

Zellvolumen-abhängige Regulation des hepatischen Methyl- und Cholinstoffwechsels

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von
Lars Hoffmann
aus Neuss

August
2008

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie des Universitätsklinikums
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Referent: PD Dr. med. B.C. Schwahn
Koreferent: Prof. Dr. D. Willbold
Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2008

Für meine Eltern

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Düsseldorf, August 2008

Teile dieser Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht

Schäfer C, Hoffmann L, Heldt K, Lornejad-Schäfer MR, Brauers G, Gehrmann T, Brauers G, Garrow TA, Häussinger D, Mayatepek E, Schwahn BC, Schliess F:
Osmotic regulation of betaine homocysteine-S-methyltransferase expression in H4IIE rat hepatoma cells.
Am J Physiol American Journal of Gastrointest Liver Physiology 292: G1089-G1098, 2007

Hoffmann L, Gehrmann T, Brauers G, Mayatepek E, Schliess F, Schwahn BC:
Osmotic regulation of the hepatic choline degrading pathway.
In Vorbereitung

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Herrn PD Dr. med. Bernd C. Schwahn und Herrn Prof. Dr. med. Ertan Mayatepek betreut.

Die experimentellen Arbeiten wurden im Stoffwechsellabor der Klinik für Allgemeine Pädiatrie der Universitätsklinik der Heinrich Heine Universität Düsseldorf sowie im Microarraylabor des Biomedizinischen Forschungszentrums der Heinrich Heine Universität Düsseldorf durchgeführt.

Ich danke Herrn PD Dr. med. Bernd Schwahn und Herrn Prof. Dr. med. Ertan Mayatepek dafür, dass ich an diesem Interessanten und methodisch abwechslungsreichen Thema arbeiten konnte und für die wertvolle Unterstützung auch über Ländergrenzen hinweg.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Willbold für die Übernahme der zweiten Korrektur und Begutachtung dieser Arbeit.

Ich danke meinen Kollegen Fr. Dr. med. Katrin Heldt, Dr. Gernot Brauers und Fr. Dr. med. Nina Brauer für ihre Unterstützung im Labor.

Ich danke meinen lieben Kolleginnen Martina Müller und Elke Diekmann für die viele schönen Momente im grauen Laboralltag, für die lehrreichen Momente in Sachen Personalführung, für die lustigen Momente im Aufenthaltsraum und für die vielen Katzengeschichten.

Ich danke Herrn Dr. Michael Gombert für die gründliche Durchsicht dieser Arbeit sowie für seine Hilfe bei meinen Auseinandersetzungen mit diversen Microsoft Produkten.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Thor Gehrman, Dr. Thomas Marx, Dr. Antje Lindecke und Dipl. Ing. Jürgen Mehrens für ihre große Hilfe bei meinen Realtime und Microarray Versuchen.

Ich danke Herrn PD Dr. Schliess für die große Hilfe bei der Erstellung der Veröffentlichungen und der kritischen Begutachtung der Ergebnisse und Fr. Dr. Lisa Richter für ihre Hilfe in Sachen Zellkultur und wenn ich mal wieder Medium brauchte.

Ich danke Frau Vanessa Horstmann für ihren großartigen Einsatz bei der Isolation der primären Hepatozyten.

Nicht zuletzt danke ich meine lieben Eltern Inge und Wolfgang Hoffmann, die mir nicht nur stets mit Rat und Tat zu Seite standen, sondern mir in jeder Hinsicht den Rücken gestärkt und alle meine Entscheidungen unterstützt und respektiert haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Das Konzept der hepatischen Osmoregulation	3
1.2	Organische Osmolyte	5
1.3	Der Cholinstoffwechsel.....	7
1.4	Bisherige Erkenntnisse zur osmosensitiven Regulation der hepatischen Genexpression.....	10
1.5	Zielsetzung.....	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Puffer und Lösungen	14
2.2	Medien und Zusätze	15
2.3	Geräte	15
2.4	Arbeitsmodelle.....	16
2.4.1	H4IIE Rattenhepatomzelllinie.....	16
2.4.2	MTHFR defiziente Mauslinie	17
2.4.3	Primäre Maushepatozyten	18
2.4.4	E.coli – Bakterien	18
2.5	Zellkultur	18
2.5.1	Kultivierung der Zellen	18
2.5.2	Osmolarität der Medien	19
2.5.3	Inhibitoren	19
2.5.4	Alternative Osmolyte.....	20
2.5.5	Einfrieren und Auftauen von H4IIE - Zellen	20
2.5.6	Kultur primärer Maushepatozyten	21
2.5.7	mRNA Stabilitätsassay	21
2.5.8	Magnetofektion	22
2.5.9	Vitalitätsmessung mittels MTT-Assay	22
2.6	Molekulargenetische Analysen	23
2.6.1	Primer für die Expressionsanalysen	23
2.6.2	RNA Isolation aus H4IIE Zellen und primären Hepatozyten	24
2.6.3	RNA Isolation aus Lebergewebe	24
2.6.4	DNA Isolation aus Mausschwanzspitzen	25
2.6.5	RT PCR zur Herstellung fluoreszenzmarkierter cDNA.....	25
2.6.6	Plasmide	26
2.6.7	Plasmidpräparation aus E.coli	27
2.6.8	Nukleinsäurequantifizierung mittels Spektral-Photometer	27
2.6.9	Bestimmung der Mausgenotypen mittels multiplex PCR	27
2.6.10	Primer für die Genotypisierung der MTHFR-Mäuse.....	28
2.6.11	Bestimmung der Genexpression mittels Realtime PCR.....	28
2.6.12	Expressionsscreening mittels DNA Microarrays	30
2.7	Proteinanalysen.....	31
2.7.1	Antikörper für Immunodetektion.....	31
2.7.2	Lysatherstellung für die Messung in der Tandem MS	31
2.7.3	Aufarbeitung von Lebergewebeproben für die Messung in der Tandem MS	32
2.7.4	Lysatherstellung für Westernblot Analysen.....	32
2.7.5	Proteinfraktionierung.....	32
2.7.6	SDS-PAGE	33
2.7.7	Westernblot und Immunodetektion	33
2.7.8	Metabolitenmessungen mittels Tandemmassenspektrometer	34
2.7.9	Dual-Luciferase Assay im Luminometer	35
2.8	Arbeiten am Tier	36
2.8.1	Probengewinnung.....	36
2.8.2	Isolation primärer Hepatozyten durch Perfusion mit Kollagenase.....	36
2.8.3	Bestimmung der Proteolyserate in perfundierten Mauslebern	37

2.9	Auswertung.....	37
2.9.1	Software und Datenanalyse.....	37
2.9.2	Statistik	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Vitalität der H4IIE Zellen unter Anisoosmolarität.....	38
3.2	Quantifizierung der mRNA Konzentration in H4IIE-Zellen mittels Realtime PCR	40
3.2.1	Cholindegradation.....	40
3.2.2	Phosphatidylcholinsynthese über den Kennedy Weg	41
3.2.3	Phosphatidylcholinsynthese über den PEMT Weg	42
3.2.4	Transsulfurierung und folsäureabhängige Remethylierung	42
3.3	Sensitivität der Zellvolumen-vermittelten Regulation	44
3.4	Einfluss der Umgebungsoosmolarität auf die Stabilität der mRNA	45
3.5	Osmolytabhängigkeit der Genexpression.....	47
3.6	Proteinexpression der Enzyme DMGDH und SARDH	49
3.7	Pharmakologische Charakterisierung der Zellvolumen-vermittelten Modulation der Genexpression.....	50
3.8	Einfluss der Umgebungsoosmolarität auf die Promotoraktivität des BHMT Gens.....	53
3.9	Quantifizierung der mRNA Expression in primären Hepatozyten mittels Realtime PCR.....	54
3.10	Quantifizierung von Metaboliten im Zelllysate von H4IIE-Zellen.....	57
3.11	Quantifizierung von Metaboliten in der Leber und im Plasma von MTHFR - Mäusen	63
3.12	Bestimmung der Proteolyse in perfundierten Mauslebern	67
3.13	Screening auf osmosensitiv regulierte Genen.....	68
4	Diskussion	75
4.1	Identifizierung neuer osmotisch regulierter Gene.....	75
4.2	Einfluss der Umgebungsoosmolarität auf die Promotoraktivität.....	82
4.3	Physiologische Auswirkungen osmotischer Regulation.....	83
4.4	Volumen-vermittelte Regulation im hepatischen Osmolytstoffwechsel ex vivo.....	87
4.5	Mechanismen und Strategien osmotischer Regulation	89
4.6	Funktion der Osmoregulation und Interaktion mit dem Methylgruppenstoffwechsel.....	91
5	Zusammenfassung.....	94
6	Lebenslauf	95
7	Anhang	96
7.1	Literaturverzeichnis	96
7.2	Abkürzungsverzeichnis	109
7.3	Abbildungsverzeichnis	112

1 Einleitung

Das Konzept der Osmose und der Anpassung an anisotone Umgebungsverhältnisse ist vorwiegend aus dem Tier- und Pflanzenreich bekannt. Pflanzen die sich an Trockenheit und Dehydratation anpassen müssen, sowie Bakterien oder marine Lebewesen, die unmittelbar einer hypotonen oder hypertonen Umgebung ausgesetzt sind, mussten Strategien entwickeln, die die Aufrechterhaltung der intrazellulären Homöostase unter diesen extremen Bedingungen erlauben. Diese Prozesse spielen aber genauso in der humanen Physiologie eine Rolle. Es ist seit langem bekannt, dass die Zellen des Nierenmarks in der Lage sind einen hohen osmotischen Gradienten aufzubauen um den Harn aufzukonzentrieren, ohne dass es zur Funktionsstörung des umgebenden Gewebes kommt.

Im Jahr 1990 wurden erstmals das Konzept einer durch Zellvolumenschwankungen vermittelten Regulation der Leberfunktion vorgestellt (1). Im Laufe der vergangenen Jahre konnte gezeigt werden, dass die Regulation der verschiedenen Funktionen des Lebergewebes ein überaus komplexes System darstellt und dass die Zellvolumen-vermittelten Signale eine wichtige Rolle bei der Feinabstimmung metabolischer Funktionen der Leber einnehmen (2,3,4).

1.1 Das Konzept der hepatischen Osmoregulation

Die Expression von Genen wird in vielfältiger Weise durch umweltbedingte Einflüsse reguliert. Ein alltägliches Beispiel ist die verstärkte Melaninproduktion in der Haut bei übermäßiger Exposition mit UV-Strahlung. Der Hydratationszustand von Säugerzellen ist ein dynamischer Zustand, der sich in Abhängigkeit von Umgebungsosmolarität, Nährstoffzufuhr, Hormonversorgung und oxidativem Stress ändern kann. Veränderungen im Hydratationszustand der Zelle sind ein unabhängiges Signal für die Regulation der Genexpression und zellulärer, metabolischer Prozesse (5-10) und stellen einen integrierenden Mechanismus für eine Adaptation an veränderte Umwelteinflüsse dar. Zum Beispiel verändert sich die Osmolarität des Pfortaderblutes während der Nahrungsaufnahme und die kumulative Aufnahme von Aminosäuren in die Leberzellen nach einer proteinhaltigen Mahlzeit vergrößert das Zellvolumen, was als Signal für die Inhibition der autophagischen Proteolyse dient (11). Wie der durch Änderungen der Umgebungsosmolarität

erzeugte mechanische Reiz in ein genregulatorisches Signal umwandelt wird, war lange Zeit unbekannt. Die Zelle benötigt dafür Strukturen, die in der Lage sind die Volumenänderung zu registrieren und daraus ein kompatibles Signal an die Effektoren der Zelle zu generieren. Diese beiden Vorgänge werden auch als „Osmosensing“ und „Osmosignalling“ bezeichnet. Die verantwortlichen Strukturen wurden als Integrine identifiziert, die als „Mechanotransducer“ wirken (12-19). So wird klar, wie eine osmotisch bedingte Volumenänderung der Zelle einen direkten Einfluss auf die Expression von Genen haben kann. Seither haben sich viele Arbeiten mit der Identifizierung der komplexen Signalstrukturen beschäftigt. Die physiologischen Auswirkungen auf die Genexpression wurde in diesem Zusammenhang aber nur von wenigen Arbeiten eingehender untersucht, so dass dieses Feld noch weitgehend unbearbeitet ist.

