b>Untersuchtes Gewebe</b>	<b>n</b>	<b>SAH-Hydrolase</b>	<b>Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor</b>
Kontrolle	8	$0,92 \pm 0,2$	$0,86 \pm 0,1$
PAN 3 Tage	3	$0,55 \pm 0,03$ *	$0,7 \pm 0,17$
PAN 11 Tage	3	$1,17 \pm 0,3$	$0,82 \pm 0,1$
Hypoxie	7	$0,29 \pm 0,05$ *	$0,61 \pm 0,07$
Diabetes	7	$0,99 \pm 0,4$	$0,74 \pm 0,1$

### 3.7 Bestimmung der Proteinexpression der SAH-Hydrolase und des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors

Die Proteinexpression der SAH-Hydrolase und des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors unter Kontrollbedingungen und den verschiedenen Krankheitszuständen wurde mittels Western Blot untersucht. Zuvor waren die Proteine mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert worden.

#### 3.7.1 Western-Blot-Analyse der SAH-Hydrolase

Zur Detektion des Enzyms wurde ein polyklonaler Antikörper des Kaninchens eingesetzt.

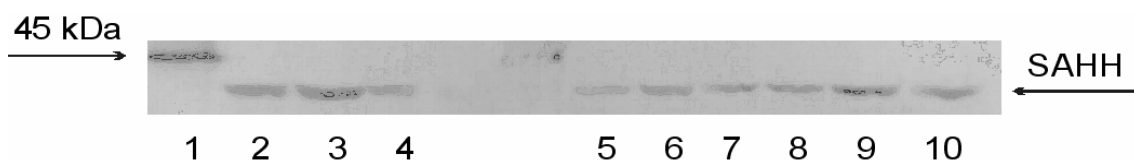


Abb. 21 A Western-Blot-Analyse der SAH-Hydrolase.  
 Bahn 1: Standardmolekulargewichtsmarker (BioRad).  
 Bahnen 2-4: Kontrollnieren.  
 Bahnen 5, 6: PAN-Nieren nach 3 Tagen.  
 Bahnen 7, 8: PAN-Nieren nach 11 Tagen.  
 Bahnen 9, 10: Hypoxie-Nieren.

Der immunologische Nachweis der SAH-Hydrolase aus nephritischen und hypoxischen Nieren (Abb. 21 A) zeigte eine deutliche Bande bei ca. 45 kDa. Dieses Molekulargewicht stimmt gut mit den Angaben in der Literatur für ein Monomer der SAH-Hydrolase der Ratte überein. Aufgrund der technischen Gegebenheiten (Luftblase im Gel) konnte leider keine quantitative, sondern lediglich eine qualitative Auswertung vorgenommen werden.

Die separat durchgeführte Western-Blot-Analyse der SAH-Hydrolase aus diabetischen Nieren (Abb. 21 B) ergab ebenfalls eine klar der SAH-Hydrolase

zuzuordnende Bande bei ca. 45 kDa. Vermutlich auf Alterungs- und Degradationsprozesse ist die unscharfe Bande der SAH-Hydrolase aus den entsprechenden Kontrollnieren zurückzuführen. Die Farbintensität der Banden aus diabetischen Nieren entspricht der aus Kontrollgewebe.

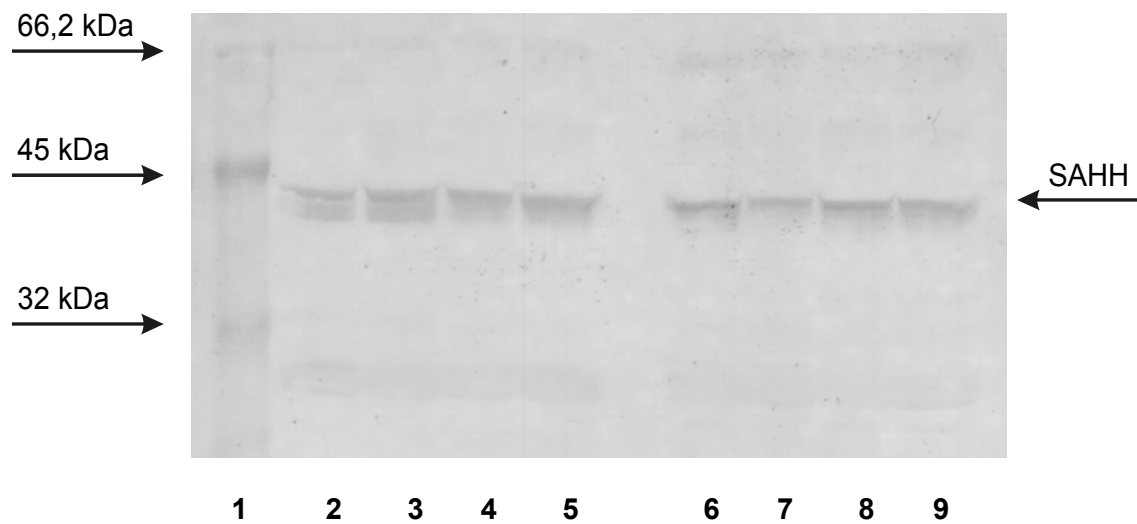


Abb. 21 B Western-Blot-Analyse der SAH-Hydrolase.  
Bahn 1: Standardmolekulargewichtsmarker (BioRad).  
Bahnen 2-5: Kontrollnieren.  
Bahnen 6-9: Diabetische Nieren.

### 3.7.2 Western-Blot-Analyse des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors

Der Nachweis des Rezeptormoleküls wurde mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper geführt.

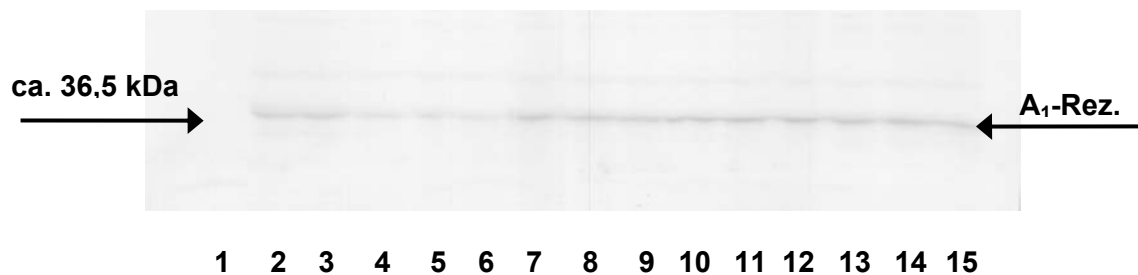


Abb. 22 Western-Blot-Analyse des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors.

- Bahn 1: Standardmolekulargewichtsmarker (BioRad), hier nur sehr schwach angefärbt.
- Bahnen 2, 3: Kontrollnieren.
- Bahnen 4-6: Diabetes-Nieren.
- Bahnen 7-9: Hypoxie-Nieren.
- Bahnen 10-12: PAN-Nieren nach 3 Tagen.
- Bahnen 13-15: PAN-Nieren nach 11 Tagen.

In der Immunoblot-Analyse (Abb. 22) konnte in allen Proben eine deutliche, durch den Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor verursachte Bande bei ungefähr 36,5 kDa nachgewiesen werden. Es zeigten sich in Farbtintensität und Größe recht einheitlich gezeichnete Banden für alle Gewebeszustände mit Ausnahme des Diabetes mellitus, wo die Banden etwas schwächer gefärbt waren.



### 3.8 Aktivitätsbestimmung der SAH-Hydrolase

Die Enzymaktivität der SAH-Hydrolase wurde spektralphotometrisch bei 578 nm mit Hilfe der MTT-Formazan-Methode aus dem Rohextrakt des Nierengewebes bestimmt und unter Zuhilfenahme des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet.

Tab. 10 SAH-Hydrolase-Aktivität im Rohextrakt des Nierengewebes.  
Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n unabhängigen Versuchswiederholungen. (\*p<0,05 versus Kontrolle)

<b>Untersuchtes Gewebe</b>	<b>n</b>	<b>SAH-Hydrolase-Aktivität [mU/mg]</b>
Kontrolle	8	0,64 $\pm$ 0,05
PAN 3 Tage	3	0,53 $\pm$ 0,01
PAN 11 Tage	3	0,63 $\pm$ 0,02
Hypoxie	7	0,75 $\pm$ 0,02
Diabetes	7	0,66 $\pm$ 0,04

In Rohextrakt der Kontrollnieren betrug die Aktivität der SAH-Hydrolase 0,64  $\pm$  0,05 mU/mg (Tab. 10). Nach 3-tägiger PAN sank dieser Wert um den Faktor 1,21 auf 0,53  $\pm$  0,01 mU/mg, um sich dann nach 11-tägiger PAN wieder auf 0,63  $\pm$  0,02 mU/mg zu erholen. In beiden Fällen entspricht diese Veränderung jedoch keiner statistischen Signifikanz. Unter Hypoxie erhöhte sich der Wert gegenüber der Kontrolle in nicht signifikantem Ausmaß um den Faktor 1,17 auf 0,75  $\pm$  0,02 mU/mg. Auch im diabetischen Falle kam es nur zu einer unwesentlichen, statistisch nicht signifikanten Erhöhung auf 0,66  $\pm$  0,04 mU/mg.

## 4 Diskussion

Das zytoplasmatische Enzym SAH-Hydrolase fungiert an einem wichtigen Verzweigungspunkt des zytosolischen Stoffwechsels und stellt eine funktionelle Verbindung zwischen Transmethylierungs- und Transsulfurierungsprozessen, dem Energiestoffwechsel sowie dem Purinmetabolismus her. In einer Studie von Kloor et al. (2000) [76] zur Lokalisation des Enzyms in der Niere der gesunden adulten Ratte wurde es dort ubiquitär nachgewiesen. Dabei fiel in der Immunhistochemie eine besonders intensive Anfärbung in den Podozyten auf.

Der Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor ist ein integrales Membranprotein und gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. In der Niere vermittelt er die Vasokonstriktion in der glomerulären afferenten Arteriole im Rahmen der tubuloglomerulären Rückkopplung (tubuloglomerular feedback, TGF). Darüber hinaus wird ihm eine entscheidende Funktion in der Regulation der Reninsekretion im juxtaglomerulären Apparat (JGA) zugeschrieben. Die Datenlage über die Lokalisation und Expression des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors in der Niere ist an manchen Stellen bisher recht uneinheitlich.

In dieser Arbeit wurden die Lokalisation und Expression beider Proteine in der Rattenniere unter Kontroll- und drei verschiedenen pathologischen Bedingungen untersucht und verglichen. Bei den Krankheitszuständen handelte es sich um Nieren nach vierwöchigem insulinpflichtigen Diabetes mellitus, nach vierstündiger systemischer Hypoxie sowie nach drei- und elftägiger Puromycin-Aminonukleosid-Nephrose (PAN).

Zur Bestimmung der Lokalisation wurden immunhistochemisch angefärbte Kryostatschnitte am konfokalen Laser-Scan-Mikroskop untersucht. Die Expressionsanalyse erfolgte zum einen auf mRNA-Ebene mittels real-time-RT-PCR, zum anderen auf Proteinebene mittels Western Blotting. Darüber hinaus wurden quantitative Analysen der Gewebsspiegel der Adeninnukleoside SAM, SAH und Adenosin mittels HPLC sowie eine spektralphotometrische Enzymaktivitätsbestimmung der SAH-Hydrolase mit Hilfe der MTT-Formazan-Methode durchgeführt.

#### 4.1 Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase

Mit Hilfe der Immunhistochemie konnte die SAH-Hydrolase ubiquitär im Nierenparenchym der gesunden adulten Ratte nachgewiesen werden, also sowohl glomerulär als auch tubulär (Abb. 8-10). Im Tubulussystem fiel eine starke Anfärbung durch den gegen SAH-Hydrolase gerichteten Antikörper apikal in den Epithelien der proximalen Tubuli und der Sammelrohre auf (Abb. 8 und 9). Glomerulär zeigte sich eine besonders intensive Anfärbung der Podozyten. Diese Befunde entsprechen exakt den Ergebnissen von Kloor et al. (2000) [76].

