

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Tübingen**

Direktor: Professor Dr. H. Oßwald

**Immunhistochemischer Nachweis von
S-Adenosylhomocystein Hydrolase in der Niere der
Ratte unter Kontroll- und pathologischen Bedingungen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

der

**Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

**Katrin Susanne Fink
aus Reutlingen**

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Oßwald

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. H. Schmid

Meinen Eltern

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. Oßwald

Immunhistochemischer Nachweis von S-Adenosylhomocystein Hydrolase in der Niere der Ratte unter Kontroll- und pathologischen Bedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung der SAH-Hydrolase in der Niere der Ratte unter Kontroll- und pathologischen Bedingungen untersucht. Das zytosolische Enzym ist in tierischem Gewebe ubiquitär vorhanden und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Transmethylierungsreaktionen des Organismus.

Die Lokalisation der SAH-Hydrolase wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Markierung nachgewiesen. Dazu wurden Kryostatschnitte von Nieren männlicher Sprague-Dawley-Ratten unter Kontrollbedingungen, mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus ohne Insulinsubstitution nach 2 und 4 Wochen, 7 und 14 Tage nach unilateraler Nephrektomie, unter experimenteller Hypoxie, sowie salzarmer und -reicher Diät untersucht.

Die SAH-Hydrolase konnte unter Kontrollbedingungen außer in den Tubuluszellen im Glomerulum und zwar in den Mesangiumzellen sowie den Podozyten, hier vor allem im Zytosol der Zellkörper und den Abgängen der Zellfortsätze lokalisiert werden. Es war kein Enzym in der Macula densa und den Zellkernen nachweisbar. Unter diabetischen Bedingungen war zusätzlich 2 Wochen nach Diabetesbeginn, SAH-Hydrolase mit den Zellkernen der tubulären Zellen des Nierenmarks assoziiert nachweisbar. In der hypoxischen Niere war die SAH-Hydrolase in Zellkernen im Interstitium von Nierenmark und -rinde, sowie in kortikalen Tubuli nachweisbar. Auch in der Niere 7 Tage nach unilateraler Nephrektomie konnte die SAH-Hydrolase in den Zellkernen der proximalen und distalen Tubuli der Nierenrinde nachgewiesen werden. Eine Co-Lokalisation der SAH-Hydrolase mit COX-2 ließ sich auch in der Macula densa von Nieren nach 7-tägiger salzarmer Diät nicht nachweisen. Mit dem Western Blot ließ sich kein SAH-Hydrolase-Protein aus den Zellkernen von Kontrollnieren und Nieren der verschiedenen pathologischen Zustände nachweisen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1. 1	Bisheriger Kenntnisstand	1
1. 2	Eigene Fragestellung	14
2	Material	16
2. 1	Versuchstiere	16
2. 2	Geräte und Chemikalien	16
2. 2. 1	Geräte	16
2. 2. 2	Chemikalien	17
2. 2. 3	Antikörper	18
2. 3	Lösungen	19
2. 3. 1	Immunhistochemie	19
2. 3. 2	Zellkernextraktion	20
2. 3. 3	Isoelektrische Fokussierung	20
2. 3. 4	SDS- Gelelektrophorese	21
2. 3. 5	Western Blot	23
3	Methoden	24
3. 1	Experimenteller Diabetes mellitus	24
3. 2	Unilaterale Nephrektomie	24
3. 3	Experimentelle Hypoxie	25
3. 4	Diäten	25
3. 5	Organentnahme	25
3. 6	Immunhistochemische Färbung	26
3. 7	Mikroskopie und Fotografie	28
3. 8	Präparation von Zellkernen	28
3. 9	SDS-PAGE	29
3. 10	Western Blot	30
3. 11	Isoelektrische Fokussierung	31

3. 12	Proteinbestimmung nach BRADFORD	32
4	Ergebnisse	34
4. 1	Nierengewicht	34
4. 2	Lokalisation der SAH-Hydrolase mittels Immunhistochemie	34
4. 3	Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der normalen Niere der gesunden, adulten Ratte	36
4. 3. 1	Verteilung der SAH-Hydrolase	36
4. 3. 2	Nachweis der SAH-Hydrolase in den Podozyten	39
4. 3. 3	Nachweis der SAH-Hydrolase in der mesangialen Matrix	39
4. 4	Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der Ratte mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus	42
4. 4. 1	Verteilung der SAH-Hydrolase	42
4. 4. 2	Nachweis der SAH-Hydrolase in den Podozyten	46
4. 4. 3	Nachweis der SAH-Hydrolase in der mesangialen Matrix	46
4. 5	Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der Ratte nach unilateraler Nephrektomie	47
4. 5. 1	Verteilung der SAH-Hydrolase	47
4. 6	Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der Ratte unter experimenteller Hypoxie	49
4. 6. 1	Verteilung der SAH-Hydrolase	49
4. 6. 2	Lokalisation von Erythropoetin mittels Immunhistochemie	51
4. 7	Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der Ratte nach 7-tägiger salzarmer und salzreicher Diät	52
4. 7. 1	Verteilung der SAH-Hydrolase	52
4. 7. 5	Nachweis der SAH-Hydrolase in den Zellen der Macula densa	52

4. 8	Nachweis der SAH-Hydrolase im Zellkern mittels SDS-PAGE und Western Blot	54
4. 9	Nachweis der SAH-Hydrolase im Zellkern mittels isoelektrischer Fokussierung und Western Blot	55
5	Diskussion	56
5. 1	Nierengewicht	56
5. 2	Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der normalen Niere der gesunden, adulten Ratte	57
5. 3	Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der Ratte mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus	63
5. 4	Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der Ratte nach unilateraler Nephrektomie	65
5. 5	Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der Ratte unter experimenteller Hypoxie	67
5. 6	Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der Ratte nach 7-tägiger salzarmer und salzreicher Diät	70
5. 7	Nachweis von SAH-Hydrolase in den Zellkernen von Nieren verschiedener pathologischer Zustände durch SDS- Gel-elektrophorese	71
5. 8	Nachweis von SAH-Hydrolase in den Zellkernen von Nieren verschiedener pathologischer Zustände durch isoelektrische Fokussierung	73
6	Zusammenfassung	74
7	Literaturverzeichnis	75

1 Einleitung

Das zytoplasmatische Enzym S-Adenosyl-L-Homocystein-(SAH)-Hydrolase (E.C. 3.3.1.1.) wurde erstmals 1959 von DE LA HABA und CANTONI beschrieben. Es katalysiert die reversible Hydrolyse von S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) zu Adenosin und L-Homocystein. Das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion liegt *in vitro* zwar eindeutig auf der Seite der Synthese ($K_{eq} = 10^{-6}$ M), unter physiologischen Bedingungen wird jedoch die Hydrolyse favorisiert, da die beiden Reaktionsprodukte Adenosin und Homocystein schnell und effizient aus dem Gleichgewicht entfernt werden (CANTONI et al., 1980). Die Schätzungen des Umfangs einer stattfindenden Rückreaktion betragen höchstens 35 % in Relation zur Hydrolyse (LLOYD et al., 1988). Der Abbau durch die SAH-Hydrolase ist der bislang einzige bekannte Stoffwechselweg, über den das SAH im Säugerorganismus metabolisiert werden kann (ELORANTA et al., 1982).

1.1 Bisheriger Kenntnisstand

Die SAH-Hydrolase ist unter Eukaryonten und Prokaryonten weit verbreitet, wobei die Struktur unter den Spezies variieren kann. Bei Säugern liegt das Enzym in einer tetrameren Form mit einer molekularen Masse von etwa 190 000 vor (DOSKELAND und UELAND, 1982, FUJIOKA und TAKATA, 1981). Jede Untereinheit besteht aus einer Polypeptidkette aus 432 Aminosäuren, mit einer Molekularmasse von 47 660. Die DNA-Sequenz der SAH-Hydrolase beim Menschen besteht aus 1299 Nukleotiden (COULTER-KARIS und HERSHFIELD, 1989). Der Genlocus der humanen SAH-Hydrolase liegt auf dem langen Arm von Chromosom 20, ebenso, wie der der Adenosindeaminase (ADA). Entsprechend scheint sich die genetische Information für die SAH-Hydrolase im Laufe der Evolution aus Teilen des ADA-Gens heraus entwickelt zu haben

(HERSHFIELD und FRANCKE, 1982). Die Enzyme von Mensch und Ratte stimmen in der Aminosäuresequenz zu 91,5 % überein.

(DE COULTER-KARIS und HERSHFIELD, 1989).

Ausschaltung des SAH-Hydrolase-Gens in Mäuseembryos hat für diese letale Folgen, was die unabdingbare Wichtigkeit dieses Enzyms für den Säugerorganismus zeigt (CHIANG et al., 1996).

Der isoelektrische Punkt des aus Rattenlebern isolierten Enzyms liegt bei $pI = 5,6$ (KAJANDAR und RAINA, 1981). Für die Hydrolyse von SAH wurde mit der SAH-Hydrolase aus Rindernieren ein K_m -Wert von $5,0 \pm 1,2 \mu M$ ermittelt, in Rattenlebern liegt er mit $0,9 \mu M$ (KAJANDAR und RAINA, 1981) bei niedrigeren Werten. In Richtung der Synthese von SAH liegt der K_m -Wert bei $5,6 \mu M$. Die Enzymaktivität wird in Gegenwart von Adenosin mit einem K_i -Wert von $3 \mu M$ gehemmt. SAH-Hydrolase der Niere zeigt dieselben kinetischen Eigenschaften, wie die der Leber (KLOOR et al. 1996) und die anderer Gewebe (KLOOR et al. 2002).

Der katalytische Mechanismus wurde von PALMER und ABELES aufgeklärt (1976 und 1979). Da das Enzym, entsprechend seiner Struktur, über vier katalytische Zentren verfügt, enthält es vier fest an C-3 gebundene NAD^+ -Moleküle (DE LA HABA et al., 1986), welche in der Redoxreaktion des Nucleosidsubstrates verbraucht werden, wobei NAD^+ während der Katalyse nicht freigesetzt wird. SAH-Hydrolase enthält als aktives Holoenzym $3,6 \text{ mol}$ fest gebundenes NAD^+ / mol Enzym. Seine inaktive Form ist ein Apoenzym, das $1,3$ bis $3,4 \text{ mol}$ enzymgebundenes $NADH$ / mol Enzym, jedoch kein enzymgebundenes NAD^+ enthält (DE LA HABA et al., 1986).

Die Hydrolyse beginnt mit der Oxidation der 3'-Hydroxylgruppe des SAH durch das enzymgebundene NAD^+ . Durch die anschließend ablaufende α - β -Elimination wird Homocystein abgespalten. Die dabei entstehende Verbindung reagiert in einer Michael-Typ-Addition mit H_2O zu 3'-Ketoadenosin, welches im nächsten Schritt durch Reduktion des enzymgebundenen $NADH$ zum zweiten Endpro-

dukt, dem Adenosin, wird. Die Reaktion ist reversibel und benötigt keine Co-faktoren.

Das Substrat der Hydrolase, S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH), entsteht im Organismus in enzymatischen Methylierungsprozessen, neben dem methylierten Reaktionsprodukt. Methylgruppen-Donator ist das S-Adenosylmethionin (SAM) (CANTONI und SCARANO, 1954). Transmethylierungsreaktionen stellen neben der SAH-Hydrolase die wesentlichen Bestandteile des Zyklus dar, der die Bereitstellung von Methylgruppen kontrolliert (siehe Abb. 1).

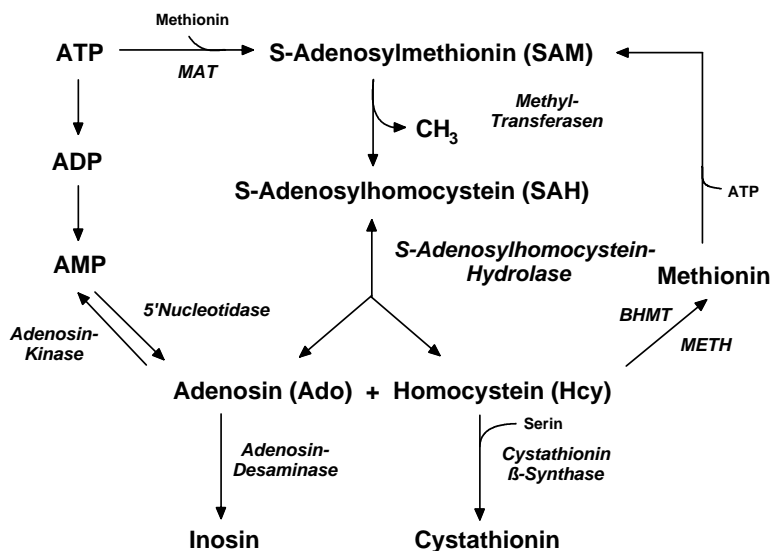


Abb. 1 Die Stellung der SAH-Hydrolase im Stoffwechsel (BHMT= Betain-Homocystein-Methyltransferase, METH= Methyl-Tetrahydrofolat-abhängige Methionin-Synthase, MAT= Methionin-Adenosyl-Transferase)

SAM wird enzymatisch aus Methionin und ATP synthetisiert (CANTONI, 1952) und ist in der aktiven L-Form der einzige im Säugerorganismus vertretene Methylgruppendonator für Methyltransferasen mit Ausnahme derer, die an der Biosynthese des Methionins beteiligt sind und N⁵-Methyltetrahydrofolat, dem eine

Rolle in der Methylierung biogener Amine zugeschrieben wird (CANTONI, 1975). Es existieren drei Bindungsstellen für SAM an einem Methyltransferenzym: Zwei obligatorisch vorkommenden Aminogruppen und einer fakultativ vorkommenden Carboxylgruppe (ZAPPIA et al., 1969, KERR und BOREK, 1972). Im Gegensatz zu desaminiertem, kommt decarboxyliertes SAM in Säugern und Mikroorganismen vor. Es erfüllt dort eine Funktion im enzymatischen Transfer von Propylaminogruppen (ZAPPIA et al., 1969), welche für Wachstum und Differenzierung von Zellen wichtig sind.

Der Methylgruppendonator SAM fungiert in enzymatischen Methylierungsprozessen einer weiten Vielfalt von Substraten, die in so gut wie allen Zellen vorkommen, wie zum Beispiel der DNA (BROWN und ATTARDI, 1965, VANYUSHIN et al., 1970). Das spezifische Methylierungsmuster der DNA ist für die unterschiedliche Genexpression verantwortlich und bleibt auch bei Zellteilung und Reparatur erhalten. Die Methylierung beeinflusst die Wechselwirkung der DNA mit Proteinen und kann so unter anderem die Bindungsfähigkeit für Transkriptionsfaktoren, Restriktionsenzyme und Steroidhormonrezeptoren verändern (BUDDECKE, 1994, CHIANG et al., 1996).

SAM ist weiterhin an der Methylierung anderer Nukleinsäuren beteiligt, wie der mRNA (PERRY und KELLEY, 1974), wobei diese Reaktionen eine wichtige Rolle beim 5'-capping eukaryotischer mRNA spielen (SHATKIN, 1976, DESROISIERS et al., 1974), der normalen Entstehung von Säuger-rRNA (VAUGHAN et al., 1967) und der richtigen und effizienten Funktion der tRNA (PETERKOFKY et al., 1971, KERR und BOREK, 1972). Des Weiteren spielen SAM-abhängige Methylierungen in eukaryontischen Zellen eine wichtige Rolle im Metabolismus von biogenen Aminen, wie der Umwandlung von Noradrenalin zu Adrenalin (GULDBERG und MARDSEN, 1975), in der Blastogenese (KREDICH und MARTIN, 1977) und der enzymatischen Synthese von Fettsäuremethylestern aus Fettsäuren (AKAMATSU und LAW, 1970). Ebenfalls durch Methylgruppen modifiziert werden Proteine, die Einfluss auf Sekretion und Chemotaxis nehmen (USDIN et al., 1979, UELAND, 1982), G-Proteine, die an der Signalübermittlung in Photorezeptoren beteiligt sind (FUKADA et al.,

1994) und Phospholipide der Zellmembran, die deren Fluidität beeinflussen und die Signaltransmission durch die Membran gewährleisten (HIRATA und AXELROD, 1980). Die Methylierung von Lysinresten an Histonen, welche mit der Zellproliferation korreliert, hat weitere biologische Bedeutung in der Cytochrom C-Reifung oder als Regulator der Genexpression (PAIK und KIM, 1975). Methylierung von Carboxylgruppen in Proteinen in der Hypophyse sind für die Speicherung und Sekretion von Oxytocin und Vasopressin wichtig (PAIK und KIM, 1975). Das SAM ist außerdem eine obligatorische Adenosinquelle (KREDICH und MARTIN, 1977).

Die Aktivität der Methyltransferasen kann via Produkthemmung durch SAH beeinflusst werden (HOFFMAN, 1980, ZAPPIA et al., 1969). So ist SAH *in vitro* ein potenter, kompetitiver Inhibitor der Aktivität der folgenden Methyltransferasen: Phenylethanolamin N-Methyltransferase (Umwandlung von Noradrenalin zu Adrenalin), Catechol-Methyltransferase, Histamin-N-Methyltransferase, tRNA-Methyltransferase und Acetylserotonin-Methyltransferase. Die Affinität dieser Enzyme ist für SAH deutlich höher, als für SAM (DEGUCHI und BARCHAS, 1971).

Aufgrund der Stellung von SAM und SAH in Methylierungsreaktionen wird der Quotient aus SAM und SAH als Methylierungspotential definiert, welches als Indikator für die Methylierungsaktivität innerhalb der Zelle gilt (USDIN et al., 1979).

Das für den Abbau des SAH verantwortliche Enzym SAH-Hydrolase stellt in diesem Zusammenhang einen die Transmethylierung stimulierenden Faktor dar. Eine Hemmung der SAH-Hydrolase würde somit über den Konzentrationsanstieg von SAH und die daraus resultierende Hemmung verschiedenster Methylierungsreaktionen, Wachstum und Vermehrung von Zellen beeinflussen und stellt somit einen pharmakologischen Angriffspunkt für Chemotherapeutika oder in der antiviralen Therapie dar (JELAND, 1982). Einer der potentesten Inhibitoren der SAH-Hydrolase ist das 3'-Deazaadenosin (CHIANG et al., 1977), andere Adenosinanaloga, wie 2'-Deoxyadenosin oder Adenosin-Arabinosid, induzieren eine Art „Suizid-Inaktivierung“ des Enzyms. Ursache ist eine kovalente Bin-

dung eines reaktiven Zwischenprodukts an funktionelle Gruppen des aktiven Zentrums des Enzyms und unter Umständen durch irreversible Reduktion von NAD^+ (HERSHFIELD, 1978). Aber auch Adenosin exhibiert in topischer Applikation antiherpetische Aktionen.

Adenosin, welches aus der Hydrolyse von SAH entsteht, ist ein wichtiger Vermittler und Regulator zahlreicher physiologischer Vorgänge. Adenosin kann aber auch durch Dephosphorylierung von 5'AMP, welches aus dem Abbau von ATP im Energiestoffwechsel anfällt, durch eine spezifische 5'Nucleotidase entstehen (BAER et al., 1966). Der Abbau des, im Transmethylierungsstoffwechsel anfallenden SAH durch die SAH-Hydrolase stellt somit eine wichtige intrazelluläre Quelle für Adenosin dar (LLOYD et al., 1988).

Abgebaut wird Adenosin durch die Adenosindeaminase (ADA) zu Inosin, was wiederum durch die Nucleosid-Phosphorylase weiter zu Hypoxanthin, durch die Xanthin-Oxidase zu Xanthin und letztendlich in der Leber weiter zu Harnsäure verstoffwechselt wird (FOX und KELLEY, 1978). Aus diesem Grund ist die Aktivität der SAH-Hydrolase *in vivo* von der Aktivität der ADA abhängig. Eine schnelle Eliminierung von Adenosin ist nötig, um die durch SAH-Hydrolase katalysierte Reaktion in Richtung der Hydrolyse ablaufen zu lassen (KREDICH und MARTIN, 1977).

Der Gewebegehalt an Adenosin liegt unter normoxischen Bedingungen bei 5 nmol / g Feuchtgewicht (OSSWALD et al., 1977). Da das intrazelluläre Adenosin durch die Adenosindeaminase rasch abgebaut wird und extrazellulär sehr geringe Konzentrationen bereits hämodynamisch wirksam sind, muss der größte Teil intrazellulär an Protein gebunden vorliegen. Das Adenosin-bindende Protein wiederum ist die SAH-Hydrolase (HERSHFIELD, 1978, HERSHFIELD und KREDICH, 1978), welche somit eine weitere Funktion als intrazellulärer Adenosinspeicher erhält. Die SAH-Hydrolase der Niere ist in der Lage, fast das gesamte im Nierengewebe enthaltene Adenosin zu binden. Sie besitzt eine hochaffine Bindungsstelle für Adenosin, deren Funktion allerdings bislang unbekannt ist (KLOOR et al. 1996).

Adenosin entfaltet seine Wirkung in erster Linie über spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche, welche an Adenylatcyclase oder Ionenkanäle der Memb-

ran gekoppelt sind. In der Niere gibt es zwei Arten solcher spezifischer membrangebundener Adenosinrezeptoren, die bei Bindung entweder zur Hemmung (A_1), oder zur Aktivierung (A_2) der Adenylatcyclase führen. Über das Vorhandensein eines A_3 -Rezeptors wird zurzeit diskutiert (COLLIS und HOURANI, 1993).

Neben direkten hat Adenosin auch einige sehr bedeutsame indirekte Wirkungen, wie die Hemmung der Pyrimidinsynthese *de novo*, die wiederum zu einer Immunsuppression führt. Es kann die intrazelluläre cAMP-Konzentration ändern, Proteinkinasen hemmen und die membrangebundene Adenylatcyclase aktivieren. Außerdem reduziert es die Gluconeogenese aus Laktat oder Pyruvat und hemmt die Lipolyse (FOX und KELLEY, 1978). Die Akkumulation von Adenosin in der Zelle und dessen weitere Verstoffwechslung spielt eine wichtige Rolle in der Hemmung der Proteinsynthese. Dieser sättigbare hemmende Effekt resultiert wahrscheinlich aus der begrenzten Verfügbarkeit von zellulärem L-Homocystein (TINTON und BUC-CALDERON, 1995 a).

Adenosin wirkt aber, ebenso wie Adenin, zytotoxisch. Vermittler dieser Toxizität ist die SAH-Hydrolase, da sie Adenosin und Adenin mit hoher Affinität bindet. Adenin, Adenosin und SAH konkurrieren kompetitiv um das aktive Zentrum der SAH-Hydrolase, was, vor allem bei der Blockierung anderer Abbauege für Adenosin, zu einer Gewebeakkumulation von SAH führt (HERSHFIELD und KREDICH, 1978). Bei Adenosinüberschuss wird außerdem entsprechend dem thermodynamischen Gleichgewicht noch SAH gebildet. Adenosin kann die SAH-Hydrolase-Aktivität aber auch direkt hemmen, bzw. umkehren, was zu einer weiteren Akkumulation von SAH und einer daraus folgenden Hemmung von Methyltransferreaktionen führt. Dies hat unter anderem eine Hemmung der DNA-Methylierung *in vivo* und eine Erhöhung des SAM-Spiegels zur Folge (TINTON und BUC-CALDERON, 1995 a, FOX und KELLEY, 1978), außerdem erhöht Adenosin den zellulären ATP-Spiegel in isolierten Hepatozyten (TINTON und BUC-CALDERON, 1995 b).

Das neben Adenosin bei der durch SAH-Hydrolase katalysierten Reaktion entstehende Reaktionsprodukt Homocystein ist eine schwefelhaltige Aminosäure. Es ist die reduzierte intrazelluläre Form des Homocystins, welches im Nierengewebe der Ratte eine zentrale Rolle im Transsulfurations-Stoffwechsel spielt, in dem zur Bildung von Cystein aus Methionin Schwefel transferiert wird (MUDD et al., 1965). Eigentlich als Zwischenstufe in der Demethylierung von Methionin vorkommend ist es ein an sich nicht toxisches, hypomethylierendes Agens (DE CABO et al., 1994). Die Hydrolyse von SAH ist die einzige bekannte metabolische Quelle für L-Homocystein in Vertebraten (CANTONI et al., 1980). Homocystein wird zur Synthese der essentiellen Aminosäure Methionin benötigt (DE LA HABA und CANTONI, 1959). In dieser Reaktion entsteht außerdem Tetrahydrofolsäure, ein Coenzym verschiedener Enzyme des C-1-Transfers, die unter anderem an der Synthese von Purinbasen beteiligt sind. Es kann entweder in der Leber durch das Enzym Betain-Homocystein-Methyltransferase zu Methionin remethyliert werden, oder irreversibel an Serin gebunden und so durch die Cystathionsynthase weiter zu Cystathion umgewandelt werden, aus welchem in der Folge durch die Cystathionase Cystein und α -Ketobutyrat gebildet wird (CHIANG et al., 1996). SAH besitzt sowohl die Fähigkeit zur Hemmung der Betain-Homocystein-Methyltransferase als auch der Aktivierung der Cystathion-Synthase und ist somit maßgeblich an der Entscheidung darüber beteiligt, welchen der beiden Stoffwechselwege das Homocystein einschlagen wird (FINKELSTEIN et al., 1974).