Alle Änderungen in der Zelle, die durch Hydratationsänderungen ausgelöst werden dienen dem Zweck das Überleben der Zelle in dieser veränderten Umgebung zu gewährleisten. Die Zelle verfolgt verschiedene, zeitlich abgestufte Strategien um dieses Ziel zu erreichen. Eine Veränderung der Umgebungsmolarität zieht unausweichlich eine Volumenänderung durch Wasseraufnahme oder Wasserabgabe der Zelle nach sich, welche die Funktion und das Überleben der Zelle gefährdet, sofern die Zelle diese Änderungen nicht kompensiert. Um diese Volumenänderung zeitnah auszugleichen, macht sich die Zelle anorganische Ionen (Elektrolyte) zunutze um kurzfristig die intrazelluläre Osmolarität der extrazellulären Osmolarität anzupassen. Mit Hilfe von Transportern werden diese Elektrolyte in oder aus der Zelle transportiert was zur Folge hat, dass die Zelle überschüssiges Wasser abgeben oder fehlendes Wasser aufnehmen kann (20). Diese kurzzeitige und schnelle Anpassung an anisotone Umgebungen kann jedoch dazu führen, dass sich unphysiologische Konzentrationen dieser Elektrolyte in der Zelle einstellen, die langfristig ebenfalls die Funktion der Zelle beeinträchtigen. Langfristig ist die Zelle bestrebt die Elektrolytkonzentration zu normalisieren ohne gleichzeitig die osmotische Anpassung an die Umgebungsmolarität aufzugeben. Die Zelle bedient sich dazu einer Vielfalt an organischen Osmolyten die im Körper synthetisiert werden können. Erst der Einsatz dieser Substanzen macht eine langfristige Adaptation der Zelle an anisotone Zustände möglich.

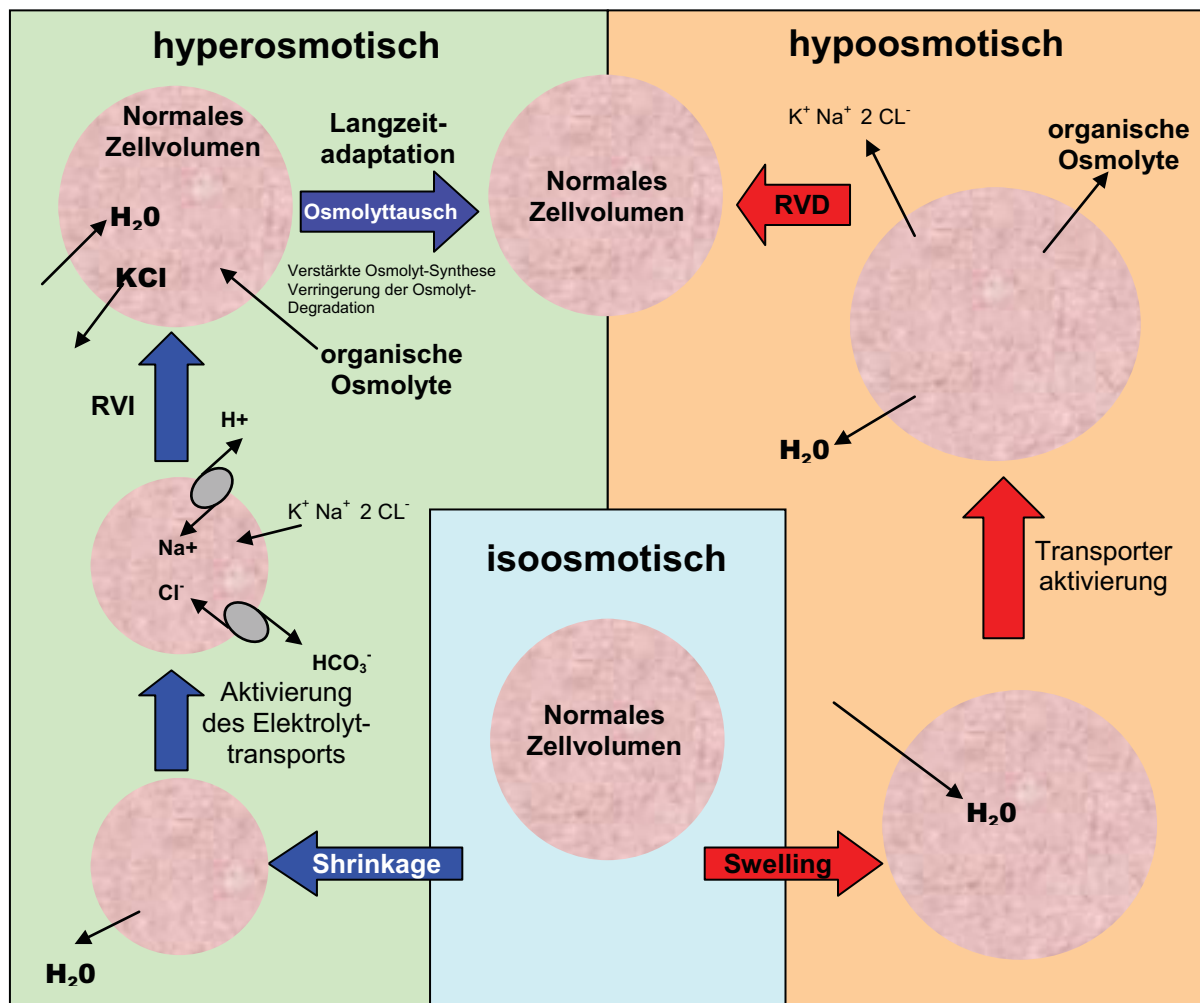


Abbildung 1: Schema der Änderungen der intrazellulären Osmolytkonzentration bei hyperosmotischer bzw. hypoosmotischer Exposition. In einer hyperosmolaren Umgebung schrumpft die Zelle, weil sie Wasser abgibt. Durch den Ionentransport in die Zelle kann diese wieder ihr normales Volumen annehmen. Dieser Vorgang wird als regulatorische Volumenerhöhung (RVI) bezeichnet. Durch den Austausch der anorganischen Ionen durch organische Osmolyte adaptiert die Zelle langfristig an die gestiegene Osmolarität. In einer hypoosmolaren Stimulation schwillt die Zelle durch Wasseraufnahme an. Durch den Export und den Abbau von Osmolyten und Ionen kann die Zelle das überschüssige Wasser wieder abgeben und das normale Zellvolumen einstellen. Dieser Vorgang wird als regulatorische Volumenabnahme (RVD) bezeichnet (21).

1.2 Organische Osmolyte

Die ersten Gene, für die eine osmosensitive Genregulation beschrieben wurde, kodieren für Transportproteine von organischen Osmolyten (22,23). Organische Osmolyte sind Substanzen, die für die langfristige Adaptation der Zelle an veränderte osmotische Bedingungen zuständig sind, während anorganische Ionen nur kurzzeitig zur Volumenregulation beitragen. Die organischen Osmolyte können bei Zellschrumpfung in der Zelle akkumulieren und bei Zellschwellung abgegeben werden. Im Gegensatz zu Elektrolyten oder Harnstoff, stören viele organische Osmolyte selbst bei höheren intrazellulären Konzentrationen nicht oder kaum das

intrazelluläre chemische Milieu oder Proteinfunktionen. Diese hohen Anforderungen erklären, warum nur wenige Substanzklassen diese Aufgabe übernehmen können. Dazu gehören Polyole (wie Myo-Inositol und Sorbitol), Methylamine (wie Betain und α -Glycerophosphocholin) und bestimmte Aminosäuren (wie z.B. Taurin). Zudem zeigen organische Osmolyte eine proteinstabilisierende Wirkung und dienen somit als Chaperone (24,25). Sie werden daher als kompatible organische Osmolyte bezeichnet.

Der Transport dieser Osmolyte wird durch spezifische Transporter bewirkt. Zu den bekannten Transporterproteinen gehört der Betaintransporter (BGT-1). Dieses einzelne, 614 Aminosäuren umfassende, Protein ist in der Lage bis zum 1000fachen der Umgebungskonzentration an Betain in der Zelle zu akkumulieren. Dieser Transporter besitzt zudem viele strukturelle Überinstimmungen mit dem GABA und Noradrenalintransporter, so dass er zur GABA/Noradrenalin-Transporterfamilie gezählt wird (26,27).

Der Na^+ -abhängige Taurintransporter (TauT) wird in vielen Geweben exprimiert und zeigt speziesübergreifend erstaunliche Sequenzübereinstimmungen (28-32). Die Zwitterioneneigenschaften des Taurins verhindern eine Diffusion durch die Lipidschichten der Zellmembran, wodurch der Taurintransporter in der Lage ist, hohe Konzentrationsgradienten zwischen dem intra- und extrazellulären Raum aufzubauen (33). In den meisten Geweben ist der Taurintransporter osmotisch reguliert, was im Einklang mit der großen Bedeutung des Taurins als Osmolyt steht (33).

Myo-Inositol wird in den Medullazellen der Niere und in Linsenepithelzellen verstärkt aufgenommen, wenn diese Zellen einer hyperosmolaren Umgebung ausgesetzt sind (27,34). Der Na^+ /Myo-Inositol-Kotransporter (SMIT) wird in diesen Geweben durch Hyperosmolarität verstärkt exprimiert (35) und erhöht seine Transportgeschwindigkeit. (36). Gestörte Myo-Inositol-Akkumulation findet man beispielsweise im Hirngewebe von Down-Syndrom-Patienten und bei hepatischer Enzephalopathie (37,38).

Glycerophosphocholin nimmt in der Gruppe der organischen Osmolyte eine Sonderstellung ein. Als Einziges der erwähnten Osmolyte wird es nicht über Transporter eingeschleust, sondern ausschliesslich in der Zelle synthetisiert und lediglich über seine Degradation zum Cholin reguliert (39).

Betain und Glycerophosphocholin finden sich überwiegend in Leber und Niere, wo sie die wichtige Rolle des Osmolyten einnehmen. Betain ist zudem ein wichtiges

Substrat für die Remethylierung von Homocystein zu Methionin (40). In Abbildung 2 sind die Stoffwechselwege skizziert, die unmittelbar an die Remethylierungswege des Homocysteins angrenzen. Daraus geht hervor, dass der Stoffwechsel wichtiger Osmolyte wie Betain, GPC und Taurin eng mit dem Methylstoffwechsel in der Leber verknüpft sind und dass regulatorische Änderungen in einem dieser Synthese- oder Degradationswege auch Auswirkungen auf den Stoffwechsel in den angrenzenden Wegen haben können.

Die Nutzung all dieser organischen Osmolyte variiert spezies- und gewebeabhängig. So wurde beschrieben, dass myo-Inositol in Rattenleber-Makrophagen (Kupffer-Zellen) eine wichtige Rolle spielt, jedoch in RAW 264.7 Mausmakrophagen nicht als Osmolyt dient (22,41).

Neben den Transporterproteinen, die direkt an der Antwort der Zelle auf osmotischen Stress beteiligt sind, wurde außerdem ein Enzym identifiziert, welches im Cholinstoffwechsel eine entscheidende Rolle spielt.

In einem Versuch wurde Meerschweinchen ein salzhaltiges Trinkwasser angeboten und man stellte fest, dass die Expression der Betain-Homocystein-Methyltransferase in der Leber dieser Tiere unter diesen Bedingungen abnahm. Die erste Veröffentlichung dazu wurde von T. Garrow 2004 herausgebracht (42). Parallel aber unabhängig von Garrow wurde im Rahmen eines Microarray Screenings die BHMT als osmosensitiv reguliertes Gen von C. Schäffer und F. Schliess 2002 entdeckt. Die Publikation dazu wurde jedoch erst 2007 veröffentlicht (43). Die BHMT war das erste Enzym, für das eine osmosensitive Genregulation beschrieben wurde.