Podozyten sind hochspezialisierte epitheliale Zellen mit begrenzter Teilungsfähigkeit, die die glomeruläre Gewebsarchitektur stabilisieren, indem sie Zugspannungen und Scherkräfte abpuffern, die auf die glomeruläre Basalmembran (GBM) und das Kapillarkonvolut einwirken [111]. Sie besitzen primäre und davon ausgehend sekundäre Verzweigungen. Die sehr feinen, außerordentlich zahlreichen interdigitierenden Sekundärfortsätze legen sich von der Harnseite aus an die GBM an. Zwischen diesen Fortsätzen ist eine Schlitzmembran ausgebildet, die mit entscheidend für die Permeabilität des glomerulären Filters ist [112]. Die Podozyten enthalten große Mengen an Mikrotubuli, Mikrofilamenten und Intermediärfilamenten im Zytoplasma; vor allem in den Fußfortsätzen finden sich große Mengen an kontraktilen Aktinfilamenten [4, 24].

Neben den bereits genannten kommen den Podozyten weitere wichtige Funktionen zu. So sind sie beispielsweise an der Synthese und am Abbau der GBM, der Regulation der glomerulären Filtration und an immunologischen Prozessen beteiligt [99]. Der hohe SAH-Hydrolase-Gehalt in den Podozyten könnte auf ein hohes Maß an Transmethylierungen hindeuten. Dies erscheint durchaus plausibel, da die Podozyten sehr stoffwechselaktive Zellen sind. Sie besitzen große Zellkerne, prominente Nukleoli, ein gut entwickeltes raues endoplasmatisches Retikulum und riesige Golgi-Apparate, was für ein hohes Maß an Genexpression, Proteinsynthese und posttranslationalen

Modifikationen spricht [99]. An all diesen Vorgängen sind wiederum Methylierungsreaktionen beteiligt.

In einer speziellen Doppelfärbung, bei der nicht nur die SAH-Hydrolase, sondern auch Synaptopodin, ein zytoplasmatisches Aktin-assoziiertes Protein der Fortsätze differenzierter Podozyten [100], mit einem spezifischen Antikörper markiert wurde, ergab sich eine homogene, überwiegend auf das Perikaryon begrenzte Lokalisation des Enzyms in den Podozyten (Abb. 10). Lediglich in den proximalen Abschnitten der Fortsätze, direkt an deren Abgang von den Perikaryen, konnten mit der angewandten Methode noch geringe Mengen SAH-Hydrolase nachgewiesen werden.

Die Doppelmarkierung mit dem Kernfarbstoff Sytox green zeigte, dass die SAH-Hydrolase in erster Linie perinukleär, die Zellkerne regelrecht aussparend, im Zytoplasma gelegen ist (Abb. 8 B). Vereinzelt auftretende intranukleäre Simultananfärbungen, vor allem im Randbereich der Zellkerne, sind vermutlich auf die durch die Acetonfixierung oder den Schneidevorgang am Mikrotom bedingte Schädigung zellulärer und subzellulärer Strukturen zurückzuführen und stellen somit ein Artefakt und keine echte Kolo­kalisierung dar. Auch in der Literatur war die SAH-Hydrolase lange Zeit nur als rein zytoplasmatisches Enzym beschrieben. Inzwischen sind aber auch intranukleäre Lokalisationen nachgewiesen worden. So kommt es in transkriptionell aktiven Zellkernen des Afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) zu einer Kolo­kalisierung der SAH-Hydrolase mit der RNA-Polymerase II [117]. Dabei wird der SAH-Hydrolase eine entscheidende Rolle bei der Methylierungsreaktion der Kopfgruppe (Cap-Struktur) am 5'-Ende der mRNA zugeschrieben. Ferner beobachteten Kloor et al. (2007) [80] eine intranukleäre Lokalisation der SAH-Hydrolase in interstitiellen Zellen der Rinde und des äußeren Marks von Rattennieren unter hypoxischen Bedingungen. Die interstitiellen Zellen sind der Ort der Erythropoietinbildung in der Niere. Unter hypoxischen Bedingungen sind diese Zellen transkriptionell besonders aktiv, da es dort zu einer gesteigerten Erythropoietinbildung kommt. Vor diesem Hintergrund erscheint ein vermehrtes intranukleäres Vorkommen der SAH-Hydrolase zur Aufrechterhaltung effizienter

Transmethylierungsreaktionen durch enzymatischen Abbau des Produktinhibitors SAH durchaus sinnvoll.

Die diabetische Nephropathie ist die führende Krankheitsmanifestation und Todesursache bei Patienten mit Diabetes mellitus [12, 105]. Der Streptozotocin-induzierte Diabetes mellitus ist ein anerkanntes Tiermodell für den Diabetes mellitus Typ I (IDDM) beim Menschen, da sich die Pathomechanismen entsprechen und somit ähnliche Veränderungen an den Geweben, im vorliegenden Falle der Niere, zu erwarten sind. Streptozotocin ist eine antibiotisch wirksame Substanz mit einer hohen Affinität zu den  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas. Als methylierendes Agens vermag Streptozotocin in hohen Konzentrationen diese selektiv zu zerstören [11]. Es wird beim Menschen als Chemotherapeutikum bei pankreatischen Neoplasien wie Inselzelltumoren und malignem Karzinoid eingesetzt. Neben der indirekten Schädigung durch die Herstellung der diabetischen Stoffwechsellage besitzt Streptozotocin auch eine direkte toxische Wirkung auf das Nierengewebe. Es sind vermehrt epitheliale und mesenchymale renale Tumoren bei Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus beschrieben, weshalb das Tiermodell nicht zur Untersuchung der langfristigen Auswirkungen eines Diabetes mellitus auf das Nierengewebe geeignet ist. Darüber hinaus sollte nicht übersehen werden, dass durch das hohe Ausmaß an Methylierungsvorgängen in den Geweben auch deren Metabolismus beeinflusst werden könnte [11].

In der vorliegenden Arbeit wurden Nieren nach vierwöchigem IDDM untersucht. Hinsichtlich der Verteilung der SAH-Hydrolase ergaben sich keine Unterschiede im Vergleich mit den Kontrollnieren (Abb. 11). Ein besonders intensives Signal zeigte sich auch hier in den Podozyten sowie in bestimmten Abschnitten des Tubulussystems, nämlich dem Sammelrohr und dem proximalen Tubulus. In der Doppelfärbung mit dem Kernfarbstoff Sytox green herrschte ebenfalls ein perinukleäres Verteilungsmuster des Enzyms vor und nur selten traten diskrete Farbvermischungen am Rande von Zellkernen auf, die auch hier höchstwahrscheinlich als Artefakt und nicht als echte Kolo-kalisation zu werten

sind (Abb. 11). Der veränderte Gewebszustand mit stärkerer Hintergrundfärbung und den schlechter abgrenzbaren Zell- und Gewebsgrenzen ist auf den Krankheitsprozess zurückzuführen. Im Rahmen einer aktuellen Studie zur Wirkung des ACE-Hemmers Irbesartan auf die Niere der diabetischen Ratte [5] wurden auch morphologische Veränderungen der Nieren untersucht. Dabei fanden sich Hyalinablagerungen, glomeruläre Verdichtungen, eine moderate interstitielle Fibrose und Arteriopathie, also teilweise ähnliche Veränderungen wie oben beschrieben. Allerdings wurden diese nach achtwöchiger und nicht wie in der vorliegenden Arbeit bereits nach vierwöchiger diabetischer Stoffwechsellage nachgewiesen, was das üppigere Ausmaß erklären könnte.

Als Modell für renale Veränderungen unter systemischer Hypoxie dienten Ratten, die vier Stunden lang in einem speziellen luftundurchlässigen Käfig bei 1200 ppm CO in der Atemluft gehalten und deren Nieren direkt anschließend entnommen worden waren.

Als Zeichen der hydropischen Schwellung durch die zelluläre Hypoxie zeigte sich morphologisch eine deutliche Verengung der Lumina tubulärer Strukturen. Auch unter hypoxischen Bedingungen entsprach die Verteilung der SAH-Hydrolase den Verhältnissen in der Kontrollniere. Glomerulär fand sich also eine besonders deutliche Anfärbung in den Podozyten, tubulär vorwiegend im apikalen Bereich des Sammelrohrepithels und des Epithels des proximalen Tubulus. In der immunhistochemischen Doppelfärbung der SAH-Hydrolase mit Sytox green ergab sich eine überwiegend zytoplasmatische, perinukleäre Lokalisation des Enzyms (Abb. 12). Es konnte keine eindeutig intranukleäre Lokalisation nachgewiesen werden. Somit konnten die oben erläuterten Ergebnisse von Kloor et al. (2007) [80] in dieser Arbeit nicht reproduziert werden. Ein Grund dafür wäre, dass in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kryostatschnitten entsprechende Gewebsregionen nicht angeschnitten worden waren. Die in der genannten Publikation beschriebene Translokation der SAH-Hydrolase vom Zytoplasma nach intranukleär war dort nämlich auch nur selten vorzufinden. Darüber hinaus wird dort angeführt, dass eine quantitative Bestimmung der SAH-Hydrolase-Expression in den Kernen

renaler Zellen auf Proteinebene nicht möglich gewesen sei, vermutlich wegen des sehr geringen SAH-Hydrolase-Gehalts dieser Zellkerne.

Auch unter nephritischen Bedingungen ergab sich keine Veränderung der Verteilung der SAH-Hydrolase.

Die PAN der Ratte zeichnet pathologische Charakteristika bestimmter proteinurischer Nephropathien des Menschen nach, wie z. B. der Minimal-change-Glomerulonephritis (minimal change disease) und der fokalsegmentalen Glomerulonephritis [97]. Neben einer massiven Proteinurie entwickeln die Tiere einen akuten tubulointerstitiellen Schaden, der durch eine gesteigerte Produktion inflammatorischer Zytokine und die Infiltration des Interstitiums durch Makrophagen gekennzeichnet ist [47, 137]. Pathogenetisch wird die schädigende Wirkung des Puromycins in einer Freisetzung von Sauerstoffradikalen gesehen, die die Entzündungskaskade in Gang setzen [45, 120]. Ungeachtet ihrer Ätiologie können proteinurische Nephropathien bis zum terminalen Nierenversagen fortschreiten [90].

Die Proteinuriemessungen bei den Tieren in dieser Arbeit dienten in erster Linie der Erfolgskontrolle der angewandten Methode. Die Gesamtprotein-ausscheidung im Urin belief sich drei Tage nach Applikation des Puromycins auf  $27,8 \pm 3,9$  mg/24 h und nach elf Tagen auf  $36,7 \pm 2,6$  mg/24 h. Im ersten Falle stellt dies eine nicht signifikante, im zweiten Falle eine statistisch signifikante Erhöhung gegenüber dem Kontrollwert von  $22,0 \pm 0,9$  mg/24 h dar. Dieser graduelle Anstieg mit dem Auftreten einer statistisch signifikanten Proteinurie oder, wie in vielen Publikationen zu finden, einer Albuminurie ab Tag vier nach Puromycingabe mit einem Gipfel um Tag zehn bis vierzehn und anschließendem sukzessivem Rückgang der Werte wird von den meisten Autoren beschrieben, die mit einer Einmalapplikation (single shot) von Puromycin eine akute PAN induzierten [82, 85, 89, 91, 97]. Allerdings ist ein Vergleich der absoluten Proteinuriewerte mit denen anderer Autoren nicht sinnvoll, da diese mit zum Teil wesentlichen höheren Puromycindosierungen als in der vorliegenden Arbeit (15 mg/kg KG) Ratten gearbeitet haben. In mehreren Veröffentlichungen wird das Einsetzen der Proteinurie im Rahmen der PAN mit

Abnormalitäten der Podozyten in Verbindung gebracht [93]. Auch in den hier durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen zeigten sich deutliche morphologische Veränderungen der Podozyten. So kam es drei Tage nach Verabreichung des Puromycins zu einer Verplumpung der Podozyten mit deutlicher Rarefizierung bzw. Retraktion der Fußfortsätze (Abb. 13, vgl. auch Abb. 10). Das stark angegriffene Nierengewebe mit Inhomogenitäten, verstärkter Hintergrundfärbung und aufgelockerter Textur lässt sich gut mit der oben beschriebenen Infiltration von Entzündungszellen im Laufe des Krankheitsprozesses erklären. Nach elftägiger PAN war neben einem deutlich erhaltenen Gewebeszustand eine ausgeprägte, im Vergleich zur Kontrolle regelrecht überschießende Regeneration und Wiederaussprossung der Fußfortsätze der Podozyten zu verzeichnen (Abb. 14, vgl. auch Abb. 10 und Abb. 13).