In der autosomal-rezessiven Erbkrankheit Homocysteinurie akkumulieren durch einen Defekt der Cystathion-Synthase große Mengen L-Homocysteinderivate in Blut, Gewebe und Urin. Sie können durch oxidative Verknüpfung der SH-Gruppen zweier Moleküle in das Disulfid Homocystin überführt werden, welches bei Akkumulation eine schwere Endothelschädigung verursacht, die zu Gefäßverschlüssen führen kann. Patienten mit heterozygoter Form der Erkrankung, der sogenannten Hyperhomocysteinämie, weisen eine Prädisposition für früh einsetzende arterielle Verschlusskrankheiten auf (LÖFFLER und PETRIDES, 1998). Erhöhtes Plasmahomocystein führt zu einer erhöhten intrazellulären SAH-Konzentration, die toxische Wirkungen hat und z. B. für die bei

Hyperhomocysteinämie vorkommenden vaskulären Veränderungen verantwortlich gemacht wird (FU et al., 2000). Ein weiterer Faktor in der Pathogenese ist die Potenzierung der durch Adenosin hervorgerufenen Hemmung der Proteinsynthese durch Homocystein (TINTON und BUC-CALDERON, 1995 a). Die Therapie der Erkrankung besteht in einer methioninarmen, cysteinreichen Diät, der Substitution der Vitamine B₆ und B₁₂ zur Stimulation der Remethylierung, ebenso die Zufuhr von Serin und Pyridoxin zur Erhöhung der Transsulfurationsrate (KREDICH und MARTIN, 1977). Ein neuer Ansatz wäre die gesteigerte Exkretion von Homocystein zu induzieren, was z. B. durch Infusion der dibasischen Aminosäuren Lysin und Arginin geschehen könnte (FOREMAN et al., 1982).

Erhöhtes Plasmahomocystein wurde, neben Patienten mit koronarer Herzkrankung (WILCKEN und WILCKEN, 1976), zerebrovaskulärer (MALINOW et al., 1989) und peripherer vaskulärer Verschlusskrankheit (BOERS et al., 1985), auch im Plasma von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (WILCKEN und GUPTA, 1979) gefunden sowie bei Parkinsonpatienten unter Langzeitbehandlung mit Levodopa (MÜLLER et al., 2001).

Dagegen zeigen Kinder, die an Trisomie 21 leiden, erniedrigte Plasmaspiegel von Homocystein, Methionin, SAH und SAM, während Cystathion und Cysteinpiegel aufgrund der Überexpression der Cystathion- β -Synthase bei diesem Defekt erhöht sind. Letztere verursacht eine Änderung im Homocystein-Stoffwechsel mit verminderter Verfügbarkeit von Homocystein und folgendem funktionellen Folsäuremangel, der zur metabolischen Pathologie des Syndroms beiträgt (POGRIBNA et al., 2001).

Die wichtigste Aufgabe der SAH-Hydrolase besteht in der Regulierung der Gewebekonzentration von SAH. SAH- und SAM-Gehalt können, in Abhängigkeit der metabolischen Gegebenheiten, von Gewebe zu Gewebe variieren, (FU et al., 2000).

Neben dem beschriebenen Reaktionsweg durch die SAH-Hydrolase kann SAH auch durch die L-Aminosäureoxidase, die in Leber und Niere vorkommt, mittels oxidativer Deaminierung abgebaut werden und anschließend über den Harn als

S-Adenosyl- χ -Thio-Ketobutytrat ausgeschieden werden (SCHATZ et al., 1977, MILLER und DUERRE, 1969, DUERRE et al., 1969).

Am schnellsten wird SAH in der Leber hydrolysiert, gefolgt von der Niere und dem Gehirn, wobei diesbezüglich nur geringe interspeziesspezifische Unterschiede bestehen (SCHATZ et al., 1977).

SAH moduliert die Endothelzellapoptose, wobei erhöhtes intrazelluläres SAH zu einer exzessiven endothelialen Apoptose führen kann, was sowohl proatherogen, als auch prothrombotisch ist (FU et al., 2000). Intrazelluläre SAH-Spiegel können in Kombination mit einem Mangel an Adenosindeaminase zu einer Hemmung der DNA-Methylierung führen, wobei das abbaugehemmte Adenosin akkumuliert und mit SAH kompetitiv um die Bindungsstelle an der SAH-Hydrolase konkurriert (KREDICH und MARTIN, 1977). Des Weiteren akkumuliert SAH in den Erythrozyten chronischer niereninsuffizienter Patienten, da dieses Kollektiv dauerhaft erhöhte Homocysteinwerte im Plasma aufweist. Die Folge dessen ist eine reduzierte Deformierbarkeit der Membran und eine erhöhte osmotische Fragilität der Erythrozyten (PERNA et al., 1996). SAH hat aber auch sedative und antikonvulsive Eigenschaften, die auf seinen Einfluss auf den Katecholaminstoffwechsel im zentralen Nervensystem zurückzuführen sind (UELAND, 1982).

Im Zusammenhang mit einer systemischen Reaktion auf hypoxische Zustände und der Erythropoetinproduktion ist die Niere als das Hauptorgan anzusehen (RATCLIFFE et al., 1990). Unter ischämischen Bedingungen steigt der Adenosinspiegel im Nierengewebe bereits nach einer Minute stark an (OSSWALD et al., 1977). Es besitzt die Fähigkeit zur Stimulation der Erythropoetinfreisetzung und wird deshalb als ein mögliches second messenger-Molekül der renalen Erythropoetinproduktion betrachtet (PAUL et al., 1988). Ebenso steigt der Gewebegehalt an SAH. Ursache hierfür ist entweder eine durch Akkumulation von Adenosin entstandene Erhöhung der SAH-Synthese oder eine ebenfalls durch Adenosin hervorgerufene Hemmung der SAH-Hydrolase (KLOOR et al., 2002). Hypoxie stimuliert außerdem die Expression von Erythropoetin-mRNA in der Niere um das 200fache (EBERT und BUNN, 1999). Die Akkumulation dieser

mRNA korreliert mit der Stärke der Hypoxie und reguliert so die Erythropoetinproduktion (BONDURANT und KOURY, 1986). Sie ist abhängig von der Verfügbarkeit von Sauerstoff und kann durch Änderungen des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes moduliert werden (PAGEL et al., 1991). Die Regulation der Produktion ist wahrscheinlich Aufgabe der proximalen Tubuli, was im Hinblick auf die Tatsache, dass die aktive Resorption von Natrium die hauptsächliche Determinante des tubulären Sauerstoffverbrauchs ist, sinnvoll erscheint (ECKARDT et al., 1989).

Über die zelluläre Lokalisation der Erythropoetinbildung in der Niere herrscht allerdings in der verfügbaren Literatur Uneinigkeit. Häufig werden die peritubulären interstitiellen Zellen der Nierenrinde als einziger Bildungsort des Hormons angegeben (DA SILVA et al., 1994, ECKARDT et al., 1993, KOURY et al., 1988, KOURY et al., 1991, LACOMBE et al., 1988, SCHUSTER et al., 1987, SCHUSTER et al., 1992). Dabei soll es sich um fibroblasten-ähnliche Typ I-interstitielle Zellen handeln (FISHER et al., 1996, MAXWELL et al., 1993) in denen die Erythropoetin-mRNA intrazellulär zentral und perinukleär gelegen ist (BACHMANN et al., 1993). Andere Autoren wiederum haben die Erythropoetinproduktion ausschließlich in Zellen des proximalen, tubulären Konvoluts (HAIDAR et al., 1997, LOYA et al., 1994, MAXWELL et al., 1990), oder sogar den mesangialen Regionen der Glomerula hypoxischer Nieren (FUKUSHIMA et al., 1990) nachgewiesen.

Unter diabetischen Bedingungen sind Größe und Funktion der Niere, sowie ihr Gewicht erhöht (SEYER-HANSEN, 1976), wobei die erhöhte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) sowie der erhöhte renale Plasmafluss (RPF) am ehesten auf die Zunahme der Nierenmasse zurückzuführen sind (MOGENSEN und ANDERSEN, 1973). Morphologisch findet sich eine glomeruläre Vergrößerung (OSTERBY und GUNDERSEN, 1975) während der ersten vier Tage in Form eines kompensatorischen Wachstums, im Verlauf von weiteren 40 Tagen ein Zuwachs von tubulärer Länge und Durchmesser (SEYER-HANSEN et al., 1980). In diabetischen Organismen wurde eine erhöhte Sekretion von Wachstumshormon gefunden (HANSEN, 1970), welches in der Lage ist das Nieren-

wachstum zu stimulieren. Neben dem Nierengewicht sind Protein- und Glykogengehalt der diabetischen Niere erhöht, wobei die Glykogenakkumulation auf einen beeinträchtigten Glucoseverbrauch in der Nierenrinde hinweist. Ebenfalls erhöht ist die Fettsäureoxidation, was wahrscheinlich der Deckung des durch Wachstum und Funktionserhöhung steigenden Energiebedarfs der hypertrophierten Niere dient (ROSS und GOLDMAN, 1971). Nieren diabetischer Ratten haben eine größere Kapazität, Adenosin zu produzieren und hohe extrazelluläre Adenosinkonzentrationen aufrecht zu erhalten (ANGIELSKI et al., 1989).

Die progressive diabetische Nephropathie ist mit einem Podozytenverlust verbunden (HOSHI, et al., 2002), wobei hier in erster Linie eine Verbreiterung der Fußfortsätze zu beobachten ist (PAGTALUNAN et al., 1997). Eine andere, bei lang anhaltendem Diabetes auftretende Störung liegt in der Organisation des kontraktilen Zytoskeletts mesangialer Zellen, welche auch Ursache für die auftretende Hyperfiltration ist (CORTES et al., 2000).

Das kompensatorische Wachstum der Niere nach unilateraler Nephrektomie besteht in adulten Ratten in erster Linie in einer Zellvergrößerung, nicht, wie in infantilen Tieren beobachtet, in einer Zellvermehrung (CELSI et al., 1986). Es kommt außerdem zu einer geringen Erhöhung des Gesamt-DNA-Gehalts (JOHNSON, 1969), welche aber ihrerseits auch Folge der Zellproliferation ist (RING et al., 1992). Das kompensatorische Nierenwachstum verläuft in rhythmischen Schüben und ist um den 30. postoperativen Tag beendet (KELLER, 1980).

Die tubuläre Hypertrophie, entsprechend einer Verlängerung der Tubuli, entwickelt sich schrittweise und dauert selten mehr als zehn Tage (PFALLER et al., 1998). Das mittlere glomeruläre Volumen erhöht sich 35 Tage nach unilateraler Nephrektomie in der verbleibenden Niere um 70 % (OLIVETTI et al., 1977), der Gesamtproteingehalt innerhalb von 14 Tagen um 37 %. Dieser Zuwachs beruht zum größten Teil auf posttranskriptioneller Regulation der Genexpression (NORMAN, 1991, NORMAN und HARDY, 1994). Die Änderungen in der DNA- und RNA-Synthese beginnen in den ersten 48 Stunden nach dem

Entfernen einer Niere. Der DNA-Gehalt der hypertrophierenden Zellen ist höher als der normaler Zellen und 95 % der Zellkerne dieser Zellen sind tetraploid (IKEDA et al., 1993).

Interessant ist außerdem, dass das Plasma unilateral nephrektomierter Ratten die Phospholipidmethylierung sowie die Freisetzung von Arachidonsäure über eine Aktivierung von Phospholipase A2 stimuliert (BANFIC und GATALICA, 1989).

Als Ausdruck eines gesunkenen Natriumgehalts der extrazellulären Flüssigkeit, verursacht durch Hypovolämie, Druckabfall im Bereich des Vas afferens des Glomerulum oder streng salzarmer Kost steigt die Reninsekretion durch die juxtaglomerulären Zellen (LÖFFLER und PETRIDES, 1998). Unter chronischer Natriumrestriktion erhöht sich der Gehalt an COX-2 in den Zellen der Macula densa um das dreifache (HARRIS et al., 1994). Die physiologische Bedeutung dieses Anstiegs liegt in den Aufgaben der durch COX-2 gebildeten Metabolite in der Regulation der Natrium- und Wasserausscheidung sowie der renalen Hämodynamik (RODRIGUEZ et al., 1999).

Als ein lösliches, ausschließlich im Zytosol lokalisiertes Enzym kommt die SAH-Hydrolase in allen Geweben verschiedener Spezies vor. Das Enzym ist in tierischem Gewebe ubiquitär vorhanden (UELAND, 1982). Das Nierengewebe der Ratte enthält unter physiologischen Bedingungen 1,08 nmol SAH-Hydrolase pro g Feuchtgewicht (STUMVOLL, 1998). Im Rattengewebe ist die Aktivität am höchsten in Leber und Pankreas, gefolgt von Niere und Nebennierenmark, im Anschluss folgen Gehirn und, wenngleich in geringen Mengen vorkommend, Herz, Milz, Testes, Prostata und Muskeln (ELORANTA, 1977, FINKELSTEIN und HARRIS, 1973, UELAND et al., 1979, SCHRADER, 1983). Im Menschen wurde SAH-Hydrolase in Plazenta, Leber, Erythrozyten, Fibroblasten, Lymphoblasten und Leukämiezellen gefunden (HERSHFIELD, 1978, HERSHFIELD et al., 1979, UELAND et al., 1979). In der Leber liegt der Anteil der SAH-Hydrolase am gesamten löslichen Proteingehalt in Ratten bei 0,7 %

(KAJANDAR und RAINA, 1981). Im Gehirn ist sowohl in Gliazellen als auch in Neuronen SAH-Hydrolase-Aktivität nachweisbar. Ein Viertel der gesamten Enzymaktivität ist in den Mitochondrien lokalisiert (BROCH und UELAND, 1980). Ein gewisser Teil wurde auch in der Kernfraktion nachgewiesen, was vor allem unter dem Aspekt einer Rolle von SAH als potenter Inhibitor von DNA-Methylierung in isolierten Rattenleberkernen interessant ist (FINKELSTEIN und HARRIS, 1973, COX et al., 1977). Vor allem transkriptionell aktive Zellkerne enthalten SAH-Hydrolase (RADOMSKI et al., 1999). Der Gehalt an SAH-Hydrolase im Gewebe der Ratte wird durch hormonelle und ernährungsbedingte Faktoren beeinflusst (FINKELSTEIN und HARRIS, 1973).

Das Enzym SAH-Hydrolase kommt, homogen verteilt, in der gesamten Niere vor. Seine Aktivität ist in den Glomerula 1,5-mal so hoch, wie in den Tubuli (KLOOR et al., 2000, STUMVOLL, 1998). Die SAH-Hydrolase der Niere ist in der Bowmanschen Kapsel, der Macula densa, dem Bürstensaum der proximalen Tubuli, den distalen Tubuli sowie den Sammelrohren qualitativ nachweisbar (MAYER, 1994). KLOOR et al., 2000, lokalisierten die SAH-Hydrolase der Niere in den Glomerula, den Epithelien der proximalen und distalen Tubuli und den Sammelrohren in Mark und Rinde. In den Glomerula wiesen sie das Enzym in mesangialen und endothelialen Zellen nach und postulierten, dass die Podozyten ebenfalls bedeutsame Mengen an SAH-Hydrolase enthalten müssten.

1.2 Eigene Fragestellung

Vor diesem Hintergrund und in Anbetracht der bisherigen Kenntnisse über die zelluläre und intrazelluläre Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen geklärt werden:

1. Ist die SAH-Hydrolase in der Niere der Ratte im Mesangium, den Zellen der Macula densa und, wie von KLOOR et al., 2000, postuliert, in den Podozyten lokalisiert?
2. Wie ändert sich die Expression der SAH-Hydrolase unter den Bedingungen des experimentell induzierten Diabetes mellitus, der unilateralen Nephrektomie, der experimentellen Hypoxie und salzarmer, bzw. -reicher Diät in den einzelnen Zellen?
3. Unter welchen pathophysiologischen Bedingungen ist die SAH-Hydrolase auch im Zellkern einer adulten Rattenniere lokalisiert?
4. Verändert sich die SAH-Hydrolase-Expression unter hypoxischen Bedingungen, wenn vermehrt das Peptidhormon Erythropoetin exprimiert wird?

Zu diesem Zweck wurden Nieren von Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus (Diabetes Typ I), verbliebene Nieren nach unilateraler Nephrektomie, Nieren aus Ratten unter experimenteller Hypoxie sowie solche aus salzarmer sowie salzreicher Diät zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht und die Ergebnisse mit denen gesunder Ratten verglichen.

2 Material

2.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich ausschließlich um männliche Sprague-Dawley-Ratten (180g- 200g) der Firma Interfauna. Bevor der Versuch begann, verbrachten sie nach Eintreffen am Pharmakologischen Institut mindestens eine Woche bei Normalfutter und Wasser ad libitum ungestört im Tierstall, um sich an die neue Umgebung zu gewöhnen.

Die Tierversuche wurden gemäß dem Tierversuchsantrag Versuchs-Nr. PH 5/01 vom 08. 02. 2001 durchgeführt.

2.2 Geräte und Chemikalien

2.2.1 Geräte

Bio-Rad	Elektrophoreseapparatur Protean II xi Cell
Boehringer Mannheim	Glucometer, Reflolux S
Branson	Ultraschallgerät Sonifier Cell Disruptor B 15
Braun Melsungen AG	Potter S
Eppendorf	Pipetten Ultrazentrifuge
Dako Diagnostica	Dako-Pen, Fettstift
Heraeus Sepatech	Kühlzentrifuge Biofuge 28 RS
Menzel	Objektträger
Precisa	Waage 40 SM 200 A
Roth	Deckgläser
Sartorius	Waage 1219 MP
Zeiss	konfokales Laser-Scan-Mikroskop LSM 410 Invert/ Axiovert 135 M

2.2.2 Chemikalien

Aldrich	4-Chloro-1-Naphthol
Altromin	Spezialfutter Altromin 1036 Spezialfutter Altromin 1324
Bio-Rad	Coomassie Brilliant Blue G 250 Coomassie Blue R 250 Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE Protein assay / dye-reagent concentrate
Byk Gulden	Thiopental (Trapanal [®])
Calbiochem	Fluorsave Reagent
Dako Diagnostica	Antikörper: goat anti rabbit IgG, Meerrettich- Peroxidase (HRP)-konjugiert Peroxidase-Antiperoxidase (PAP), rabbit
Dianova	Antikörper (s. u.): Texas Red, Cy5
Fluka	Saccharose
Hedinger	H ₂ O ₂
ICN Biochemicals	O-Toluidin
Jackson	Esel-Normalserum (NDS)
LKB	Trägerampholyte pH 3,5- 10,0 Trägerampholyte pH 4,0- 6,0
Merck	Aceton (CH ₃ COCH ₃) Bromphenol-Blau Glycerin (C ₃ H ₈ O ₃) Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) Magnesiumchlorid (MgCl ₂) Methanol (CH ₃ OH) Natriumchlorid (NaCl) Salzsäure rauchend 37 % (HCl) Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween-20)
Mobitec	Kernfarbstoff (Sytox green)
Progen	Antikörper (s. u.): Synaptopodin

Roth	Acrylamid 30 % N-N'-Methylenbisacrylamid 2 % Glycin Kaliumchlorid (KCl)
Santa Cruz	Antikörper (s. u.): WT, HIF, COX2, Epo
Schleicher & Schüll	Nitrocellulose-Membran (0,45 µm)
Seikagaku	Antikörper (s. u.): THY-1
Serva	Trägerampholyte pH 5- 6 N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) Triton
Sigma	Rinderserumalbumin (BSA) Streptozotocin Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)
Töpfer	Magermilchpulver

2.2.3 Antikörper

- gegen SAH-Hydrolase:
polyklonaler Antikörper des Kaninchens gegen SAH-Hydrolase
(D. Kloor)
- gegen glomeruläre Mesangiumzellen:
monoklonaler Antikörper der Maus gegen THY-I-Antigen
(Seikagaku, Tokio/ Japan)
(HUGO et al., 1977)
- gegen Podozyten-Fortsätze:
monoklonaler Antikörper aus Maus gegen Synaptopodin (zytoplasmatisches, Aktin-assoziiertes Protein der Zellfortsätze differenzierter Podozyten)
(Progen, Heidelberg)
(MUNDEL et al., 1997)

- gegen Podozyten-Zellkörper:
monoklonaler Antikörper aus Maus gegen Wilms-Tumor-Protein (WT-1) (podozytenspezifisches, nukleäres Protein)
(Santa Cruz Biotechnology, California)
(PAVENSTÄDT, 2000).
- gegen Macula densa-Zellen:
polyklonaler Antikörper der Ziege gegen Cyclooxygenase-2 (COX-2)
(Santa Cruz Biotechnology, California)
- gegen Erythropoetin:
polyklonaler Antikörper des Kaninchens gegen Erythropoetin (Epo)
(Santa Cruz Biotechnology, California)
- gegen Zellkerne:
Sytox green Nukleinsäurefarbstoff
(Mabtec, Göttingen)

Sekundärantikörper:

- Texas Red Ziege gegen Maus IgG
 - Texas Red Esel gegen Ziege IgG
 - Cy 5 Esel gegen Kaninchen IgG
 - Cy 5 Ziege gegen Kaninchen IgG
- (alle von: Jackson, Baltimore/ USA).

2.3 Lösungen

2.3.1 Immunhistochemie

TBS pH 7,6:

50 mM Tris-HCl pH 7,5

150 mM NaCl

ad 2 Liter Aqua bidest.

mit HCl rauchend auf pH 7,6 titrieren

Antikörperpuffer:

100 mg BSA

250 mg Sucrose

ad 10 ml TBS

50 µl Normalserum / 1 ml Antikörperpuffer

2.3.2 Zellkernextraktion:

Lösung 1:

0,32 M Sucrose

5 mM MgCl₂

ad 500 ml Aqua bidest.

Lösung 2:

2,7 M Sucrose

5 mM MgCl₂

ad 250 ml Aqua bidest.

Lösung 3:

1 M Sucrose

1 mM MgCl₂

ad 250 ml Aqua bidest.

2.3.3 Isoelektrische Fokussierung:

Gel:

2,7 ml Acrylamid 28 %

1,2 ml Bisacrylamid 2 %

9,2 ml Aqua bidest.

Anfolines: 0,5 ml 4- 6 LKB + 0,1 ml 5- 6 SERVA + 0,2 ml 3- 10 LKB

1,95 g Saccharose

1 ml Ammonium-Persulfat (aus einer Lösung von 20 mg auf 4 ml)

0,1 ml TEMED (aus einer Lösung von 30 µl auf 1 ml)

Elektrodenlösungen:

Kathode: 1 M NaOH

Anode: 1 M H₃PO₄

Farbstoff:

Coomassie Brilliant Blue G 250 mit Perchlorsäure nach REISNER et al., 1975:

50 ml Perchlorsäure (etwa 70 %) ad 1 Liter mit Aqua dest. und unter ständigem

Rühren 0,4 g Coomassie G 250 langsam dazu geben.

Nach jedem Gebrauch filtern, da Coomassie bei Kontakt mit Wasser ausfällt.

2.3.4 SDS-Gelelektrophorese:

Trenngel:

schwere Lösung:

5,7 ml 38 % Acrylamid / 2 % Bisacrylamid

2,85 ml Trenngelpuffer

2,8 ml Glycerin 87 %

0,44 ml Aqua bidest

11 µl Ammoniumpersulfat 40 %

7,5 µl TEMED

leichte Lösung:

2,1ml 38 % Acrylamid / 2 % Bisacrylamid

2,85 ml Trenngelpuffer

6,85 ml Aqua bidest

11 µl Ammoniumpersulfat 40 %

7,5 µl TEMED

Sammelgel:

0,4 ml 38 % Acrylamid / 2 % Bisacrylamid
1,2 ml Sammelgelpuffer
2,4 ml Aqua bidest
40 µl 10 % SDS
18 µl Ammoniumpersulfat 10 %
5 µl TEMED

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris
14 mM SDS pH 8,8
mit rauchender HCl auf pH 8,8 einstellen

Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris
mit rauchender HCl auf pH 6,8 einstellen

Probenpuffer:

1,25 ml Sammelgelpuffer
2 ml 10 % SDS
1,75 ml Glycerin 87 %
20 µl 1 mM Bromcresolgrün

Brückenpuffer:

30,285 g Tris
144 g Glycerin
10 g SDS
ad 1000 ml mit Aqua bidest.