1.3 Der Cholinstoffwechsel

Cholin ist ein essentieller Bestandteil unserer Nahrung und ist als Bestandteil des Phosphatidylcholins wichtig für die strukturelle Integrität und Funktionalität der zellulären Membranen. Darüber hinaus vermittelt Cholin Teile der intrazellulären Signaltransduktion sowie als Acetylcholin die cholinerge Neurotransmission (44). Cholin ist weiterhin für die Muskelfunktion und den Lipidtransport der Leber notwendig. Während der fetalen Entwicklung werden große Mengen an Cholin für den Gewebeaufbau, vor allem des Nervensystems, benötigt (45-49). Intrauteriner Cholinmangel kann zum Beispiel Defekte des Neuralrohrs und zentralnervöse Funktionsstörungen zur Folge haben (50,51). Nach seiner irreversiblen Oxidation zu

Betain spielt Cholin eine weitere Rolle als wichtige Quelle für übertragbare Methylgruppen im Körper (52). Cholin wird einerseits direkt, zum überwiegenden Teil jedoch als Phosphatidylcholin (Lecithin) mit der Nahrung aufgenommen. Phosphatidylcholin kann und muss bei mangelndem Nahrungsangebot in der Leber *de novo* synthetisiert werden (52). Durch die Übertragung von drei Methylgruppen auf Phosphatidylethanolamin entsteht in drei aufeinanderfolgenden Transmethylierungsschritten Phosphatidylcholin. Bei dieser durch das Enzym Phosphatidyl-Ethanolamin-Methyltransferase (PEMT) katalysierten Reaktion dient, wie auch bei allen anderen Transmethylierungsreaktionen, S-Adenosyl-Methionin als Methylgruppendonor. Inzwischen ist gut belegt, dass die endogene Phosphatidylcholinsynthese je nach Ernährung einen erheblichen Anteil an der Erhaltung des körpereigenen PtdCholin-Pools haben kann. Das endogen gebildete Phosphatidylcholin kann wiederum zu Cholin katabolisiert werden und dann eine seiner drei Methylgruppen für Transmethylierungsreaktionen bereitstellen.

Der Abbauweg des Cholins beginnt mit der Oxidation zu Betainaldehyd durch die Cholindehydrogenase (CHDH). Die Betainaldehyddehydrogenase (BADH) katalysiert einen weiteren Oxidationsschritt zu Betain. Betain dient als Methylgruppendonor bei der durch das Enzym Betain:Homocystein Methyltransferase (BHMT) vermittelten Remethylierung von Homocystein zu Methionin unter Bildung von Dimethylglycin (DMG). DMG wird unter Abspaltung einer Methylengruppe durch das Enzym Dimethylglycin-Dehydrogenase (DMGDH) zu Sarkosin (Monomethylglycin) oxidiert. In einem weiteren Oxidationsschritt unter Vermittlung der Sarkosindehydrogenase (SARDH) wird Sarkosin nach Abspaltung einer weiteren Methylengruppe zu Glycin umgewandelt. Die beiden Enzyme DMGDH und SARDH sind jeweils mit Tetrahydrofolat als Kofaktor assoziiert. Dieses dient in beiden Reaktionen als Methylengruppenakzeptor, woraus dann sogenanntes „aktiviertes Formaldehyd“, besser bekannt als 5,10-Methylentetrahydrofolat, gebildet wird (53). Weitere Methylengruppen werden durch die Aminosäure Serin auf Tetrahydrofolat übertragen und dem Einkohlenstoff-Pool zugeführt.

5,10-Methylentetrahydrofolat wird entweder für die Nukleotidsynthese verwendet oder durch irreversible Reduktion zu 5-Methyltetrahydrofolat der Remethylierung von Homocystein zu Methionin durch das Cobalamin-abhängige Enzym Methioninsynthase (MS) zugeführt. Das gebildete Methionin kann nach Aktivierung zu SAM wieder als Methyl donor der Transmethylierung verwendet werden. Die

Aktivität des Enzyms 5,10-Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) kontrolliert dabei die Menge der Methylengruppen die der Transmethylierung zugeführt werden. Homocystein ist das endogene Produkt aller Transmethylierungsreaktionen. Methioninaufnahme und Transmethylierungsaktivität bestimmen die Menge an Homocystein, die in das System gelangt. Ein Teil dieses Homocysteins wird über den Transsulfurierungsweg irreversibel katabolisiert. Etwa 30-50% des Homocysteins wird durch Remethylierung zu Methionin wiederverwendet (54,55). Dies geschieht über die beiden oben erwähnten voneinander unabhängigen Remethylierungswege.

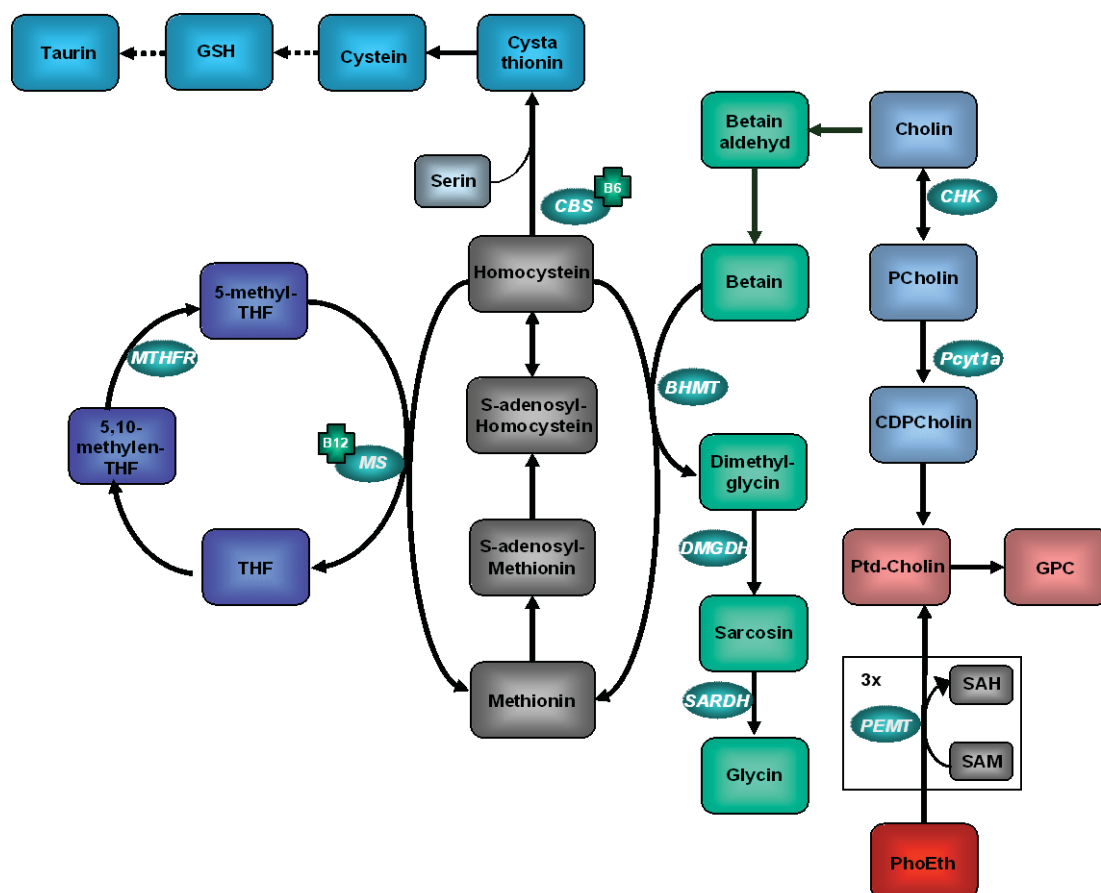


Abbildung 2: Schema der am Cholin- und Methylgruppenstoffwechsel beteiligten Reaktionen. Funktionelle Einheiten sind farbig kodiert: Schwarz, Transmethylierung; Blau, Folsäure-abhängige Remethylierung; Grün, Betain-abhängige Remethylierung; Türkis, Transsulfurierung; Hellblau, Kennedy-Weg der PtdCho-Synthese; Rot, PEMT-abhängige PtdCho-Synthese. Daneben ist die Synthese der wichtigen organischen Osmolyte Taurin und GPC dargestellt. In der Abbildung sind nur Enzyme genannt, die in dieser Arbeit auch thematisiert werden.

Die Methioninsynthese ist wie die Enzyme des Folsäurezyklus ubiquitär zu finden. Das Enzym BHMT wird dagegen beim Menschen exklusiv in der Leber und der Niere exprimiert, bei Mäusen lediglich in der Leber. Betain wird nur zu einem geringen Anteil direkt mit der Nahrung zu geführt, wird aber durch Oxidation von Cholin, welches in ausreichender Menge in der Nahrung vorkommt, der BHMT zu Verfügung

gestellt (56). Unter Laborbedingungen konnte in Ratten gezeigt werden, dass die beiden Remethylierungswege zu etwa gleichen Teilen zur gesamten Remethylierung beitragen (40).

1.4 Bisherige Erkenntnisse zur osmosensitiven Regulation der hepatischen Genexpression

Die Leber ist das wichtigste Organ zum Abbau stoffwechseleigener und stoffwechselfremder Substanzen. Daneben nimmt sie eine zentrale Rolle bei der Aufnahme und Verwertung von Nahrungsbestandteilen ein, beherbergt eine Vielzahl wichtiger Synthesewege und greift regulierend in das Immunsystem und die Hormone ein. In den vergangenen Jahren wurden für einige dieser Leberfunktionen osmosensible Regulationsvorgänge nachgewiesen. Die folgende Tabelle fasst diese Ergebnisse zusammen (11).

Tabelle 1: Effekte der hypoosmotisch bedingten Zellschwellung auf die Leberfunktionen. Gegensätzliche physiologische Effekte werden durch hyperosmotisch bedingte Zellschrumpfung ausgelöst (5-10).

Zunahme	Abnahme
Proteinsynthese	Proteolyse
Glykogensynthese	Glykogenolyse
Pentosephosphat shunt	Glutaminsynthese
Glycinoxidation	Billäre GSSG Freisetzung
Acetyl-CoA Carboxylase	Cytosolischer pH
Harnstoffsynthese aus Aminosäuren	mRNA Spiegel von PEPCK, Tyrosin-aminotransferase,Transporter für Betain, Taurin und Myo-Inositol
Glutathionfreisetzung	mRNA Spiegel für MI-2 Autoantigen und die Serum- und Glucocorticoid-regulierte Kinase
Taurocholalexkretion in die Galle	Virale Replikation
Ansäuerung des cytosolischen pH	
mRNA Spiegel der Ornithin Decarboxylase, β -Aktin und Tubulin	
HSP70 Expression	

Die bereits erwähnten Integrine, die den mechanischen Reiz der Volumenänderung in ein zellregulatorisches Signal umwandeln, bilden den Startpunkt des osmosensiblen Regulationsmechanismus. Dieses Signal verzweigt sich danach in verschiedene Signaltransduktionswege um so auf die individuellen Funktionen der Leber zu zugreifen. Die Tatsache, dass verschiedene Stimuli die gleiche Signaltransduktionskomponente auslösen und simultan zu qualitativ unterschiedlichen Effekten führt ist nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung. Es wird vermutet, dass die Unterschiede in der Kinetik der Kinasenaktivierung/-inaktivierung, begleitender Phosphatasenaktivität und räumlicher Trennung der angesprochenen Ziele, liegt (57). Zudem dürfte die Interaktion zwischen der osmotisch induzierten Signaltransduktion und den Signalkaskaden die durch Wachstumsfaktoren, Cytokine oder umweltbedingten Stress ausgelöst werden, von pathobiologischer Relevanz sein, da der Hydratationszustand der Zelle Proteinkatabolismus (58) und Insulinresistenz auslösen kann (59). Wenn die Signale entsprechend ihrer Bestimmung weitergeleitet werden, werden diese auf genomischer Ebene in eine molekulare Antwort umgewandelt.