Die Befunde nach dreitägiger PAN stehen im Einklang mit den Erkenntnissen aus der einschlägigen Literatur. Die Retraktion bzw. die Reduktion der Fußfortsätze und die gleichzeitige Veränderung der Filtrationsschlitze im Glomerulum sowie eine Verdünnung der GBM wurden bereits in den 70er Jahren als morphologische Hauptmerkmale der nephrotischen Syndrome des Menschen und entsprechender Tiermodelle beschrieben [31, 116]. Zwar wurde der Hauptangriffsort des Puromycins damals bereits im glomerulären Epithel, also den Podozyten, gesehen, allerdings ging man auch davon aus, dass das Auftreten der Proteinurie vor allen Dingen auf Veränderungen an der GBM zurückzuführen sei. Neben den eben beschriebenen morphologischen Veränderungen entdeckten Messina et al. (1987) [93] simultan mit dem Auftreten der Proteinurie eine regionale Loslösung des Epithels von der GBM. Sie folgerten, dass in diesen Arealen die Proteinleckage über die GBM hinweg stattfinden müsse. Somit rückten dann bereits die Podozyten als integraler Bestandteil der Filtrationsbarriere deutlicher in den Blickpunkt.

Zahlreiche aktuelle Publikationen beschäftigen sich mit der Frage nach dem genauen Pathomechanismus der Proteinurie bei nephrotischen Nephropathien bzw. dem Modell der PAN. So beobachteten Smoyer und Ransom (2002) [131] verschiedene strukturelle Veränderungen am Filterorgan als Folge der PAN:



Retraktion und Verschwinden (effacement) der distalen, der GBM anliegenden Fußfortsätze der Podozyten, Unterbrechung und Neuverteilung der dicht gedrängten Anhäufungen von Aktin in diesen Fortsätzen und in manchen Arealen eine Loslösung der Podozyten von der GBM. Aktinfilamente sollen die wichtigsten oder gar einzigen zytoskelettalen Proteine in den Fußfortsätzen der Podozyten sein [146]. Dieser Umstand legt nahe, dass dem Aktinzytoskelett in den Podozyten eine entscheidende Rolle in der Regulation der Struktur und Funktion der Fußfortsätze sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen zukommt. Andere Autoren fordern eine Schlüsselrolle für die Schlitzmembran-assoziierten Proteine Nephrin und Podocin, die in der PAN einer veränderten Expression unterliegen [73, 74, 88]. Björnson et al. (2005) [14] wiederum fanden heraus, dass es unter Puromycingabe zu einer Veränderung des Proteoglykanmusters im glomerulären Filterorgan kommt. Diese Proteoglykane bedecken die Podozyten und sollen ganz entscheidend an der Ausbildung der Permselectivität beteiligt sein. Zur Aufklärung der exakten Pathogenese bei der Ausbildung der Proteinurie im Rahmen nephrotischer Nephropathien bedarf es weiterer Untersuchungen. Es ist aber davon auszugehen, dass es sich hierbei um ein multifaktorielles Geschehen handelt.

Über die Regeneration und Wiederaussprossung der Fußfortsätze bei der PAN finden sich deutlich weniger Daten in der Literatur. Dies mag unter anderem damit zusammenhängen, dass die mit Puromycin behandelten Tiere oft bereits früh geopfert wurden und das Hauptinteresse der Untersuchung des neu eingetretenen akuten Schadens galt. Caulfield et al. (1976) [31] berichten ebenfalls von einer Wiederausbildung der Fußfortsätze. Jedoch trat diese hier später auf als in den Experimenten der vorliegenden Arbeit, waren also am Tag elf noch nicht so deutlich ausgeprägt und auch nicht überschießend, wie oben beschrieben. Allerdings lag diesen Experimenten von Caulfield et al. (1976) [31] auch ein anderes Versuchsprotokoll zu Grunde: es wurde keine einmalige, sondern eine tägliche Puromycinapplikation vorgenommen, so dass insgesamt eine viel höhere Puromycinmenge verabreicht wurde. Daher ist davon

auszugehen, dass sich die Reparationsvorgänge hier, wenn überhaupt, nur mit Verzögerung einstellen würden.

Nach elftägiger PAN zeigten sich also histologisch bereits deutliche Reparations- und Regenerationszeichen, während die Proteinausscheidung im Urin noch signifikant erhöhte Werte aufwies. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Normalisierung der Proteinurie der morphologischen Regeneration zeitlich etwas nachläuft.

#### **4.2 Immunhistochemische Lokalisation des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors**

Die Lokalisation des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors in der Rattenniere verhielt sich unter den drei untersuchten pathologischen Zuständen gleich wie unter Kontrollbedingungen. Der immunhistochemische Nachweis des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors ergab ein umschriebenes, intensives spezifisches Signal in direkter Umgebung des Glomerulums. Dieses war zwar streng extraglomerulär, also außerhalb der Bowmanschen Kapsel, aber in unmittelbarer räumlicher Beziehung zu dieser lokalisiert (Abb. 15-20). Ebenfalls in direkter Umgebung hierzu fand sich ein Abschnitt des distalen Tubulussystems. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei dem beschriebenen Areal um den JGA am Gefäßpol des Nierenkörperchens handelt. Um eine genauere Zuordnung des Signals zu den verschiedenen Zellpopulationen im JGA vornehmen zu können, wurde eine gleichzeitige Anfärbung des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors mit Cox-2 durchgeführt. Cox-2 soll in der Niere in besonders hohem Maße in den Zellen der Macula densa exprimiert werden [62, 102]. Hier zeigte sich eine eindeutige Kolokalisation des Rezeptors mit Cox-2 (Abb. 16, 17, 18, 20), wobei es nicht notwendigerweise zu einer solchen kam; vielmehr traten auch Bereiche auf, in denen sehr wohl Cox-2, aber kein Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor nachgewiesen werden konnte. Die Doppelfärbung mit dem Kernfarbstoff Sytox green machte überdies eine streng extranukleäre Lokalisation des Rezeptors deutlich (Abb. 15 B, 19 A, 20).

Unstrittig ist das Vorkommen des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors im JGA. Dort ist er zentral am TGF und der Modulation der Reninsekretion beteiligt [124, 143].

Eine Erhöhung der NaCl- und vielleicht auch der KCl-Konzentration luminal an der Macula densa resultiert in einer Konstriktion der afferenten Arteriole (TGF) und einer Drosselung der Reninsekretion aus den granulären Zellen des JGA. Transmittersubstanz für die Vasokonstriktion ist Adenosin, dessen interstitielle Konzentrationserhöhung die verstärkte Aktivierung von Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptoren auf vaskulären glatten Muskelzellen und/oder extraglomerulären Mesangiumzellen bewirkt [124]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Rezeptor zwar auch im JGA, allerdings nicht exakt in der von Schnermann (2003) [124] geforderten Lokalisation, sondern in der Macula densa nachgewiesen, was aus funktionellen Überlegungen heraus zunächst weniger plausibel erscheint. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass es durch die extreme räumliche Nähe der verschiedenen Zellpopulationen im JGA beim Schneiden des Gewebes am Mikrotom zu einem Übereinander- bzw. Ineinanderschieben benachbarter Zellen kommt, so dass die beobachtete Kolo-kalisation lediglich als Überlagerungsphänomen und somit als Artefakt aufzufassen ist. Überdies gibt es durchaus kontroverse Standpunkte bezüglich der exklusiven renalen Lokalisation der Cox-2 in der Macula densa [18, 147].

Es existieren zahlreiche Untersuchungen zur Verteilung des A<sub>1</sub>-Rezeptors in der Rattenniere, denen teils immunhistochemische, zumeist aber molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden zugrunde liegen. Dabei wurde der Rezeptor in der afferenten Arteriole, den Glomerula und dort auch in den Mesangiumzellen, in den juxtaglomerulären Zellen, in den Vasa recta und in verschiedenen Segmenten des Tubulus- und Sammelrohrsystems nachgewiesen [143]. Smith et al. (2001) [130] lokalisierten den Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor immunhistochemisch mit zwei verschiedenen Antikörpern. Der erste Antikörper färbte kortikal vereinzelt mesangiale Zellen im Glomerulum und die afferente Arteriole in der Kontaktzone mit dem Glomerulum an. Im kortikalen Bereich band der zweite Antikörper an Strukturen des proximalen gewundenen Anteils des Tubulussystems. Medullär zeigten beide Antikörper eine Bindung an Sammelrohrepithel und das papilläre Oberflächenepithel. Als Erklärung für das distinkte Bindungsmuster der beiden Antikörper postulieren die Autoren, dass in vivo verschiedene Formen des Rezeptors existieren, die sich in ihrem

Glykosylierungsmuster unterscheiden. Die zitierte Studie weist einige methodische Unterschiede im Vergleich mit der vorliegenden Arbeit auf, über die sich die verschiedenen Ergebnisse erklären lassen. So wurden hier die Auswertungen nicht mit der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie sondern lichtmikroskopisch vorgenommen. Ferner wurde mit selbst hergestellten Primärantikörpern gearbeitet, die gegen andere Zielstrukturen des Rezeptormoleküls gerichtet waren als der von der Firma Sigma erworbene Antikörper, der in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kam.

Auch Vitzthum et al. (2004) [148], die in einer systematisch angelegten Studie die Verteilung der verschiedenen Adenosin-Rezeptorsubtypen auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR-Analysen untersuchten, erkannten den Schwerpunkt des kortikalen Vorkommens des A<sub>1</sub>-Rezeptors in der glomerulären Kontaktzone mit der afferenten Arteriole.

Die Tatsache, dass in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit neben dem Signal im JGA keine weitere Lokalisation des Rezeptormoleküls dargestellt werden konnte, lässt sich zum einen mit der Spezifität des Antikörpers erklären, zum anderen aber auch mit der Fixation des Gewebes. Membranständige Proteinstrukturen lassen sich im perfusionsfixierten Gewebe besser nachweisen. Außerdem ist bei Sprague-Dawley-Ratten eine sehr niedrige A<sub>1</sub>-Rezeptordichte in der Größenordnung von fmol/mg Membran in den isolierten Glomerula beschrieben [1]. Daher ist es nicht unwahrscheinlich, dass nur im JGA eine ausreichend hohe Rezeptorkonzentration vorhanden ist, um mit Hilfe der Immunhistochemie nachgewiesen zu werden. Mögliche weitere Lokalisationen könnten also lediglich nicht dargestellt worden sein, da die Rezeptordichte an der entsprechenden Stelle unterhalb der Empfindlichkeitsgrenze des eingesetzten Verfahrens liegt.

#### 4.3 Quantitative Analyse der Adeninnukleoside und Bestimmung des Methylierungspotentials (MP)

Diabetes mellitus, Hypoxie und PAN sind durch Veränderungen in der Expressionsrate verschiedener Proteine charakterisiert [15, 66]. Hierfür ist eine verstärkte Genexpression erforderlich, die wiederum mit einer hohen Rate an intranukleären Transmethylierungsreaktionen einhergeht [117]. Das MP, definiert als Quotient aus SAM und SAH, ist ein sensibler Indikator für die Transmethylierungsaktivität innerhalb eines Gewebes. Da die SAH-Hydrolase die intrazellulären SAH-Spiegel kontrolliert, beeinflusst die Hemmung des Enzyms nachhaltig das Ausmaß an Transmethylierungsreaktionen [142].

Unter Kontrollbedingungen betrug das MP in der Niere  $54,5 \pm 3,0$ , der Adenosingewebsgehalt  $4,5 \pm 0,3$  nmol/g FG (Tab. 8).

Im Falle der PAN fiel das MP nach drei Tagen signifikant auf  $16,0 \pm 2,0$ , nach elf Tagen sogar signifikant auf  $11,3 \pm 0,8$ . Die PAN ist also mit einer verminderten Transmethylierungsaktivität vergesellschaftet. Die Reduktion des MPs ist auf die signifikante Zunahme des SAH-Gewebsgehaltes zurückzuführen. Ein erhöhter SAH-Gewebsgehalt kann nämlich über den Mechanismus der Produkthemmung die Aktivität von Methyltransferasen beeinflussen [66]. Die Zunahme des SAH-Gewebsspiegels kann zum einen die Folge einer vermehrten Transmethylierungsaktivität in der Zelle sein oder zum anderen auf der Hemmung der SAH-Hydrolase beruhen. Für Adenosin ist ein starker inhibitorischer Einfluss auf das Enzym beschrieben [78]. Da es sowohl nach drei als auch nach elf Tagen PAN zu einem signifikanten Anstieg des Adenosingehalts auf  $7,0 \pm 0,3$  nmol/g FG bzw.  $10,7 \pm 1,9$  nmol/g FG kommt, ist der erhöhte SAH-Gewebsgehalt hier auf eine Hemmung der SAH-Hydrolase durch Adenosin zurückzuführen. Ein erhöhter Adenosingehalt deutet auf eine Ischämie im Nierengewebe hin [77, 107]. Es ist also wahrscheinlich, dass es in der PAN bedingt durch den Entzündungsprozess zu einer Sauerstoffunterversorgung kommt.