Fritz-Essigsäure-Lösung:

250 ml Ethanol vergällt

80 ml Essigsäure 100 %

ad 1000 ml mit Aqua bidest

2.3.5 Western Blot:

PBS pH 7,2:

150 mM NaCl

50 mM KH₂PO₄

20 mM Na₂HPO₄

Tween-PBS:

PBS mit 0,05% Tween-20 (1 l PBS + 500 µl Tween-PBS)

Entwicklerlösung:

200 µl 4-Chloro-1-Naphthol in 2 % Diethylenglycol

1 ml o-Toluidin in 7 % Essigsäure

1 ml 3 % H₂O₂

in 100 ml PBS.

PBS / Albumin:

300 ml PBS

0,5 % Albumin = 1,5 g BSA

3 Methoden

3.1 Experimenteller Diabetes mellitus

Der experimentelle, insulinpflichtige Diabetes mellitus (Insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM) wurde durch intraperitoneale Gabe von 65 mg Streptozotocin pro kg Körpergewicht, gelöst in 0,1 M Natriumcitrat-Puffer (pH 6,2), induziert. Streptozotocin ist in der Lage, B-Zellen des Pankreas selektiv zu zerstören (BENNETT und PEGG, 1981). Drei Tage nach der Injektion erfolgte die Überprüfung des Blutglukosespiegels unter Verwendung von Haemo-Glukotest-Teststreifen und eines Glukometers. Bei einem Blutzuckerwert < 200 mg / dl galten die Tiere als nicht-diabetisiert und wurden demzufolge nicht untersucht. Die Messung des Blutglukosewertes wurde bei allen mit Streptozotocin behandelten Gruppen am Tag der Präparation wiederholt.

Es wurden die Nieren von Tieren nach zweiwöchigem IDDM und vierwöchigem IDDM mit den Tieren nicht-diabetischer Kontrollen verglichen.

3.2 Unilaterale Nephrektomie

Nach Betäubung der Tiere mit 100 mg / kg Körpergewicht Ketamin und 8 mg / kg Körpergewicht Rompun wurde das Abdomen durch einen medianen Längsschnitt eröffnet. Die linke Niere wurde frei präpariert und hervorkluxiert. Nach der Spaltung der Nierenkapsel wurde diese ebenso wie Fettkapsel, Nebenniere und Bindegewebe abpräpariert. Ureter und Gefäße wurden abgeklemmt, ligiert und die Niere abgesetzt. Nach Entnahme des Organs erfolgte ein schichtweiser Wundverschluss.

3.3 Experimentelle Hypoxie

Die Hypoxie wurde in einem speziellen Käfig mit 1 200 ppm CO erzeugt. Unter diesen Bedingungen wurden die Versuchstiere für vier Stunden gehalten.

Die geringe Sauerstoffkonzentration erzeugt bereits nach Ablauf von vier Stunden erheblich Anpassungserscheinungen, wobei dennoch noch nicht mit einer Erhöhung des Organgewichts gerechnet werden kann.

3.4 Diäten

Je zwei Tiere wurden für 7 Tage der folgenden NaCl-armen, beziehungsweise NaCl-reichen Diät unterworfen:

a) NaCl-arm:

Initial wurde Furosemid (Lasix®) 10 mg / kg Körpergewicht gespritzt, um von vornherein eine beträchtliche Menge Salz und Flüssigkeit zu eliminieren. Die Tiere wurden dann für sieben Tage mit einem Spezialfutter, das 0,015 % NaCl enthielt (Altromin 1036) und normalem Leitungswasser ad libitum ernährt.

b) NaCl-reich

Die Tiere wurden für sieben Tage mit einem Spezialfutter, das 4 % NaCl enthielt (Altromin 1324) und normalem Leitungswasser ad libitum ernährt.

3.5 Organentnahme

Die Tiere wurden mit Thiopental (Trapanal®), 90 mg / kg Körpergewicht i. p., betäubt, wobei die Spontanatmung nicht beeinträchtigt wurde. Nach dem vollständigen Eintritt der Wirkung des Narkotikums wurde das Abdomen durch medianen Längsschnitt eröffnet. Die linke Niere wurde als erstes entfernt und mit einer Pinzette sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die Gewebs-

struktur zu erhalten. Die Nieren wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Danach wurde die rechte Niere entfernt und gewogen.

3.6 Immunhistochemische Färbung

Bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden von Frau E. Zabinsky, Toxikologisches Institut der Universität Tübingen, mit einem Mikrotom Kryostatschnitte von etwa $10\text{ }\mu\text{m}$ Dicke angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Diese wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) an der Luft vollständig getrocknet.

Anschließend wurden sie 10 min, ebenfalls bei RT, in Aceton fixiert und erneut bei Raumtemperatur eine Stunde luftgetrocknet. Danach wurde jeder Objektträger dreimal für je 10 min in TBS gewaschen, und es wurde mit einem Fettstift ein lipophiler Ring um jeden Gewebsschnitt auf dem Objektträger gezogen, damit die im weiteren Verlauf aufgetragenen Lösungen nicht verlaufen konnten. Die zu einem unspezifischen Hintergrund führende Anlagerung von Antikörpern wurde durch Präinkubation mit 5% Normalserum (dessen Herkunft entsprechend der des Sekundärantikörpers gewählt wurde) in Antikörperpuffer, für eine weitere Stunde in feuchter Kammer bei RT, reduziert. Der Puffer wurde vom Objektträger abgeklopft und die Schnitte für die immunhistochemische Doppelmarkierung mit einem Gemisch aus dem polyklonalen Antikörper gegen SAH-Hydrolase (1: 50 verdünnt mit Antikörperpuffer) und den monoklonalen Antikörpern gegen die jeweils zu färbenden Struktur (1: 100 verdünnt mit Antikörperpuffer, mit Ausnahme von anti-COX-2 IgG, das nur 1: 50 verdünnt wurde) über Nacht inkubiert.

Am darauf folgenden Morgen wurden die Schnitte erneut dreimal für je 10 min in TBS gewaschen. Die aufgetauten Sekundärantikörper wurden 1: 100 mit Antikörperpuffer vorverdünnt und 10 min bei 10 000 rpm zentrifugiert, um die auftretenden unspezifischen Ablagerungen dieses Antikörpers auf den Schnitten zu reduzieren. Zur anstehenden einstündigen Sekundärinkubation wurden auf jeden Schnitt die entsprechenden Sekundärantikörper (1: 300 verdünnt mit An-

tikörperpuffer) gegeben und bei Raumtemperatur in feuchter Kammer stehen gelassen. Es wurde erneut dreimal für je 10 min in TBS gewaschen.

Im letzten Schritt wurden die Objektträger abgeklopft und jeder Schnitt wurde mit drei Tropfen Floursave[®] eingedeckt, bevor ein Deckglas aufgelegt wurde. Am Ende wurden die gefärbten Schnitte eine weitere Stunde im Kühlschrank bei +8 °C getrocknet.

Die Schnitte konnten so für circa einen Tag ohne merklichen Verlust in der Färbung gelagert werden.

Zur Färbung von Podozyten wurde ein monoklonaler Antikörper der Maus gegen Wilms-Tumor-Protein (WT-1), einem podozytenspezifischen, nukleären Protein differenzierter und undifferenzierter Zellen (PAVENSTÄDT, 2000), verwendet, welcher die Zellkörper der Podozyten perinukleär anfärbt. Für die Podozyten-Fortsätze wurde ein monoklonaler Antikörper der Maus gegen Synaptopodin, einem zytoplasmatischen Aktin-assoziierten Protein der Zellfortsätze differenzierter Podozyten (MUNDEL et al., 1997), eingesetzt. Zur Anfärbung von glomerulären Mesangiumzellen wurde ein monoklonaler Antikörper der Maus gegen THY-1-Antigen (HUGO et al., 1977) und zur Markierung der Macula densa-Zellen ein monoklonaler Antikörper der Ziege gegen das in der Niere konstitutionell vorhandene Enzym Cyclooxygenase-2 verwendet, welches dort vorwiegend in den Zellen der Macula densa exprimiert wird (HARRIS et al., 1994).

Für die Lokalisation von Erythropoetin wurde ein Antikörper der Ziege gegen Erythropoetin eingesetzt, zur Detektion der SAH-Hydrolase ein Antiserum des Kaninchens und zur Anfärbung der Zellkerne der Nukleinsäurefarbstoff Sytox-green.

Zur Immunfluoreszenzmarkierung der SAH-Hydrolase wurden Indocarbocyanin (Cy5)-konjugierte Antikörper gegen Kaninchen-IgG, für die anderen zu färbenden Strukturen wurde Texas Red-konjugierte Antikörper gegen Maus bzw. Ziege verwendet. Der Kernfarbstoff Sytox green wurde in der Färbung behandelt wie ein Sekundärantikörper, im Gegensatz zu diesen aber 1: 100 000 in TBS verdünnt.

Zur Sicherung der Spezifität der Antikörper wurden Negativkontrollen durchgeführt. Die Schnitte wurden ebenfalls nach dem oben erläuterten Schema behandelt, der Primärantikörper wurde allerdings weggelassen. Somit kann der Sekundärantikörper nicht mehr am Gewebe binden, und es findet keine Anfärbung statt.

3.7 Mikroskopie und Fotografie

Die gefärbten Präparate wurden mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop (LSM) mit einem 40 x 1,2 W Wasser-Immersionsobjektiv angeschaut und ausgewertet. Die Auswertung der Schnitte am LSM erfolgte im Anatomischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Dr. A. Mack.

3.8 Präparation von Zellkernen

Rattennieren wurden mit 0,9 % iger Kochsalzlösung (0,9 g NaCl ad 100 ml Aqua bidest.) gewaschen und zerkleinert. Das Nierengewebe wurde mit zwei Volumina Lösung 1 unter Eiskühlung in einem Potter (Spaltbreite: 0,010 mm-0,016 mm) bei 1 200 rpm homogenisiert. Nach Filtrieren des Homogenates durch ein Stahlsieb mit 0,2 mm Maschenweite wurde das Filtrat 15 min bei 800 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment, in dem in diesem Fall die Kerne enthalten waren, mit Lösung 2 aufgenommen. Die entstandene Suspension wurde 90 min bei 19 000 rpm und 4 °C in Eppendorf-Reaktionsgefäßen zentrifugiert. Das Kernsediment wurde mit Lösung 3 suspendiert und erneut 15 min bei 1 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Das nun gereinigt vorliegende Kernsediment konnte in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -80 °C gelagert werden.

3.9 SDS-PAGE

Die Auftrennung der im Zellkern enthaltenen Proteine erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI, 1970. Dies ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach deren Molekulargewicht in einem Trennsystem mit diskontinuierlichem pH-Verlauf. Man macht sich hier, neben dem Siebeffekt des Gels, aufgrund der Molekülbeziehungsweise Porengröße des zu durchwandernden Gels, die Gesamtladung der Proteine zunutze. Die Proteine werden durch das ionisch denaturierende Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zu Polypeptidketten denaturiert und bilden mit ihm Komplexe. Durch die Einführung von stark negativen Ladungen (Polyanionen) wird die Eigenladung der Proteine überdeckt, wobei die Zahl der negativen Ladungen proportional zur Masse des Proteins ist (COOPER, 1981).

Nach Anlegen einer Gleichspannung wandern die gebildeten Komplexe im elektrischen Feld durch die Gelmatrix zur Anode, wobei die Geschwindigkeit der Polypeptide nur von deren Beweglichkeit im Gel und somit von deren Molekulargewicht abhängt.

Für die Herstellung des Polyacrylamidgradientengels wurde ein aus einer schweren und einer leichten Lösung bestehendes Trenngel hergestellt. Nach der Polymerisationszeit von einer Stunde bei RT wurde darauf das Sammelgel gegeben, das Ganze in die mit 1,5 l Brückenpuffer befüllte Elektrophoreseapparatur gestellt. In die Taschen des Sammelgels wurden 50 µl der zu untersuchenden Probe, bestehend aus je 30 µl Probe, die in 20 µl Probenpuffer aufgenommen wurde, gegeben. Die Geräteeinstellungen wurden wie folgt vorgenommen: 180 V, 15 mA und 10 W. Der Lauf erfolgte über Nacht.

Nach Beendigung des Laufes wurde eines der Gele für den Western Blot weiter verwendet, das andere in 10 % Trichloressigsäure (TCA) für 30 min fixiert. Nach dreimal zehnmütigem Waschen in Fritz-Essigsäure-Lösung 0,1 % wurde das Gel mit Coomassie Blue R 250 angefärbt und anschließend mit 25 % Ethanol und

8 % Essigsäure entfärbt. In dieser Lösung konnte es auch einige Zeit aufbewahrt werden. Mit dem ersten, geblotteten Gel wurde nach Beendigung des Blots entsprechend verfahren.

Die Taschen des Gels wurden mit Proteinen der zuvor aufgearbeiteten Zellkerne hypoxischer Nieren und Lebern, Nieren sieben und 14 Tage nach unilateraler Nephrektomie sowie Kontrollnieren beimpft. In eine weitere Tasche wurde weiterhin gereinigte SAH-Hydrolase in einer Verdünnung von 1: 100 gegeben, um die SAH-Hydrolase am Ende als Bande identifizieren zu können.

3.10 Western Blot

Durch die nach TOWBIN et al., 1979, entwickelte Methode wurden die in den SDS-Polyacrylamidgelen nach ihrem Molekulargewicht fraktionierten Proteine elektrisch auf eine Nitrocellulose (NC)-Membran transferiert.

Geblottet wurde bei 4° C und Gleichspannung (400 mA) in 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 10 % Methanol und bei pH 8,2 und dauerte 2 Stunden. Die Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,45 µm) wurde für mindestens drei Stunden mit 5 % Magermilchpulver in PBS geblockt, was durch eine Bindung des Milchpulvers an die NC-Membran geschieht, die verhindern soll, dass der gesamte eingesetzte Antikörper an der NC-Membran hängen bleibt. Es wird dreimal 15 Minuten in Tween-PBS (T-PBS) gewaschen, da Tween-20 ebenfalls die Nitrocellulose blockiert sowie alle überschüssigen Proteine binden kann, was die Spezifität des Antikörpers erhöht. Anschließend wurde über Nacht bei RT mit dem Primärantikörper (1: 500 in PBS/ Albumin) inkubiert.

Die Blots wurden am nächsten Tag dreimal 15 Minuten in T-PBS gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen, und eine Stunde mit dem Sekundärantikörper (Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG, 1: 1 500 in PBS/ Albumin verdünnt) bei RT inkubiert. Nach dem wiederum dreimaligen Waschen in T-PBS wurde die Folie mit PAP (1: 750 in PBS/ Albumin), welches an die Peroxidase bindet und so zu einer Signalverstärkung des Sekundärantikör-

pers führt, eine weitere Stunde bei RT inkubiert und wiederum dreimal 15 Minuten in TPBS gewaschen.

Zuletzt wurden die immunreaktiven Banden mittels o-Toluidin-abhängiger Peroxidase-Reaktion visualisiert.

3.11 Isoelektrische Fokussierung

Die Isoelektrische Fokussierung (IEF) stellt ein rasches und hochauflösendes Trennverfahren für Proteingemische in einem pH-Gradienten dar.

Aufgrund des amphoteren Charakters von Proteinen verlieren diese innerhalb jenes pH-Gradienten die elektrophoretische Beweglichkeit an der Stelle, an der die Nettoladung des Proteins gleich Null ist (SVENSSON, 1962). Der pH-Wert des Fokussierungspunkts entspricht somit dem isoelektrischen Punkt des Proteins.

Stabile pH-Gradienten lassen sich durch niedermolekulare, synthetische Träger-Ampholyte, die einen bestimmten pH-Bereich abdecken, aufbauen, die in der Trägermatrix suspendiert werden. Entsprechend ihrer Zusammensetzung lässt sich der lineare pH-Bereich über die Trennstrecke hinweg anordnen. Das Anlegen einer elektrischen Gleichspannung führt dazu, dass die Proteine zum Erreichen des spezifischen isoelektrischen Punktes von der Anode weg in Richtung Kathode wandern.

Für die Herstellung des Polyacrylamidgels wurden Acrylamid und N-N'-Methylenbisacrylamid verwendet. Die Gelkonzentration betrug 5 %, die Quervernetzung 3 %. Zusätzlich enthielt das Gel Saccharose 13 % (w / v) und 800 µl Trägerampholyte in folgender Zusammensetzung: 600 µl pH 5- 8 und 200 µl pH 3,5- 10. Nach dem Entlüften wurden dem Gel TEMED bis zur Endkonzentration von 0,02 % und Ammoniumsulfat bis zur Endkonzentration von 0,03 % zugesetzt.

Das Gel polymerisierte bei Raumtemperatur innerhalb von 12 h.

Die Auftrennungsbedingungen lagen bei 5 W, 1500 V, 10 mA und +10 °C (Wasserkühlung). Die Elektrodenstreifen, die den Kontakt zwischen Gel und

Elektrodendraht herstellen, wurden in einer Lösung, die 1 M H_3PO_4 als Anolyt und 1 M NaOH als Katholyt enthielt, getränkt. Die Vorfokussierung des Gels dauerte 45 min an. Anschließend wurden je 15 μl der Rohextrakte mit Hilfe eines Applikationsstreifens in einer Entfernung von 2 cm zur Anode aufgetragen. Der Lauf wurde nach 3 000 V / h beendet.

Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel 90 min in Coomassie Brilliant Blue G 250 gelassen wobei man sich hierbei die Tatsache zu Nutze macht, dass die

G 250-Form des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue in verdünnter Perchlorsäure eine Farbänderung vollzieht, die allerdings bei Bindung von Protein an den Farbstoff invertiert wird (REISNER et al., 1975). Anschließend wurde das Gel in 5 % Essigsäure 15 min entfärbt, was die Sensitivität der Färbung auf das dreifache erhöht (HOLBROOK und LEAVER, 1976). Zur Konservierung wurde es in eine 5 % Glycerinlösung gegeben und anschließend getrocknet.

Die isoelektrische Fokussierung der Kernproteine erfolgte im gleichen Gel, zusammen mit isolierter SAH-Hydrolase. Es wurden die Proteine der aufbereiteten Zellkerne hypoxischer Nieren, Nieren sieben und 14 Tage nach unilateraler Nephrektomie, Kontrollnieren sowie hypoxischer Lebern aufgetragen. Als Kontrolle wurde außerdem gereinigte SAH-Hydrolase in einer Verdünnung von 1: 100 auf ein Plättchen geimpft.

3.12 Proteinbestimmung nach BRADFORD

Um die in Gel und Blot enthaltenen Proteinmengen abschätzen zu können wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt.

Diese quantitative Proteinbestimmungsmethode nach BRADFORD, 1976, beruht auf einer Bindung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue G 250. Die Bindung des Proteins an den Farbstoff verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm, die gemessen werden kann. Die Ursache hierfür liegt darin, dass Coomassie Brilliant Blue G 250 in den zwei Farben rot und blau vorkommt, wobei die rote nach Bindung an Protein in die

blaue übergeht (REISNER et al., 1975). Der hohe Extinktionskoeffizient des Protein-Farbstoff-Komplexes führt zu einer hohen Sensitivität in der Proteinmessung.

Gemessen wird die Probe gegen einen Serumalbumin-Standard (5,0 mg Rinder-Serumalbumin pro 0,1 % SDS in Aqua dest.) im Bereich von 10 bis 125 μg . Die Probe kann somit zwischen 10 und 100 μg Protein enthalten. Das Absorptionsmaximum liegt zwischen 580 und 600 nm.

Es wurden 100 μl verdünnte Proteinlösung im Verhältnis 1: 10 mit Farblösung aus Coomassie Brilliant Blue G 250 gemischt. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde im Photometer gemessen und so der Proteingehalt der aufzutragenden Proben ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Nierengewicht

Das Nierengewicht der entnommenen Nieren der Kontrollratten lag im Durchschnitt bei etwa 4,1 g / kg Körpergewicht.

Das Gewicht der Nieren nach unilateraler Nephrektomie stieg mit zunehmender Dauer an. So wogen die verbliebenen Nieren bereits sieben Tage nach kontralateraler Nephrektomie im Durchschnitt 5,29 g / kg Körpergewicht. Nach 14 Tagen unilateraler Nephrektomie betrug das Nierengewicht im Mittel 6,31 g / kg Körpergewicht bei gleichzeitig ansteigendem Gesamtkörpergewicht.

Ebenfalls ansteigend war das mittlere Nierengewicht nach experimenteller Induktion eines insulinpflichtigen Diabetes mellitus. Nach zwei Wochen stieg das mittlere Nierengewicht auf 5,86 g / kg Körpergewicht und blieb dann auch vier Wochen nach Induktion nahezu konstant (5,68 g / kg Körpergewicht).

Das Gewicht der Nieren von Ratten nach salzarmer Diät sowie nach Hypoxie wurde nicht ermittelt.

4.2 Lokalisation der SAH-Hydrolase mittels Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbemethode ist eine weit verbreitete Technik, bei der Immunglobuline eine zentrale Rolle in der Detektion und Lokalisation von Proteinen in einem Gewebe spielen.

Bei der hier angewandten Technik bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das korrespondierende Antigen. Dieser Primärantikörper wird nun wiederum selbst an seinem F_c-Fragment von einem sekundären Antikörper erkannt, der einen fluoreszierenden Farbstoff gebunden hat. Der Farbstoff Cy 5 fluoresziert bei Anregung durch einen Laser einer Wellenlänge von 633 nm, der Farbstoff Texas Red bei einer Wellenlänge von 543 nm und der Kernfarbstoff Sytox

green bei einer Wellenlänge von 488 nm und kann so im konfokalen Laser-Scan-Mikroskop für den Betrachter sichtbar gemacht werden.

Sensitivität und Spezifität des Sekundärantikörpers wurden durch Anfertigung von Negativkontrollen geprüft. Hierbei wurde der Primärantikörper weggelassen. So kann die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an das Nierengewebe in Form einer Fluoreszenzmarkierung unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden.

Die fehlende Immunreaktion in den Negativkontrollen der vorliegenden immunhistochemischen Färbungen beweist somit Sensitivität und Spezifität des verwendeten primären Antikörpers.

4.3 Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der normalen Niere der gesunden, adulten Ratte

4.3.1 Verteilung der SAH-Hydrolase

Die immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in Nieren von Kontrolltieren zeigte, dass das Enzym im Glomerulum und in den Tubuli von Nierenrinde und -mark vorkommt (Abb. 2 a- c). Die SAH-Hydrolase wird im Glomerulum in bestimmten Zellen exprimiert, die im konfokalen Lasermikroskop allerdings ohne zusätzliche Färbung nicht näher bestimmt werden können.

Morphologisch ähneln diese Zellen Podozyten.

Sowohl in der Nierenrinde, als auch im Nierenmark zeigte sich keinerlei Expression der SAH-Hydrolase in den Zellwänden der Tubuli und Sammelrohre.

Die Doppelfärbung des Nierenschnittes der Kontrollniere mit Antikörper gegen SAH-Hydrolase und dem Zellkernfarbstoff Sytox zeigte, dass in den Glomerula die SAH-Hydrolase in zellulären Strukturen, die einem Zellkörper entsprechen exprimiert ist. Hier steht sie in enger Beziehung zu den angefärbten Zellkernen, ohne aber in denselben vorzukommen.

In den Zellkernen von proximalen und distalen Tubuli der Nierenrinde war keine Expression von SAH-Hydrolase nachzuweisen. Das Enzym ist eher perinukleär, den Kern aussparend im tubulären Zytoplasma gelegen. Am deutlichsten zu erkennen ist dieser Sachverhalt in den proximalen Tubuli (Abb. 3 a und b) und Sammelrohren. Weniger deutlich ausgeprägt, aber dennoch erkennbar, war dieses Verteilungsmuster in den distalen Tubuli.

Im Nierenmark sind, entsprechend der Nierenrinde, die durch Sytox angefärbten Zellkerne frei von SAH-Hydrolase, diese liegt perinukleär verteilt im Zytoplasma.