Da es sich bei den derzeit bekannten Genen um solche Gene handelt, die nicht exklusiv „nur Tonizitäts-abhängig“ exprimiert werden, sondern auch im „normalen“ Zellbetrieb benötigt werden, vermutete man sogenannte „Enhancerelemente“ die sich im Promotorbereich dieser Gene befinden und bei osmotischem Stress gezielt angesprochen werden. Osmosensitive Genregulation stellt im übertragenen Sinne einen zusätzlichen „Ein-Aus Schalter“ für Gene dar und benötigt spezielle Transkriptionsfaktoren die an diese exklusiven Sequenzen im Promotor der Gene binden. 1998 wurde zum ersten Mal eine Konsensussequenz für Enhancer-Sequenzen im Promotor von Betaintransporter BGT-1 veröffentlicht die aus den Promotorregionen von 3 verschiedenen Spezies (Mensch, Ratte, Hund) abgeleitet wurde (60). Ein Jahr später wurde bereits das passende „Binding Protein“ für diese Enhancersequenz veröffentlicht, das erste sogenannte TonEBP (61). Es folgten weitere Gene, bei denen man mit Hilfe der Konsensussequenz funktionelle TonE-Sequenzen im Promotorbereich entdecken konnte. Mit Hilfe von Reportergen-Konstrukten konnte die Funktionalität der Sequenzen bestätigt werden (62). Das TonEBP ist ein Transkriptionsfaktor, der bei Aktivierung durch Hyperosmolarität, die Transkription von Genen erhöht, einschließlich der Gene die für die Transporterproteine kodieren, die an der Akkumulation von organischen Osmolyten

beteiligt sind. TonEBP ist in praktisch allen Geweben exprimiert, einschließlich solchen, die normalerweise niemals mit veränderten Tonizitätszuständen konfrontiert werden. Die Quantifizierung des TonEBP Proteins und der mRNA in den verschiedenen Geweben unter verschiedenen osmotischen Zuständen hat gezeigt, dass die TonEBP-Protein oder mRNA Expression im Thymus, der Leber und im Hirngewebe durch Hyperosmolarität verringert wird (63). Ausserdem wurde festgestellt, dass TonEBP mRNA und Protein in manchen Geweben unterschiedlich reguliert sind (63). Obwohl die bekannten Osmolyttransporter in den Medulla Zellen der Niere durch TonEBP reguliert werden, besteht die Möglichkeit, dass in anderen Geweben andere Regulationsfaktoren vorherrschen oder dass die TonEBP Verfügbarkeit durch andere Faktoren als den Hydratationszustand der Zelle bestimmt wird (63). Wenngleich die Regulation der mRNA Expression über TonE Sequenzen und das TonEBP Protein ein elegantes Mittel zur Expressionsänderung darstellt, so stehen der Zelle durch Degradation und Modifikation der mRNA und Proteine der Osmolyttransporter, weitere Mittel zu Verfügung, um die Expression durch Zellvolumen-vermittelte Signale zu beeinflussen.

Wie bereits im Kapitel 1.2 beschrieben ist das Enzym Betain-Homocystein-Methyltransferase das erste Enzym, für das eine Tonizitäts-abhängige Genexpression gezeigt werden konnte. Die BHMT ist also das erste bekannte Enzym, welches aufgrund einer hypoosmolaren Änderung des zellulären Hydratationszustands, aktiv die Degradation eines organischen Osmolyten katalysiert. Diese Erkenntnis wies einen weiteren eleganten Mechanismus der Zelle zur Adaptation an osmotische Stresszustände auf. Die BHMT nimmt eine zentrale Rolle im cholindegradierenden Stoffwechselweg ein und reguliert durch ihre Menge und Aktivität die Konzentration des Osmolyten Betain. Die enge Verknüpfung vieler Osmolytsynthesewege mit dem Stoffwechsel des Cholins macht diesen Stoffwechselweg zu einem zentralen Ziel bei der Suche nach bisher unbekannten osmotisch regulierten Genen.

1.5 Zielsetzung

Trotz der vielen Erkenntnisse, die in den letzten Jahren zusammengetragen wurden, bleiben immer noch viele Zusammenhänge ungeklärt. Ziel dieser, vom Sonderforschungsbereich 575 „Experimentelle Hepatologie“ geförderten, Arbeit war es, ein besseres Verständnis der Bedeutung kompatibler organischer Osmolyte für die Funktion der Leber zu erlangen.

Dazu gehört die Identifizierung und Charakterisierung neuer osmotisch regulierter Gene. Die zentrale Frage ist, ob es eine Zellvolumen-vermittelte Regulation im hepatischen Stoffwechsel organischer Osmolyte und deren Transport gibt. Welchen Einfluss hat die Volumenänderung auf die Transkription und Translation dieser Gene? Welche physiologischen Auswirkungen haben diese Änderungen? Spielt die Enzymaktivität/Transporteraktivität im Osmolytstoffwechsel eine Rolle? Welche Mechanismen liegen diesen Änderungen zugrunde und welcher zeitliche Verlauf lässt sich bei diesen Anpassungsvorgängen erkennen?

Besonderes Augenmerk lag dabei auf möglichen Interaktionen zwischen verschiedenen Stoffwechselwegen um Zusammenhang oder Eigenständigkeit der Regulationsvorgänge herausstellen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Puffer und Lösungen

Tris-Glycin-Puffer für die Elektrophorese

25 mM Tris

192 mM Glycin

0,1 %[w/v] SDS

pH sollte bei ~8,3 liegen, pH darf nicht eingestellt werden

Waschpuffer für Westernblots

TBS pH 7,5

+1 ml Tween 20

Blockierlösung für Westernblot

TBS-T_{0,1%} mit 5 % Magermilchpulver

STET Puffer

0,1 M NaCl

10 mM Tris

1 mM EDTA

5 %[v/v] Triton-X100

TBS-Puffer

25 mM Tris

100-150 mM NaCl

Für meine Versuche wurde der Puffer mit HCl auf pH 7,5 eingestellt.

TE-Puffer

10 mM Tris

1 mM EDTA

mit HCl auf pH8 einstellen und autoklavieren

LB-Medium

10 g Bacto-Tryptone

10 g NaCl

5 g Bacto-Yeast- Extrakt

auf 1 l auffüllen, mit NaOH auf pH 7,0 einstellen,dann autoklavieren

LB-Agar-Platten

wie LB Medium

+15 g Bacto Agar

Bei Bedarf, kurz vor dem gießen das Selektivum zugeben.

2.2 Medien und Zusätze

Trypsin EDTA (Gibco)

DMEM:F12 (900 mM Glucose) (Gibco)

PBS (Gibco)

FCS (PAA)

Pen/Strept (Invitrogen)

2.3 Geräte

Sterilbank Hera safe (Heraeus)

Brutschrank (Heraeus)

Schüttler WT-12 (Biometra)

Thermocycler Tpersonal (Biometra)

Heizrührer RCT-B (IKA Labortechnik)

Thermoblock Thermomixer comfort (Eppendorf)

Tischzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus)

Multifuge 3 S-R (Heraeus)

Rotor für Multifuge 6441 Ausschwenkrotor (Heraeus)

Mikroskop ID 03 (Zeiss)

Bunsenbrenner Fireboy eco (IBS)

Pipettierhilfe Pipetboy acu (IBS)

Tiefkühlschrank ULT 1786 V-O-E (REVCO)

Realtime PCR	7700 Sequence Detctor	(ABI)
Luminometer	Ascent	(Thermo)
Gelkammer	B-2	(Owl)
SDS-Gel System	Protean	(Bio-Rad)
Westernblot System	Protean	(Bio-Rad)
Netzteile	Powerblock P25	(Biometra)
	E 831	(Consort)
UV Gel-Dokumentation	GelDocUV	(Biometra)
Nanodrop Photometer	ND-1000	(PeqLab)
Kapillarelektrophorese	Bioanalyzer	(Agilent Technologies)
Array Spotter	QArray2	(Genetix)
Array Scanner	FLA 8000	(Fuji)
Hybridisierung	ASP	(Amersham Pharmacia)
Ultraturrax	PT1200C	(Kinematica)
Platereader	InfiniteM200	(Tecan)
Tandem-MS	Quattro micro API	(Micromass)
HPLC	2795 Seperation Modul	(Waters)

2.4 Arbeitsmodelle

2.4.1 H4IIE Rattenhepatomzelllinie

Die H4IIE-C3 Zelllinie (ATCC # CRL-1600) ist ein Subklon des H35 Rattenhepatoms, der 1964 von Pivot et al. isoliert und 1977 von Evans et al. charakterisiert wurde. Die Zellen sind adhärent und zeigen eine epitheliale Morphologie. Die Zellen sind unter Kulturbedingungen weitestgehend ausdifferenziert und dienen als Modellsystem für die Rattenleber.

2.4.2 MTHFR defiziente Mauslinie

In dieser transgenen C57BL/6 Mauslinie wurde durch Insertion einer Neomycin-Kassette in das 3. Exon des MTHFR Gens ein Knockout in diesem Gen generiert wodurch die homozygoten Mäuse kein funktionelles MTHFR-Enzym herstellen können. Heterozygote Tiere sind bis auf biochemische Abweichungen unauffällig. Sie zeigen in ihrer Lebenserwartung und Entwicklung keine signifikanten Abweichungen von den Wildtyp-Tieren. Die Enzymaktivitätsminderung der MTHFR auf etwa 50 % der Wildtyp-Tiere, macht diese Mäuse zu einem Modell des milden MTHFR-Mangels, der eine Prävalenz von etwa 10 % in der ciskaukasischen Bevölkerung aufweist (56). Homozygote Tiere weisen eine hohe postnatale Letalität auf. Die homozygoten Tiere zeigen signifikante Abweichungen in Wachstum und Entwicklung. Zudem haben sie eine geringere Überlebensrate in den ersten 5 Wochen. Homozygote Tiere, welche die kritischen ersten 5 Wochen überstanden haben zeigten anschließend stabile Überlebensraten, was darauf schließen lässt, dass MTHFR besonders in der frühen Entwicklungsphase eine wichtige Rolle spielt (64). Die MTHFR-Defizienz der Maus entspricht im Phänotyp der entsprechenden angeborenen Stoffwechselerkrankung des Menschen, die als MTHFR-Mangel oder atypische Homocysteinurie bezeichnet wird. Bei dieser Krankheit ist die Folsäure-abhängige Remethylierung von Homocystein zu Methionin gestört. In Folge der Betain-abhängigen alternativen Remethylierung kommt es bei unzureichender Supplementierung zu einer Verarmung an Betain und Cholin in der Leber. Die MTHFR-Knockout-Maus stellt für diese Arbeit also ein Modell der dauerhaften Betaindepletion dar, die möglicherweise die Adaptation an anisotone Zustände stört. Um erfolgreich homozygote Knockout-Tiere zu züchten ist eine Betainsupplementierung der heterozygoten Zuchtpaare, sowie der neugeborenen Mäuse in den ersten Lebenswochen unumgänglich. Den neugeborenen Mäusen wird bis zum Absatz vom Muttertier (nach etwa 3 Wochen) eine 2 %ige Betainlösung als Trinkwasser angeboten. Diese Supplementierung ist ausreichend um die perinatale Letalität fast zu normalisieren und stabile Überlebensraten im adulten Tier zu gewährleisten (56).

2.4.3 Primäre Maushepatozyten

Primäre Hepatozyten wurden aus C57BL/6 Mäusen mittels einer Collagenase-Perfusions-Technik isoliert. Für die Versuche in dieser Arbeit wurden Zellen aus Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten MTHFR-Knockout-Mäusen verwendet.

2.4.4 E.coli – Bakterien

Für die Promotorversuche wurden chemisch kompetente DH5 α -E.coli Zellen verwendet (Invitrogen). Das Transformieren wurde entsprechend der Herstellerangaben für diese Zellen durchgeführt.