Unter Hypoxie zeigte sich zwar ebenfalls eine Verringerung des MPs auf  $47,1 \pm 5,0$ , allerdings ist diese nicht signifikant. Erwartungsgemäß stieg hier

hingegen der Adenosingehalt signifikant auf  $7,6 \pm 0,5$  nmol/g FG an. Adenosin vermag nach dem Prinzip der metabolischen Kontrolle der Organfunktion die Sauerstoffversorgung im jeweiligen Gewebe dem Sauerstoffbedarf anzupassen [13, 103].

Das MP unter diabetischen Bedingungen erhöhte sich signifikant auf  $88,2 \pm 4,0$ , d. h. dass die Methylierungsreaktionen in der Zelle ungehindert ablaufen können. Nur unwesentlich und nicht signifikant erhöht war der Adenosingewebsgehalt von  $5,7 \pm 0,7$  nmol/g FG.

#### **4.4 Bestimmung der Expression des SAH-Hydrolase-Gens und des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor-Gens auf mRNA-Ebene**

Wie oben beschrieben kommt es im Diabetes mellitus, in der Hypoxie und der PAN zu Veränderungen in der Expressionsrate verschiedener Proteine [15, 66]. Einer verstärkten Proteinexpression liegt stets auch eine verstärkte Genexpression zu Grunde. Um zu klären, ob auch die SAH-Hydrolase und/oder der Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor hiervon betroffen sind, wurden Genexpressionsanalysen auf mRNA-Ebene mittels real-time-RT-PCR durchgeführt. Für eine verstärkte Genexpression ist eine hohe intranukleäre Transmethylierungsaktivität erforderlich [117]. In der vorliegenden Arbeit wurde für den Diabetes und die PAN eine Veränderung des MPs nachgewiesen (s. Kap. 4.3). Daher drängt sich natürlich die Frage auf, ob auch die Expression der untersuchten Gene verändert ist.

Gegenüber der Kontrollsituation sank die mRNA-Expression des SAH-Hydrolase-Gens nach dreitägiger PAN in statistisch signifikantem Maße um den Faktor 1,67 ab, um sich dann nach elftägiger PAN wieder zu erholen bzw. sich sogar etwas zu erhöhen, allerdings in nicht signifikantem Maße (s. auch Tab. 9). Nach dreitägiger PAN korrespondiert die verminderte Genexpression des Enzyms also entsprechend der oben formulierten Hypothese mit einem herabgesetzten MP. Nach elf Tagen entwickeln sich die beiden Parameter jedoch gerade gegenläufig, d. h. einem weiter abfallenden MP steht nun eine sogar etwas überschießend kompensierte Genexpression

gegenüber. Unter Berücksichtigung des nach elftägiger PAN auch schon erheblich verbesserten Gewebszustandes (Kap. 4.1) ist davon auszugehen, dass sich die deutliche Regeneration bereits in der Genexpressionsrate, aber eben noch nicht in der Transmethylierungsaktivität niederschlägt. Dies ist insofern kein Paradoxon, als Transmethylierungsvorgänge nicht nur an Reaktionen im Rahmen der Genexpression, sondern auch an vielen anderen biochemischen Prozessen entscheidend beteiligt sind [32].

Auch unter Hypoxie wurde eine signifikante Veränderung der relativen Genexpressionsrate beobachtet. Hier kam es zu einem Absinken um den Faktor 3,17 gegenüber der Kontrolle. Dieser deutliche Abfall korreliert nicht mit einem entsprechenden Verhalten des MPs, da dieses sich nicht in signifikantem Maße veränderte. Ein starker Abfall der mRNA-Expression um 64 % gegenüber dem Ausgangswert in der Rattenniere nach vierstündiger CO-induzierter Hypoxie zeigte sich auch in einer anderen aktuellen Studie von Kloor et al. (2007) [80].

Unter diabetischen Bedingungen fand sich keine nennenswerte Veränderung der Expression des SAH-Hydrolase-Gens. Hier war allerdings das MP deutlich erhöht. Somit kann nicht von einem direkten Zusammenhang der Transmethylierungsaktivität und der Expression des SAH-Hydrolase-Gens ausgegangen werden. Zumindest liegt nahe, dass neben Transmethylierungsvorgängen noch zusätzliche Mechanismen an der Regulation der Genexpression der SAH-Hydrolase bei den untersuchten Krankheitsbildern beteiligt sind.

Für den Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor ergab sich unter keinem der experimentell induzierten Krankheitszustände eine statistisch signifikante Veränderung der Expression des Rezeptorgens (Tab. 9). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen berichten Pawelczyk et al. (2005) [113] von einer Erhöhung der A<sub>1</sub>-Rezeptor-Genexpression auf mRNA-Ebene in der Rattenniere im Streptozotocin-induzierten Diabetes um den Faktor 1,9 gegenüber der Kontrolle. Vermutlich ist dieser scheinbare Widerspruch auf methodische Unterschiede zurückzuführen. Während in der genannten Publikation Wistar-Ratten als Versuchstiere dienten,

wurden die Versuche der vorliegenden Arbeit mit Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Außerdem wurden die Nieren der Tiere von der polnischen Arbeitsgruppe bereits nach zwei und nicht erst nach vier Wochen unter diabetischer Stoffwechsellage entnommen. Und schließlich verwendete sie das  $\beta$ -Aktin- und nicht das 18S rRNA-Gen als Haushaltsgen bei den real-time-RT-PCR-Untersuchungen. Letztlich sind aber weitere Untersuchungen notwendig, um die exakte Ursache der Unterschiede dezidiert klären zu können.

#### **4.5 Bestimmung der Proteinexpression der SAH-Hydrolase und des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors sowie Aktivitätsbestimmung der SAH-Hydrolase**

Neben Untersuchungen zur Genexpression auf mRNA-Ebene wurden natürlich auch Untersuchungen zur Expression der Genprodukte, also auf Proteinebene, durchgeführt. Dies geschah durch Western-Blot-Analysen der SAH-Hydrolase und des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors.

Der immunologische Nachweis der SAH-Hydrolase aus nephritischen und hypoxischen Nieren (Abb. 21 A) zeigte eine deutliche Bande bei ca. 45 kDa. Dieses Molekulargewicht stimmt gut mit den Angaben in der Literatur für ein Monomer der SAH-Hydrolase der Ratte überein. Aufgrund der technischen Gegebenheiten (Luftblase im Gel) konnte leider keine quantitative, sondern lediglich eine qualitative Auswertung vorgenommen werden. Aus der Enzymaktivität können aber wiederum Rückschlüsse auf die Proteinexpression gezogen werden, da für die SAH-Hydrolase die Regel gilt, dass die Enzymaktivität allein von der Proteinmenge abhängt [79]. Hinsichtlich der Enzymaktivität der SAH-Hydrolase ergaben sich zwar diskrete Veränderungen nach dreitägiger PAN und bei der Hypoxie (Tab. 10), jedoch erreichten diese keine statistische Signifikanz. Nach elftägiger PAN war sie verglichen mit der Kontrollniere sogar nahezu identisch. Daher ist für alle genannten Gewebzustände sowohl die Enzymaktivität als auch die Proteinexpression als weitgehend konstant anzusehen.



Die separat durchgeführte Western-Blot-Analyse der SAH-Hydrolase aus diabetischen Nieren (Abb. 21 B) ergab ebenfalls eine klar der SAH-Hydrolase zuzuordnende Bande bei ca. 45 kDa. Vermutlich auf Alterungs- und Degradationsprozesse ist die unscharfe Bande der SAH-Hydrolase aus den entsprechenden Kontrollnieren zurückzuführen. Die Farbintensität der Banden aus diabetischen Nieren entspricht der aus Kontrollgewebe. Dies passt gut zu der ebenfalls unveränderten Genexpression unter diabetischen Bedingungen (Kap. 4.4) und der konstanten Enzymaktivität (Tab. 10).

In der Immunoblot-Analyse (Abb. 22) des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors konnte in allen Proben eine deutliche, durch das Rezeptormolekül verursachte Bande bei ungefähr 36,5 kDa nachgewiesen werden. Es zeigten sich in Farbintensität und Größe recht einheitlich gezeichnete Banden für alle Gewebszustände mit Ausnahme des Diabetes mellitus, wo die Banden etwas schwächer gefärbt waren. Möglicherweise lässt sich dieser Befund mit einem Verdünnungseffekt erklären. In der diabetischen Niere kommt es nämlich zum verlangsamten Umsatz und zur Anhäufung nichtenzymatisch glykosylierter Proteine, sogenannter AGEs (advanced glycation end products) [15]. Dadurch könnte sich der relative Anteil des A<sub>1</sub>-Rezeptor-Moleküls in der Tasche des Gels verringert haben, da ja stets eine definierte und gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde.

Auch bei der Western-Blot-Analyse kommen Pawelczyk et al. (2005) [113] zu anderen Ergebnissen bezüglich der diabetischen Niere. Passend zu einer gesteigerten Genexpression beobachteten sie auch eine vermehrte Proteinexpression des Rezeptormoleküls. Die möglichen Ursachen dieser Unterschiede wurden bereits im vorangehenden Kapitel diskutiert.

#### 4.6 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit folgende Aussagen bzw. Schlüsse zu:

Weder die SAH-Hydrolase noch der Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor weist bei den untersuchten Krankheitszuständen eine Veränderung der Lokalisation in der Niere auf.

Ein verändertes MP geht nicht zwingend mit einer gleichsinnig veränderten Genexpression einher. Zwar ist ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Transmethylierungsaktivität und einer gesteigerten Genexpression beschrieben [117], jedoch legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass noch weitere Mechanismen an der Regulation der Genexpression beteiligt sein müssen.

Gleichermaßen spiegeln sich Veränderungen in der mRNA-Expression auch nicht regelhaft in entsprechenden Entwicklungen in der Proteinexpression und, im Falle der SAH-Hydrolase, in der Enzymaktivität wider. Dies könnte damit zusammenhängen, dass eine veränderte Genexpression erst mit zeitlicher Verzögerung auch Veränderungen auf Proteinebene nach sich zieht. Des Weiteren wäre denkbar, dass auf mRNA-Ebene Regulationsmechanismen stattfinden, die eine Verwirklichung der genetischen Information beeinflussen oder gar verhindern.

## 5 Zusammenfassung

Das zytoplasmatische Enzym SAH-Hydrolase nimmt eine zentrale Stellung im zytosolischen Metabolismus ein. Es stellt eine Verbindung zwischen Prozessen des Energie-, Transmethylierungs-, Transsulfurierungs- und Purinstoffwechsels her. Mit der pharmakologischen Beeinflussbarkeit der SAH-Hydrolase werden große Hoffnungen für die Therapie von Tumor-, Virus-, Autoimmun- und allergischen Erkrankungen verbunden.

Der Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor ist ein integrales Membranprotein und gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. In der Niere vermittelt er die Vasokonstriktion in der glomerulären afferenten Arteriole im Rahmen der tubuloglomerulären Rückkopplung (tubuloglomerular feedback, TGF). Darüber hinaus wird ihm eine entscheidende Rolle in der Regulation der Reninsekretion im juxtaglomerulären Apparat (JGA) zugeschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen verschiedener experimentell induzierter pathologischer Zustände auf die Lokalisation und Expression des Enzyms und des Rezeptors in der Niere der adulten Ratte untersucht und mit der Situation unter physiologischen Bedingungen verglichen. Bei den Krankheitszuständen, die allesamt ein Modell für entsprechende menschliche Nephropathien darstellen, handelte es sich zum einen um den insulinpflichtigen Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus, zum anderen um eine Kohlenmonoxid-induzierte systemische Hypoxie und schließlich um die Puromycin-Aminonukleosid-Nephrose.