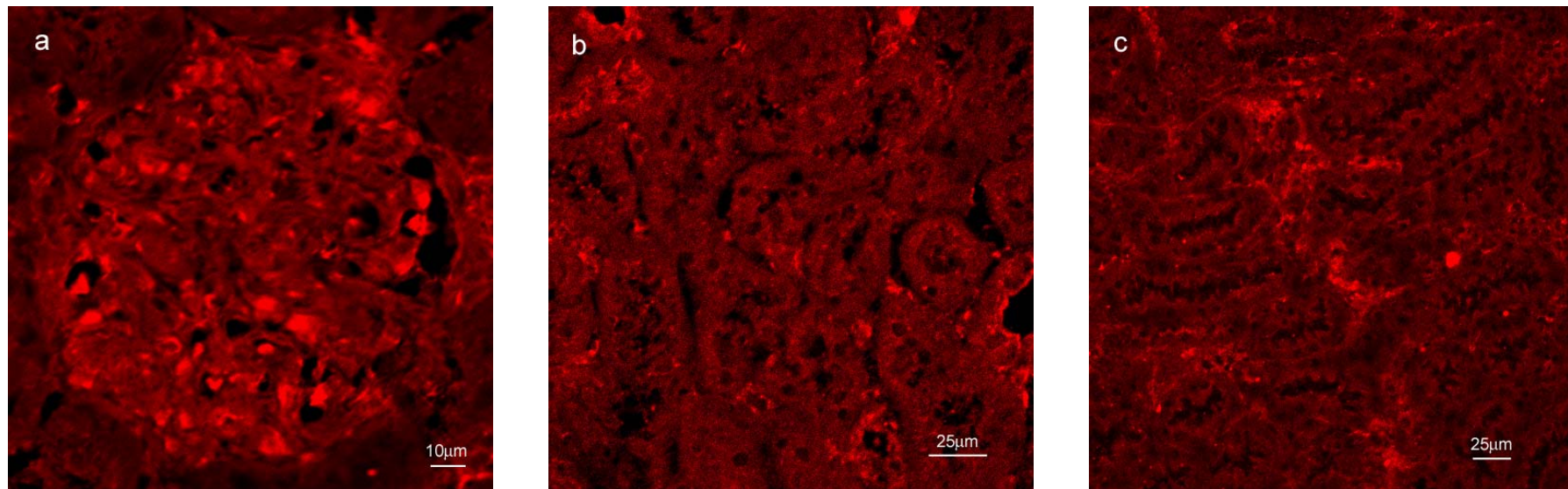


Abb. 2 Darstellung der SAH-Hydrolase in der Kontroll-Rattenniere durch Immunfluoreszenz.

Nachweis der SAH-Hydrolase mit polyklonalem Antikörper gegen SAH-Hydrolase und Cy 5-konjugiertem Sekundärantikörper (rot).

a: Glomerulum (1: 1 500)

b: proximale Tubuli der Nierenrinde (1: 900)

c: Nierenmark (1: 600)

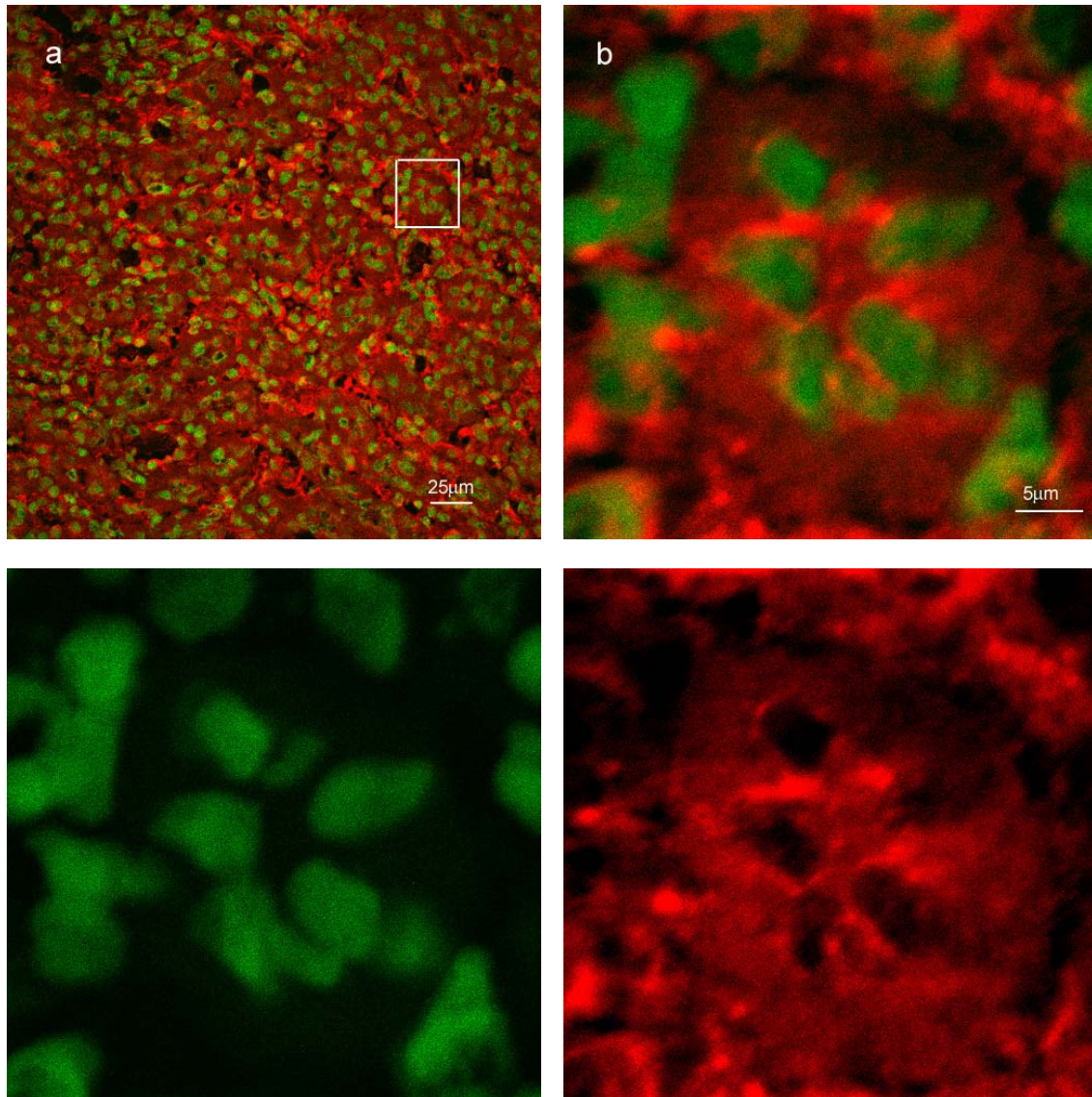


Abb. 3 Darstellung von SAH-Hydrolase und Zellkernen in den proximalen Tubuli der Nierenrinde von Kontroll-Rattenniere durch Immunfluoreszenz.
Vergrößerungen:
a: 1: 600
b: 1: 4 800
Nachweis der SAH-Hydrolase mit polyklonalem Antikörper gegen SAH-Hydrolase, Cy 5-kon-jugiertem Sekundärantikörper (rot) und Sytox green (grün).

4.3.2 Nachweis der SAH-Hydrolase in den Podozyten

Um den Zelltyp zu bestimmen, in dem die SAH-Hydrolase im Glomerulum vermehrt exprimiert ist, wurde der Nierenschnitt der Kontrollniere sowohl mit einem Antikörper gegen SAH-Hydrolase als auch mit einem spezifischen Antikörper gegen das Podozytenantigen WT-1 angefärbt.

Wie aus Abb. 4 hervorgeht ist die SAH-Hydrolase eindeutig in den Podozyten der Kontrollnieren exprimiert.

Sie befindet sich im Zellkörper der Podozyten, ist dort aber nicht streng perinukleär lokalisiert, sondern etwas weiter peripher (Abb. 4 a). In den Zellfortsätzen der Podozyten, nachgewiesen durch Synaptopodin, ist die SAH-Hydrolase nur mäßig exprimiert (Abb. 4 b). Sie kommt hier jedoch zum größeren Teil nur an den Abgängen der Fortsätze vom Zellkörper und nicht in deren weiteren Verlauf vor.

4.3.3 Nachweis der SAH-Hydrolase im Mesangium

Mesangiumzellen konnten mit dem spezifischen Antikörper gegen das Mesangiumzellantigen THY-1 bestimmt werden. Die Doppelmarkierung des Nierenschnittes der Kontrollniere mit anti-SAH-Hydrolase und anti-THY-1 lässt im

Mesangium eine mäßige, aber deutlich erkennbare Expression von SAH-Hydrolase erkennen (Abb. 5).

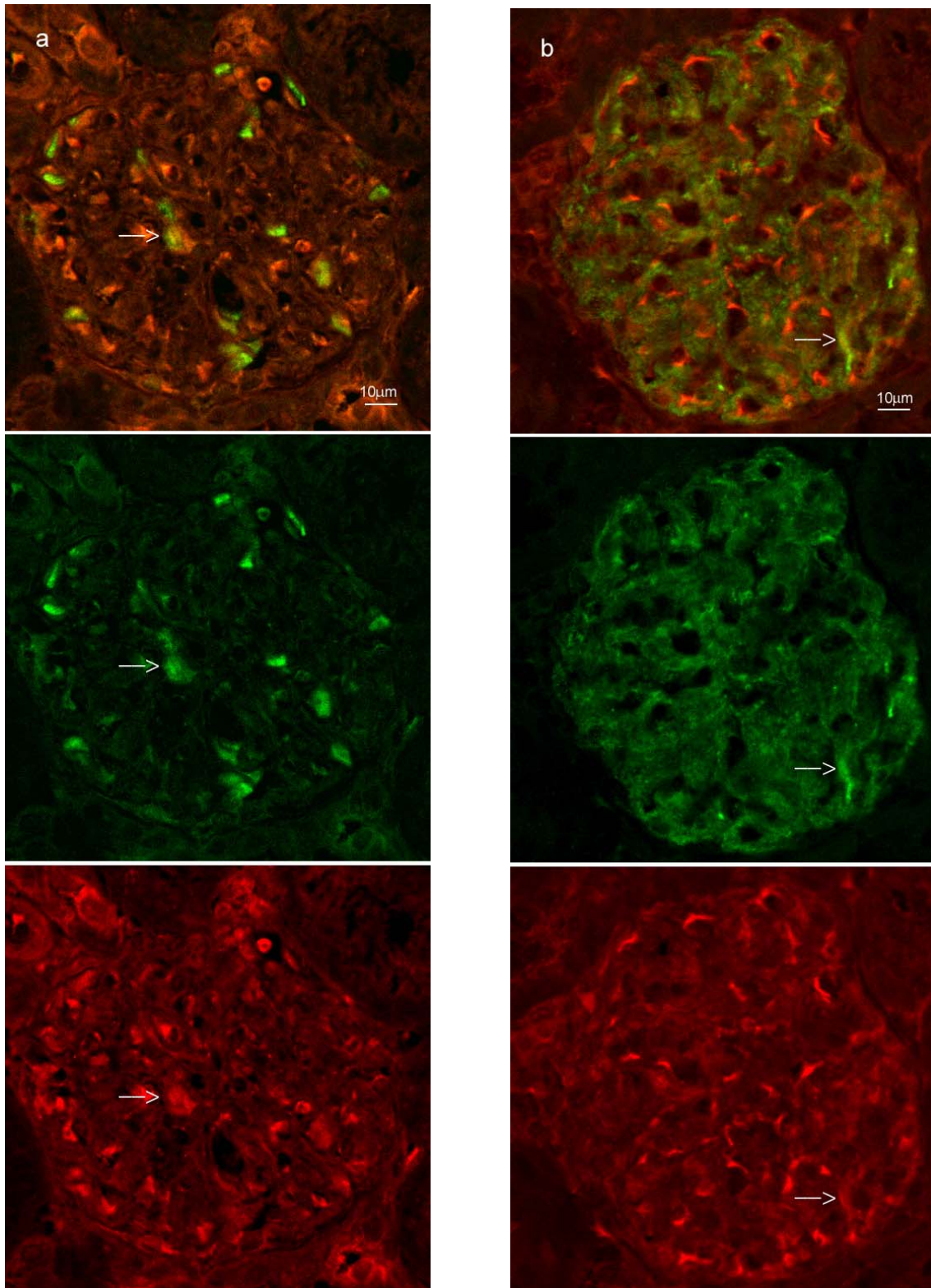


Abb. 4 Darstellung von SAH-Hydrolase in glomerulären Strukturen der Kontroll-Rattenniere durch Immunfluoreszenz. Vergrößerung: 1: 1 500
Nachweis der SAH-Hydrolase mit polyklonalem Antikörper gegen SAH-Hydrolase und Cy 5-konjugiertem Sekundärantikörper (rot).
a: Podozytenzellkörperfärbung WT-1 und Texas Red-konjugiertem Antikörper (grün)
b: Podozytenfortsätze mit Synaptopodin und Texas Red-konjugiertem Antikörper (grün)

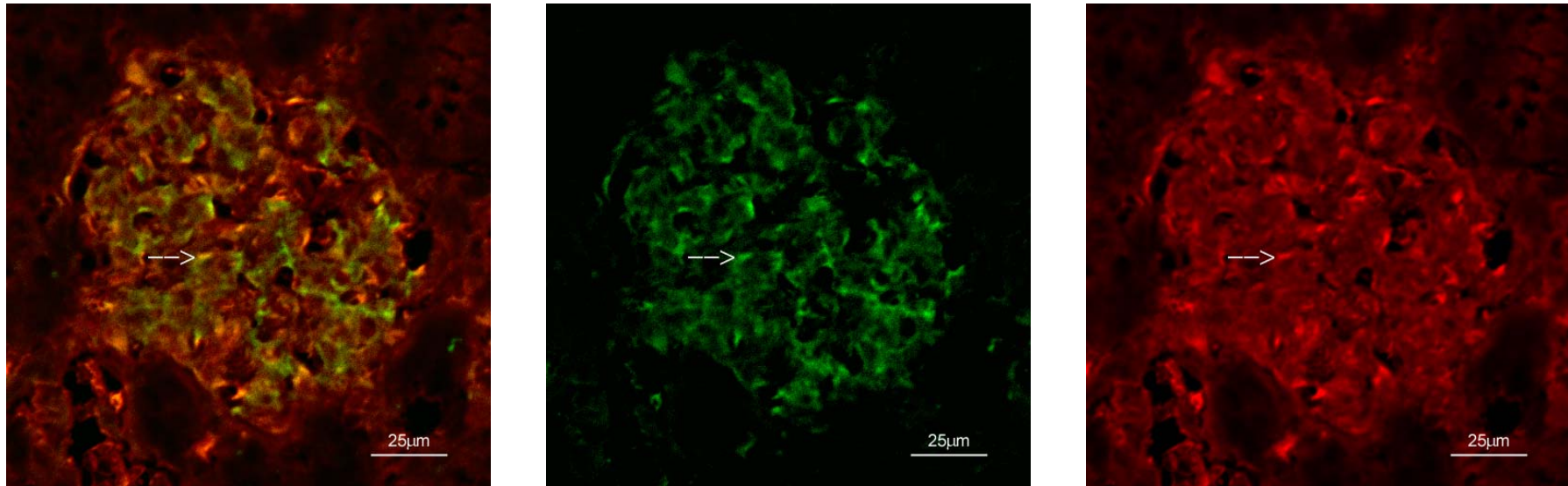


Abb. 5 Darstellung der SAH-Hydrolase in glomerulären Strukturen der Kontroll-Rattenniere durch Immunfluoreszenz.

Vergrößerung: 1: 1 500

Nachweis der SAH-Hydrolase mit polyklonalem Antikörper gegen SAH-Hydrolase und Cy 5- konjugiertem Sekundärantikörper (rot) und Mesangiumfärbung mit THY-1 und Texas Red- konjugiertem Sekundärantikörper (grün).

4.4 Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der Ratte mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus

4.4.1 Verteilung der SAH-Hydrolase

Untersucht wurde die Verteilung der SAH-Hydrolase in Nieren nach zwei und vier Wochen IDDM.

Zwei Wochen nach Diabetesbeginn entsprach die Lokalisation der SAH-Hydrolase in diesen Nieren derjenigen der Kontrollniere. Die SAH-Hydrolase ließ sich im Glomerulum in Podozyten (Abb. 6 a) und Mesangium, sowie interstitiell zwischen den Tubuli nachweisen. Einzige Ausnahme stellt ein deutlich vermehrtes Vorkommen von SAH-Hydrolase in bestimmten Bezirken der Tubulusschwänze des Nierenmarks dar, die Zellkernen entsprechen (Abb. 6 b).

Die vorgenommene Doppelfärbung der Nieren zwei Wochen nach Induktion des IDDM mit einem Antikörper gegen SAH-Hydrolase und dem Zellkernfarbstoff Sytox zeigt assoziiert mit Zellkernen der tubulären Zellen des Nierenmarks dieser Nieren eine deutlich vermehrte Expression von SAH-Hydrolase (Abb. 7 a). Dagegen ist das Enzym jedoch, entsprechend der Lokalisation in den Kontrollnieren, nicht in den Zellkernen der proximalen und distalen Tubuli der Nierenrinne nachweisbar. Die interstitiellen Zellen zeigen an manchen Stellen in Rinde und Mark sogar regelrechte Aussparungen der Zellkerne in der SAH-Hydrolase-Färbung, was einem perinukleären Verteilungsmuster entspricht.

Durch die morphologische Veränderung der Niere nach vier Wochen IDDM erscheint die Verteilung der SAH-Hydrolase weniger homogen. Die Glomerula weisen Hohlräume auf, die auf einen dort stattgehabten Zellverlust hindeuten und sind daher in ihrer Struktur aufgelockerter (Abb. 6 c).

Die Lokalisation der SAH-Hydrolase ist wiederum intrazellulär in Tubuli und Glomerula vermehrt, jedoch eher perinukleär ausgeprägt (Abb. 6 d).

Hier zeigt die Doppelfärbung der tubulären Strukturen der Niere vier Wochen nach Induktion des IDDM mit einem Antikörper gegen SAH-Hydrolase und dem Zellkernfarbstoff Sytox, dass die durch Sytox-Färbung als Zellkerne identifizierten Stellen von der Enzymmarkierung ausgespart werden und weist somit, entsprechend der Kontrollniere, wiederum auf ein perinukleäres Verteilungsmuster der Hydrolase (Abb. 7 b).

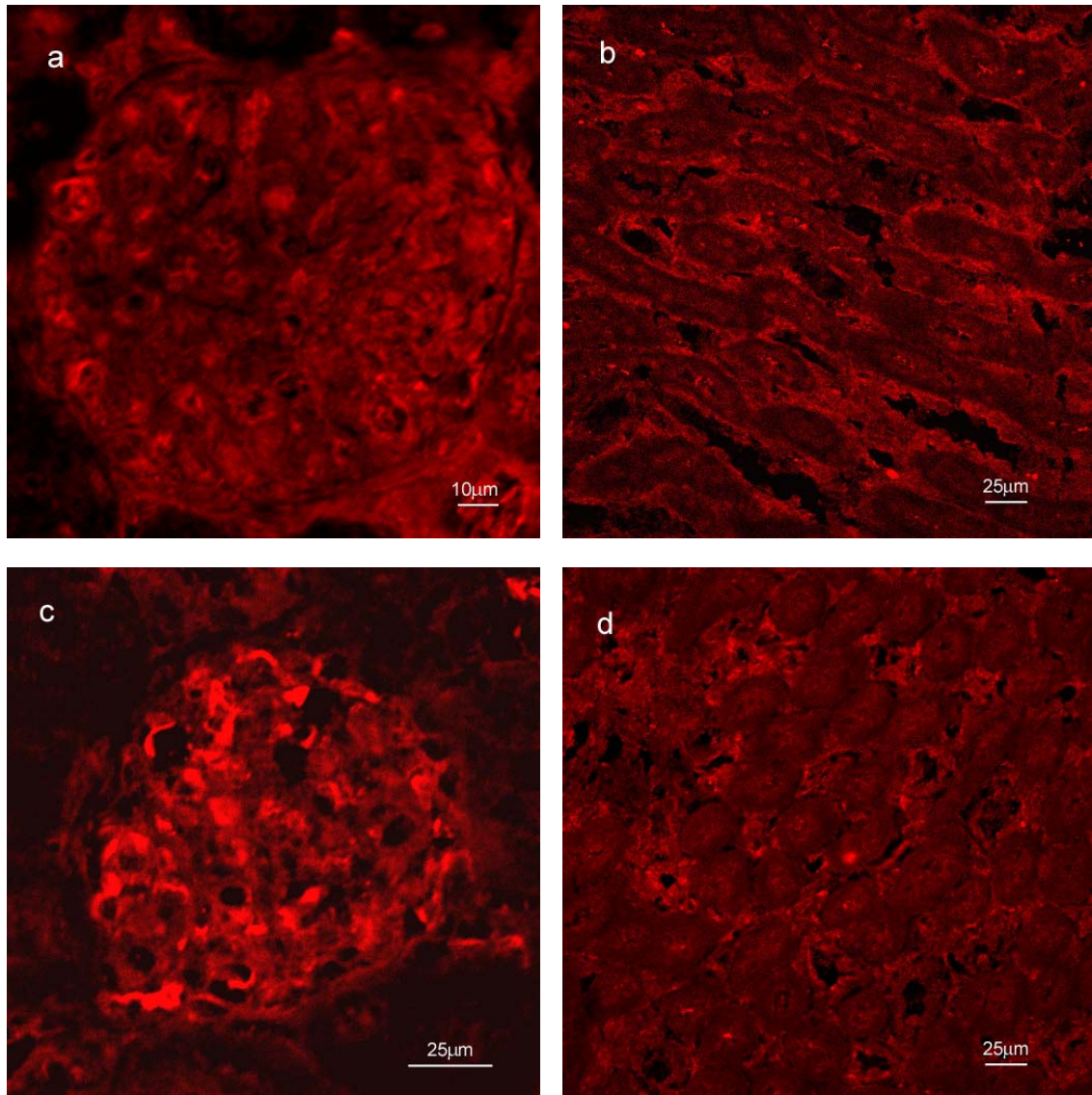


Abb. 6 Darstellung der SAH-Hydrolase in Glomerulum und Nierenmark verschiedener Nieren durch Immunfluoreszenz.

Nachweis der SAH-Hydrolase mit polyklonalem Antikörper gegen SAH-Hydrolase und Cy 5-konjugiertem Sekundärantikörper (rot).

a: Glomerulum der zweiwöchig diabetischen Niere (1: 1 500)

b: Schnitt durch das Nierenmark der zweiwöchig diabetischen Niere (1: 600)

c: Glomerulum der vierwöchig diabetischen Niere (1: 1 200)

d: Schnitt durch das Nierenmark der vierwöchig diabetischen Niere (1: 600)

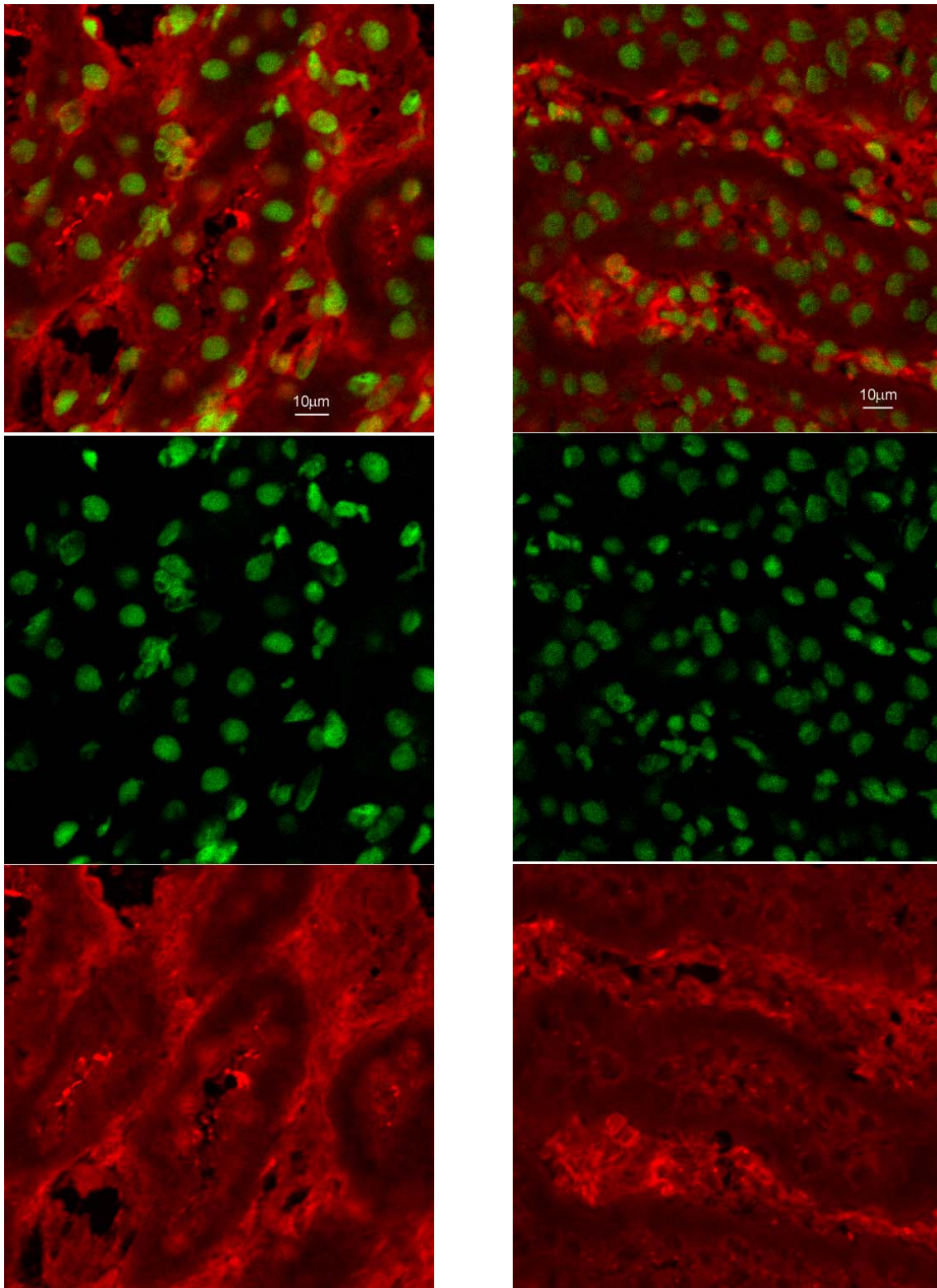


Abb.7 Darstellung von SAH-Hydrolase und Zellkernen des Nierenmarks diabetischer Nieren durch Immunfluoreszenz. Vergrößerung: 1: 1 500
Nachweis der SAH-Hydrolase mit polyklonalem Antikörper und Cy 5- konjugiertem Sekundärantikörper (rot). Zellkernfärbung mit Sytox green (grün).
a: zweiwöchig diabetische Niere
b: vierwöchig diabetische Niere

4.4.2 Nachweis der SAH-Hydrolase in den Podozyten

Sowohl nach zwei, als auch nach vier Wochen IDDM entspricht die Expression der SAH-Hydrolase in den Podozyten derjenigen der Kontrollniere, wobei das Enzym vor allem in den Zellkörpern vorkommt. In diesen Zellen ist es, entsprechend der Kontrollnieren, nicht in den von WT-1 gefärbten, perinukleär gelegenen Bezirken lokalisiert, sondern in den Fortsätzen der Podozyten. Auch hier, analog der Kontrolle, eher an deren Abgängen aus dem Zellkörper.