2.5 Zellkultur

2.5.1 Kultivierung der Zellen

Die H4IIE Zellen wurden in einem modifizierten DMEM/F12 Medium mit 5 mM Glucose und mit einem Serumanteil von 10 % fetales Kälberserum (FCS) kultiviert. Das Medium weist in dieser Formulierung eine Osmolarität von 305 mOsmol/l auf. Auf die Verwendung von Antibiotikum und Antimykotikum wurde verzichtet. Die Zellen benötigen alle 2-3 Tage frisches Medium und müssen spätestens bei 95 % Konfluenz passagiert werden, da die Zellen ansonsten aufgrund einer Kontaktinhibition recht schnell absterben. Bei Passagen werden die Zellen mit 1×10^6 Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen, mit 4×10^5 Zellen in 6-well Zellkulturschalen oder mit 5×10^6 Zellen auf 10cm Petrischalen ausgesät. Die Verdoppelungszeit beträgt etwa 24 h. Für die Versuche wurden ausschließlich Zellen verwendet die mindestens 20 und maximal 40 Passagen durchlaufen haben. Die Morphologie der Zellen wurde vor der Durchführung der Experimente lichtmikroskopisch überprüft. Die Subkultivierung (Passagieren) der Zellen wurde durch Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche mit Trypsin-EDTA und anschließender Aufnahme in frischem, serumhaltigem Medium durchgeführt. Die Zellen werden bei 37 °C mit 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank gehalten. Die Kulturgefäße sind ventiliert, so dass ein Gasaustausch möglich ist. Vor Versuchsbeginn werden die

Zellen für mindestens 6 Stunden in serumfreien Medium gehalten. Dadurch stellen die Zellen sich das Wachstum ein und befinden sich bei Versuchsbeginn in der gleichen Zellzyklusphase (65).

2.5.2 Osmolarität der Medien

Die Versuchsmedien haben eine definierte Osmolarität. Ausgehend von dem 305 mOsmol/l Medium wurden durch Zugabe von NaCl oder durch Verdünnung mit salzfreiem Medium, Osmolaritäten von 405 mOsmol/l bzw. 205 mOsmol/l erzielt. Im weiteren Verlauf werden die Medien mit 205 mOsmol/l als hypoosmolares Medium und die Medien mit 405 mOsmol/l als hyperosmolares Medium für die Versuche verwendet. Ausnahmen von dieser Regel sind separat erwähnt.

2.5.3 Inhibitoren

Für die Charakterisierung der Signalkaskaden wurden spezifische Inhibitoren eingesetzt.

Genistein ist ein Tyrosinkinaseinhibitor und Daidzein das inaktive Analogon dazu. Der Inhibitor 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine * 2HCl (H7) ist ein wenig spezifischer und N-[2-((p-Bromocinnamyl)amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamid * 2HCl (H89) ein hoch spezifischer Proteinkinaseinhibitor.

Wortmannin und 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on (LY294002) sind Inhibitoren der PI3Kinase und Rapamycin unterbindet hochspezifisch das Signalling von mTOR. Die Substanz 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4'-pyridyl)1H-imidazol (SB203580) hemmt die Erk1/Erk2 und 2'-Amino-3-methoxyflavon (PD98059) verhindert das Signalling der c-Jun-Kinase (Jnk). Diese beiden Inhibitoren wurden von Calbiochem bezogen. 1,9-Pyrazoloanthron (SP600125) inhibiert die p38-MAP Kinase und wurde von Biomol bezogen. Der Proteinkinase C Inhibitor Gö6850 wurde freundlicherweise von der Gödecke AG aus Freiburg zu Verfügung gestellt.

2.5.4 Alternative Osmolyte

Als Alternative zum NaCl wurde in einigen Versuchsreihen Harnstoff und Raffinose als Osmolyt eingesetzt. Auf diese Weise wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge Substanz ein Medium hergestellt, welches eine normosmolare Menge NaCl enthält, aber durch Zugabe weiterer Osmolyte hyperosmolar ist. Raffinose ist ein impermeabler Osmolyt, der eine Osmolaritätserhöhung erzielt, ohne dass die Raffinose mit den biochemischen Prozessen innerhalb der Zelle in Kontakt treten kann. Harnstoff ist ein permeabler Osmolyt, der die Osmolarität des Mediums anhebt, ohne das Volumen der Zelle zu verändern, in hohen Konzentrationen jedoch die Funktion der Zelle stören kann.

2.5.5 Einfrieren und Auftauen von H4IIE - Zellen

Zur Aufbewahrung können die H4IIE Zellen kryokonserviert werden. Dazu werden die Zellen in einem Kulturgefäß bis zu einer 70 %igen Konfluenz herangezogen. Das Kulturmedium wird dann abgezogen und die Zellen werden mit sterilem PBS gewaschen, das ebenfalls wieder abgezogen wird. Anschließend werden die Zellen mit Trypsin vom Kulturgefäß gelöst und in Einfriermedium aufgenommen. Das Einfriermedium wird aus serumhaltigen Kulturmedium mit einem 10 %[v/v] Anteil an frischem DMSO hergestellt. Die Zellsuspension wird mit Einfriermedium soweit verdünnt, dass die Konzentration etwa 3×10^6 Zellen/ml beträgt. Die eingestellte Zellsuspension wird in 1ml Aliquots auf Cryoröhrchen aufgeteilt. Anschließend werden die Zellen über 24h hinweg langsam auf -80 °C heruntergekühlt.

Zum Auftauen werden die Cryoröhrchen in ein 37 °C Wasserbad gestellt und dort zügig aufgetaut. Um das toxische DMSO aus der Kultur zu entfernen werden die aufgetauten Zellen zunächst in frischem Wachstumsmedium verdünnt und für 5 Minuten bei 700 rpm herunterzentrifugiert. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen werden erneut in frischem Medium resuspendiert. Ausgehend von dieser Suspension können nun neue Kulturen angesetzt werden.

2.5.6 Kultur primärer Maushepatozyten

Da die primären Hepatozyten nicht subkultivierbar sind, werden sie im Anschluss an die Isolation aus der Leber direkt in die Gefäße ausgesät, in denen später der Versuch stattfindet. Die Kulturbedingungen unterscheiden sich nur geringfügig von den H4IIE Zellen. Aufgrund des hohen Kontaminationsrisikos musste das Medium für diese Zellen für die Zeit bis zum Versuchsbeginn mit einem Antibiotikum/Antimykotikum behandelt werden. Die Zellen werden zunächst für mindestens 3 Stunden im Isolationsmedium belassen, bis die Zellen am Boden des Kulturgefäßes adherieren. Anschließend wird das bereits beschriebene Medium bis zum Versuchsbeginn auf die Zellen gegeben.

2.5.7 mRNA Stabilitätsassay

Für den Stabilitätsassay wurden die H4IIE Zellen wie beschrieben kultiviert und nach der serumfreien Preinkubationsphase mit normosmolaren Medium werden die Zellen für 24 Stunden in hypoosmolaren Medium (205 mOsmol/l) inkubiert um eine maximale Genexpression der Kandidatengene zu gewährleisten. Im Anschluss daran wird das Zellkulturmedium in drei getrennten Kulturgefäßen gewechselt, wobei eines mit hypoosmolarem Medium, eins mit normosmolaren Medium und eins mit hyperosmolaren Medium beschickt wird. Zusätzlich zu diesen veränderten osmotischen Zuständen wird in die Medien 10 µmol/ml Actinomycin D (act D) hinein pipettiert und durch sanftes Schütteln im Kulturgefäß verteilt. Das Actinomycin D ist ein Inhibitor der Transkription und verhindert somit die Entstehung neuer RNA. Das bedeutet das kurz nach der Zugabe des act D nur noch die RNA in der Zelle ist, die vor der Zugabe hergestellt wurde. In kurzen Zeitabständen wurden die Zellen lysiert und die RNA extrahiert. Die Quantifizierung der verbleibenden RNA-Menge wurde über Realtime PCR durchgeführt. Ein Abfall der mRNA Konzentration unter diesen Bedingungen, relativ zur maximalen Expression am Startpunkt, gibt an, wie stabil die mRNA unter der jeweiligen osmotischen Situation ist. Dadurch lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob die Osmolarität des Mediums einen Einfluss auf die Stabilität der RNA hat und somit für ein Abfall oder Anstieg der RNA Menge verantwortlich sein kann.

2.5.8 Magnetofektion

Für die Magnetofektion werden 2×10^5 Zellen pro well in 6well Platten ausgesät bis zu einer 80 %igen Konfluenz herangezogen. Danach wird das Medium abgezogen und durch serumfreies Medium ausgetauscht. Für das Magnetofektionsgemisch wird die gewünschte Menge Plasmid-DNA (2 µg/well in einem Verhältnis von experimentalem Vektor zu Kontrollvektor von 10:1 mit Versuchsmedium und dem PolyMag-Reagenz gemischt. Das pDNA zu PolyMag-Verhältnis ist 1:1. Als weitere Kontrolle wird in einem weiteren Ansatz nur PolyMag und Medium gemischt. Nachdem das Gemisch bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubieren konnte, wobei die Plasmid DNA an die magnetischen Partikel bindet, wird es auf die Zellen gegeben. Für den eigentlichen Vorgang der Magnetofektion wird die Kulturschale auf ein sehr starkes Magnetfeld aus 3 Nd-FE-B-Magnete mit einem Durchmesser von jeweils 25mm gestellt. In diesem Magnetfeld bleiben die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wird das Medium abgezogen und durch das Versuchsmedium mit 205, 305 oder 405 mOsmol/l ausgetauscht und die Zellen zurück in den Brutschrank bei 37 °C gestellt. Nach Ende der Inkubationszeit, wurde das Medium wiederum abgezogen und die Zellen anschließend lysiert. Die Analyse der Expression wurde mittels Dual-Luciferase Assay in einem Luminometer durchgeführt.

2.5.9 Vitalitätsmessung mittels MTT-Assay

Der MTT-Assay wird in 96-well Zellkulturplatten durchgeführt. Dazu werden für jede Situation ca. 75000 Zellen in eine Vertiefung der Platte ausgesät. und für zwei Tage kultiviert bis das well etwa 90 % konfluent bewachsen ist. Danach werden die Zellen für 4 Stunden in serumfreien Medium gehalten. Im Anschluss daran können nun die zu untersuchenden Substanzen oder Medien auf die Zellen gegeben werden. Gleichzeitig mit der Zugabe von Medium oder Substanzen wird 10 µl des MTT Reagenzes in jedes zu untersuchende Well gegeben und für vier Stunden im 37 °C Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit wird der violette Farbstoff gebildet. Um die Reaktion zu beenden werden die Zellen mit 100 µl Detergenz versetzt und für 2 Stunden dunkel abgestellt. Während dieser Zeit werden die Zellen lysiert und der Farbstoff tritt aus. Nach zwei Stunden kann die Intensität des Farbstoffes durch

Messung der Absorption im Platten-Photometer bei einer Wellenlänge 570nm gemessen werden.

2.6 Molekulargenetische Analysen

2.6.1 Primer für die Expressionsanalysen

Tabelle 2: Liste aller verwendeten Primer für die Messung der mRNA Expressionen. Die Primer wurden mit Hilfe der Software FastPCR generiert.