Die Lokalisation beider Proteine wurde an immunhistochemisch gefärbten Kryostatschnitten mit Hilfe der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie nachgewiesen. Expressionsanalysen wurden auf Genebene mittels real-time-RT-PCR und auf Proteinebene mittels Western Blotting durchgeführt. Zusätzlich wurde die Enzymaktivität der SAH-Hydrolase spektralphotometrisch mit der MTT-Formazan-Methode bestimmt. Schließlich erfolgte die quantitative Analyse der Gewebsspiegel der Adeninnukleoside SAH, SAM und Adenosin mittels HPLC. Daraus wurde das Methylierungspotential (MP) bestimmt, das eine

quantitative Aussage über die Methylierungsaktivität im untersuchten Gewebe ermöglicht.

In der Niere der gesunden adulten Ratte war die SAH-Hydrolase mit immunhistochemischen Methoden ubiquitär nachzuweisen. Ein besonders intensives Signal zeigte sich dabei in den Podozyten. Hier war das Enzym perinukleär im Zytoplasma, vorwiegend im Perikaryon, aber auch im proximalen Bereich der Fußfortsätze lokalisiert. Der Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor stellte sich in der Immunhistochemie am Gefäßpol des Glomerulums im JGA dar, wo er an der Vermittlung des TGF beteiligt ist und modulierend auf die Reninsekretion einwirkt. Die Genexpressionsanalyse ergab einen Induktionsfaktor, der als Maß für die relative Expressionsrate eines Gens herangezogen werden kann, von  $0,92 \pm 0,2$  für die SAH-Hydrolase und von  $0,86 \pm 0,1$  für den A<sub>1</sub>-Rezeptor. In der Western-Blot-Analyse konnten beide Proteine eindeutig identifiziert und gleichzeitig die Spezifität der eingesetzten Antikörper sichergestellt werden. Die Enzymaktivität der SAH-Hydrolase belief sich auf  $0,64 \pm 0,05$  mU/mg, das dimensionslose MP auf  $54,5 \pm 3,0$ .

Unter diabetischen Bedingungen zeigte sich in den immunhistochemischen Untersuchungen lediglich eine Verschlechterung des Gewebeszustandes, die auf den Krankheitsprozess zurückzuführen ist. Verglichen mit der Kontrollniere erhöhte sich das MP signifikant auf  $88,2 \pm 4,0$ , was für eine deutlich regere Methylierungsaktivität in diesem Gewebe spricht. Hingegen ergaben sich hinsichtlich der Genexpression auf mRNA-Ebene und der Proteinexpression sowohl der SAH-Hydrolase als auch des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors sowie hinsichtlich der SAH-Hydrolase-Aktivität keine signifikanten Veränderungen.

Auch unter hypoxischen Bedingungen blieb die Lokalisation des Enzyms und des Rezeptors unverändert. Einem konstanten MP, einer vermutlich gleich bleibenden Proteinexpression der SAH-Hydrolase und einer konstanten Enzymaktivität steht eine um den Faktor 3,17 signifikant verminderte Expression des SAH-Hydrolase-Gens gegenüber. Die mRNA-Expression und Proteinexpression des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors waren nicht signifikant verändert.

Drei Tage nach Induktion der PAN zeigte sich morphologisch ein stark angegriffenes Gewebe mit Veränderungen an den Podozyten. Hier kam es zu einer Rarefizierung bzw. Retraktion der Fußfortsätze. Hinzu kam ein stark abgefallenes MP von  $16,9 \pm 2,0$  und eine Verminderung der relativen SAH-Hydrolase-Genexpression um den Faktor 1,67 gegenüber der Kontrolle, die sich aber nicht in einer Erhöhung der Proteinexpression und der Enzymaktivität äußerte. Die untersuchten Parameter für den A<sub>1</sub>-Rezeptor blieben unverändert. Nach elftägiger PAN war eine im Vergleich mit der Kontrollniere regelrecht überschießende Regeneration und Wiederaussprossung der Fußfortsätze der Podozyten zu beobachten. Bei einem etwas überschießend nahe dem Kontrollwert wieder eingependelten Induktionsfaktor bei der mRNA-Expression blieb ein weiterhin stark vermindertes MP von  $11,3 \pm 0,8$ . Auch hier zeigten sich unbeeinflusste Werte für die Gen- und Proteinexpression des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass weder die SAH-Hydrolase noch der Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor von einer veränderten Proteinexpression oder Lokalisation im Nierengewebe bei den untersuchten Krankheitsmodellen betroffen sind. Im Falle der SAH-Hydrolase kommt es zwar teilweise zu einer Veränderung in der Genexpression auf mRNA-Ebene, jedoch schlägt sich dies nicht auf Ebene des Genprodukts nieder. Es ist anzunehmen, dass dieser Effekt sich erst mit zeitlicher Verzögerung einstellt oder dass Regulationsmechanismen auf mRNA-Ebene stattfinden, die eine Verwirklichung der genetischen Information beeinflussen oder gar verhindern. Veränderungen im MP ohne gleichsinnige Entwicklungen der Genexpressionsrate deuten darauf hin, dass neben Transmethylierungsreaktionen noch weitere Mechanismen an der Regulation der Genexpression beteiligt sein müssen.

**6 Literaturverzeichnis**

- [1] Albinus M, Halene S, Riehle R, Englert R, Osswald H (1994)  
Characterization of adenosine-A1-receptors in glomerular membranes from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus  
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 349, R29
- [2] Albinus M, Finkbeiner E, Sosath B, Osswald H (1998)  
Isolated superfused juxtaglomerular cells from rat kidney: a model for study of renin secretion  
Am J Physiol Renal Physiol, 275, F991-F997
- [3] Aletta JM, Cimato TR, Ettinger MJ (1998)  
Protein methylation: a signal event in post-translational modification  
Trends Biochem Sci, 23 (3), 89-91
- [4] Andrews P, Bates SB (1984)  
Filament actin bundles in the kidney  
Anat Rec, 210, 1-9
- [5] Anjaneyulu M, Chopra K (2004)  
Effect of irbesartan on the antioxidant defence system and nitric oxide release in diabetic rat kidney  
Am J Nephrol, 24 (5), 488-496
- [6] Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD (2004)  
The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29  
Pflügers Arch, 447 (5), 735-743
- [7] Barajas L, Powers K (1984)  
The structure of the juxtaglomerular apparatus (JGA) and the control of renin secretion  
J Hypertens, 2 (1), 3-12
- [8] Baric I, Fumic K, Glenn B, Cuk M, Schulze A, Finkelstein JD, James SJ, Mejaski-Bosnjak V, Pazanin L, Pogribny IP, Rados M, Sarnavka V, Scukanec-Spoljar M, Allen RH, Stabler S, Uzelac L, Vugrek O, Wagner C, Zeisel S, Mudd SH (2004)  
S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: A genetic disorder of methionine metabolism  
Proc Natl Acad Sci U S A, 101 (12), 4234-4239
- [9] Baric I, Cuk M, Fumic K, Vugrek O, Allen RH, Glenn B, Maradin M, Pazanin L, Pogribny I, Rados M, Sarnavka V, Schulze A, Stabler S, Wagner C, Zeisel SH, Mudd SH (2005)  
S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: a second patient, the younger brother of the index patient, and outcomes during therapy  
J Inherit Metab Dis, 28 (6), 885-902

- [10] Bell PD, Lapointe JY, Sabirov R, Hayashi S, Peti-Peterdi J, Manabe K, Kovacs G, Okada Y (2003)  
Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel  
Proc Natl Acad Sci USA, 100, 4322-4327
- [11] Bennett RA, Pegg AE (1981)  
Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin  
Cancer Res, 41, 2786-2790
- [12] Berger M, Mönks D, Wanner C, Lindner TH (2003)  
Diabetic nephropathy: an inherited disease or just a diabetic complication?  
Kidney Blood Press Res, 26, 143-154
- [13] Berne RM, Knabb RM, Ely SW, Rubio R (1983)  
Adenosine in the local regulation of blood flow: a brief overview  
Fed Proc, 42 (15), 3136-3142
- [14] Björnson A, Moses J, Ingemansson A, Haraldsson B, Sörensson J (2005)  
Primary human glomerular endothelial cells produce proteoglycans, and puromycin affects their posttranslational modification  
Am J Physiol Renal Physiol, 288 (4), F748-F756
- [15] Böcker W, Denk H, Heitz PU (2001)  
Pathologie  
Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 2. Auflage
- [16] Bradford MM (1976)  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding  
Anal Biochem, 72, 248-254
- [17] Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L (1998)  
Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis  
Circulation, 98 (23), 2520-2526
- [18] Breyer MD, Harris RC (2001)  
Cyclooxygenase 2 and the kidney  
Curr Opin Nephrol Hypertens, 10 (1), 89-98

- [19] Briggs JP, Schnermann J (1987)  
The tubuloglomerular feedback mechanism: functional and biochemical aspects  
*Annu Rev Physiol*, 49, 251-273
- [20] Broackes-Carter FC, Mouchel N, Gill D, Hyde S, Bassett J, Harris A (2002)  
Temporal regulation of CFTR expression during ovine lung development: Implications for CF gene therapy  
*Hum Mol Genet*, 11, 125-131
- [21] Brown R, Ollerstam A, Johansson B, Skott O, Gebre-Medhin S, Fredholm B, Persson EG (2001)  
Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma renin in adenosine A1 receptor-deficient mice  
*Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 281, R1362-R1367
- [22] Brown TA (2002)  
Gentechnologie für Einsteiger  
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2. Auflage
- [23] Buddecke E (1994)  
Grundriss der Biochemie: Für Studierende der Medizin, Zahnmedizin und Naturwissenschaften  
Walter de Gruyter Verlag, Berlin, 9. neubearbeitete Auflage, 92
- [24] Buniatian G, Traub P, Albinus M, Beckers G, Buchmann A, Gebhardt R, Osswald H (1998)  
The immunoreactivity of glial fibrillary acidic protein in mesangial cells and podocytes of the glomeruli of rat kidney in vivo and in culture  
*Biol Cell*, 90, 53-61
- [25] Caboche M, Bachellerie JP (1977)  
RNA methylation and control of eukaryotic RNA biosynthesis. Effects of cycloleucine, a specific inhibitor of methylation, on ribosomal RNA maturation  
*Eur J Biochem*, 74 (1), 19-29
- [26] Cantoni GL (1952)  
The nature of the active methyl donor formed enzymatically from L-methionine and adenosinetriphosphate  
*J Am Chem Soc*, 74, 2942-2943
- [27] Cantoni GL, Scarano E (1954)  
The formation of S-Adenosylhomocysteine in enzymatic transmethylation reactions  
*J Amer Chem Soc*, 76, 4744



- [28] Cantoni GL, Chiang PK (1980)  
The role of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase in the control of biological methylation  
In: Cavallini D, Gaull GE, Zappia V, eds. *Natural Sulfur Compounds: Novel Biochemical and Structural Aspects*, New York, London, Plenum Press, 67-80
- [29] Casero RA, Pegg AE (1993)  
Spermidine/Spermin N1-acetyltransferase--the turning point in polyamine metabolism  
*FASEB J*, 7 (8), 653-661
- [30] Castrop H, Schweda F, Schumacher K, Wolf K, Kurtz A (2001)  
Role of renocortical cyclooxygenase-2 for renal vascular resistance and macula densa control of renin secretion  
*J Am Soc Nephrol*, 12, 867-874
- [31] Caulfield JP, Reid JJ, Farquhar MG (1976)  
Alterations of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis. Evidence for formation of occluding junctions and epithelial cell detachment  
*Lab Invest*, 34, 43-59
- [32] Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, Mc Cann PP (1996)  
S-Adenosylmethionine and methylation  
*FASEB J*, 10 (4), 471-480
- [33] Chomczynski P, Sacchi N (1987)  
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction  
*Anal Biochem*, 162 (1), 156-159
- [34] Christofi FL, Zhang H, Yu JG, Guzman J, Xue J, Kim M, Wang YZ, Cooke HJ (2001)  
Differential gene expression of adenosine A1, A2a, A2b and A3 receptors in the human enteric nervous system  
*J Comp Neurol*, 439, 46-64
- [35] Churchill PC, Rossi NF, Churchill MC (1987)  
Renin secretory effects of N-6-cyclohexyladenosine: effects of dietary sodium  
*Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*, 252, F872-F876
- [36] Clarke S (2003)  
Aging as war between chemical and biochemical processes: protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair  
*Ageing Res Rev*, 2 (3), 263-285