Nach vier Wochen IDDM scheint die Anzahl der Podozyten im Glomerulum abgenommen zu haben, wobei durch die immunhistochemische Färbung allein hierüber keinerlei quantitative Aussage gemacht werden kann.

4.4.3 Nachweis der SAH-Hydrolase im Mesangium

Die Expression der SAH-Hydrolase in den mesangialen Zellen entspricht sowohl nach zwei, als auch nach vier Wochen experimentellem Diabetes mellitus der in der Kontrollniere

4.5 Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der Ratte nach unilateraler Nephrektomie

4.5.2 Verteilung der SAH-Hydrolase

Die Lokalisation der SAH-Hydrolase in der verbliebenen Niere 7, beziehungsweise 14 Tage nach unilateraler Nephrektomie entsprach der der Kontrollniere. Die SAH-Hydrolase ließ sich im Glomerulum in Podozyten und Mesangium, sowie interstitiell zwischen den Tubuli nachweisen.

Am 7. Tag nach unilateraler Nephrektomie ließ sich die SAH-Hydrolase auch in den Zellkernen proximaler Tubuli nachweisen (Abb. 8 a und b), wenngleich nicht besonders deutlich ausgeprägt, was auf eine geringe Menge an SAH-Hydrolase im Kern zurückzuführen ist. Auch die Anzahl der SAH-Hydrolase-enthaltenden Zellkerne in den proximalen Tubuli war gering und ihr Vorkommen unregelmäßig verteilt.

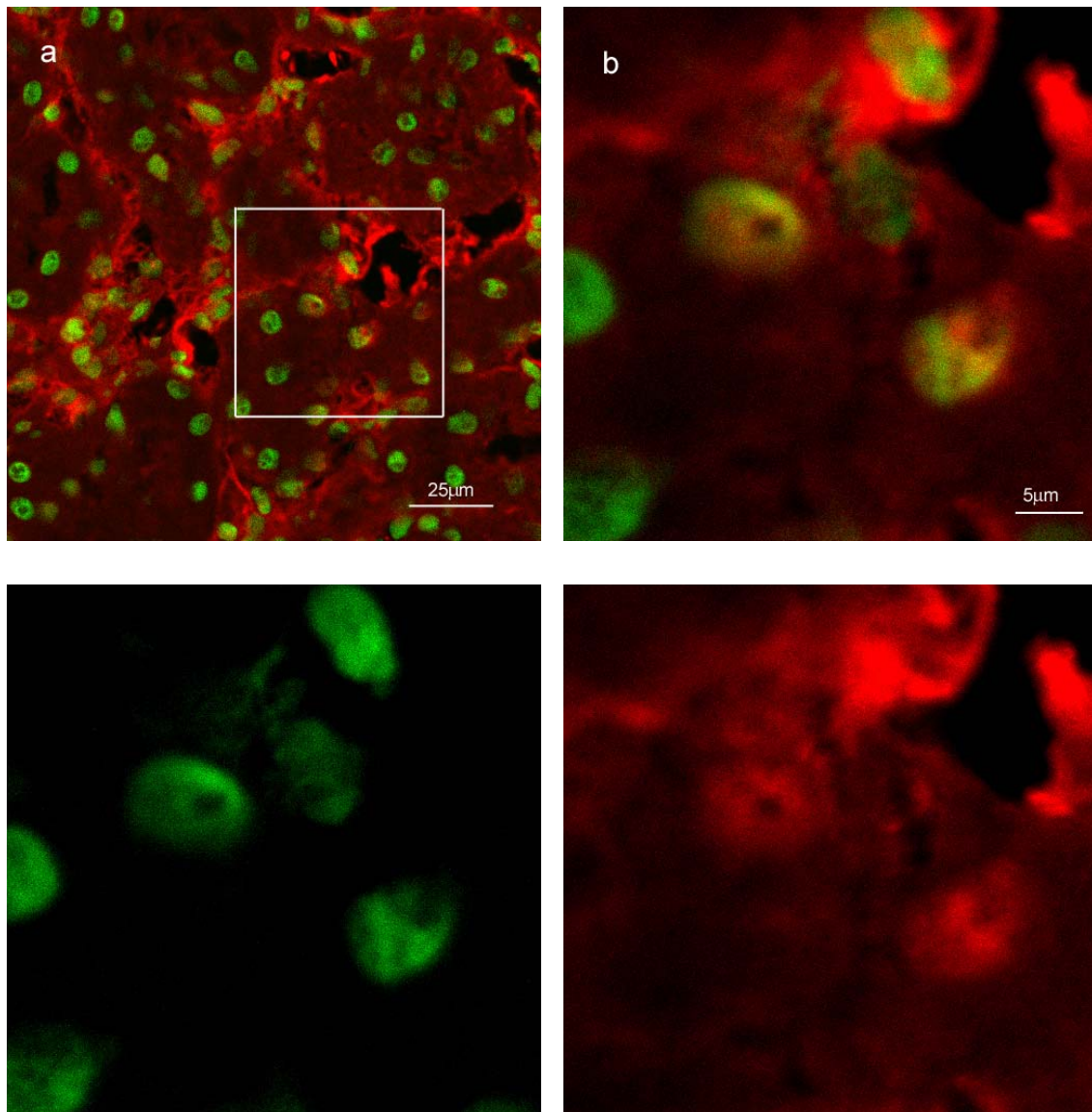


Abb. 8 Darstellung der SAH-Hydrolase in Zellkernen proximaler Tubuli der Nierenrinde 7 Tage nach unilateraler Nephrektomie durch Immunfluoreszenz.

Vergrößerungen:

a: 1: 1 200

b: 1: 4 800

Nachweis der SAH-Hydrolase mit polyklonalem Antikörper gegen SAH-Hydrolase und Cy 5-konjugiertem Sekundärantikörper (rot). Zellkernfärbung mit Sytox green (grün).

4.6 Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der Ratte unter experimenteller Hypoxie

4.6.1 Verteilung der SAH-Hydrolase

Unter hypoxischen Bedingungen entsprach die Verteilung der SAH-Hydrolase der der Kontrollniere. Die SAH-Hydrolase ließ sich im Glomerulum in Podozyten und Mesangium, sowie interstitiell und peritubulär zwischen den Tubuli von Nierenrinde und -mark nachweisen.

Im Gegensatz zur Expression in den Kontrolltieren kommt das Enzym in den hypoxischen Nieren jedoch auch in Zellkernen distaler Tubuli von Nierenrinde und -mark vor. Der Hauptunterschied in der Verteilung der Hydrolase zwischen der Niere der hypoxisch gehaltenen Versuchstiere und der Kontrollniere ist jedoch eine deutliche Anhäufung von SAH-Hydrolase in den Zellkernen im Interstitium von Rinde und Mark (Abb. 9 a und b).

In Nierenmark und -rinde sind deutlich die durch zelluläre Hypoxie hervorgerufenen Zellschwellungen mit einhergehender Verkleinerung der tubulären Lumina zu erkennen.

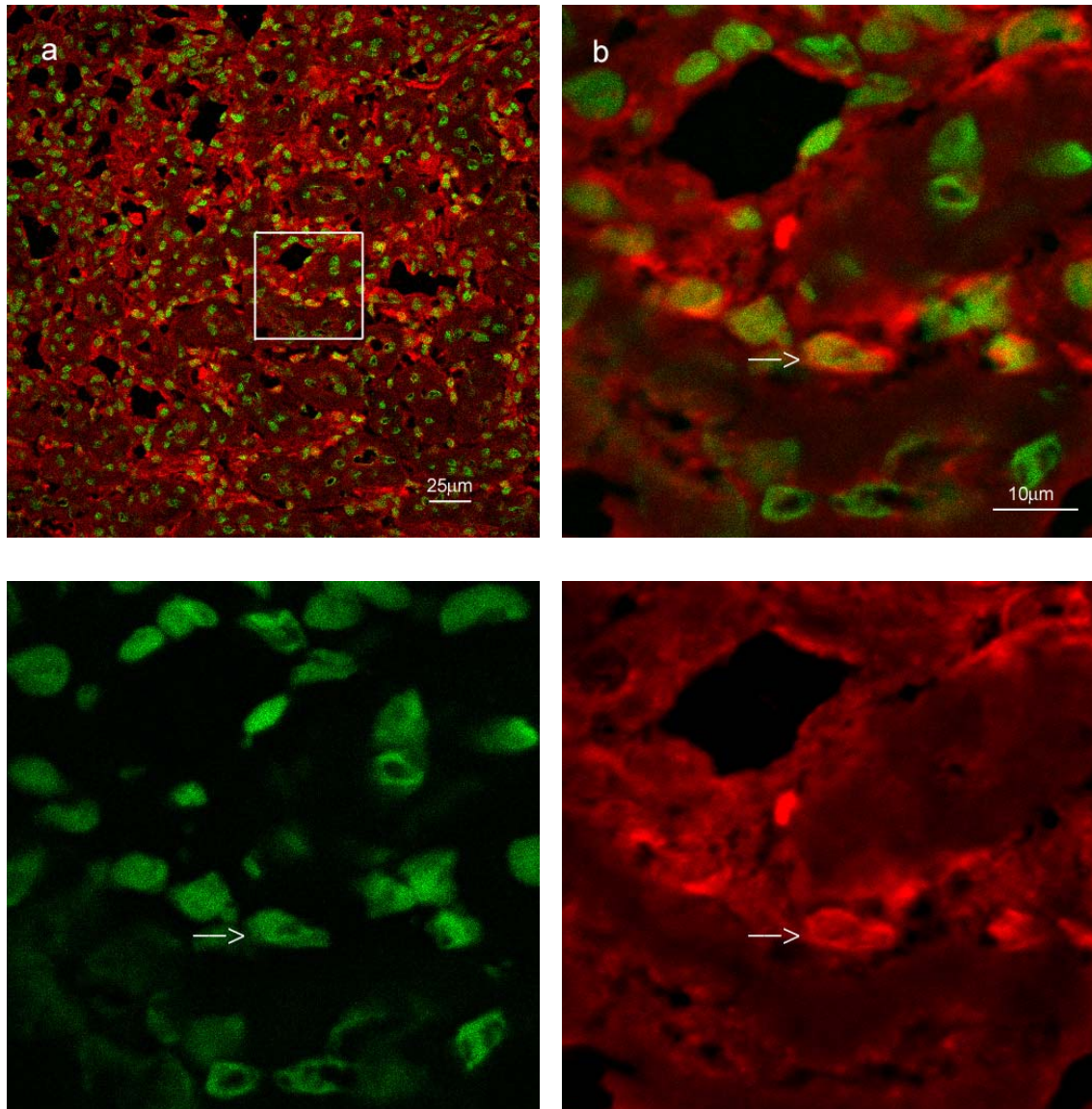


Abb. 9 Darstellung der SAH-Hydrolase in Zellkernen des Nierenmarks hypoxischer Nieren durch Immunfluoreszenz.

Vergrößerungen:

a: 1: 600

b: 1: 3 000

Nachweis der SAH-Hydrolase mit polyklonalem Antikörper gegen SAH-Hydrolase und Cy 5-konjugiertem Sekundärantikörper (rot). Zellkernfärbung mit Sytox green (grün).

4.6.2 Lokalisation von Erythropoetin mittels Immunhistochemie

Erythropoetin wird in der hypoxischen Niere, wie in Abb. 10 mit einem Antikörper gegen Erythropoetin dargestellt ist, ausschließlich im Nierenmark exprimiert.

Das Peptidhormon ist in den Zellen einer interstitiell an, oder nahe der Papille liegenden Zellpopulation lokalisiert (Abb. 10 a). Es findet sich weiterhin basal und apikal in den Wänden von Sammelrohren und Tubuli des Nierenmarks. Auch hier liegt es immer lumennah (Abb. 10 b).

Keine Expression von Erythropoetin findet sich in den proximalen und distalen Tubuli der Nierenrinde.

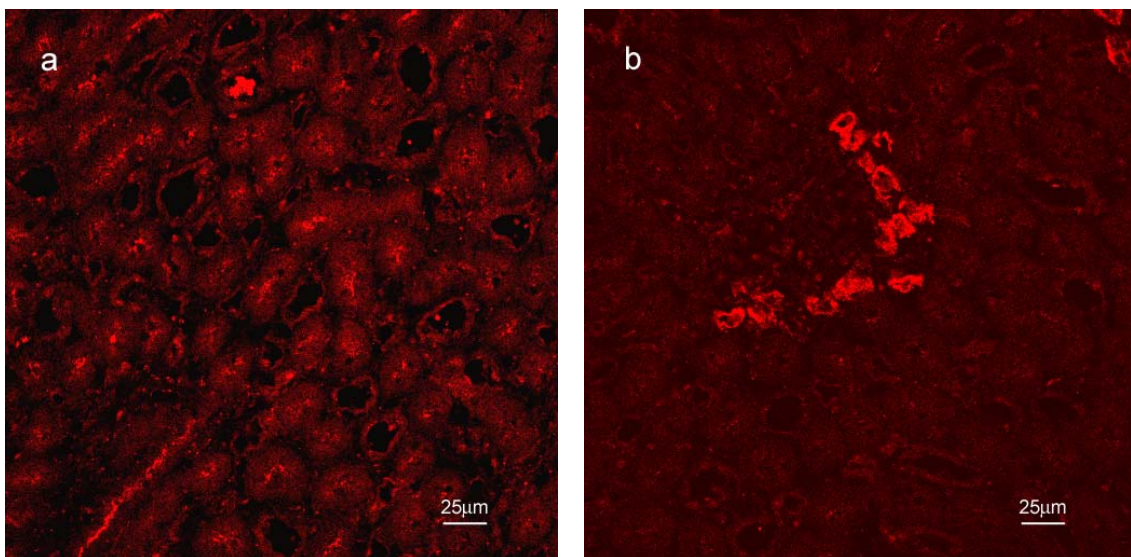


Abb.10 Darstellung von Erythropoetin im Nierenmark der hypoxischen Niere durch Immunfluoreszenz.

Vergrößerung: 1: 600

Nachweis von Erythropoetin mit einem polyklonalen Antikörper gegen Erythropoetin und Cy 5-konjugiertem Sekundärantikörper (rot).

a: Tubuli und Sammelrohre des Nierenmarks

b: im Nierenmark vorkommender Zellverband mit Erythropoetinmarkierung

4.7 Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der Ratte nach 7-tägiger salzartermer und salzreicher Diät

4.7.1 Verteilung der SAH-Hydrolase

Die Lokalisation der SAH-Hydrolase im Gewebe der Niere von Ratten unter salzartermer, sowie unter salzreicher Diät entsprach derjenigen der Kontrollniere. Die SAH-Hydrolase ließ sich im Glomerulum in Podozyten und mesangialer Matrix, sowie interstitiell zwischen den Tubuli nachweisen.

4.7.2 Nachweis der SAH-Hydrolase in den Zellen der Macula densa

In der Niere aus salzartermer Diät ist eine deutliche Vermehrung und Vergrößerung der Zellen der Macula densa festzustellen.

In den durch COX-2 spezifisch angefärbten Macula densa-Zellen ist jedoch, entsprechend der Kontrollniere, keine durch Antikörperfärbung zu erfassende Menge an SAH-Hydrolase nachzuweisen, wenngleich das Enzym in enger Nachbarschaft zu den Zellen der Macula densa exprimiert ist (Abb. 11 a und b). Von der Färbung mit COX-2 sowie SAH-Hydrolase ausgenommen sind die Zellkerne der Macula densa.

In den Nieren aus salzreicher Diät ist hinsichtlich der Morphologie, der Anzahl und Größe der Zellen der Macula densa, sowie dem Vorkommen der SAH-Hydrolase in diesen Zellen keine Veränderung gegenüber den Kontrollnieren zu erkennen.

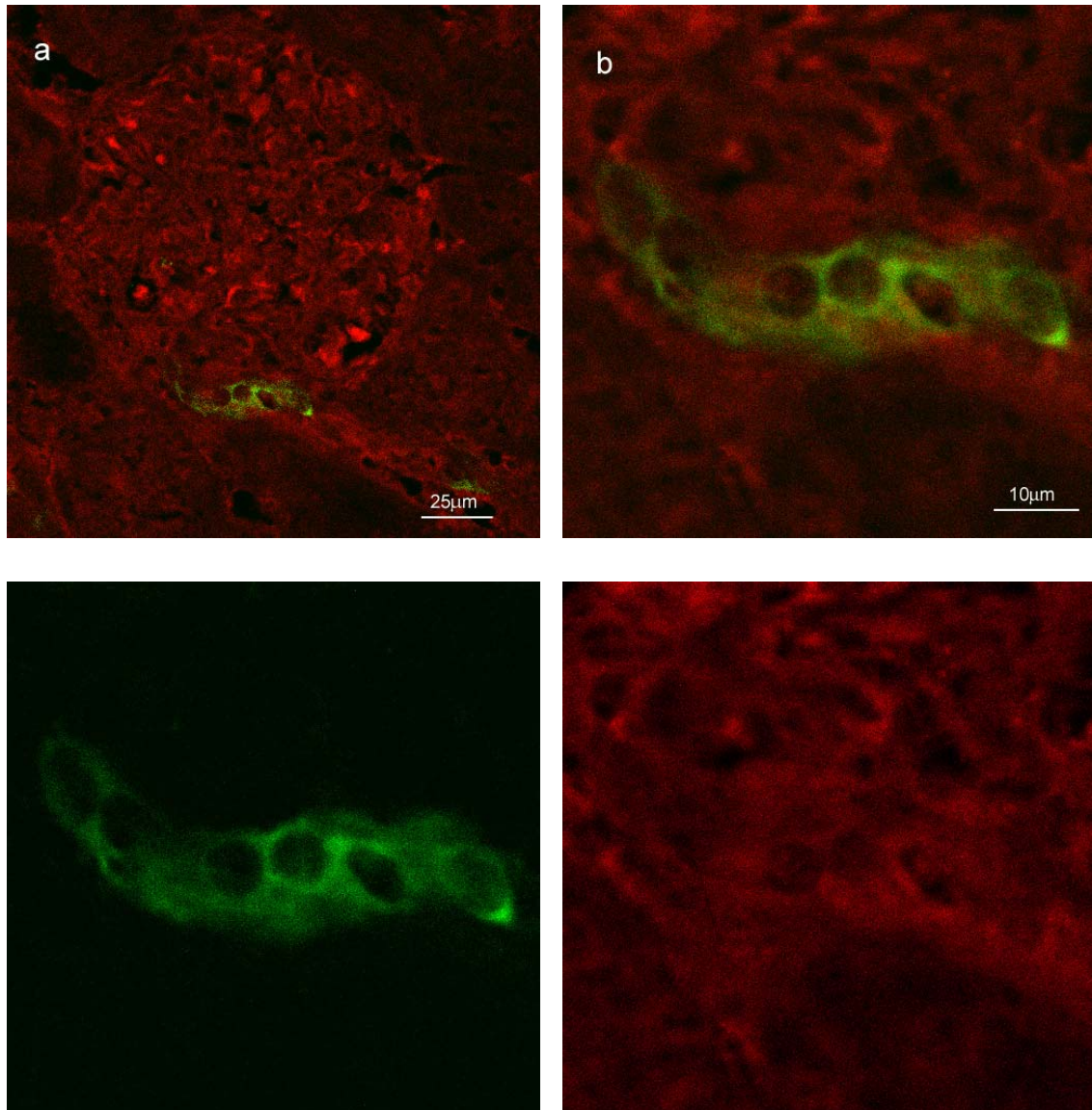


Abb.11 Darstellung von SAH-Hydrolase und COX-2 in den Zellen der Macula densa von Nieren aus salzreicher Diät durch Immunfluoreszenz.

Vergrößerungen:

a: 1: 1 000

b: 1: 3 000

Nachweis der SAH-Hydrolase mit polyklonalem Antikörper gegen SAH-Hydrolase und Cy 5-konjugiertem Sekundärantikörper (rot). Markierung der Macula densa-Zellen mit COX-2 und Texas Red-konjugiertem Sekundärantikörper (grün).

4.8 Nachweis der SAH-Hydrolase im Zellkern mittels SDS-PAGE und Western Blot

Die in den Zellkernen enthaltenen Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und im Western Blot, einem Elektrotransferverfahren von Proteinen, auf eine proteinbindende Oberfläche übertragen. Als proteinbindendes Material wurden Folien aus Nitrocellulose verwendet. Die transferierten Antigene wurden immunchemisch, mittels eines Primärantikörpers gegen SAH-Hydrolase, einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper, sowie mit PAP, welches durch Bindung an die Meerrettich-Peroxidase zu einer Signalverstärkung führt, markiert.

Untersucht wurden Zellkerne von Nieren 7 beziehungsweise 14 Tage nach unilateraler Nephrektomie, sowie Zellkerne aus Nieren hypoxisch gehaltener Versuchstiere. Als Kontrolle wurden Zellkerne normal gehaltener, gesunder Versuchstiere, sowie isolierte Zellkerne hypoxischer Rattenlebern gewählt. Nach Entwicklung der Cellulosefolie waren weder in den zu untersuchenden pathologischen, noch in denen der Kontrollen, durch den gegen SAH-Hydrolase gerichteten Antikörper angefärbte Banden zu erkennen.

Zu erkennen war lediglich die Bande aus gereinigter SAH-Hydrolase, was die Sensitivität und Spezifität des verwendeten Antikörpers beweist.

Das Protein, das im SDS-Gel aufgetrennt wurde, wurde mittels Coomassie-Anfärbung des ungeblotteten Gels gezeigt.

4.9 Nachweis der SAH-Hydrolase im Zellkern mittels isoelektrischer Fokussierung und Western Blot

Die isoelektrische Fokussierung diente dem Nachweis der nativen SAH-Hydrolase aus den isolierten Zellkernen von Nieren, die verschiedenen pathologischen Zuständen ausgesetzt waren, im Vergleich zu denen von Kontrolltieren.

Untersucht wurden die Zellkerne der verbliebenen Nieren 7 beziehungsweise 14 Tage nach unilateraler Nephrektomie, sowie solche aus Nieren hypoxisch gehaltener Versuchstiere. Als Kontrolle wurden Zellkerne normal gehaltener, gesunder Versuchstiere, sowie isolierte Zellkerne hypoxischer Rattenlebern gewählt.

Nach Entwicklung der Cellulosefolie waren weder in den zu untersuchenden Zellkernen pathologisch veränderter Nieren, noch in denen der Kontrollen durch den gegen SAH-Hydrolase gerichteten Antikörper angefärbte Banden zu erkennen.

Zu erkennen war lediglich die Bande aus gereinigter SAH-Hydrolase, was die Sensitivität und Spezifität des verwendeten Antikörpers beweist.

5 Diskussion

5.1 Nierengewicht

Das Gewicht der immunhistochemisch untersuchten Nieren der verschiedenen pathologischen Zustände wurde nach Organentnahme bestimmt, um einen Anhaltspunkt über die Richtung der Entwicklung des Organgewichts im Vergleich zur Kontrolle zu erhalten. Das Nierengewicht wurde auf das Körpergewicht bezogen.