Gen-Bezeichnung	Richtung	Primersequenz	Tm °C	GC %
<i>Cox IV</i>	Fwd	5'-tggtgatcgccgtgactacc-3'	59,4	55
	Fwd	5'-tgatgtggccacgtcaagc-3'	61,4	60
	Rev	5'-tggaaaggctgctccagtcg-3'	61,4	60
	Rev	5'-atccctggaaaggctgctcc-3'	61,4	60
<i>Bhmt</i>	Fwd	5'-accagagttgccaccagatgg-3'	53	59
	Fwd	5'-gcggtattgagccctaccacatcagg-3'	58	57
	Rev	5'-tggacatcgaaggattgtacggtctgc-3'	56	51
	Rev	5'-tccaggggttggtgtgcatgtcc-3'	54	56
<i>Cbs</i>	Fwd	5'-tggcatctgctgtgtccaagagc-3'	64,0	59,1
	Rev	5'-aggacaacatgttcccagagtcacc-3'	66,4	53,8
	Rev	5'-ccattgttgcggtattggatctgctcatgg-3'	68,1	50
<i>Chk</i>	Fwd	5'-tggagtcgaagcagcttggtgg-3'	64,0	59,1
	Rev	5'-tcaccaaacactggctatggagtctgg-3'	66,4	53,8
	Rev	5'-actggaacagcatgttactgagaccacc-3'	66,6	50
<i>Dmgdh</i>	Fwd	5'-cgagtccaagtgttccatgggtttcc-3'	66,4	53,8
	Fwd	5'-caagtgttccatgggtttccatgcagg-3'	66,5	51,9
	Rev	5'-agtcagctcagcgtacactcgacc-3'	66,1	58,3
<i>Mthfr</i>	Fwd	5'-cctcatctcgaggttgaccgggttg-3'	68,0	57,7
	Fwd	5'-tccaaggacagttccagatgttccacc-3'	66,5	51,9
	Rev	5'-ggtttccaagccacagtagttcagtcg-3'	66,5	51,9
<i>Ms</i>	Fwd	5'-gctgtctgaacctcaccagtgagc-3'	68,0	57,7
	Rev	5'-tgcatacaggtggatgtcatcttggaag-3'	66,6	50
	Rev	5'-gggaaatcctcggttcgggtacttgc-3'	68,0	57,7

<i>Pcyt1a</i>	Fwd	5'-agcgctgtgcagtcggtttacg-3'	64,0	59,1
	Fwd	5'-tgtgcagtcggtttacggcagc-3'	64,0	59,1
	Rev	5'-tgcgttacgtcatcactgcagactcc-3'	66,4	53,8
<i>Pemt</i>	Fwd	5'-acacaggccatgatgagccagc-3'	64,0	59,1
	Rev	5'-tgtggtcactctggactccttgagga-3'	66,4	53,8
	Rev	5'-accacgtagacgagtgccacca-3'	64,0	59,1
<i>Sardh</i>	Fwd	5'-acagccaatgttggtggtcattggtgg-3'	64,8	50
	Rev	5'-aggccaccattctggatccagc-3'	64,0	59,1
	Rev	5'-cggatacagatccttggtctctgcagg-3'	68,0	55,6

2.6.2 RNA Isolation aus H4IIE Zellen und primären Hepatozyten

Die Präparation der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) entsprechend der Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Dazu werden die Zellen mit Lysepuffer benetzt und vom Kulturgefäß mit einem Schaber abgelöst. Die abgelösten Zellen werden nun mit dem Puffer zusammen in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 70 % Ethanol versetzt. Diese Mischung wird nun auf eine Silica-Trennsäule überführt und mehreren Waschschritten unterzogen wobei Salz-, DNA- und Proteinkontamination sukzessive entfernt werden. Die Ausbeute der Isolation wurde anschließend im Spektralphotometer gemessen.

2.6.3 RNA Isolation aus Lebergewebe

Von den tiefgefrorenen Leberproben wird ein Stück von etwa 150-200 mg abgeschnitten, ohne dass dabei die Leber oder die Probe vollständig auftaut. Die Probe wird in ein RNase freies Reaktionsgefäß überführt und mit Lysepuffer aufgenommen. Mit einem Ultraturrax wird die Probe in dem Lysepuffer homogenisiert. Die Präparation der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Midi Kits (Qiagen) entsprechend der Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die homogenisierten Leberproben werden zunächst mit einem Lysepuffer versetzt und bei 3000-5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 70 % Ethanol versetzt, auf eine Silica-Trennsäule übertragen und erneut zentrifugiert. Die RNA bindet an der Säulenmatrix und wird nun in mehreren

Waschschritten von Salz-, Protein- und DNA-Kontaminationen befreit. Die gereinigte RNA wird in ein RNase-freies Gefäß eluiert. Die Konzentrationsbestimmung der Probe erfolgt in einem Spektralphotometer.

2.6.4 DNA Isolation aus Mausschwanzspitzen

Um den Genotyp der Mäuse unserer Zuchtlinie zu bestimmen, wurde den Absatzmäusen ein winziges Stück des Schwanzes abgeschnitten (2 - 4mm). Diese Schwanzspitze wird dann mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits (Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben verarbeitet und man erhält Gesamt-DNA. Dazu wurden die Gewebestücke für mindestens 3 Stunden in einem Lysepuffer zusammen mit einer Proteinase bei 55 °C inkubiert. Bei dieser ersten Inkubation wird der Gewebeverband aufgelöst und die Zellen größtenteils vereinzelt. Danach werden die Zellen in einem zweiten Lyseschnitt bei 70°C aufgeschlossen. Dieses Lysat wird nun mit absolutem Ethanol versetzt und auf eine Silica-Trennsäule aufgetragen und mehreren Waschschritten unterzogen, bei denen die Probe sukzessive von Salz und Proteinkontaminationen befreit wird. Die gereinigte Gesamt-DNA wird nach den Reinigungsschritten in ein DNase-freies Gefäß eluiert und kann z.B. für eine PCR verwendet werden. Die Ausbeute der Isolation wurde anschließend im Spektralphotometer gemessen.

2.6.5 RT PCR zur Herstellung fluoreszenzmarkierter cDNA

Die Reaktion wurde mit dem First Strand cDNA Synthese-Kit (GE Healthcare) durchgeführt. Der Farbstoff für meine Reaktionen ist Cy3-dUTP (GE Healthcare). Dazu wird die RNA, die zuvor über Nanodrop-Photometer und Kapillarelektrophorese, auf ihre Qualität getestet wurde, mit anchored Oligo dT- Primern inkubiert. Die Inkubation beginnt mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C. Danach wird dem Ansatz erlaubt über 20-30 Minuten langsam abzukühlen und dabei findet das Primerannealing statt. Anschließend wird der Reaktionsansatz für die RT-PCR hinzugefügt und die Synthese bei 42 °C durchgeführt. Die neu synthetisierte cDNA muss nun von dem überschüssigen Farbstoff und der RNA gereinigt werden. Dazu wird die Probe mit 2 M NaOH versetzt. Nach 10 Minuten wird die Base mit 2,5

M HEPES (freie Säure) neutralisiert. Danach wird die Probe mit dem Probenpuffer des Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) versetzt und auf eine Säule appliziert und entsprechend der Herstellerangaben gereinigt und eluiert. Bei korrekter Reaktion und Reinigung entsteht ein blass-rosé gefärbte cDNA-Probe, die nun als „target“ für den DNA-Microarray eingesetzt werden kann.

2.6.6 Plasmide

Die Basis für die Promotorkonstruktvektoren war der pGL3basic Vektor von Promega. In diese Vektoren wurden zwei verschiedene Fragmente des menschlichen BHMT Promotors inseriert. Der *KpnI*-Vektor beinhaltet das Fragment mit der Region -3179 bis -28 aus dem 5'-nichtcodierenden Bereich des BHMT Gens. Der 400 bp-Vektor besitzt die Region -424 bis -28 dieses Bereichs. Die ursprüngliche Klonierung des BHMT Promotors in pBlueskript II wurde bereits in (66) genau beschrieben. Der daraus resultierende Vektor pEP8 beinhaltete neben der 5' flankierenden Region auch das Exon 1 und 2 des BHMT Gens. Um die *KpnI*- und 400bp-Vektoren herzustellen, wurde der pEP8-Vektor mit *Sall* geschnitten. Daraus entstand ein 10 kilobasenpaar (kb) Fragment, welches über Gelelektrophorese gereinigt und mit *KpnI* erneut verdaut wurde. Das entstandene 3,2 kb Fragment wird erneut gereinigt und in den, mit *KpnI* und *XhoI* linearisierten, pGL3 basic Vektor ligiert. Der 400 bp-Vektor leitet sich vom *KpnI*-Vektor ab. Dazu wird das *KpnI*-Konstrukt wurde mit *StuI* geschnitten und über eine T4 DNA Polymerase mit blunt ends versehen. Nach der Reinigung wurde das Fragment in den pGL3 basic plus Vektor ligiert. Die Konstrukte wurden durch Sequenzierung auf ihre Orientierung und Fehlerfreiheit untersucht (67). Die Konstrukte *KpnI* und 400bp wurden freundlicherweise von T. Garrow zu Verfügung gestellt.

2.6.7 Plasmidpräparation aus E.coli

Zur Vermehrung des Luciferasevektors wurde dieser in kompetente DH5 α -E.coli Bakterien (Invitrogen) transformiert und in einer 100 ml Kultur über Nacht herangezogen.

Zur Präparation wurden die Bakterien abzentrifugiert, lysiert und die DNA über eine Säule aus dem Lysat herausgefiltert. Die Lyse und Reinigung der Plasmid DNA wurde mit dem Kit Nucleobond von Macherey – Nagel durchgeführt. Nachdem die DNA gereinigt vorliegt, wird sie anschließend mittels Isopropanol und Ethanol aus dem Eluat gefällt und zum Schluss getrocknet. Nachdem der Alkohol verdampft ist, kann die reine DNA in einem gewünschten Volumen TE Puffer oder Wasser resuspendiert und für die Magnetofektion eingesetzt werden.

2.6.8 Nukleinsäurequantifizierung mittels Spektral-Photometer

Nukleinsäurekonzentration erfolgte durch Messung der Absorption im Bereich von 260 nm, 280 nm und 320 nm mit einem Photometer. Bei 280 nm wird der Proteingehalt der Lösung bestimmt und die Absorption bei 320 nm ist ein Maß für Streuung. Der Quotient A_{260}/A_{280} gibt die Reinheit der Nukleinsäureproben an. Für die hochsensitiven Methoden wie DNA Microarrays und Realtime PCR sollte dieser Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Der Messwert der Absorption bei 320 nm wird von den Messwerten bei 260 nm und 280 nm abgezogen. Die Konzentration und Reinheit wurde nach Sambrook et al. berechnet. Für hochmolekulare DNA entspricht eine Absorption A_{260} von 1 genau 50 μg DNA/ml, für RNA 40 μg . Die Reinheit ist jedoch nicht mit der tatsächlichen Qualität der RNA/DNA zu verwechseln. Das Photometer gibt lediglich die Menge und die Reinheit der Nukleinsäuren an.

2.6.9 Bestimmung der Mausgenotypen mittels multiplex PCR

Die DNA aus den Mausschwänzen wird in einer multiplex-PCR auf ihren Genotyp bezüglich des MTHFR-Gens untersucht. Multiplex PCR bedeutet, dass mehr als ein Primerpaar in der Reaktion vorhanden sind und somit unterschiedlich große Fragmente in einer Reaktion amplifiziert werden können. Für die Genotypisierung

bedeutet das, dass ein Wildtypallel und ein mutiertes Allel gleichzeitig in einer Reaktion amplifiziert werden kann, wenn die Primer entsprechend gestaltet wurden.

2.6.10 Primer für die Genotypisierung der MTHFR-Mäuse

Tabelle 3: Liste der Primer für die Genotypisierung der MTHFR-Mäuse

Genbezeichnung	Richtung	Primersequenz	T _m °C	GC %
<i>Mthfr 1</i>	Fwd	5' -GAAGCAGAGGGAAGGAGGCTTCAG-3'	66,1	58,3
<i>Mthfr 2</i>	Fwd	5' -AGCCTGAAGAACGAGATCAGCAGC-3'	64,4	54,2
<i>Mthfr 3</i>	Rev	5' -GACTAGCTGGCTATCCTCTCATCC-3'	64,4	54,2

Die Genotypen der Mäuse wurden mittels Multiplex-PCR bestimmt. Die PCR wurde mit der HotstarTaq-Polymerase von Qiagen durchgeführt. Das Primergemisch von 3:2:3 (Primer 1/2/3) und die ideale Menge von 5 mM MgCl₂ für die Reaktion sowie die optimale Annealingtemperatur von 68,5°C wurde in aufwendiger Optimierungsarbeit ermittelt. Das PCR-Temperaturschema sieht nun wie folgt aus:

- 1: Denaturierung : 15 Minuten bei 95 °C
- 2: Denaturierung : 30 Sekunden bei 95 °C
- 3: Annealing : 30 Sekunden bei 68,5 °C
- 4: Elongation : 1 Minute bei 72 °C

Schritt 2-4 werden 35x wiederholt

Die Methode wurde erstmals in (68) beschrieben.