- [37] Cooper GC (1981)  
Biochemische Arbeitsmethoden  
Walter de Gruyter Verlag, Berlin, 1. Auflage, 179-192
- [38] Coulter-Karis DE, Hershfield MS (1989)  
Sequence of full length cDNA for human S-adenosylhomocysteine  
hydrolase  
Ann Hum Genet, 53 (Pt 2), 169-175
- [39] Deguchi T, Barchas J (1971)  
Inhibition of transmethylations of biogenic amines by S-  
adenosylhomocysteine. Enhancement of transmethylation by  
adenosylhomocysteinase  
J Biol Chem, 246 (10), 3175-3181
- [40] Delabar U, Kloor D, Luippold G, Mühlbauer B (1999)  
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, 724 (2), 231-238
- [41] De Clercq E (1987)  
S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors as broad-spectrum antiviral  
agents  
Biochem Pharmacol, 36 (16), 2567-2575
- [42] De Clercq E (2005)  
John Montgomery's legacy: carbocyclic adenosine analogues as SAH  
hydrolase inhibitors with broad-spectrum antiviral activity  
Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 24 (10-12), 1395-1415
- [43] De la Haba G, Cantoni GL (1959)  
The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine  
and homocysteine  
J Biol Chem, 234 (3), 603-608
- [44] Diamond JR, Karnovsky MJ (1986a)  
Focal and segmental glomerulosclerosis following a single intravenous  
dose of puromycin aminonucleoside  
Am J Pathol, 122 (3), 481-487
- [45] Diamond JR, Bonventre JV, Karnovsky MJ (1986b)  
A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis  
Kidney Int, 29, 478-483

- [46] Diamond JR, Pesek I (1991)  
Glomerular tumor necrosis factor and interleukin 1 during acute aminonucleoside nephrosis. An immunohistochemical study  
Lab Invest, 64 (1):21-28
- [47] Eddy AA, Michael AF (1988)  
Acute tubulointerstitial nephritis associated with aminonucleoside nephrosis  
Kidney Int, 33 (1), 14-23
- [48] Ehrenhofer-Murray AE (2004)  
Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair  
Eur J Biochem, 271 (12), 2335-2349
- [49] Eloranta TO (1977)  
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, 166 (3), 521-529
- [50] Eloranta TO, Kajander EO, Raina AM (1982)  
Effect of 9-beta-D-arabinofuranosyladenine and erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine on the metabolism of S-adenosylhomocysteine, S-adenosylmethionine and adenosine in rat liver  
Med Biol, 60, 272-277
- [51] Finkelstein JD, Harris B (1973)  
Methionine metabolism in mammals. Synthesis of S-adenosylhomocysteine in rat tissues  
Arch Biochem Biophys, 159, 160-165
- [52] Fox IH, Kelley WN (1978)  
The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells  
Annu Rev Biochem, 47, 655-686
- [53] Fredholm BB, Hedqvist P (1980)  
Modulation of neurotransmission by purine nucleotides and nucleosides  
Biochem Pharmacol, 29 (12), 1635-1643
- [54] Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001)  
International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors  
Pharmacol Rev, 53 (4), 527-552

- [55] Fu YF, Zhu YN, Ni J, Zhong XG, Tang W, Re YD, Shi LP, Wan J, Yang YF, Yuan C, Nan FJ, Lawson BR, Zuo JP (2006)  
A reversible S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitor ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting T cell activation  
*J Pharmacol Exp Ther*, 319 (2), 799-808
- [56] Fujioka M, Takata Y (1981)  
S-Adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver. Purification and some properties  
*J Biol Chem*, 256 (4), 1631-1635
- [57] Fux R, Kloor D, Hermes M, Röck T, Proksch B, Grenz A, Delabar U, Bücheler R, Igel S, Mörike K, Gleiter CH, Osswald H (2005)  
Effect of acute hyperhomocysteinemia on methylation potential of erythrocytes and on DANN methylation of lymphocytes in healthy male volunteers  
*Am J Physiol Renal Physiol*, 289, F786-F792
- [58] German DC, Bloch CA, Kredich NM (1983)  
Measurements of S-adenosylmethionine and L-homocysteine metabolism in cultured human lymphoid cells  
*J Biol Chem*, 258, 10997-11003
- [59] Haas JA, Osswald H (1981)  
Adenosine induced fall in glomerular capillary pressure. Effect of ureteral obstruction and aortic constriction in the Munich-Wistar rat kidney  
*Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 317, 86-89
- [60] Hankey GJ, Eikelboom JW (1999)  
Homocysteine and vascular disease  
*Lancet*, 354, 407-413
- [61] Hansen PB, Schnermann J (2003)  
Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the kidney  
*Am J Physiol Renal Physiol*, 285, F590-F599
- [62] Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD (1994)  
Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction  
*J Clin Invest*, 94, 2504-2510
- [63] Haslam RJ, Rosson GM (1975)  
Effects of adenosine on levels of adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate in human blood platelets in relation to adenosine incorporation and platelet aggregation  
*Mol Pharmacol*, 11, 528-544

- [64] Hauri HP, Bucher K (1986)  
Immunoblotting with monoclonal antibodies: importance of the blocking solution  
Anal Biochem, 159, 386-289
- [65] Hermes M (2004a)  
Die Rolle der S-Adenosyl-L-homocystein-Hydrolase bei der Regulation der DNA- und RNA-Methylierung sowie der Genexpression und Apoptose  
Tübingen, Universität, Dissertation der Fakultät für Biologie
- [66] Hermes M, Mattar J, Osswald H, Kloor D (2004b)  
Influence of an altered methylation potential on mRNA methylation and gene expression in HepG2 cells  
Exp Cell Res, 294 (2), 325-334
- [67] Hirata F, Axelrod J (1980)  
Phospholipid methylation and biological signal transmission  
Science, 209 (4461), 1082-1090
- [68] Hoffman DR, Cornatzer WE, Duerre JA (1979)  
Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and transmethylation reactions  
Can J Biochem, 57 (1), 56-65
- [69] Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, Kuwahara M, Saito H, Furukawa T, Nakajima K, Yamaguchi Y, Gojobori T, et al. (1994)  
Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells  
Proc Natl Acad Sci U S A, 91 (14), 6269-6273
- [70] Jackson EK, Zhu C, Tofovic SP (2002)  
Expression of adenosine receptors in the preglomerular microcirculation  
Am J Physiol Renal Physiol, 283, F41-F51
- [71] Jacobson KA, Hoffmann C, Cattabeni F, Abbracchio MP (1999)  
Adenosine-induced cell death: evidence for receptor-mediated signalling  
Apoptosis, 4, 197-211
- [72] Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO (2002)  
Histologie  
Springer-Verlag, Berlin, 5. Auflage

- [73] Kawachi H, Koike H, Kurihara H, Yaoita E, Orikasa M, Shia MA, Sakai T, Yamamoto T, Salant DJ, Shimizu F (2000)  
Cloning of rat nephrin: expression in developing glomeruli and in proteinuric states  
*Kidney Int*, 57 (5), 1949-1961
- [74] Kawachi H, Koike H, Kurihara H, Sakai T, Shimizu F (2003)  
Cloning of rat homologue of podocin: expression in proteinuric states and in developing glomeruli  
*J Am Soc Nephrol*, 14 (1), 46-56
- [75] Kloor D, Kurz J, Fuchs S, Faust B, Osswald H (1996)  
S-adenosylhomocysteine-hydrolase from bovine kidney: enzymatic and binding properties  
*Kidney Blood Press Res*, 19 (2), 100-108
- [76] Kloor D, Stumvoll W, Schmid H, Kömpf J, Mack A, Osswald H (2000)  
Localization of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the rat kidney.  
*J Histochem Cytochem*, 48, 211-218
- [77] Kloor D, Delabar U, Mühlbauer B, Luippold G, Osswald H (2002)  
Tissue levels of S-adenosylhomocysteine in the rat kidney: effects of ischemia and homocysteine  
*Biochem Pharmacol*, 63 (4), 809-815
- [78] Kloor D, Osswald H (2004)  
S-Adenosylhomocysteine hydrolase as a target for intracellular adenosine action  
*Trends Pharmacol Sci*, 25 (6), 294-297
- [79] Kloor D, Fumic K, Attig S, Tete M, Osswald H, Baric I, Tomiuk J, Kömpf J (2006)  
Studies of S-adenosylhomocysteine-hydrolase polymorphism in a Croatian population  
*J Hum Gen*, 51, 21-24
- [80] Kloor D, Hermes M, Fink K, Schmid H, Klingel K, Mack A, Grenz A, Osswald H (2007)  
Expression and localization of S-Adenosylhomocysteine-hydrolase in the rat kidney following carbon monoxide induced hypoxia  
*Cell Physiol Biochem*, 19 (1-4), 57-66
- [81] Komlosi P, Peti-Peterdi J, Fuson AL, Fintha A, Rosivall L, Bell PD (2004)  
Macula densa basolateral ATP release is regulated by luminal [NaCl] and dietary salt intake  
*Am J Physiol Renal Physiol*, 286, F1054-F1058

- [82] Koshikawa M, Mukoyama M, Mori K, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Nagae T, Yokoi H, Kawachi H, Shimizu F, Sugawara A, Nakao K (2005)  
Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation in podocyte injury and proteinuria in experimental nephrotic syndrome  
*J Am Soc Nephrol*, 16 (9), 2690-2701
- [83] Kumagai I, Watanabe K, Oshima T (1982)  
A thermostable tRNA (guanosine-2')-methyltransferase from *Thermus thermophilus* HB27 and the effect of ribose methylation on the conformational stability of tRNA  
*J Biol Chem*, 257 (13), 7388-7395
- [84] Laemmli UK (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4  
*Nature*, 227, 680-685
- [85] Lee YK, Kwon T, Kim, DJ, Huh W, Kim YG, Oh HY, Kawachi H (2004)  
Ultrastructural study on nephrin expression in experimental puromycin aminonucleoside nephrosis  
*Nephrol Dial Transplant*, 19, 2981-2986
- [86] Löffler G, Petrides PE (1998)  
*Biochemie und Pathobiochemie*  
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 6. Auflage
- [87] Lorenz JN, Weihprecht H, He XR, Skott O, Briggs JP, Schnermann J (1993)  
Effects of adenosine and angiotensin on macula densa-stimulated renin secretion  
*Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*, 260, F187-F194
- [88] Luimula P, Ahola H, Wang SX, Solin ML, Aaltonen P, Tikkanen I, Kerjaschki D, Holthofer H (2000)  
Nephrin in experimental glomerular disease  
*Kidney Int*, 58, 1461-1468
- [89] Luimula P, Sandstrom N, Novikov D, Holthofer H (2002)  
Podocyte-associated molecules in puromycin aminonucleoside nephrosis of the rat  
*Lab Invest*, 82 (6), 713-718
- [90] Macconi D, Bonomelli M, Benigni A, Plati T, Sangalli F, Longaretti L, Conti S, Kawachi H, Hill P, Remuzzi G, Remuzzi A (2006)  
Pathophysiologic implications of reduced podocyte number in a rat model of progressive glomerular injury  
*Am J Pathol*, 168 (1), 42-54

- [91] Martin A, Molina A, Bricio T, Mampaso F (1995)  
Passive dual immunization against tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and IL-1 beta maximally ameliorates acute aminonucleoside nephrosis  
*Clin Exp Immunol*, 99 (2), 283-288
- [92] Medina M, Urdiales JL, Amores-Sanchez MI (2001)  
Roles of homocysteine in cell metabolism: old and new functions  
*Eur J Biochem*, 268, 3871-3882
- [93] Messina A, Davies DJ, Dillane PC, Ryan GB (1987)  
Glomerular epithelial abnormalities associated with the onset of proteinuria in aminonucleoside nephrosis  
*Am J Pathol*, 126, 220-229
- [94] Miller MW, Duhl DM, Winkes BM, Arredondo-Vega F, Saxon PJ, Wolff GL, Epstein CJ, Hershfield MS, Barsh GS (1994)  
The mouse lethal nonagouti (a(x)) mutation deletes the S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) gene  
*EMBO J*, 13 (8), 1806-1816
- [95] Montgomery JA, Clayton SJ, Thomas HJ, Shannon WM, Arnett G, Bodner AJ, Kion IK, Cantoni GL, Chiang PK (1982)  
Carbocyclic analogues of 3-deazaadenosine: a novel antiviral agent using S-adenosylhomocysteine hydrolase as a pharmacological target  
*J Med Chem*, 25 (6), 626-629
- [96] Moore JP, Johannsson A, Hesketh TR, Smith GA, Metcalfe JC (1984)  
Calcium signals and phospholipid methylation in eukaryotic cells  
*Biochem J*, 221 (3), 675-684
- [97] Moreno-Manzano V, Mampaso F, Sepulveda-Munoz JC, Alique M, Chen S, Ziyadeh FN, Iglesias-de la Cruz MC, Rodriguez J, Nieto E, Orellana JM, Reyes P, Arribas I, Xu Q, Kitamura M, Lucio Cazana FJ (2003)  
Retinoids as a potential treatment for experimental puromycin-induced nephrosis  
*Br J Pharmacol*, 139 (4), 823-831
- [98] Müller T, Voitalla D, Hauptmann B, Fowler B, Kuhn W (2001)  
Decrease of methionine and S-adenosylmethionine and increase of homocysteine in treated patients with Parkinson's disease  
*Neurosci Lett*, 308 (1), 54-56
- [99] Mundel P, Kriz W (1995)  
Structure and function of podocytes: an update  
*Anat Embryol*, 192, 385-397