Im vorliegenden Versuch stieg das Gewicht der Nieren nach experimenteller Induktion eines insulinpflichtigen Diabetes mellitus an. Es lag bereits in den ersten zwei Wochen nach Diabetesbeginn deutlich über dem der Kontrollnieren und blieb auch in den vier Wochen nach Induktion entnommenen Nieren nahezu konstant. Nach MOGENSEN und ANDERSEN, 1973, ist die Nierenfunktion aufgrund der Größen- und Gewichtszunahme bei Diabetes mellitus erhöht. Die erwähnte Zunahme findet in Form eines kompensatorischen Wachstums, bestehend aus einer glomerulären Vergrößerung (OSTERBY und GUNDERSEN, 1975) statt. Die in der Frühphase der Erkrankung auftretende glomeruläre und tubuläre Hypertrophie mit Zunahme der mesangialen Matrix (BÖHM, 2001) sorgt hier wohl für den Zuwachs an Gewicht. Im weiteren Verlauf des schweren, unbehandelten Diabetes tritt eine glomeruläre und tubulo-interstitielle Fibrose mit tubulärer Atrophie auf (SARRE et al., 1988), die wahrscheinlich den nachfolgenden Abfall des Nierengewichts verursacht.

Ebenfalls ansteigend war das mittlere Nierengewicht der verbliebenen Nieren nach unilateraler Nephrektomie. Nach 14 Tagen war es sogar deutlich höher als das der sieben Tage nach Nephrektomie entnommenen. Da sich nach NORMAN, 1991, der Gesamtproteingehalt der verbleibenden Niere um 37 % innerhalb von 14 Tagen nach kontralateraler Nephrektomie erhöht, was in erster Linie einer Erhöhung des epithelialen Volumens des Nephrons (PFALLER et al., 1998) und des mittleren glomerulären Volumens (OLIVETTI et al., 1977)

zuzuschreiben ist, ist zu vermuten, dass die untersuchten Nieren im Zuge der kompensatorischen Hypertrophie an Gewicht und an Größe hinzu gewonnen haben.

5.2 Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der normalen Niere der gesunden, adulten Ratte

Das Enzym SAH-Hydrolase kommt homogen verteilt, in der gesamten Niere vor. Seine Aktivität ist in den Glomerula 1,5-mal so hoch, wie in den Tubuli (KLOOR et al., 2000), wobei die Glomerula jedoch nur ungefähr 2 % des Gesamtvolumens der Niere ausmachen (ELIAS und HENNING, 1967).

MAYER, 1994, wies die SAH-Hydrolase der Niere in der Bowmanschen Kapsel, der Macula densa, dem Bürstensaum der proximalen und distalen Tubuli sowie den Sammelrohren qualitativ nach. KLOOR et al., 2000, lokalisierten die SAH-Hydrolase der Niere in den Glomerula, den Epithelien proximaler und distaler Tubuli und den Sammelrohren. Sie wiesen das Enzym auf zellulärer Ebene in den Glomerula, mesangialen und endothelialen Zellen nach. Die Autoren postulierten weiter, dass die Podozyten ebenfalls bedeutsame Mengen an SAH-Hydrolase enthalten müssten.

Im Gegensatz zur gleichmäßig im Zytoplasma verschiedener Zellen der Niere vorkommenden SAH-Hydrolase sind andere Enzyme auf bestimmte renale Strukturen begrenzt lokalisierbar.

Da in den Tubuli der Nierenrinde verschiedene wichtige Stoffwechselreaktionen stattfinden, kommt in den distalen Tubuli der Nieren adulter Ratten zum Beispiel das Enzym SAM-Synthase vor, welches die Bildung von SAM aus Methionin und ATP katalysiert (HORIKAWA et al., 1993), was den Ablauf SAM-abhängiger Methylierungen in diesen Zellen vermuten lässt. Im proximalen Konvolut kommt mit Fructose-1,6-Bisphosphatase ein Enzym der Gluconeogenese, im dicken, aufsteigenden Teil der Henle-Schleife mit Phosphofruktokinase eines der Glykolyse vor (SCHMID et al., 1978). Im Zytoplasma der proximalen

Tubuli der Rattenniere wurde Argininosuccinat-Synthetase lokalisiert, die durch die Kondensation von Aspartat mit Citrullin zu Argininosuccinat eine wichtige Rolle im Harnstoffzyklus spielt (WAKUI et al., 1992). Des Weiteren entfalten die lysosomalen Proteasen Cathepsin B, L und S ihre höchste Aktivität in der pars convoluta des proximalen Tubulus. Diese Abschnitte des tubulären Systems sind demzufolge maßgeblich an der Reabsorption von Proteinen aus dem glomerulären Ultrafiltrates und deren Abbau beteiligt (OLBRICHT, 1992, SCHMID et al., 1997).

SAH-Hydrolase war außerdem in interstitiellen Zellen zwischen den Tubuli von Nierenrinde und -mark nachzuweisen. FLÖGE et al., 1997 wiesen dort eine hohe Anzahl an PDGF α -Rezeptoren nach. PDGF α fördert die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen und Fibroblasten, was wiederum an eine erhöhte Stoffwechselleistung dieser Zellen gebunden ist.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte die SAH-Hydrolase immunhistochemisch ebenfalls vorwiegend in den Glomerula der Nierenrinde lokalisiert werden. Auch andere Enzyme, wie die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Adenylatkinase, erreichen im Glomerulum ihr Maximum (GUDER und ROSS, 1984).

In den Glomerula kommt die SAH-Hydrolase in bestimmten Zellen vor, die morphologisch Podozyten ähneln.

In einer Gegenfärbung des SAH-Hydrolase-markierten Nierenschnittes mit einem Antikörper gegen Wilms-Tumor-Protein (WT-1), einem podozytenspezifischen, nukleären Protein differenzierter und undifferenzierter Zellen (PAVENSTÄDT, 2000), stellte sich heraus, dass es sich bei den in der Hydrolase-gefärbten Kontrollnieren zu beobachtenden Zellen tatsächlich um Podozyten handelt. Das Enzym ist zwar in den durch den Antikörper erfassten Teilen des Podozytenzellkörpers teils nur mäßig exprimiert, zweifellos aber in derselben Zelle.

Ebenso wurde durch eine Doppelfärbung des Nierenschnittes mit Antikörper gegen Synaptopodin, einem im Zytoplasma der Fußfortsätze differenzierter Podozyten enthaltenen, Aktin-assoziierten Protein (MUNDEL et al., 1997) durch-

geführt. Es zeigte sich, dass auch in den Zellfortsätzen der Podozyten SAH-Hydrolase zu finden ist. Hier kommt das Enzym jedoch vorwiegend an den Abgängen der Fortsätze aus dem Zellkörper vor und nicht in deren weiterem Verlauf. Synaptopodin dagegen färbt nach MUNDEL et al., 1991, am stärksten die Podozytenabgänge aus dem Hauptfortsatz an.

Die SAH-Hydrolase kommt somit in Podozyten vor, ist dort aber nicht streng perinukleär lokalisiert, sondern zeigt die höchste Expression in diesen Zellen etwas weiter peripher im Zellkörper einschließlich der Abgänge der Zellfortsätze.

Da Podozyten hochspezialisierte Zellen mit komplexer Architektur und vielfältigen Funktionen sind, erscheint ein aufgrund vermehrt ablaufender Methylierungsreaktionen erhöhter Gehalt an SAH-Hydrolase wahrscheinlich. Ihren Zellkörpern entspringt ein Hauptfortsatz, der sich im weiteren Verlauf in Fußfortsätze teilt, welche an die Außenseite der glomerulären Basalmembran (GBM) grenzen und so das charakteristische ineinandergreifende Muster benachbarter Fußfortsätze hervorrufen (MUNDEL et al., 1991). Sie sind glomeruläre viszerale Zellen epithelialen Ursprungs.

Die Hauptaufgabe der Podozyten liegt in der glomerulären Filtration. Ihre Fußfortsätze bilden, zusammen mit den dazwischen gelegenen Schlitzmembranen, die Hauptbarriere für Moleküle, die größer sind als Albumin und stellen damit die wichtigste Determinante in der Größenselektivität des Filters dar. Des Weiteren trägt die negative Ladung auf ihrer Außenseite zu einem kleineren Teil auch zur Ladungselektivität bei (MUNDEL und KRIZ, 1995), und sie sind für circa

40 % des hydraulischen Widerstandes der Filtrationsbarriere verantwortlich (PAVENSTÄDT, 2000).

Sie enthalten außerdem ein gut ausgebildetes kontraktiles System aus Aktin und Myosin in ihren Fußfortsätzen, welches mechanische Unterstützung gegen zu hohe Zugspannungen an der GBM gewährleisten soll. Zudem liegt wahrscheinlich eine gewisse regulatorische Funktion in der Änderung der Größe der Filtrationsschlitze, die eine Änderung der Filtrationsoberfläche bewirken (MUNDEL und KRIZ, 1995, KRIZ et al., 1995).

Aber Podozyten haben auch die Fähigkeit Kollagen zu sezernieren und haben hohe endozytotische Aktivität, womit sie zur Synthese und dem Abbau der GBM beitragen (MUNDEL und KRIZ, 1995, KILLEN und STRIKER, 1979). Sie besitzen große Zellkerne, prominente Nukleolen sowie gut entwickeltes rauhes endoplasmatisches Retikulum und riesige Golgiapparate, die ihnen eine hohe Kapazität zur Proteinsynthese und zu posttranslationalen Modifikationen erlauben (MUNDEL und KRIZ, 1995), was im Falle einer erhöhten Methylierungsrate eine relativ hohe Aktivität der SAH-Hydrolase in diesen Zellen erklären würde. In den Glomerula der Niere und dort insbesondere in den Podozyten kommen auch sogenannte gliale fibrilläre saure Proteine (GFAP) (BUNIATIAN et al., 1998) und PKC α , ein Isoenzym der Proteinkinase C der Rattenniere vor (PFAFF et al., 1999).

Wie schon von KLOOR et al., 2000, gezeigt, konnte die SAH-Hydrolase auch in der vorliegenden Arbeit im Mesangium nachgewiesen werden. Neben GFAP (BUNIATIAN et al., 1998) konnten in den mesangialen Zellen auch PDGF α -Rezeptoren lokalisiert werden (FLÖGE et al., 1997).

Mesangiumzellen sind sternförmige Zellen mit zytoplasmatischen Fortsätzen und weisen Ähnlichkeiten mit glatten Muskelzellen und Fibroblasten auf. Sie exprimieren einige mesenchymale Oberflächenantigene, wie Fibronectin und THY-1.

Die Mesangiumzellen haben die Funktion, das Glomerulum strukturell zu erhalten und durch Proliferation nach Gewebeverletzungen entstandene Schäden zu decken (HUGO et al., 1997). Sie enthalten einen kontraktilem Apparat aus Mikrofilamenten wie Aktin, Myosin und Tropomyosin. So geben sie strukturelle Unterstützung für die glomerulären Kapillaren gegen den auf sie einwirkenden hydrostatischen Druck (KRIZ et al., 1995) und sind aufgrund ihrer Fähigkeit zur spontanen Kontraktion und Relaxation in der Lage, den Durchmesser von Kapillarschlingen zu regulieren (MENE e al., 1989). Die mesangialen Zellen sind durch ihre Fähigkeit zur Pino- und Phagozytose in der Lage, die GBM zu reinigen und so deren Permeabilität aufrecht zu erhalten (KARNOVSKY, 1979). Die Zellen sind in der Lage mesangiale Matrix zu synthetisieren, verschiedene Kol-

lagentypen herzustellen und exprimieren eine inaktive Vorstufe von Renin. Sie sind Produktionsort für Hormone und Zytokine wie Erythropoietin, Interleukin-1, Prostaglandin E₂ und F_{2α}, PDGF und IGF-1 und sind somit in die Synthese und Regulation der verschiedensten Moleküle involviert (MENE e al., 1989). Des Weiteren haben sie eine hohe Kapazität zur Prozessierung zirkulierender Makromoleküle (LATTA et al., 1960) und nehmen so aktiv an der Plasma-Ultrafiltration und dem Stoffwechsel gefilterter und ingestierter Makromoleküle teil.

Somit könnte ein vermehrtes Vorkommen von SAH-Hydrolase in diesen Zellen auf eine im Zusammenhang mit Prozessierung und Synthese auftretende Erhöhung der Methylierungsrate stehen.

Zum Nachweis von SAH-Hydrolase in den Zellen der Macula densa wurde eine Doppelfärbung der Hydrolase-gefärbten Nieren mit einem Antikörper gegen das Enzym Cyclooxygenase 2 (COX-2) durchgeführt. COX-2 ist ein Bestandteil der Prostaglandin-Synthase und katalysiert die Bildung von Prostaglandinen aus Arachidonsäure (NEEDLEMAN et al., 1986). Es kommt in den Zellen der Macula densa vor (HARRIS et al., 1994, NANTEL et al., 1999) und steigert die Salz- und Wasserexkretion im Urin, den renalen Blutfluss, sowie die Macula densa-vermittelte Reninsekretion und senkt den renalen Gefäßwiderstand (CASTROP et al., 2001). Im Zuge der Proteinsynthese und -freisetzung des Renin wäre eine Erhöhung der Methylierung in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates und somit eine vermehrte Aktivität der SAH-Hydrolase prinzipiell denkbar. In den hier präsentierten Ergebnissen konnte die SAH-Hydrolase nicht in den Zellen der Macula densa nachgewiesen werden, wenngleich eine enge räumliche Beziehung von COX-2 und SAH-Hydrolase zu vermuten ist, was den Schluss zulässt, dass so wenig Antigen in diesen Zellen vorkommt, dass es auf die beschriebene Weise nicht nachzuweisen ist .

Die Zellen der Macula densa nehmen am tubuloglomerulären Feedback und der Reninfreisetzung teil. Zur Kontrolle der GFR werden durch die Macula densa-Zellen Änderungen in NaCl-Konzentration und Osmolarität im distalen Nephron ermittelt (PERSSON et al., 1991). Die Reninsekretion wird prinzipiell

durch alle Zustände gesunkenen Natriumgehalts in der extrazellulären Flüssigkeit wie Abfall der Natriumkonzentration im Harn des distalen Tubulus, Hypovolämie sowie Druckabfall im Bereich des Vas afferens des Glomerulum stimuliert. Die Freisetzung des proteolytischen Hormons aus den granulierten Epitheloidzellen des JGA wird über β_1 -Rezeptoren des adrenergen Systems vermittelt (LÖFFLER und PETRIDES, 1998).

In den Zellen des juxtaglomerulären Apparates (JGA) wurde die Aktivität von Enzymen des Glucosestoffwechsels, wie z. B. Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase, sowie diverse Enzyme der Gluconeogenese (GUDER und ROSS, 1984), im Zytoplasma von Macula densa-Zellen des JGA das Enzym NO-Synthase, ein Signalmolekül des Gefäßsystems (MUNDEL et al., 1992) nachgewiesen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von FINKELSTEIN und HARRIS, 1973, die angaben, dass in Rattenlebern rund 30 % des gesamten Enzymgehalts im Zellkern lokalisiert sind, konnte in den Zellkernen der normalen Niere der adulten Ratte in den vorliegenden Versuchen keine SAH-Hydrolase nachgewiesen werden. Der durch eine gleichzeitige Färbung der Nierenpräparate mit dem Kernfarbstoff Sytox green erfolgte Nachweis, zeigte, dass die Kerne der glomerulären Zellen, sowie der proximalen und distalen Tubuli von Rinde und Mark keine SAH-Hydrolase enthalten.

WEDLICH und DREYER, 1988, zeigten, dass der Zellkern von Oozyten von *Xenopus*-Spezies als Speicher für nukleäre Proteine dient, die für die eine rasche Zellteilung während der Entwicklung benötigt werden. SAH-Hydrolase im Oozyten-Zellkern reguliert die Kerntranslokationen während der Embryogenese. Sie ist somit ein nukleäres Enzym, wobei ihre Kernlokalisation mit hohen Raten von mRNA-Synthese und mit transkriptioneller Aktivität korreliert. Daraus folgt, dass eine Akkumulation von SAH-Hydrolase im Kern nötig ist für eine effiziente cap-Methylierung in transkriptionell aktiven Zellen. Kernproteine können somit Ziel SAM-abhängiger Methylierungsprozesse sein (RADOMSKI et al., 1999). Des Weiteren scheint die SAH-Hydrolase zwischen Kern und Plasma in Abhängigkeit vorhandener Bindungspartner zu pendeln. Da die Molekülgröße des En-

zyms aber eine Translokation in den Zellkern durch dessen Poren mittels Diffusion verbieten würde, muss ein sättigbarer Transport- oder ein Ankermechanismus vorhanden sein (RADOMSKI et al., 1999).

5.3 Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der Ratte mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus

Der Streptozotocin-induzierte Diabetes mellitus bei Ratten ist ein anerkanntes Modell für Typ I-Diabetes und ist geeignet, um diabetisch bedingte Veränderungen der Niere zu untersuchen.

Streptozotocin ist ein Antibiotikum, das hohe Affinität für die in den Langerhanschen Inseln des Pankreas gelegenen B-Zellen besitzt. Es ist ein potentes, methylierendes Agens, das mit DNA zu methylierten Purinbasen reagiert und über eine Hypermethylierung pankreatischer DNA bei ausreichend hohen Konzentrationen in den B-Zellen zu deren selektiven Zerstörung beiträgt (BENNETT und PEGG, 1981). Die Substanz findet pharmakologische Verwendung in der Behandlung von Inselzelltumoren und malignem Karzinoid.

Streptozotocin kann aber auch auf die Niere, über die der Stoff unverändert ausgeschieden wird, zytotoxisch wirken, indem er proximale Tubuluszellen zerstört.

Mikroskopisch sichtbare Veränderungen treten in Abhängigkeit der Dauer des Diabetes auf (OSTERBY und GUNDERSON, 1975). So erhöhen sich Nierengröße und -funktion sowie ihr Gewicht (SEYER-HANSEN, 1976).

Die Frühphase ist charakterisiert durch das Auftreten einer glomerulären (OSTERBY und GUNDERSEN, 1975) und tubulären Hypertrophie, einer Zunahme der mesangialen Matrix, unter anderem durch Proliferation der Mesangiumzellen, und einer Verbreiterung der glomerulären und tubulären Basalmembran. Im weiteren Verlauf tritt eine glomeruläre und tubulo-interstitielle Fibrose auf, die im Endstadium in einer glomerulären Sklerose (Kimmelstiel-Wilson-Syndrom) endet (BÖHM, 2001). Es sind außerdem zahlreiche Tubulusläsionen beschrieben, einschließlich Vakuolisierung der proximalen Tubuli und

tubulärer Atrophie. Daneben treten interstitielle Fibrose, Ödeme und zelluläre Infiltrationen auf (SARRE et al., 1988).

Aus dem tubulären Zuwachs an Länge und Durchmesser resultieren eine Erhöhung der Filtrationsoberfläche und eine Abnahme des Flusswiderstandes im Tubulus (SEYER-HANSEN et al., 1980).

Ein auftretender Podozytenverlust trägt zum Fortschreiten der diabetischen Nephropathie bei (PAGTALUNAN et al., 1997), da Podozyten adulter Nieren unfähig sind, sich zu vermehren (MUNDEL und KRIZ, 1995).

Zu den durch Diabetes mellitus verursachten Nierenschäden tragen weiterhin die progressiv ansteigende Expression von glomerulärem TGF- β 1 (BERTOLUCI et al., 1996) und der in diabetischen Ratten erhöhte Proteingehalt des kortikalen Glucosetransporters GLUT-1 bei, der eine Erhöhung der intrazellulären Glucosekonzentrationen in den mesangialen Zellen verursacht (D'AGORD-SCHAAN et al., 2001). Der reduzierte Insulinspiegel kann die mesangiale Kontraktilität beeinträchtigen, was durch eine mangelhafte Regulation des Kapillardurchmessers (MENE e al., 1989) in der, im Diabetes mellitus auftretenden Hyperfiltration resultieren kann (CORTES et al., 2000)

Im vorliegenden immunhistochemischen Nachweis von SAH-Hydrolase in der Niere der diabetischen Ratte entspricht die Verteilung des Enzyms zwei, beziehungsweise vier Wochen nach Diabetesbeginn der der Verteilung in der Kontrollniere gesunder Tiere. Lediglich nach zwei Wochen insulinpflichtigem Diabetes mellitus ist eine vermehrte Expression des Enzyms mit den Zellkernen tubulärer Zellen des Nierenmarks assoziiert nachweisbar.

Im Verlauf von weiteren zwei Wochen unterscheidet sich die Verteilung der SAH-Hydrolase wiederum etwas von der, der Niere mit zweiwöchigem Diabetes. Die tubulären Zellkerne des Nierenmarks enthalten keine SAH-Hydrolase, diese ist dagegen eher perinukleär exprimiert, was wiederum den Ergebnissen der Kontrollen entspricht. Außerdem ist die Verteilung des Enzyms weniger homogen, die Glomerula erscheinen morphologisch aufgelockerter. Diese Veränderungen sind aber aller Wahrscheinlichkeit nach nicht als eine Änderung der Aktivität des Enzyms oder einer Umverteilung innerhalb des Nierengewebes zu

betrachten, sondern vielmehr Ausdruck der veränderten Morphologie des diabetischen Nierenparenchyms, da in Abhängigkeit der Dauer des Diabetes mellitus in der Niere verschiedene mikroskopisch sichtbare Veränderungen auftreten (OSTERBY und GUNDERSON, 1975).

Auch im Glomerulum findet sich keine Änderung im Expressionsmuster der SAH-Hydrolase. Das Enzym konnte, entsprechend der Kontrollen, in den Podozyten sehr stark angefärbt werden, in geringerem Maße weiterhin in mesangialen Regionen.

Unter experimentell induziertem Diabetes mellitus scheint der Gewebegehalt an 5'-Nucleotidase in Glomerula, Nierenmark und -rinde ebenso wie der der Adenosindeaminase unverändert zu sein. Das ebenfalls Adenosin metabolisierende Enzym Adenosinkinase dagegen nimmt im selben System um knapp 70 % ab, woraus auf eine Erhöhung der Adenosinkonzentration in diesem Gewebe geschlossen werden kann (ANGIELKSI et al., 1989). Dieser Anstieg würde über eine Hemmung der SAH-Hydrolase das mit zunehmender Dauer des IDDM auftretende Absinken der Aktivität des Enzyms in Leber und Niere erklären (STUMVOLL, 1998).

Der Gehalt an SAH und SAM im diabetischen Nierengewebe und der SAH/SAM-Quotient, der als sensitiver Indikator für die Methylierungsaktivität eines Gewebes gilt, ändern sich dagegen nur sehr wenig. Auch nach MAYER, 1994, finden sich keine Änderungen der spezifischen Aktivität der SAH-Hydrolase unter Bedingungen des experimentell induzierten Diabetes mellitus. Neuere Untersuchungen (KLOOR, unpubliziert) zeigen jedoch, dass die Expression der SAH-Hydrolase im IDDM um das dreifache erhöht ist, was auch mit einer Zunahme der SAH-Hydrolase-Aktivität korreliert.

5.4 Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der Ratte nach unilateraler Nephrektomie

Nach unilateraler Nephrektomie beginnt das kompensatorische Nierenwachstum schon sehr bald. Glomeruläre Zellen der verbleibenden Niere teilen sich

zum Beispiel bereits innerhalb der ersten 24 Stunden (IKEDA et al., 1993). Das in rhythmischen Schüben verlaufende Wachstum der kontralateralen Niere (KELLER, 1980) ist nach 20- 37 Tagen beendet (HÜBNER, 1967). Im vorliegenden Modell wurde die Verteilung der SAH-Hydrolase in der verbleibenden Niere am 7. und 14. postoperativen Tag ermittelt.