Nach der PCR werden 10-15 µl des Reaktionsansatzes auf in einer Agarose-gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wird nach der Elektrophorese für 20 Minuten in ein Ethidiumbromid-Bad getaucht und die gefärbten Banden unter UV-Licht betrachtet.

2.6.11 Bestimmung der Genexpression mittels Realtime PCR

Für die Bestimmung der Genexpression mit Hilfe der Realtime PCR-Technik wurde zunächst eine endogene Kontrolle benötigt, um minimale Qualitäts- und Mengenschwankungen der DNA herausrechnen zu können. Ein Gen, welches sich als endogene Kontrolle eignet, wird optimalerweise durch die Versuchsbedingungen

nicht in seiner Expression verändert. Das mitochondriale Cytochrom C Oxidase subunit IV Gen entsprach dieser Vorgabe. Das Primerdesign wurde mit Hilfe der Software FastPCR durchgeführt. (R. Kalendar, Institute of Biotechnology, Helsinki; (http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/download.htm)). Die Primer besitzen einen T_m zwischen 58°C und 63°C mit einem GC Gehalt von 50-60% (Tabelle 2).

Für die Realtime PCR wurde mit dem SYBR-Green® RT-PCR Kit von Qiagen gearbeitet. Bei dieser One-Step Realtime PCR wird Gesamt-RNA in die Reaktion als Template eingesetzt. Die Qualität und Quantität der RNA wird nach jeder Isolation bestimmt und 150 ng der RNA wird in jede einzelne Reaktion als Template eingesetzt. Das Umschreiben der RNA in cDNA findet in einem initialen Schritt vor der eigentlichen Realtime PCR statt. Die Realtime PCR wurde in ein Applied Biosystems Prism 7700 Sequence Detection System in weißen 96-well Reaktionsgefäßplatten mit transparentem Deckel von Peqlab durchgeführt.

Die gesamte Reaktion ist dreistufig und hat folgendes Schema:

Stufe 1 : cDNA Synthese (30 Minuten bei 50 °C)

Stufe 2 : Denaturierung (15 Minuten bei 95 °C)

Stufe 3 : Realtime PCR (20 Sekunden 95 °C, 1 Minute 60 °C, 1 Minute 72 °C) für 40 Zyklen. Nach jedem Elongationsschritt der Stufe 3 wird die Fluoreszenz der einzelnen Reaktionen gemessen. Die Datenpunkte werden als Fluoreszenzsignal gegen die Zyklusnummer aufgetragen. Der Fluoreszenzwert (R_n) wird nach der folgenden Formel berechnet.

$$\theta R_n = (R_{n+}) - (R_{n-})$$

Dabei stellt R_{n+} das Fluoreszenzsignal des Reaktionsproduktes und R_{n-} das Basisfluoreszenzsignal dar, welches aus den Emissionen der Zyklen 6-15 berechnet wird. Ein beliebiger Schwellenwert wird in die logarithmische Phase der Kurve R_n gegen Zyklusnummer gelegt. Der Zyklusschwellenwert (C_t) wird als Zyklusnummer definiert, an dem die R_n Kurve den Schwellenwert schneidet. Der relative Unterschied der cDNA-Konzentration wird als $\Delta\text{Conc} = 2^{(C_{tA}-C_{tB})}$ bestimmt, wobei A die zu untersuchende Probe und B die zur Normalisierung verwendete Kontrolle darstellt. Die Spezifität der Reaktion wurde im Anschluss an die Realtime PCR durch eine Analyse der Dissoziationskurven überprüft. Jede Kurve zeigte ein eindeutiges Produkt.

2.6.12 Expressionsscreening mittels DNA Microarrays

Die Arrayslides sind Glasslides, die mit einer Epoxysilanschicht (Eppendorf) versehen wurden. Die von uns gewünschten Sonden sind Oligomere (70-mere) die im Microarraylabor der Universität mit Hilfe der SoftwareOligoWiz erdacht und von Operon synthetisiert wurden. Im Microarraylabor wurden dann die Sonden im Triplikate auf die Slides „gespottet“. Das geschah automatisiert mit dem Affymetrix GMS417 Arrayer bei 55 % Luftfeuchte und 20 °C Raumtemperatur. Dabei werden die Sonden durch eine säurekatalysierte Reaktion kovalent auf der Epoxysilan-Oberfläche des Slides gebunden. Die Reaktion wird gemäß der Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die Qualität der „Spots“ auf den Slides wurde durch SYBR-Green II Färbung überprüft.

Die fluoreszenzmarkierte cDNA wurde in Hybridisierungspuffer verdünnt. Die cDNA wurde denaturiert (10 Minuten bei 95°C) und anschließend in eine ASP Hybridisierungsstation (Amersham Pharmacia). Das ASP wurde mit dem folgenden Programm betrieben.

1. Prähybridisierung : 1h bei 42 °C mit Hybridisierungspuffer
2. Hybridisierung : 12h bei 42 °C mit cDNA in Hybridisierungspuffer
3. Waschen : 60s bei 30 °C mit 2xSSC/0,05 % SDS
4. Spülen : 2x 60 s bei 30 °C mit 2xSSC

Die hybridisierten Arrays werden in einem Fuji FLA 8000 Scanner visualisiert. Die Einstellungen des Scanners sind: Excitation 532 nm, Emissionsfilter 570 nm, Auflösung 10µm, Scangeschwindigkeit 200mm/s, Photomultiplier-Spannung 100 %.

Die Auswertung der eingescannten Slides wurde im Microarraylabor mit Hilfe der AIDA Array Analysis Software (Version 3.21) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte wie in (43) beschrieben.

2.7 Proteinanalysen

2.7.1 Antikörper für Immunodetektion

Für die Detektion der DMGDH und der SARDH wurde ein Antiserum verwendet, welches uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. R. Brandsch (Universität Freiburg/Br.) zu Verfügung gestellt wurde. Dieses Antiserum wurde aus Kaninchen gewonnen. Als Auftragskontrolle habe ich in meinen Versuchen GAPDH als unbeeinflusstes Housekeeping Gen verwendet. Der Antikörper GAPDH (FL-335) polyclonal IgG wurde von SantaCruz Biotechnologies bezogen. Als Zweitantikörper wurde einen HRP-gekoppelten goat-anti-rabbit Antikörper von SantaCruz Biotechnologies verwendet.

2.7.2 Lysatherstellung für die Messung in der Tandem MS

Nachdem die Zellen bis zur 90%ige Konfluenz auf den 10cm Platten gewachsen sind, werden die Zellen anschließend für 8-16 Stunden auf serumfreies Medium umgestellt. Im Anschluss werden die Zellen für 24 Stunden auf die gewünschte Osmolarität eingestellt. Danach wird das Medium abgezogen und die Zellen zweimal mit 10ml sterilem PBS gewaschen um sämtliche Mediumreste zu entfernen. Da im Medium ebenfalls ein Teil der Metabolite, die nachher in der MS bestimmt werden sollen, vorhanden sind, muss eine besonders gründliche Reinigung vor der Lyse stattfinden. Zur Lyse wird nun STET – Puffer pH 8,0 (Fluka) auf die Zellen gegeben und der Zellrasen mit dem Spatel abgeschabt. Das inhomogene Gemisch wird sofort in ein Reaktionsgefäß überführt und auf Eis für 60 Minuten belassen. Anschließend werden die Zelltrümmer in einer Zentrifuge bei 4°C für 30 Minuten abzentrifugiert und der Überstand in ein sauberes Gefäß überführt. Zur Untersuchung im Tandem-Massenspektrometer müssen die Proben noch von Proteinen befreit werden. Das geschieht mittels einer Proteinfällung mit 10%iger Sulfosalicylsäure. Das ausgefallene Protein wird für 10 Minuten abzentrifugiert und anschließend kann der Überstand für die Tandem-Massenspektrometrie verwendet werden.

2.7.3 Aufarbeitung von Lebergewebeproben für die Messung in der Tandem MS

Von tiefgefrorenen Leberpräparaten werden kleine Proben ca. 500 mg abgeschnitten ohne dass die Leber dabei vollends auftaut. Die Probe wird in STET Lysepuffer mit einem Ultraturrax (Kinematica) homogenisiert. Dabei ist darauf zu achten, dass sich die Probe nicht zu stark erwärmt um ein Destabilisierung der Metabolite oder enzymatischen Abbau zu vermeiden. Danach werden die Homogenisate für 30 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand wie üblich zur Messung im Tandem-Massenspektrometer vorbereitet.

2.7.4 Lysatherstellung für Westernblot Analysen

Für ein Volllysat werden die Zellen nach Abschluss der Versuchsphase mit PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe des STET pH8 Puffers für 30 Minuten lysiert und zum Schluss zentrifugiert. Die festen Zellbestandteile werden dabei von den löslichen Bestandteilen getrennt. Der Überstand kann nun zur elektrophoretischen Trennung verwendet werden.

2.7.5 Proteinfraktionierung

Wenn im Westernblot zu viele unspezifische Proteine durch das Antiserum erkannt werden, macht es Sinn, einen Teil der überflüssigen Proteine durch Fraktionierung aus der Probe zu entfernen. Mit Hilfe des QProteome Cell Compartment Kit kann durch Zugabe spezieller Puffer und durch Einhaltung definierter Zentrifugationsschritte das Volllysat in Proteine verschiedener Kompartimente der Zelle getrennt werden. Mit dem von mir verwendeten Kit wurde das Lysat in zytosolische Proteine (Schritt1), membranassoziierte Proteine (Schritt2), nukleäre Proteine (Schritt3), Zytoskelettproteine (Schritt4). Für die Analysen wurde die membranassoziierten Proteine der Fraktion 2 verwendet.

2.7.6 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde als Tanksystem auf einer Apparatur von BIO-RAD durchgeführt. Als Gelmatrix dienten Precast Ready-Gele mit 7,5% mit einem Tris-Glycin-Puffersystem. Die Proben werden mit Lämmli-Puffer versetzt und für 15-20 Minuten im Thermoblock bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. 24µl der Probe (das entsprach im Schnitt 8 mg Protein) in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit 200V/35mA/15W für 90-120 Minuten durchgeführt. Zur optischen Kontrolle der Laufrichtung besitzt der Lämmli-Puffer einen blauen Farbstoff. Zur späteren Identifizierung der Bandengröße lief bei jedem Gel eine Bahn mit einem Größenstandard mit.

2.7.7 Westernblot und Immunodetektion

Nach der Elektrophorese werden die Proteine aus dem Gel durch ein Wet-Blot-Westernblot Verfahren auf einen PVDF – Membran übertragen. Bei einem Wet-Blot sind der gesamte Blot in einen Puffertank eingetaucht und durch anlegen eines elektrischen Feldes, werden die Proteine auf die Membran übertragen. Der Blot wurde mit 200V/350mA/50W durchgeführt. Danach wird der Blot abgebaut und die Membran sofort in den Blockierungspuffer überführt. Der Blockierungspuffer sorgt dafür, dass die Bindungsstellen der Membran, an der keine Proteine aus dem Gel sind, durch ein unkritisches Protein oder Molekül abgedeckt werden, so dass diese blockierten Stellen bei der anschließenden Immunodetektion kein Signal abgeben. Nach einer Stunde wird der Blockierungspuffer verworfen und der erste Antikörper/das erste Antiserum (1.AK) gegen das gewünschte Protein auf die Blots gegeben. Die Antikörper werden in einer Verdünnung von 1:1000 (DMGDH und SARDH) bzw. 1:5000 (GAPDH) verwendet. Als Puffer für den 1.AK dient ebenfalls wieder der Blockierungspuffer. Der Antikörper bleibt über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln auf dem Blot. Nach dieser Inkubation wird der Puffer mit dem ersten Antikörper verworfen und der Blot für mindestens 2 Stunden bei regelmäßigem Wechsel des Waschpuffers (TBS-T_{0,1%}) gewaschen. Danach wird in frischem Waschpuffer der 2.AK verdünnt. Es wurde eine Verdünnung von 1:10000 verwendet. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper dauert 1h und findet bei

Raumtemperatur statt. Der Puffer mit dem Zweit-AK wird nach der Inkubationszeit verworfen und der Blot erneut für mindestens 2 Stunden gewaschen, wobei der Waschpuffer regelmäßig gewechselt werden muss. Für die Detektion wurde ein Substrat verwendet, womit die, an den Zweit-AK gebundene Peroxidase (HRP), eine Licht emittierende Reaktion durchführt und somit die Detektion auf einem lichtempfindlichen Film ermöglicht. Das Substrat ist ein Zweikomponentensystem aus Substrat und Verstärkerlösung, die erst kurz vor der Verwendung frisch zusammengemischt werden. Der Blot wird 5 Minuten in diesem Gemisch getränkt. Unter Lichtabschluss wird nun ein Film aufgelegt. Dieser konnte danach automatisiert in einer Entwicklerstation entwickelt werden.