- [100] Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Krüger M, Reiser J, Kriz W (1997)  
Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes  
J Cell Biol, 139, 193-204
- [101] Nagai M, Yaoita E, Yoshida Y, Kuwano R, Nameta M, Ohshiro K, Isome M, Fujinaka H, Suzuki S, Suzuki J, Suzuki H, Yamamoto T (2003)  
Coxsackievirus and adenovirus receptor, a tight junction membrane protein, is expressed in glomerular podocytes in the kidney  
Lab Invest, 83 (6), 901-911
- [102] Nantel F, Meadows E, Denis D, Connolly B, Metters KM, Giaid A (1999)  
Immunolocalization of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human elderly  
FEBS Lett, 457 (3), 475-477
- [103] Newby AC, Holmquist CA (1984)  
Adenosine and the concept of retaliatory metabolites  
Trends Biochem Sci, 9, 42-44
- [104] Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE (1997)  
Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease  
N Engl J Med, 337, 230-236
- [105] Orchard TJ, Forrest KY, Ellis D, Becker DJ (1997)  
Cumulative glycemic exposure and microvascular complications in insulin-dependent diabetes mellitus  
Arch Intern Med, 157, 1851-1856
- [106] Osswald H (1975)  
Renal effects of adenosine and their inhibition by theophylline in dogs  
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 288, 79-86
- [107] Osswald H, Schmitz HJ, Kemper R (1977)  
Tissue content of adenosine, inosine and hypoxanthine in rat kidney after ischemia and post ischemic recirculation  
Pflügers Arch, 371, 45-49
- [108] Osswald H, Nabakowski G, Hermes H (1980)  
Adenosine as a possible mediator of metabolic control of glomerular filtration rate  
Int J Biochem, 12, 263-267
- [109] Osswald H, Hermes HH, Nabakowski G (1982)  
Role of adenosine in signal transmission of tubuloglomerular feedback  
Kidney Int Suppl, 12, S136-142

- [110] Palmer JL, Abeles RH (1979)  
The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinease  
J Biol Chem, 254 (4), 1217-1226
- [111] Pavenstädt H (2000)  
Roles of the podocyte in glomerular function  
Am J Physiol Renal Physiol, 278 (2), F 173-F179
- [112] Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M (2003)  
Cell biology of the glomerular podocyte  
Physiol Rev, 83, 253-307
- [113] Pawelczyk T, Grden M, Rzepko R, Sakowicz M, Szutowicz A (2005)  
Region-specific alterations of adenosine receptors expression level in kidney of diabetic rat  
Am J Pathol, 167, 315-325
- [114] Perna AF, Ingrosso D, Satta E, Lombardi C, Acanfora F, De Santo NG (2004)  
Homocysteine metabolism in renal failure  
Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 7, 53-57
- [115] Pfaffl MW (2001)  
A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR  
Nucl Acids Res, 29, e45
- [116] Pricam C, Humbert F, Perrelet A, Amherdt M, Orci L (1975)  
Intercellular junctions in podocytes of the nephrotic glomerulus as seen with freeze-fracture  
Lab Invest, 33, 209-218
- [117] Radomski N, Kaufmann C, Dreyer C (1999)  
Nuclear accumulation of S-adenosylhomocysteine hydrolase in transcriptionally active cells during development of *Xenopus laevis*  
Mol Biol Cell, 10 (12), 4283-4298
- [118] Reddy R, Singh R, Shimba S (1992)  
Methylated cap structures in eukaryotic RNAs: structure, synthesis and functions  
Pharmacol Ther, 54 (3), 249-267
- [119] Ren Y, Arima S, Carretero OA, Ito S (2002)  
Possible role of adenosine in macula densa control of glomerular hemodynamics  
Kidney Int, 61, 169-176

- [120] Ricardo SD, Bertram JF, Ryan GB (1994)  
Antioxidants protect podocyte foot processes in puromycin aminonucleoside-treated rats  
J Am Soc Nephrol, 4 (12), 1974-1986
- [121] Rieg T, Steigele H, Schnermann J, Richter K, Osswald H, Vallon V (2005)  
Requirement of intact adenosine A1 receptors for the diuretic and natriuretic action of methylxanthines theophylline and caffeine  
J Pharmacol Exp Ther, 313, 403-409
- [122] Schatz RA, Wilens TE, Sellinger OZ (1981)  
Decreased transmethylation of biogenic amines after in vivo elevation of brain S-adenosyl-L-homocysteine  
J Neurochem, 36 (5), 1739-1748
- [123] Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K (1999)  
Anatomie  
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 8. Auflage
- [124] Schnermann J (2003)  
The juxtaglomerular apparatus: from anatomical peculiarity to physiological relevance  
J Am Soc Nephrol, 14, 1681-1694
- [125] Schweda F, Wagner C, Krämer BK, Schnermann J, Kurtz A (2003)  
Preserved macula densa-dependent renin secretion in A1 adenosine receptor knockout mice  
Am J Physiol Renal Physiol, 284, F770-F777
- [126] Schwedt G (1994)  
Chromatographische Trennmethode: Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 3. erweiterte Auflage
- [127] Selhub J, Miller JW (1992)  
The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine  
Am J Clin Nutr, 55, 131-138
- [128] Siragy HM, Linden J (1996)  
Sodium intake markedly alters renal interstitial fluid adenosine  
Hypertension, 27, 404-407
- [129] Skott O, Briggs JP (1987)  
Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion  
Science, 237, 1618-1620

- [130] Smith JA, Sivaprasadarao A, Munsey TS, Bowmer CJ, Yates MS (2001)  
Immunolocalisation of adenosine A(1) receptors in the rat kidney  
*Biochem Pharmacol*, 61 (2), 237-244
- [131] Smoyer WE, Ransom RF (2002)  
Hsp27 regulates podocyte cytoskeletal changes in an in vitro model of podocyte process retraction  
*FASEB J*, 16 (3), 315-326
- [132] Spielman WS, Thompson CI (1982)  
A proposed role for adenosine in the regulation of renal hemodynamics and renin release  
*Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*, 242, F423-F435
- [133] Springer MS, Goy MF, Adler J (1979)  
Protein methylation in behavioural control mechanisms and in signal transduction  
*Nature*, 280, 279-284
- [134] Sun D, Samuelson LC, Yang T, Huang Y, Paliege A, Saunders T, Briggs J, Schnermann J (2001)  
Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: Evidence from mice lacking adenosine 1 receptors  
*Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (17), 9983-9988
- [135] Szyf M, Detich N (2001)  
Regulation of the DNA methylation machinery and its role in cellular transformation  
*Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 69, 47-79
- [136] Takeda M, Yoshitomi K, Imai M (1993)  
Regulation of Na<sup>+</sup>-3HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport in rabbit proximal convoluted tubule via adenosine A1 receptor  
*Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*, 265, F511-F519
- [137] Tang WW, Qi M, Warren JS, Van GY (1997)  
Chemokine expression in experimental tubulointerstitial nephritis  
*J Immunol*, 159, 870-876
- [138] Thomson S, Bao D, Deng A, Vallon V (2000)  
Adenosine formed by 5'-nucleotidase mediates tubuloglomerular feedback  
*J Clin Invest*, 106, 289-298
- [139] Thureau K (1964)  
Renal hemodynamics  
*Am J Med*, 36, 689-719

- [140] Towbin H, Staehlin T, Gordon J (1979)  
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications  
Proc Natl Acad Sci, 76, 4350-4355
- [141] Ueland PM (1982)  
Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase  
Pharmacol Rev, 34, 223-253
- [142] Ueland PM, Helland S (1983)  
Binding of adenosine to intracellular S-adenosylhomocysteine hydrolase in isolated rat hepatocytes  
J Biol Chem, 258 (2), 747-752
- [143] Vallon V, Mühlbauer B, Osswald H (2006)  
Adenosine and kidney function  
Physiol Rev, 86, 901-940
- [144] Vance DE, Ridgway ND (1988)  
The methylation of phosphatidylethanolamine  
Prog Lipid Res, 27 (1), 61-79
- [145] Van Guldener C, Kulik W, Berger R, Dijkstra DA, Jakobs C, Reijngoud DJ, Donker AJ, Stehouwer CD, De Meer K (1999)  
Homocysteine and methionine metabolism in ESRD: a stable isotope study  
Kidney Int, 56, 1064-1071
- [146] Vasmant D, Maurice M, Feldmann G (1984)  
Cytoskeleton ultrastructure of podocytes and glomerular endothelial cells in man and in the rat  
Anat Rec, 210 (1), 17-24
- [147] Vio CP, Cespedes C, Gallardo P, Masferrer JL (1997)  
Renal identification of cyclooxygenase-2 in a subset of thick ascending limb cells  
Hypertension, 30 (3 Pt 2), 687-692
- [148] Vitzthum H, Weiss B, Bachleitner W, Krämer BK, Kurtz A (2004)  
Gene expression of adenosine receptors along the nephron  
Kidney Int, 65, 1180-1190

- [149] Wu QL, Fu YF, Zhou WL, Wang JX, Feng YH, Liu J, Xu JY, He PL, Zhou R, Tang W, Wang GF, Zhou Y, Yang YF, Ding J, Li XY, Chen XR, Yuan C, Lawson BR, Zuo JP (2005)  
Inhibition of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase induces immunosuppression  
J Pharmacol Exp Ther, 313 (2), 7

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A <sub>s</sub>	Spezifische Aktivität
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AGE	advanced glycation end product
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Antikörperpuffer
APS	Ammoniumpersulfat
AQP1	Aquaporin 1
AQP3	Aquaporin 3
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	concentration, Konzentration
C	Cytosin
C <sub>t</sub>	cycle threshold
ca.	circa, zirka
cAMP	cyclic AMP, zyklisches AMP
CAR	coxsackie and adenovirus receptor, Coxsackie-und-Adenovirus-Rezeptor
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CDP	Cytidindiphosphat
cGMP	cyclic GMP, zyklisches GMP
CO	Kohlenstoffmonoxid
Cox-2	Cyclooxygenase 2
Cy5	Indocarbocyanin 5
d	Schichtdicke

---

Da	Dalton
d. h.	das heißt
dl	Deziliter
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Effizienz
E'	Extinktion
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalitis
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay, Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest
engl.	englisch
Epo	Erythropoietin
et al.	et alii, und andere
FG	Feuchtgewicht
fmol	Femtomol
g	Gramm
g'	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
G	Guanin
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Glut2	Glucosetransporter 2
GMP	Guanosinmonophosphat
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie



---

IDDM	insulin dependent diabetes mellitus, Insulin-abhängiger Diabetes mellitus
IGF-IR	insulin-like-growth-factor-I receptor, Insulin-ähnlicher-Wachstumsfaktor-I-Rezeptor
IgG	Immunglobulin der Klasse G
JGA	Juxtaglomerulärer Apparat
$K_{eq}$	Gleichgewichtskonstante
KCl	Kaliumchlorid
$K_2CO_3$	Kaliumcarbonat
kDa	Kilodalton
$KH_2PO_4$	Kaliumhydrogenphosphat
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KPP	Kaliumphosphatpuffer
l	Liter
LSM	Laser-Scan-Mikroskop(ie)
M	molar (mol/l)
mA	Milliampere
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mg	Milligramm
min	Minute(n)
MIP-1 $\beta$	Makrophagen-inflammatorisches-Protein 1 $\beta$
mol	Mol
MP	Methylierungspotential
mPa	Millipascal
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
MS	Multiple Sklerose
MTT	Monotetrazoliumsalsz
mU	Milliunit