Im vorliegenden immunhistochemischen Nachweis von SAH-Hydrolase in der verbliebenen Rattenniere 7 beziehungsweise 14 Tage nach unilateraler Nephrektomie entspricht die Verteilung des Enzyms derjenigen der Verteilung in der Kontrollniere gesunder Tiere. Lediglich 7 Tage nach Nephrektomie ist in den Zellkernen der proximalen und, wenngleich weniger deutlich ausgeprägt, denen der distalen Tubuli eine vermehrte Expression des Enzyms nachweisbar. Dennoch kommen weniger Kerne, in denen das Enzym angefärbt ist vor, als in der hypoxischen Niere. 14 Tage nach unilateraler Nephrektomie sind dagegen keinerlei Änderungen in der Verteilung des Enzyms im Bezug auf die Zellkerne der verbliebenen Niere mehr auszumachen, sie sind wieder, entsprechend der Kontrollniere, von der perinukleär exprimierten SAH-Hydrolase, ausgespart. Nach JOHNSON, 1969, kommt es nach unilateraler Nephrektomie zwar zu einer geringeren Erhöhung des Gesamt-DNA-Gehalts, dieser ist aber wahrscheinlich ausschließlich auf die Zellproliferation an sich zurückzuführen (RING et al., 1992). Innerhalb von 14 Tagen erhöht sich der Gesamtproteingehalt der verbleibenden Niere um 37 %, was zum größten Teil auf posttranskriptioneller Regulation der Genexpression beruht (NORMAN, 1991, NORMAN und HARDY, 1994). Änderungen der DNA- und RNA-Synthese beginnen in den ersten 48 Stunden nach dem Entfernen einer Niere, und der DNA-Gehalt der hypertrophierenden Zellen ist höher als der normaler Zellen. 95 % der Zellkerne dieser Zellen sind tetraploid (IKEDA et al., 1993). DNA-Methylierung ist mit der Genaktivierung und zellulärer Differenzierung im Säugerorganismus verbunden (CHIANG et al., 1996). Da sie eng mit der DNA-Synthese korreliert, kann man in regenerierendem und sich entwickelndem Gewebe den Grad der Methylierung als Maß für die DNA-Synthese heranziehen (GERACI et al., 1974). Es ist somit davon auszugehen, dass in den Kernen

tubulärer Zellen der regenerierenden Niere nach unilateraler Nephrektomie Transmethylierungsprozesse ablaufen, die eine Translokation der SAH-Hydrolase in den Zellkern mit sich bringen. PFALLER et al., 1998, fanden heraus, dass sich die tubuläre Hypertrophie, entsprechend einer Verlängerung der Tubuli, schrittweise entwickelt und selten mehr als zehn Tage andauert. Dies legt den Schluss nahe, dass die fehlende Lokalisation der SAH-Hydrolase in den Zellkernen der tubulären Zellen der Niere 14 Tage nach Nephrektomie auf eine bereits abgeschlossene Regeneration dieser Gewebe zurückzuführen ist. Es findet sich weder in den untersuchten Nieren sieben Tage nach Nephrektomie, noch in den 14 Tage nach Nephrektomie im Organismus belassenen eine Expression von SAH-Hydrolase in den Zellkernen des Nierenmarks und der Glomerula. Obwohl sich nach OLIVETTI et al., 1977, das mittlere glomeruläre Volumen 35 Tage nach unilateraler Nephrektomie in der verbleibenden Niere um 70 % erhöht.

5.5 Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der Ratte unter experimenteller Hypoxie

Bekanntermaßen steigt der Adenosinspiegel im Nierengewebe bereits nach einer Minute anhaltender Ischämie steil an (OSSWALD et al., 1977). Dieser Anstieg in der Adenosinfreisetzung stammt von der erhöhten Hydrolyse von 5'AMP (LLOYD et al., 1988) und resultiert in einem ansteigenden SAH-Gewebegehalt (KLOOR et al., 2002). Ursache ist in der ersten Phase eine durch Akkumulation von Adenosin entstandene Umkehrung der hydrolytischen Reaktion der SAH-Hydrolase. Im weiteren Verlauf führt eine ebenfalls durch steigende Adenosinspiegel hervorgerufene Hemmung des Enzyms zum weiteren Anstieg von SAH (KLOOR et al., 2002, STUMVOLL, 1998). Im ersten Falle wäre somit eine Erhöhung der Aktivität der SAH-Hydrolase denkbar, im zweiten träte in der Folge eine verringerte Aktivität des Enzyms auf.

In hypoxischem Gewebe zeigt sich eine beeinträchtigte Transmethylierungsaktivität. LLOYD et al., 1988, wiesen dagegen eine weitgehende Sauerstoffunabhängigkeit dieser Prozesse nach.

In diesem Zusammenhang wäre neben einer durch Adenosin, via Endprodukt-hemmung hervorgerufenen Hemmung der SAH-Hydrolase auch ein vermehrtes Vorkommen des Enzyms mit Aufgaben im raschen Abbau des anfallenden SAH in den untersuchten hypoxischen Nieren denkbar.

Im vorliegenden immunhistochemischen Nachweis von SAH-Hydrolase in der hypoxisch gehaltenen Niere entspricht die Verteilung des Enzyms der der Verteilung in der Kontrollniere gesunder Tiere. Lediglich in den Zellkernen ist, im Gegensatz zu den Kontrollnieren, eine eindeutige Lokalisation von SAH-Hydrolase auszumachen. Die SAH-Hydrolase-enthaltenden Kerne liegen vor allem im Interstitium des Nierenmarks, sowie der Nierenrinde, nicht aber in den glomerulären Zellen. Das bedeutet, dass das Enzym unter den veränderten Stoffwechselbedingungen der hypoxischen Niere offenbar in den Zellkern interstitieller Zellen von Mark und Rinde translociert, um der entstandenen Erhöhung von SAH entgegenzuwirken.

Im vorliegenden Versuch konnte, mittels immunhistochemischer Methoden eine eindeutige Expression von Erythropoetin im Nierenmark hypoxischer Nieren nachgewiesen werden. Zur Markierung wurde ein gegen Erythropoetin gerichteter Antikörper verwendet. Das Peptidhormon scheint im Nierenmark in bestimmten, interstitiell gelegenen Zellverbänden an oder nahe der Papille lokalisiert zu sein und findet sich weiterhin in den apikalen Bereichen der Wände und in den Lumina von Sammelrohren und Tubuli des Nierenmarks. Diese Beobachtungen decken sich mit dem von der Mehrzahl der Autoren postulierten Bildungsort für Erythropoetin in peritubulären, interstitiellen Zellen (DA SILVA et al., 1994, ECKARDT et al., 1993, KOURY et al., 1988, KOURY et al., 1991, LACOMBE et al., 1988, SCHUSTER et al., 1987, SCHUSTER et al., 1992), wenngleich diese im vorliegenden Versuch eher im Nierenmark oder der Übergangszone, als der

Nierenrinde zu liegen scheinen. Eine genauere Bestimmung des Zelltyps ist mit fluoreszenzmarkierenden Methoden nicht möglich.

Eine durch die Proteinsynthese von Erythropoetin hervorgerufene, erhöhte zelluläre Stoffwechsellistung der Erythropoetin-produzierenden Zellen ließe ein vermehrtes Auftreten von SAH-Hydrolase in diesen Zellen möglich erscheinen. Im hier präsentierten Versuch scheint Erythropoetin eher lumennah, SAH-Hydrolase dagegen vermehrt im Zellkörper interstitieller Zellen gelegen zu sein, was im indirekten Vergleich keine übereinstimmende Lokalisation vermuten lässt.

In diesem Zusammenhang ist aber zu erwähnen, dass keine Doppelmarkierung von SAH-Hydrolase und Erythropoetin vorgenommen werden konnte, da beide verfügbaren Antikörper aus dem Kaninchen stammen und somit durch einen sekundären Antikörper nicht zu unterscheiden sind.

Bei Absinken des arteriellen Sauerstoffgehalts unter hypoxischen und anämischen Bedingungen wird im Nierengewebe das Peptidhormon Erythropoetin freigesetzt (KOURY et al., 1991, PAGEL et al., 1991). Bestimmte renale Zellen in Rinde und Mark enthalten Erythropoetinrezeptoren (WESTENFELDER et al., 1999), durch welche Erythropoetin mRNA-Synthese stimuliert wird (ANAGNOSTOU et al., 1990). Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit liegen jedoch nur geringe Mengen von Erythropoetin im Serum vor (KRANTZ, 1991), welche ins Knochenmark transportiert werden, wo sie an spezifische Rezeptoren von Vorläuferzellen der erythroiden Reihe binden und eine Signalkaskade auslösen (WENGER und GASSMANN, 1997). Auf diesem Weg wird via einer Verzögerung der Rate der DNA-Spaltung der programmierte Zelltod (Apoptose) in diesen Zellen verhindert. Die Zellen bleiben lebensfähig und können mit Mitose und terminaler Differenzierung fortschreiten (KOURY und BONDURANT, 1990). Dieser Mechanismus erhöht die Anzahl der Retikulozyten und Erythrozyten im Blut und gewährleistet so eine verbesserte Sauerstoffversorgung des Gewebes.

Kontroverse Meinungen herrschen in der verfügbaren Literatur über die zelluläre Lokalisation der Erythropoetinbildung in der Niere. Von den meisten Autoren

werden ausschließlich die peritubulären, interstitiellen Zellen der Nierenrinde als Bildungsort des Hormons angegeben (DA SILVA et al., 1994, ECKARDT et al., 1993, KOURY et al., 1988, KOURY et al., 1991, LACOMBE et al., 1988, SCHUSTER et al., 1987, SCHUSTER et al., 1992). Dabei soll es sich um fibroblasten-ähnliche Typ I-interstitielle Zellen handeln (FISHER et al., 1996, MAXWELL et al., 1993), in denen die Erythropoetin-mRNA intrazellulär zentral und perinukleär gelegen ist (BACHMANN et al., 1993). Des Weiteren werden die Zellen des proximalen, tubulären Konvoluts oder die mesangialen Regionen der Glomerula hypoxischer Nieren (FUKUSHIMA et al., 1990) als einziger Ort der Erythropoetinproduktion genannt (HAIDAR et al., 1997, LOYA et al., 1994, MAXWELL et al., 1990). ECKARDT et al., 1989, postulierten, dass die Regulation der Erythropoetinproduktion wahrscheinlich Aufgabe der proximalen Tubuli sei, was im Hinblick auf die Tatsache, dass die aktive Resorption von Natrium die hauptsächliche Determinante des tubulären Sauerstoffverbrauchs ist, sinnvoll erscheint. Auch die mesangialen Zellen sind Produktionsort für verschiedene Hormone und Zytokine, wie zum Beispiel auch Erythropoietin (MENE et al., 1989).

5.6 Immunhistochemische Lokalisation der SAH-Hydrolase in der Niere der Ratte nach 7-tägiger salzarter und salzreicher Diät

In den Nieren aus Versuchstieren, die unter salzarter Diät gehalten wurden, ist die COX-2-Konzentration in den Macula densa-Zellen um das dreifache erhöht (HARRIS et al., 1994). Da unter gesteigerter renokortikaler Expression von COX-2 der renale Gefäßwiderstand und die Kontrolle der Reninsekretion durch die Macula densa abhängig wird von Prostaglandinen, die durch COX-2 gebildet werden, geraten diese sozusagen indirekt unter die Kontrolle der COX-2-Aktivität (CASTROP et al., 2001). Die durch COX-2 gebildeten Metabolite sind in die Regulation der Natrium- und Wasserausscheidung mit einbezogen (RODRIGUEZ et al., 1999) und tragen zum Mechanismus des tubuloglomerulären Feedbacks bei, indem sie dem auf die afferenten Arteriolen konstringierend

wirkenden Einfluss eines erhöhten renalen Perfusionsdruckes entgegenwirken (ICHIHARA et al., 1999). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der renalen Hämodynamik bei Hunden unter salzarmer Diät (RODRIGUEZ et al., 1999).

Im vorliegenden immunhistochemischen Nachweis von SAH-Hydrolase in der Niere aus salzarmer beziehungsweise -reicher Diät entspricht die Verteilung des Enzyms der der Verteilung in der Kontrollniere gesunder Tiere. Zwar konnte in den vorliegenden untersuchten Nieren die oben beschriebene Hypertrophie der Macula densa-Zellen unter salzarmer Diät beobachtet werden, dennoch konnte, entsprechend den Kontrollnieren, die SAH-Hydrolase in diesen Zellen auch unter salzarmen Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass die SAH-Hydrolase selbst unter den Bedingungen des intensivierten Stoffwechsels der salzarmen Diät in den Zellen der Macula densa keine, beziehungsweise keine mit den angewandten Methoden meßbare Veränderung erfährt.

Die in den Ratten unter salzarmer Diät stattfindende vermehrte Expression von COX-2 geht mit einer Hypertrophie der Macula densa-Zellen und somit einer vermehrt ablaufende Reninsynthese und -sekretion einher (PERSSON et al., 1991). In den Zellen des juxtaglomerulären Apparates könnte aus der daraus resultierenden Erhöhung der Proteinbiosynthese auf eine Stimulation ablaufender Methylierungsreaktionen geschlossen werden.

5.7 Nachweis der SAH-Hydrolase in den Zellkernen von Nieren verschiedener pathologischer Zustände mittels SDS-Gelelektrophorese

Nach Isolation der Zellkerne aus den Gewebeextrakten der Nieren wurden die darin enthaltenen Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Western Blot auf eine proteinbindende Oberfläche übertragen. Anschließend wurde durch immunochemische Markierung mittels eines Primärantikörpers gegen SAH-Hydrolase versucht, das Enzym in den entstandenen

Banden durch Anfärbung nachzuweisen. Es wurde ein Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierter Antikörper als Sekundärantikörper verwendet, da die anschließende Erkennung der HRP durch PAP zu einer Signalverstärkung führt. Durch die Proteindetektion mittels Peroxidasereaktion, welche deutlich sensitiver ist als die Detektion mittels Fluorescein-konjugierten Antikörpern, können auch noch bis zu 100 pg große Mengen an Antigen klar detektiert werden (TOWBIN et al., 1979).

Untersucht wurden die Zellkerne der Nieren, die sieben, beziehungsweise 14 Tage nach kontralateraler Nephrektomie verbliebenen waren, sowie solche aus Nieren hypoxisch gehaltener Versuchstiere. Als Kontrolle wurden Zellkerne normal gehaltener, gesunder Versuchstiere sowie isolierte Zellkerne hypoxischer Rattenlebern gewählt.

Im vorliegenden Versuch waren weder in den zu untersuchenden Zellkernen pathologischer Nieren, noch in denen der Kontrollen Banden zu erkennen. Das lässt darauf schließen, dass die Menge an SAH-Hydrolase im Zellkern der verschiedenen Nieren unterhalb der Nachweisgrenze dieser Methoden liegt. Dies beruht unter anderem auch auf der Tatsache, dass zudem, wie den Ergebnissen zu entnehmen ist, nicht alle Zellkerne einer Niere vermehrt SAH-Hydrolase enthalten, sondern der Enzymgehalt unter den verschiedenen Zelltypen variiert. Gut zu erkennen waren die ebenfalls als Kontrolle verwendeten Marker aus gereinigter SAH-Hydrolase, was einen Fehler im Ablauf des Versuchsgangs ausschließt und die Sensitivität und Spezifität des Antikörpers beweist. Auch in der quantitativen Proteinbestimmung nach BRADFORD, 1976, konnten ausreichende Mengen an Protein in den Zellkernen nachgewiesen werden, was gegen einen Verlust von Proteinen im Verlauf der Aufbereitung spricht.

Da durch verschiedene immunhistochemische Färbungen wiederholt SAH-Hydrolase in Zellkernen hypoxischer Nieren, sowie Nieren sieben Tage nach unilateraler Nephrektomie nachgewiesen werden konnte, ist zu vermuten, dass sich zu wenig Antigen, sprich SAH-Hydrolase, in den Zellkernen befindet, oder aber sehr viele Zellkerne isoliert werden müssen, um die SAH-Hydrolase aus diesen im Western Blot erfassen zu können.

5.8 Nachweis von SAH-Hydrolase in den Zellkernen von Nieren verschiedener pathologischer Zustände durch isoelektrische Fokussierung

Nach erneuter Zellkernisolation wurde versucht, native SAH-Hydrolase im Zellkern mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) und einem anschließenden Western Blot nachzuweisen.

Es wurden erneut die Zellkerne der verbliebenen Nieren sieben, beziehungsweise 14 Tage nach unilateraler Nephrektomie, die der hypoxisch gehaltenen, sowie die normal gehaltenen, gesunder Versuchstiere untersucht. Als Kontrolle wurden weiterhin Zellkerne hypoxischer Rattenlebern gewählt.

Dennoch waren auch mit dieser Methode nach Entwicklung der Cellulosefolie in keiner der Sparten angefärbten Banden mit, durch den Antikörper spezifisch gebundener SAH-Hydrolase zu erkennen.

Da erneut der Marker aus gereinigter SAH-Hydrolase zu erkennen war und in der quantitativen Proteinbestimmung nach BRADFORD, 1976, ausreichende Mengen an Protein in den Zellkernen nachgewiesen werden konnten, ist auch hier davon auszugehen, dass sich die in den Zellkernen enthaltenen Mengen an SAH-Hydrolase unterhalb der Detektionsgrenze der IEF befinden. Ebenfalls als eine mögliche Ursache aufzuführen ist auch hier die Tatsache nicht alle Zellkerne einer Niere vermehrt SAH-Hydrolase enthalten, sondern der Enzymgehalt unter den verschiedenen Zelltypen variiert.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung der SAH-Hydrolase in der Niere der Ratte unter Kontroll- und pathologischen Bedingungen untersucht. Das zytosolische Enzym ist in tierischem Gewebe ubiquitär vorhanden und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Transmethylierungsreaktionen des Organismus.

Die Lokalisation der SAH-Hydrolase wurde immunhistochemisch mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Markierung und einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop nachgewiesen. Dazu wurden Kryostatschnitte von Nieren männlicher Sprague-Dawley-Ratten unter Kontrollbedingungen, mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus ohne Insulinsubstitution nach 2 und 4 Wochen, 7 und 14 Tage nach unilateraler Nephrektomie, unter experimenteller Hypoxie sowie salzarmer und -reicher Diät untersucht.

Die SAH-Hydrolase konnte unter Kontrollbedingungen in den Tubuluszellen und im Glomerulum und zwar dort in den Mesangiumzellen und Podozyten, hierbei vor allem im Zytosol der Zellkörper und den Abgängen der Zellfortsätze lokalisiert werden. Es war kein Enzym in der Macula densa und in den Zellkernen nachweisbar. Unter diabetischen Bedingungen war zusätzlich 2 Wochen, jedoch nicht mehr 4 Wochen nach Diabetesbeginn, SAH-Hydrolase mit den Zellkernen der tubulären Zellen des Nierenmarks assoziiert nachweisbar. In den Nieren aus hypoxischen Bedingungen war die SAH-Hydrolase besonders in Zellkernen im Interstitium von Nierenmark und -rinde, sowie in kortikalen Tubuli lokalisiert. Auch in am 7. Tag nach unilateraler Nephrektomie entnommenen Nieren konnte die SAH-Hydrolase in den Zellkernen der proximalen und schwächer auch in denen der distalen Tubuli der Nierenrinde nachgewiesen werden. Eine Co-Lokalisation der SAH-Hydrolase mit COX-2 ließ sich auch in der Macula densa von Nieren nach 7-tägiger salzarmer Diät nicht nachweisen. Mit dem Western Blot ließ sich kein SAH-Hydrolase-Protein aus den Zellkernen von Kontrollnieren und Nieren der verschiedenen pathologischen Zustände nachweisen.

7 Literaturverzeichnis

Akamatsu Y., Law J.H. (1970)

The enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters by carboxyl group alkylation
J Biol Chem 245, 709- 713

Anagnostou A., Liu Z., Steiner M., Chin K., Lee E.S., Kessimian N., Noguchi
C.T. (1994)

Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells
Proc Natl Acad Sci 91, 3974- 3978

Angielski S., Jakubowski Z., Pawelczyk T., Piec G., Redlak M. (1989)

Renal handling and metabolism of adenosine in diabetic rats
Contrib Nephrol 73, 52- 58

Bachmann S., Le Hir M., Eckardt K.-U. (1993)

Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase
immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts
produce erythropoietin
J Histochem Cytochem 41, 335- 341

Baer H.P., Drummond G.I., Duncan E.L. (1966)

Formation and deamination of adenosine by cardiac muscle enzymes
Mol Pharmacol 1, 67- 76

Banfic H., Gatalica Z. (1989)

Plasma from uninephrectomized rats stimulates phospholipid methylation and
arachidonic acid release in renal-cortical slices
Biochem J 260, 365- 369

Bennett R.A., Pegg A.E. (1981)

Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin
Cancer Res 41, 2786- 2790

Bertoluci M.C., Schmid H., Lachat J.J., Coimbra T.M. (1996)

Transforming growth factor-beta in the development of rat diabetic nephropathy.
A 10-month study with insulin-treated rats
Nephron 74, 189- 196

Boers G.H., Smals A.G., Trijbels F.J., Fowler B., Bakkeren J.A.,
Schoonderwaldt H.C., Kleijer W.J., Kloppenborg P.W. (1985)

Heterozygosity for homocysteinuria in premature peripheral and cerebral
occlusive arterial disease
New Engl J Med 313 (12), 709- 715

Böhm B.O. (2001)

Klinische Diabetologie
Springer, Berlin, Heidelberg 173- 178

Bondurant M.C., Koury M.J. (1986)

Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver
Mol Cell Biol 6 (7), 2731- 2733

Bradford M.M. (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

Broch O.J., Ueland P.M. (1980)

Regional and subcellular distribution of S-adenosylhomocysteine hydrolase in
the adult rat brain
J Neurochem 35 (2), 484- 488

Brown G.M., Attardi G. (1965)

Methylation of nucleic acids in Hela cells

Biochem Biophys Res Commun 20, 298- 302

Buddecke E. (1994)

Grundriss der Biochemie: Für Studierende der Medizin, Zahnmedizin und
Naturwissenschaften

Walter de Gruyter, Berlin; New York 9.neubearbeitete Auflage, 92

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

Cantoni G.L. (1952)

The nature of the active methyl donor formed enzymatically from L-methionine
and adenosinetriphosphate

J Am Chem Soc 74, 2942- 2943

Cantoni G.L. (1975)

Biological methylation: selected aspects

Ann Rev Biochem 44, 435- 451

Cantoni G.L., Chiang P.K., Cavallini D., Gaull G.E., Zappia V. (1980)

The role of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase in
the control of biological methylations

Natural sulfur compounds: novel biochemical and structural aspects. Plenum
Press, New York and London, 67- 80

Cantoni G.L., Scarano E. (1954)

The formation of S-adenosylhomocysteine in enzymatic transmethylation reactions

J Am Chem Soc 76, 4744

Castrop H., Schweda F., Schumacher K., Wolf K., Kurtz A. (2001)

Role of cyclooxygenase-2 for renal vascular resistance and macula densa control of renin

J Am Soc Nephrol 12, 867- 874

Celsi G., Jacobsson B., Aperia A. (1986)

Influence of age on compensatory renal growth in rats

Pediatr Res 20 (4), 347- 350

Chiang P.K., Gordon R.K., Tal J., Zeng G.C., Doctor B.P., Pardhasaradhi K., McCann P.P. (1996)

S-adenosylmethionine and methylation

FASEB- J 10, 471- 480

Chiang P.K., Richards H.H., Cantoni G.L. (1977)

S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase: analogues of S-adenosyl-L-homocysteine as potential inhibitors

Mol Pharmacol 13, 939- 947

Collis M.G., Hourani S.M.O. (1993)

Adenosin receptor subtypes

TIPS 14, 360- 366

Cooper G.C. (1981)

Biochemische Arbeitsmethoden

Walter de Gruyter, Berlin, New York 1.Aufl., 179- 192

Cortes P., Mendez M., Riser G.L., Guerin L.J., Rodriguez-Barbero A., Hassett C., Yee J. (2000)

F-actin fiber distribution in glomerular cells: structural and functional implications

Kidney int 58, 2452- 2461

Coulter-Karis D.E., Hershfield M.S. (1989)

Sequence of full length cDNA for human S-adenosylhomocysteine hydrolase

Ann Hum Genet 53, 169- 175

Cox R., Prescott C., Irving C.C. (1977)

The effect of S-adenosylhomocysteine on DNA methylation in isolated rat liver nuclei

Biochim Biophys Acta 474, 493- 499

Da Silva J.L., Schwartzman M.L., Goodman A., Levere R.D., Abraham N.G. (1994)

Localization of erythropoietin mRNA in the rat kidney by polymerase chain reaction

J Cell Biochem 54, 239- 246

D'Agord-Schaan B., Lacchini S., Bertoluci M.C., Irigoyen M.C., Machado U.F., Schmid H. (2001)

Increased renal GLUT1 abundance and urinary TGF-beta 1 in streptozotocin-induced diabetic rats: implications for the development of nephropathy complicating diabetes

Horm Metab Res 33, 664- 669

De la Haba G., Agostini S., Bozzi A., Unson C., Cantoni G.L. (1986)

S-adenosylhomocysteinease: mechanism of reversible and irreversible inactivation by ATP, cAMP and 2'deoxyadenosine

Biochemistry 25, 8337- 8342

De la Haba G., Cantoni G.L. (1959)

The enzymatic synthesis of S-adenosylhomocysteine from adenosine and homocystein

J Biol Chem 234, 603- 608

Deguchi T., Barchas J. (1971)

Inhibition of transmethylations of biogenic amines by S-adenosylhomocysteine

J Biol Chem 246, 3175- 3181

Desroisiers R., Friderici K., Rottman F. (1974)

Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells

Proc Natl Acad Sci 71 (10), 3971- 3975

Doskeland S.O., Ueland P.M. (1982)

Comparison of some physicochemical and kinetic properties of S-adenosylhomocysteine hydrolase from bovine liver, bovine adrenal cortex and mouse liver

Biochim Biophys Acta 708, 185- 193

Duerre J.A., Miller C.H., Reams G.G. (1969)

Metabolism of S-adenosyl-L-homocysteine in vivo by the rat

J Biol Chem 244, 107- 111

Ebert B.L., Bunn H.F. (1999)

Regulation of the erythropoietin gene

Blood 94, 1864- 1877

Eckardt K.-U., Koury S.T., Tan C.C., Schuster S.J., Kaissling B., Ratcliffe P.J., Kurtz A. (1993)

Distribution of erythropoietin producing cells in rat kidneys during hypoxic hypoxia

Kidney Int 43, 815- 823

Eckardt K.-U., Kurtz A., Bauer C. (1989)

Regulation of erythropoietin production is related to proximal tubular function

Am J Physiol 256, F 942- F 947

Elias H., Henning A. (1967)

Stereology of the human renal glomerulus.

In: Quantitative methods in morphology (eds. Weibel E., Elias H.)

Springer Verlag, Berlin, 130- 166

Eloranta T.O. (1977)

Tissue distribution of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in the rat

Biochem J 166, 521- 529

Eloranta T.O., Kajander E.O., Raina A.M. (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

Fava de Moraes F., Zangheri E.O., Doine A.I. (1979)

Immunohistochemical localization of erythropoietin in the rat and mouse submandibular gland

Histochem J 11, 97- 102

Finkelstein J.D., Harris B. (1973)

Methionine metabolism in mammals: synthesis of S-adenosylhomocysteine in rat tissue

Arch Biochem Biophys 159, 160- 165

Finkelstein J.D., Kyle W.E., Harris B.J. (1974)

Methionine metabolism in mammals: regulatory effects of S-adenosylhomocysteine

Arch Biochem Biophys 165, 774- 779

Fisher J.W., Koury S., Ducey T., Mendel S. (1996)

Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys

Br J Haematol 95, 27- 32

Flöge J., Hudkins K.L., Seifert R.A., Francki A., Bowen-Pope D.F., Alpers C.E. (1997)

Localization of PDGF alpha-receptor in the developing and mature human kidney

Kidney Int 51, 1140- 1150

Foreman J.W., Wald H., Blumberg G., Pepe L.M., Segal S. (1982)

Homocystine uptake in isolated rat renal cortical tubules

Metabolism 31, 613- 619

Fox I.H., Kelley W.N. (1978)

The role of adenosine and 2'deoxyadenosine in mammalian cells

Ann Rev Biochem 47, 655- 686

Fredholm B.B., Sollevi A. (1981)

The release of adenosine and inosine from canine subcutaneous adipose tissue by nerve stimulation and noradrenaline

J Physiol 313, 351- 367

- Fu W., Dudman N.P.B., Perry M.A., Young K., Wang X.L. (2000)
Interrelations between plasma homocysteine and intracellular S-adenosylhomocysteine
Biochem Biophys Res Commun 271, 47- 53
- Fujioka M., Takata Y. (1981)
S-adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver. Purification and some properties
J Biol Chem 256, 1631- 1635
- Fukada Y., Matsuda T., Kokame K., Takao T., Shimonishi Y., Akino T., Yoshizawa T. (1994)
Effects of carboxylmethylation of photoreceptor G protein gamma-subunit in visual transduction
J Biol Chem 269, 5163- 5170
- Fukushima Y., Yanagisawa M., Nakamoto Y., Miura A.B. (1990)
Localization of renal erythropoietin and the role of Ia antigen expression in hypoxic rat glomeruli
Tohoku J Exp Med 160, 129- 140
- Geraci D., Eremenko T., Cocchiara R., Granieri A., Scarano E., Volpe P. (1974)
Correlation between synthesis and methylation of DNA in HeLa cells
Biochem Biophys Res Commun 57, 353- 358
- Guder W.G., Ross B.D. (1984)
Enzyme distribution along the nephron
Kidney Int 26, 101- 111

Guldberg H.C., Mardsen C.A. (1975)

Catechol-O-methyl-transferase (COMT): pharmacological aspects and physiological role

Pharm Rev 27, 135- 206

Haidar M.A., Loya F., Yang Y., Lin H., Glassmann A., Goldwasser E., Albitar M. (1997)

Electron microscopic localization of lacZ expression in the proximal convoluted tubular cells of the kidney in transgenic mice carrying chimeric erythropoietin/lacZ gene constructs

J Struct Biol 118, 220- 225

Hansen A.P. (1970)

Abnormal serum growth hormone response to exercise in juvenile diabetics

J Clin Invest 49, 1467- 1478

Harris R.C., McKanna J.A., Akai Y., Jacobson H.R., Dubois R.N. (1994)

Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction

J Clin Invest 94, 2504- 2510

Hershfield M.S. (1978)

Human cytoplasmic adenosine binding proteine. Identification as S-adenosylhomocysteinase

Fed Proc 37, 1466

Hershfield M.S., Francke U. (1982)

The human genes for S-adenosylhomocysteine hydrolase and ADA are syntenic on chromosome 20

Science 216, 739- 742

Hershfield M.S., Kredich N.M. (1978)

S-adenosylhomocysteine hydrolase is an adenosine-binding-protein: a target for adenosine toxicity

Science 202, 757- 760

Hershfield M.S., Kredich N.M., Ownby D.R., Buckley R. (1979)

In vivo inactivation of erythrocyte S-adenosylhomocysteine hydrolase by 2'deoxyadenosine in adenosine deaminase-deficient patients

J Clin Invest 63, 807- 811

Hirata F., Axelrod J. (1980)

Phospholipid methylation and biological signal transmission

Science 209, 1082- 1090

Hoffman J.L. (1980)

The rate of transmethylation in mouse liver as measured by trapping S-adenosylhomocysteine

Arch Biochem Biophys 205, 132- 135

Holbrook I.B., Leaver A.G. (1976)

A procedure to increase the sensitivity of staining by Coomassie Brilliant Blue G250-perchloric acid solution

Anal Biochem 75, 634- 636

Horikawa S., Ozasa H., Ota K., Tsukada K. (1993)

Immunohistochemical analysis of rat S-adenosylmethionine synthetase isoenzymes in developmental liver

FEBS Lett 330 (3), 307- 311

Hoshi S., Shu Y., Yoshida F., Inagaki T., Sonoda J., Watanabe T., Nomoto K., Nagata M. (2002)

Podocyte injury promotes progressive nephropathy in Zucker diabetic fatty rats
Lab Invest 82, 25- 35

Hübner K. (1967)

Kompensatorische Hypertrophie, Wachstum und Regeneration der Rattenniere
Ergebn Path Anat 48, 1- 80

Hugo C., Shankland S.J., Bowen-Pope D.F., Cuoser W.G., Johnson R.J. (1997)

Extraglomerular origin of mesangial cell after injury
J Clin Invest 100, 786- 794

Hurwitz J., Gold M., Anders M. (1964)

The enzymatic methylation of ribonucleic acid and desoxyribonucleic acid
J Biol Chem 239, 3474- 3482

Ichihara A., Imig J.D., Navar G. (1999)

Cyclooxygenase-2 modulates afferent arteriolar responses to increases in pressure
Hypertension 34 (2), 843- 847

Ikeda M., Suzuki M., Miyazaki K., Takeuchi Y., Yamaguchi Y., Sakai S., Kawaguchi Y., Sakai O. (1993)

Glomerular growth in the remnant kidney after a contralateral nephrectomy
Nephron 65, 95- 99

Johnson H.A. (1969)

Cytoplasmic response to overwork
Compensatory renal hypertrophy, N.Y., Academic Press, 1- 9

Kajandar E.O., Raina A.M. (1981)

Affinity-chromatographic purification of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase.

Some properties of the enzyme from rat liver

Biochem J 193, 503- 512

Karnovsky M.J (1979)

The ultrastructure of glomerular filtration

Ann Rev Med 30, 213- 224

Keller, M. (1980)

Histoautoradiographische Untersuchungen mit ³H- Thymidin zum kompensatorischen Nierenwachstum bei Ratten nach unilateraler Nephrektomie mit und ohne Thermokoagulation des Ductus thoracicus vor dessen Einmündung in den linken Ventrikel

Med Diss

Kerr S.J., Borek E. (1972)

The tRNA methyltransferases

Adv Enzymol 36, 1- 27

Killen P.D., Striker G.E. (1979)

Human glomerular visceral epithelial cells synthesize a basal lamina collagen in vitro

Proc Natl Acad Sci 76, 3518- 3522

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, 100- 108

Kloor D., Stumvoll W., Faust B., Delabar U., Mühlbauer B., Osswald H. (2002)
Does S-adenosylhomocysteine (SAH) accumulate in the ischemic rat kidney?
Naunyn Schmiedeb Arch Pharmacol 353, R 11

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

Koury M.J., Bondurant M.C. (1990)
Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed cell death in
erythroid progenitor cells
Science 248, 378- 381

Koury S.T., Bondurant M.C., Koury M.J. (1988)
Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ
hybridization
Blood 71, 524-527

Koury S.T., Bondurant M.C., Koury M.J., Semenza G.L. (1991)
Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ
hybridization
Blood 77, 2497- 2503

Krantz S.B. (1991)
Erythropoietin
Blood 77, 419- 434

Kredich N.M., Martin D.W.Jr. (1977)
Role of S-adenosylhomocysteine in adenosine-mediated toxicity in cultured
mouse T-Lymphoma cells
Cell 12, 931- 938

Kriz W., Elger M., Mundel P., Lemley K.V. (1995)

Structure-stabilizing forces in glomerular tuft

J Am Soc Nephrol 5, 1731- 1739

Lacombe C., Da Silva J.-L., Bruneval P., Fournier J.-G., Wendling F.,

Casadevall N., Camillieri J.-P., Bariety J., Varet B., Tambourin P. (1988)

Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney

J Clin Invest 81, 620- 623

Laemmli, U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4

Nature 227, 680- 685

Latta H., Maunsbach A.B., Madden S.C. (1960)

The centrolobular region of the renal glomerulus studied by electron microscopy

J Ultrastruct Res 4, 455- 472

Lloyd H.G., Deussen A., Wuppermann H., Schrader J. (1988)

The transmethylation pathway as a source for adenosine in the isolated guinea pig heart

Biochem J 252, 489- 494

Löffler G., Petrides P.E. (1998)

Biochemie und Pathobiochemie

Springer, Berlin, Heidelberg 6. Auflage, 559

Loya F., Yang Y., Lin H., Goldwasser E., Albitar M. (1994)

Transgenic mice carrying the epo gene promotor linked to lacZ express the reporter in proximal convoluted tubule cells after hypoxia

Blood 84, 1831- 1836

Maxwell A.P., Lappin T.R., Johnston C.F., Bridges J.M., McGeown M.G. (1990)
Erythropoietin production in kidney tubular cells
Br J Haematol 74, 535- 539

Maxwell P.H., Osmond M.K., Pugh C.W., Heryet A., Nicholls L.G., Tan C.C.,
Doe B.G., Ferguson D.J.P., Johnson M.H., Ratcliffe P.J. (1993)
Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice
Kidney Int 44, 1149- 1162

Mayer, T.E. (1994)
S-adenosylhomocystein Hydrolase in der Niere: Reinigung, Charakterisierung,
Gewebsverteilung und funktionelle Regulation
Biol Diss

Mené P., Simonson M.S., Dunn M.J. (1989)
Physiology of the mesangial cell
Physiol Rev 69, 1347- 1424

Miller C.H., Duerre J.A. (1969)
Oxidative deamination of S-adenosyl-L-homocysteine by rat kidney L-amino
acid oxidase
J Biol Chem 244, 4273- 4276

Mogensen C.E., Andersen M.J.F. (1973)
Increased kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes
Diabetes 22 (9), 706- 712

Mudd S.H., Finkelstein J.D., Irreverre F., Laster L. (1965)
Transsulfuration in mammals: microassays and tissue distribution of three
enzymes of the pathway
J Biol Chem 240, 4382- 4392

- Müller T., Woitalla D., Hauptmann B., Fowler B., Kuhn W. (2001)
Decrease of methionine an S- adenosylmethionine and increase of
homocysteine in treated patients with Parkinson's disease
Neurosci Lett 308, 54- 56
- Mundel P., Bachmann S., Bader M., Fischer A., Kummer W., Mayer B., Kriz W.
(1992)
Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells
Kidney Int 42, 1017- 1019
- Mundel P., Gilbert P., Kriz W. (1991)
Podocytes in glomerulus of rat kidney express a characteristic 44 kD protein
J Histochem Cytochem 39, 1047- 1056
- Mundel P., Heid H.W., Mundel T., Krüger M., Reiser J., Kriz W. (1997)
Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal
podocytes
J Cell Biol 139, 193- 204
- Mundel P., Kriz W. (1995)
Structure and function of podocytes: an update
Anat Embryol 192, 385- 397
- Nantel F., Meadows E., Denis D., Connoly B., Metters K.M., Giaid A. (1999)
Immunolocalization of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human elderly
FEBS Lett 457, 475- 477
- Needleman P., Turk J., Jakschik B.A., Morrison A.R., Lefkowitz J.B. (1986)
Arachidonic acid metabolism
Annu Rev Biochem 55, 69- 102

Norman J.T. (1991)

Regulation of gene expression in renal compensatory growth

Am J Kidney Dis 17, 638- 640

Norman J.T., Hardy D. (1994)

Post-transcriptional regulation of gene expression in compensatory renal hypertrophy

Exp Nephrol 2, 30- 39

Olbricht C.J. (1992)

Distribution of cathepsins B and L in the kidney and their role in tubular protein absorption

Eur J Clin Chem Clin Biochem 30, 675- 681

Olivetti G., Anversa P., Rigamonti W., Vitali-Mazza L., Loud A.V. (1977)

Morphometry of renal corpuscle during normal postnatal growth and compensatory hypertrophy- a light microscopy study

J Cell Biol 75, 573- 585

Osswald H. (1984)

The role of adenosine in the regulation of glomerular filtration rate and renin secretion

TIPS 5, 94- 97

Osswald H., Mühlbauer B., Schenk F. (1991)

Adenosine mediates tubuloglomerular feedback response: an element of metabolic control of kidney function

Kidney Int 32, S 128- S 131

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

Osswald H., Schmitz H.J., Heidenreich O. (1975)

Adenosin response of the rat kidney after saline loading, sodium restriction and hemorrhagia

Pflügers Arch 357, 323- 333

Osswald H., Schmitz H.J., Kemper R. (1977)

Tissue content of adenosine, inosine and hypoxanthine in rat kidney after ischemia and postischemic recirculation

Pflügers Arch 371, 45- 49

Osterby R., Gundersen H.J.G. (1975)

Glomerular size and structure in diabetes mellitus. I. Early abnormalities.

Diabetologia 11, 225- 229

Pagel H., Jelkmann W., Weiss C. (1991)

Isolated serum-free perfused rat kidneys release immunoreactive erythropoietin in response to hypoxia

Endocrinology 128, 2633- 2638

Pagtalunan M.E., Miller P.L., Jumping-Eagle S., Nelson R.G., Myers B.D.,

Rennke H.G., Coplon N.S., Sun L., Meyer T.W. (1997)

Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes

J Clin Invest 99, 342- 348

Paik W.K., Kim S. (1975)

Protein methylation: chemical, enzymological, and biological significance

Adv Enzymol 42, 227- 286

- Palmer J.L., Abeles R.H. (1979)
The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase
J Biol Chem 254, 1217- 1226
- Palmer J.L., Abeles R.H. (1976)
Mechanism for enzymatic thioether formation
J Biol Chem 251, 5817- 5819
- Paul P., Rothmann S.A., Meagher R.C. (1988)
Modulation of erythropoietin production by adenosine
J Lab Clin Med 112 (2), 168- 173
- Pavenstädt H. (2000)
Roles of the podocyte in glomerular function
Am J Physiol Renal Physiol 278, F 173- F 179
- Pawlowksa D., Stepinski J., Rekowski P., Kupryszewski G., Angielski S. (1987)
ANF natriuresis is accompanied by an increase in urinary adenosine excretion
10th int. Contr. Nephrology, London, 205
- Perna A.F., Ingrosso D., Galetti P., Zappia V., De Santo N.G. (1996)
Membrane protein damage and methylation reactions in chronic renal failure
Kidney Int 50, 358- 366
- Perry R.P., Kelley D.E. (1974)
Existence of methylated messenger RNA in mouse L cells
Cell 1, 37- 42
- Persson A.E.G., Salomonsson M., Westerlund P., Greger R., Schlatter E.,
Gonzalez E. (1991)
Macula densa cell function
Kidney Int 39 (S 32), S 39- S 44

Peterkofsky A., Litwack M, Marmer J. (1971)

Modified bases and transfer RNA function

Cancer Res 31, 675- 678

Pfaff I.L., Wagner H.-J., Vallon V. (1999)

Immunolocalization of proteinkinase C isoenzymes alpha, β I and β II in rat kidney

J Am Soc Nephrol 10, 1861- 1873

Pfaller W., Seppi T., Ohno A., Giebisch G., Beck F.X. (1998)

Quantitative morphology of renal cortical structures during compensatory hypertrophy

Exp Nephrol 6, 308- 319

Pogribna M., Melnyk S., Pogribny I., Chango A., Yi P., James S.J. (2001)

Homocysteine in children with Down syndrome: in vitro modulation

Ann J Hum Genet 69, 88- 95

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, 4283- 4298

Ratcliffe P.J., Jones R.W., Philipps R.E., Nicholls L.G., Bell J.I. (1990)

Oxygen-dependent modulation of erythropoietin mRNA levels in the isolated rat kidneys studied by Rnase protection

J Exp Med 172, 657- 660

Reisner A.H., Nemes P., Bucholtz C. (1975)

The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels

Anal Biochem 64, 509- 516

- Ring K.S., Benson M.C., Bandyk M.G., Sawczuk I.S. (1992)
Detection of cellular proliferation during compensatory renal growth using flow cytometry
Nephron 61, 200- 203
- Rodriguez F., Llinás M.T., González J.D., Salazar F.J. (1999)
Renal changes induced by cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition during normal and low sodium intake
FASEB- J 13, A 721
- Ross J., Goldman J.K. (1971)
Effect of streptozotocin-induced diabetes on kidney weight and compensatory hypertrophy in the rat
Endocrinology 88, 1079- 1082
- Sarre H., Gessler U., Seybold D. (1988)
Nierenkrankheiten- Physiologie, Pathophysiologie, Untersuchungsmethoden, Klinik und Therapie
Thieme, Stuttgart, New York 5. Auflage, 667
- Schatz R.A., Vunnam C.R., Sellinger, O.Z. (1977)
Species and tissue differences in the catabolism of S-adenosyl-L-homocysteine: A quantitative, chromatographic study
Life Sci 20, 375- 384
- Schmid H., Koop M., Utermann S., Lambacher L., Mayer P., Schäfer L. (1997)
Specific catalytic activity of cathepsin S in comparison to cathepsins B and L along the rat nephron
Biol Chem 378, 61- 69

Schmid H., Scholz M., Mall A., Schmidt U., Guder W.G., Dubach U.C. (1978)
Carbohydrate metabolism in rat kidney: heterogeneous distribution of glycolytic
and gluconeogenic key enzymes

Curr Probl Clin Biochem 8, 282- 289

Schrader J. (1983)

In: Regulatory function of adenosine (eds. Berne R.M., Rall T.W., Rubio R.)

Martinus Nijhoff, Boston, 133- 135

Schuster S.J., Koury S.T., Bohrer M., Salceda S., Caro J. (1992)

Cellular sites of extrarenal and renal erythropoietin production in anaemic rats

Br J Haematol 81 (2), 153- 159

Schuster S.J., Wilson J.H., Erslev A.J., Caro J. (1987)

Physiologic regulation and tissue localisation of renal erythropoietin messenger
RNA

Blood 70, 316- 318

Seyer-Hansen K. (1976)

Renal hypertrophy in streptozotocin-diabetic rats

Clin Sci Mol Med 51, 551- 555

Seyer-Hansen K., Hansen J., Gundersen H.J.G. (1980)

Renal hypertrophy in experimental diabetes

Diabetologia 18, 501- 505

Smolenski R.T., Montero C., Duley J.A., Simmonds H.A. (1991)

Effects of adenosine analogues on ATP concentrations in human erythrocytes.

Further evidence for a route independent of adenosine kinase

Biochem Pharmacol 42, 1767- 1773

Stiles G.L. (1992)

Adenosine receptors

J Biol Chem 267, 6451- 6454

Stumvoll W. (1998)

S-Adenosyl-L-Homocystein Hydrolase, S-adenosyl-L-Homocystein und S-Adenosyl-L-Methionin in der Niere und Leber der Ratte: Einfluß von Hypoxie und experimentellem Diabetes

Med Diss

Svensson H. (1962)

Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradient

Acta Chem Scand 16, 456- 466

Tinton S., Buc-Calderon P. (1995)

Homocysteine enhances the inhibitory effect of extracellular adenosine on the synthesis of proteins in isolated rat hepatocytes

Biochem J 310, 893- 896

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

Ueland P.M. (1982)

Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase

Pharmacol Rev 34, 223- 253

- Ueland P.M., Berge R.K., Saebo J., Farstad M. (1979)
S-adenosylhomocysteine hydrolase in human and rat liver is localized to the
cytosol fraction of the tissue homogenate
FEBS Lett 101, 184- 186
- Usdin E., Borchardt R.T., Creveling C.R. (1979)
Transmethylation
Elsevier North Holland, New York
- Vanyushin B.F., Tkacheva S.G., Belozersky A.N. (1970)
Rare bases in animal DNA
Nature 225, 948- 949
- Vaughan M.H. Jr., Soeiro R., Warner J.R., Darnell J.E. Jr. (1967)
The effects of methionine deprivation on ribosome synthesis in HeLa cells
Proc Natl Acad Sci 58, 1527- 1534
- Wakui H., Komatsuda A., Itoh H., Kobayashi R., Nakamoto Y., Miura A.B.
(1992)
Renal argininosuccinate synthetase: purification, immunohistochemical
localization, and elastin-binding property
Renal Physiol Biochem 15, 1- 9
- Walker R.D., Duerre J.A. (1975)
S-Adenosylhomocysteine metabolism in various species
Can J Biochem 53, 312- 319
- Wedlich D., Dreyer C. (1988)
Cell specificity of nuclear protein antigens in the development of *Xenopus*
species
Cell Tissue Res 252, 479- 489

Wenger R.H., Gassmann M. (1997)

Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1

Biol Chem 278, 609- 616

Westenfelder C., Biddle D.L., Baranowski R.L. (1999)

Human, rat and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors

Kidney Int 55, 808- 820

Wilcken D.E.L., Wilcken B. (1976)

The pathogenesis of coronary artery disease: a possible role for methionine metabolism

J Clin Invest 57, 1079- 1082

Zappia V., Zydeck-Cwick C.R., Schlenk F. (1969)

The specificity of S-adenosylmethionine derivatives in methyl transfer reactions

J Biol Chem 244, 4499- 4509

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Doris Kloor für die Einweisung in das Thema und die in jeder Hinsicht hervorragende Betreuung und Hilfe bei der Anfertigung der Arbeit, sowie ihrer stets freundlichen, offenen und unkomplizierten Art im Umgang mit ihren Doktoranden und Mitarbeitern.

Herrn Prof. Dr. H. Oßwald danke ich für die Bereitstellung des Themas, die sehr guten Arbeitsmöglichkeiten am Pharmakologischen Institut und die Bereicherungen durch wissenschaftliche Diskussionen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Renate Riehle für Einweisung in die verschiedenen analytischen Verfahren und zusätzlich bei Marina Hermes, Marcus Rübiger und Timo Rieg für die Hilfe bei allen größeren und kleineren Problemen und vor allem für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor.

Bei Frau Elke Zabinsky bedanke ich mich für die Anfertigung der Kryostatschnitte und die Demonstration des Vorgehens am Mikrotom.

Mein Dank gilt weiterhin insbesondere Herrn Dr. Andreas Mack für die kompetente Betreuung am LSM bei der Erstellung der Bilder, sowie für die Unterstützung und die zahlreichen Anregungen bei der Bearbeitung der Abbildungen.

Frau PD Dr. H. Schmid danke ich für die Zweitkorrektur und die weiteren Denkanstöße und Hilfestellungen, sowie ihre weiterführenden Einblicke in andere Gebiete der Forschung an der Niere.

Lebenslauf

Name: Fink

Vorname: Katrin Susanne

Geburtsdatum: 27. 10. 1977

Geburtsort: Reutlingen

Eltern: Werner und Eva- Maria Fink, geb. Siegert

1984- 88 Grundschule in Reutlingen- Betzingen

1988- 97 Johannes- Kepler- Gymnasium Reutlingen

Oktober 1997 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-
Karls- Universität Tübingen

31. 08. 1999 Ärztliche Vorprüfung

20. 09. 2000 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

April 2001 Beginn der vorliegenden Arbeit am Pharmakologischen
Institut der Universität Tübingen

17. 09. 2003 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

30. 11. 2004 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Tübingen, 02. 01. 2005