---

n	Anzahl Versuchstiere
N	normal (mol/l)
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
Na/K-ATPase	Natrium/Kalium-ATPase
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Ammoniumhydrogenphosphat
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OH	Hydroxy-, Hydroxylgruppe
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAN	Puromycin-Aminonukleosid-Nephrose
PBS	phosphate buffered saline, Phosphatpuffer in Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
pH	potentia Hydrogenii
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PN	Produktnummer
ppm	parts per million
RBF	Renaler Blutfluss
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
RT'	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Svedberg-Koeffizient
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error of the means, Standardfehler des Mittelwertes

---

syn.	Synonym
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Azetat/EDTA
TBS	tris buffered saline, Trispuffer in Kochsalzlösung
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethyldiamin
TGF	tubuloglomerular feedback, Tubuloglomeruläre Rückkopplung
TH1	T-Helfer-Zelle vom Typ 1
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TPBS	Tween PBS
tRNA	Transfer-RNA
U	units, Einheiten
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
vWF	von-Willebrand-Faktor
v/v	Volumen in Volumen
WT1	Wilms-Tumor-Protein 1
x	mal, fach (z. B. 3fach)
z. B.	zum Beispiel
$\epsilon$	Molarer Extinktionskoeffizient
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	mikromolar
$\mu\text{mol}$	Mikromol
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\Delta$	Delta, Differenz

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Stellung der S-Adenosylhomocystein-Hydrolase im Intermediärstoffwechsel	S. 2
Abb. 2	Strukturformel des Adenosins	S. 7
Abb. 3	Schematische Darstellung der Regulierung der extra- und intrazellulären Adenosinkonzentrationen	S. 8
Abb. 4	Der juxtaglomeruläre Apparat	S. 11
Abb. 5	Schematische Darstellung des Aufbaus eines konfokalen Laser-Scan-Mikroskops und Prinzip der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie	S. 24
Abb. 6	Relative Quantifizierung und Bestimmung der Effizienz	S. 35
Abb. 7	Reaktionskaskade des SAH-Abbaus bei der spektralphotometrischen Aktivitätsbestimmung der SAH-Hydrolase mit Hilfe der MTT-Formazan-Methode	S. 42
Abb. 8	Darstellung der SAH-Hydrolase mit einem polyklonalen Primärantikörper des Kaninchens und einem Texas-Red-konjugierten Sekundärantikörper der Ziege in der Niere der gesunden adulten Ratte durch Immunfluoreszenz	S. 48
Abb. 9	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der SAH-Hydrolase in der Niere der gesunden adulten Ratte in Kombination mit einer Markierung von Sammelrohren mit einem polyklonalen Antikörper der Ziege gegen AQP3	S. 49
Abb. 10	Immunhistochemische Doppelmarkierung der SAH-Hydrolase und von Synaptopodin, einem Protein der Podozytenfortsätze, mit überlagertem Transmissionsbild in der Niere der gesunden adulten Ratte	S. 50
Abb. 11	Darstellung der SAH-Hydrolase mit einem polyklonalen Primärantikörper des Kaninchens und einem Texas-Red-konjugierten Sekundärantikörper der Ziege in Kombination mit einer Kernfärbung mit Sytox green in der Niere der adulten Ratte nach 4-wöchigem IDDM	S. 52

- 
- Abb. 12 Darstellung der SAH-Hydrolase mit einem polyklonalen Primärantikörper des Kaninchens und einem Texas-Red-konjugierten Sekundärantikörper der Ziege in der Rattennieren unter experimenteller Hypoxie durch indirekte Immunfluoreszenz S. 54
- Abb. 13 Immunhistochemische Doppelmarkierung der SAH-Hydrolase und von Synaptopodin, einem Protein der Podozytenfortsätze, in der Niere der adulten Ratte nach 3-tägiger PAN S. 57
- Abb. 14 Immunhistochemische Doppelmarkierung der SAH-Hydrolase und von Synaptopodin, einem Protein der Podozytenfortsätze, mit überlagertem Transmissionsbild in der Niere der adulten Ratte nach 11-tägiger PAN S. 58
- Abb. 15 Darstellung des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors mit einem polyklonalen Primärantikörper des Kaninchens und einem Cy5-konjugierten Sekundärantikörper der Ziege in der Niere der gesunden adulten Ratte durch Immunfluoreszenz S. 60
- Abb. 16 Immunhistochemische Darstellung des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors mit gleichzeitiger zusätzlicher Markierung der Macula densa mit einem polyklonalen Antikörper der Ziege Cox-2 und überlagertem Transmissionsbild S. 61
- Abb. 17 Immunhistochemischer Nachweis des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors mit einem polyklonalen Primärantikörper des Kaninchens in der Niere der diabetischen adulten Ratte S. 63
- Abb. 18 Immunhistochemische Darstellung des Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptors mit einem polyklonalen Primärantikörper des Kaninchens in der Niere der unter Hypoxie gehaltenen adulten Ratte S. 65

---

Abb. 19	Immunhistochemischer Nachweis des Adenosin-A <sub>1</sub> -Rezeptors nach 3-tägiger PAN in der Niere der adulten Ratte mit einem polyklonalen Antikörper des Kaninchens und einem Texas-Red-konjugierten Sekundärantikörper der Ziege	S. 67
Abb. 20	Nachweis des Adenosin-A <sub>1</sub> -Rezeptors nach 11-tägiger PAN in Verbindung mit einer Anfärbung der Macula densa durch einen polyklonalen Antikörper der Ziege gegen Cox-2 und einer Kernfärbung mit Sytox green	S. 68
Abb. 21	Western-Blot-Analyse der SAH-Hydrolase	S. 72, 73
Abb. 22	Western-Blot-Analyse des Adenosin-A <sub>1</sub> -Rezeptors	S. 74

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Zusammensetzung der Laufmittel für die Elution der Adeninnukleoside	S. 28
Tab. 2	Verlauf der Gradienten zur HPLC-Analyse	S. 28
Tab. 3	Experimentelle LightCycler-Protokolle für die verschiedenen untersuchten Gene	S. 32
Tab. 4	Sequenzen der für die RT-PCR-Analysen verwendeten Primer und Größen der entstandenen Produkte in Basenpaaren (bp)	S. 32
Tab. 5	Effizienz der LightCycler-Amplifikation während der exponentiellen Phase	S. 36
Tab. 6	Komponenten des Trenn- und des Sammelgels	S. 39
Tab. 7	Zusammensetzung der Entwicklerlösung für die colorimetrische Detektion	S. 41
Tab. 8	Gewebkonzentration der Adeninnukleoside SAH, SAM und Adenosin unter Kontroll- und pathologischen Bedingungen sowie das jeweils resultierende MP	S. 70
Tab. 9	Induktionsfaktoren der mRNA-Expression des SAH-Hydrolase-Gens und des Adenosin-A <sub>1</sub> -Rezeptor-Gens bei der real-time-RT-PCR unter Kontroll- und pathologischen Bedingungen als Maß für die relative Expressionsrate des entsprechenden Gens	S. 71
Tab. 10	SAH-Hydrolase-Aktivität im Rohextrakt des Nierengewebes	S. 75

## 8 Danksagung

An erster Stelle danke ich meiner Doktormutter Frau PD Dr. Doris Kloor ganz herzlich für die Überlassung des Themas und die stets hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Neben ihrer fachlichen Kompetenz lernte ich ihren freundlichen und offenen Umgang mit ihren Mitarbeitern sowie ihre große Hilfsbereitschaft und Geduld sehr zu schätzen.

Nicht genug danken kann ich auch Herrn Dr. Andreas Mack vom Anatomischen Institut, der mich kompetent und geduldig in die Benutzung des konfokalen Laser-Scan-Mikroskops eingewiesen hat, jedes technische Problem in den Griff bekam und dessen Tür auch noch bei der hundertsten Nachfrage am Tag für mich offen stand.

Ein ganz großes Dankeschön geht an Frau Dr. Marina Hermes, die mir insbesondere bei den molekularbiologischen Untersuchungen eine unerlässliche Hilfe war. Darüber hinaus war sie mir bei der graphischen Darstellung von Reaktionsschemata und Schaubildern behilflich.

Großer Dank gebührt auch Frau Renate Riehle, die mir bei allen (labor-) technischen und zeitlich-organisatorischen Problemen mit Rat und Tat sowie riesiger Hilfsbereitschaft zur Seite stand. Überdies hat sie mir bei der Probenaufbereitung und den Western-Blot-Analysen sehr geholfen.

Weiterhin geht mein aufrichtiger Dank an Frau Elke Zabinsky für die Anfertigung der Kryostatschnitte und die freundliche Einführung in die Bedienung des Mikrotoms.

Meinen besten Dank aussprechen möchte ich auch Frau PD Dr. Heide Schmid für ihre kritische und intensive Auseinandersetzung mit meiner Dissertation, die daraus resultierenden wertvollen Denkanstöße und Anregungen.

Bei Herrn Prof. Dr. Oßwald bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die guten Arbeitsbedingungen am Institut für Pharmakologie. Meinen Labor- und Doktorandenkolleginnen Julia Kirschler, Sandra von Hippel, Julia Mattar und Martina Tete danke ich für die fröhliche und angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor.



Ein ganz herzlicher Dank geht auch an meine beiden langjährigen Freunde Shantha Mayanna und Philipp Hahn. Shantha hat das Manuskript korrekturgelesen und wertvolle Anregungen zum Layout gemacht, während Philipp mir sehr beim Druck der Arbeit behilflich war. Meinen lieben Freunden Christiane Bretschneider, Esther Engel und Carsten Lange sei ebenfalls herzlich gedankt. Sie haben durch ihre ehrlichen Einschätzungen und konstruktiven Ratschläge maßgeblichen Anteil an der Entstehung der vorliegenden Dissertation. Außerdem waren mir alle genannten Freunde in schwierigen Phasen dieser Arbeit eine wichtige moralische Stütze, wofür ich ihnen sehr verbunden bin.

Zu guter Letzt seien meine Eltern Ingeborg und Wolfgang Roll erwähnt. Durch ihr bedingungsloses Vertrauen in mich und ihre Unterstützung auf meinem gesamten bisherigen Weg haben sie diese Arbeit erst ermöglicht.

Vielen Dank Euch allen!

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

---

Vor- und Zuname	Jan Benjamin Roll
Geburtsdatum, -ort	15.09.1978, Schwäbisch Gmünd
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

### Schulbildung

---

1985 - 1989	Grundschule, Uhland-Schule Schwäbisch Gmünd
1989 - 1998	Scheffold-Gymnasium Schwäbisch Gmünd
22.06.1998	Allgemeine Hochschulreife

### Zivildienst

---

01.09.1998 - 30.09.1999	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Klinische Abteilung, Hamburg
-------------------------	---

### Studium

---

10/1999 - 02/2000	Studium der Biochemie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
03/2000 - 11/2006	Studium der Humanmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
27.03.2002	Ärztliche Vorprüfung
25.03.2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05.09.2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
17.11.2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
23.11.2006	Approbation als Arzt

**Famulaturen**

---

12.08. - 10.09.2002	Kreiskrankenhaus Reutlingen, Medizinische Klinik
27.03. - 26.04.2003	Gesundheitsamt Stuttgart
31.07 - 29.08.2003	Universitätsklinikum Carl Gustav Carus der TU Dresden, Klinik und Poliklinik für Dermatologie
14.08 - 29.08.2004	Institut für Tropenmedizin des Universitätsklinikums Tübingen
06.09 - 20.09.2004	Landesinstitut für gerichtliche und soziale Medizin Berlin

**Praktisches Jahr**

---

24.10.2005 - 12.02.2006	Krankenhaus Bad Cannstatt, Klinik für Allgemeine Innere Medizin, Gastroenterologie und Hepatologie
13.02. - 04.06.2006	Krankenhaus Bad Cannstatt, Zentrum für Hautkrankheiten
05.06. - 27.08.2006	Krankenhaus Bad Cannstatt, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Unfallchirurgie

**Stipendium**

---

02/2000 - 11/2006	Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes e.V.
-------------------	---

**Promotion**

---

10/2004 - 07/2007	Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Eberhard-Karls- Universität Tübingen
-------------------	--