2.7.8 Metabolitenmessungen mittels Tandemmassenspektrometer

Die Metabolite wurden mittels High-Performance-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS) analysiert. Die Proben werden in ein gekühltes Fach des Probengebers gestellt von wo aus 30 µl einer Probe in das Gerät injiziert wird. Die Probe wird auf der HPLC über eine Agilent Zorbax 300SB-C8 Säule getrennt. Das Laufmittel ist eine Mischung aus Lösung A (0,005% [v/v] Ammoniak in Wasser, pH 9,0) und Lösung B (0,65 M Essigsäure, pH 2,0). Danach läuft die getrennte Probe in das Tandem-Massenspektrometer wo es mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,8ml/min mit den folgenden Schritten in das Gerät.

0-0,5 Minuten 100% Lösung A

0,5-3,0 Minuten 100% Lösung B

3,0-10 Minuten 100% Lösung A

Die ESI Sonde wurde im Positive Ion Modus verwendet.

Der Injektionsintervall zwischen zwei Proben betrug 12 Minuten. Als Trocknungsgas wurde Stickstoff mit einer Flussrate von 650l/h verwendet. In der Kollisionszelle wurde Argon als Kollisionsgas verwendet und die Kollisionsenergie betrug für Betain / Betain d11 16eV, für DMG /DMGd6 12 eV. Die Ionenquelle wurde auf 100°C gehalten und die „declustering Energy“ betrug 18 eV für DMG und 31 eV für Betain. Die Metabolite wurde mit dem „Multi-reaction monitoring“ Modus detektiert. Folgende Massenverschiebungen ließen sich beobachten. DMG, m/z 103,8 → 57; d6-DMG, m/z 109,8 → 63,6; Betain, m/z 128,9 → 58,5; d11-Betain, m/z 67,6. Die Datenanalyse wurde mit der Software Masslynx NT 4.0 durchgeführt. Durch

„gespiketes“ Lysat wurde eine Standardreihe hergestellt, wodurch gleichbleibende Sensitivität und Linearität bei der Messung der Proben gewährleistet werden soll. Die Konzentration der Metabolite in den Proben wurde aus dem Verhältnis der Flächen der Peaks von Betain bzw. DMG zu denen der mit stabilen Isotopen markierten internen Standards Betain-d11 bzw. DMG-d6 berechnet.

2.7.9 Dual-Luciferase Assay im Luminometer

Die Expression der Luciferase, die als Reportergen mittels Magnetofektion in die Zellen eingebracht wurde, kann nach Lyse der Zellen mit einem Dual-Luciferase-Reporter-System (Promega) gemessen werden. Dabei wird die Menge der hergestellten Luciferase der Lichtmenge gleichgesetzt, die beim Assay gemessen wird. Die Messwerte werden gegen die Hintergrundlumineszenz und die Lichtmenge des Kontrollvektors korrigiert.

Die Zellen werden einmal gründlich mit PBS gewaschen und anschließend mit 100µl Passiv-Lysis-Buffer (PLB) aufgeschlossen. Die Lyse dauert 15 Minuten und findet bei Raumtemperatur statt. Dieses Lysat kann ohne weitere Bearbeitung für den Assay eingesetzt werden. Dazu werden 20 µl des Lysats in einem Ascent Luminometer (Labsystems,Thermo) gemessen. In die Probe wird zuerst 100µl Luciferase-Assay-Puffer gegeben und die Lichtmenge über 10 Sekunden gemessen. Dieser erste Reaktionsschritt beinhaltet das Substrat für die Firefly-Luciferase. Nach dieser Messung wird durch Zugabe eines „Stop and glo“ Reagenz die Firefly Lichtemission gestoppt und gleichzeitig die Lichtemission der Renilla–Luciferase durch ein passendes Substrat aktiviert. Diese dient als Kontrolle und soll ein Maß für die Lumineszenz ohne das Promotorkonstrukt festlegen. Diese Emission wird ebenfalls für 10 Sekunden gemessen. Jede Probe wurde als Triplikat durchgeführt.

2.8 Arbeiten am Tier

2.8.1 Probengewinnung

In einem Akutversuch werden die Tiere durch CO₂ Begasung getötet. Da das Herz noch etwa eine Minute weiter schlägt, kann unmittelbar anschließend das Herz mit einer Kanüle punktiert und ca. 0,5 - 1ml Blut vorsichtig abgezogen und in ein mit Kalium EDTA versetztes Blutsammelgefäß überführt werden. Anschließend kann das Tier auf der ventralen Seite eröffnet und die Leber präpariert werden. Die Leber wird sofort nach der Freilegung geteilt, in ein sauberes Gefäß überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schock-tiefgefroren. Aus den tiefgefrorenen Proben lässt sich nach dem Auftauen RNA für weitere Analysen extrahieren. Das entnommene Blut wird für 10 Minuten zentrifugiert und der Plasmaüberstand in ein sauberes Gefäß überführt. Das Plasma kann nach seiner Enteiweißung zur Analyse in der Tandem-Massenspektrometrie verwendet werden.

2.8.2 Isolation primärer Hepatozyten durch Perfusion mit Kollagenase

Das Tier wird vor Versuchsbeginn in eine tiefe Narkose gelegt. Der Bauchraum wird eröffnet und die Leber freigelegt. Zuerst wird die Pfortader kanüliert und die Kanüle mit einer Ligatur fixiert. Danach wird das Organ für 15 Minuten mit einer Ca²⁺/SO₄²⁻-freien Perfusionslösung perfundiert. Die Durchflussgeschwindigkeit wird der Größe der Leber angepasst. Verzögerungsfrei wird die Perfusion mit kollagenasehaltiger Perfusionslösung für 8-10 Minuten fortgesetzt. Gegen Ende der Perfusion wird damit begonnen, die Leber frei zupräparieren. Nach Ende der Perfusion wird die Leber ganz entnommen und von leberfremden Gewebe befreit. Die Leberkapsel wird mit einer Kanüle mehrfach punktiert und die enthaltene Flüssigkeit zusammen mit den gelösten Zellen vorsichtig heraus gespült werden. Die Zellen werden zunächst grob filtriert und anschließend bei 500 rpm in einer Zentrifuge sedimentiert. Das Medium wird verworfen. Die Zellen werden in Krebs-Henseleit-Puffer resuspendiert und feinfiltriert. Aus dem Filtrat werden die Zellen erneut bei 500rpm sedimentiert. Nun werden sie resuspendiert, gezählt und anschließend in die dafür vorgesehenen Kulturgefäße überführt. Die Zellen benötigen etwa 3-4 Stunden um auf dem Boden der Kulturgefäße zu adhären.

2.8.3 Bestimmung der Proteolyserate in perfundierten Mauslebern

Zwei Tage vor Versuchsbeginn wird den Mäusen intraperitoneal eine ^3H -Leucin-Lösung verabreicht. Das ^3H -Leucin wird sukzessive in körpereigenes Protein eingebaut. Am Versuchstag werden die Tiere wie zuvor bei der Isolation der primären Hepatozyten beschrieben, zur Perfusion vorbereitet und mit $\text{Ca}^{2+}/\text{SO}_4^{2-}$ -freien Perfusionslösung perfundiert. Nachdem sich ein Äquilibrium eingestellt hat erfolgt die Perfusion mit hypoosmolarer Perfusionslösung. Die Probenentnahme fand im Rhythmus von zwei Minuten zwischen 80 und 190 Minuten statt. Im Eluat wird die Konzentration des Leucins bestimmt. Hierbei repräsentiert die Konzentration des markierten Leucins die intrazelluläre Proteolyserate in der Leber. In diesem Versuchsansatz wird der Einfluss einer hypoosmolaren Stimulation auf die Proteolyserate der Leber in Abhängigkeit vom Genotyp analysiert.

2.9 Auswertung

2.9.1 Software und Datenanalyse

Die Daten wurden mit Hilfe von Microsoft Excel organisiert und ausgewertet.

Für die statistische Auswertung und die graphische Darstellung wurden die Daten in das Programm Graphpad Prism 3.0 übertragen.

Die Skalierung und Organisation der Abbildungen und Graphen wurde in Adobe Photoshop CS und die Beschriftung in Microsoft Powerpoint durchgeführt.

2.9.2 Statistik

Alle Ergebnisse wurden aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen in Triplikaten generiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. Vergleiche zwischen den Ergebnissen wurden mittels one-way ANOVA oder two-way ANOVA, je nach Situation durchgeführt, gefolgt von einem Bonferroni Multi-Vergleichstest oder single-t-Tests. Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Vitalität der H4IIE Zellen unter Anisoosmolarität

Um ausschließen zu können, dass die Auswirkungen der Osmolarität auf die Expression durch Artefakte zustande kommt, die durch eine sterbende Zellpopulation hervorgerufen wird, wurde mit den Zellen ein Überlebenstest durchgeführt. Dieser MTT-Assay zeigte, dass die Zellen sowohl in hyperosmolarem als auch in hypoosmolarem Medium für mindestens 48h zu mindestens 80% überlebten.

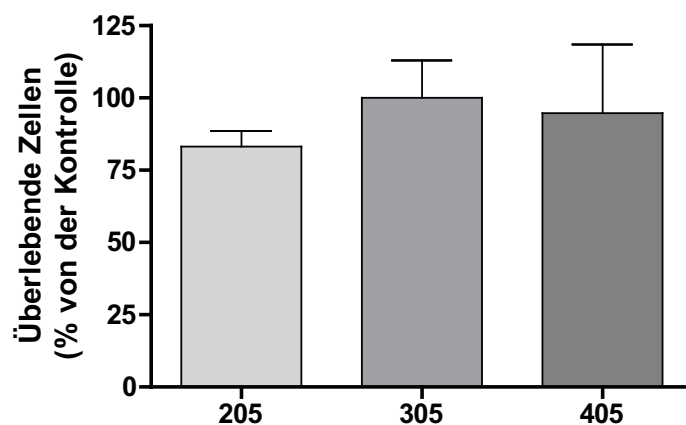


Abbildung 3: Messung der Zellvitalität unter Einfluss anisoosmolarer NaCl Konzentrationen. Die Zellen werden in eine Vertiefung einer 96-well Zellkulturplatte ausgesät und, wie bereits unter Material und Methoden beschrieben, vorbereitet. Nach der serumfreien Inkubation werden die Zellen für 48h einer hypo- normo- oder hyperosmolaren Situation ausgesetzt. Anschließend wird das MTT-Substrat in das Medium gegeben und vorsichtig verteilt. Nach zwei Stunden wird die Intensität des Farbstoffes in einem Photometer gemessen. Die Intensität des Farbstoffes korreliert proportional mit dem Zustand der Zellen. Als Kontrolle dient die Farbstoffintensität eines wells in denen keine Zellen gewachsen sind. (n=3)

Auch für den Ansatz des mRNA Stabilitätsversuchs wurde ein Überlebenstest durchgeführt. Wie bereits beschrieben ist Actinomycin D ein Gift, welches die Transkription blockiert und damit ist zu erwarten, dass die Zellen nicht allzu lange überleben werden. Tatsächlich zeigt aber der MTT-Test, dass nach 5 Stunden noch mindestens 70% der Zellen leben.

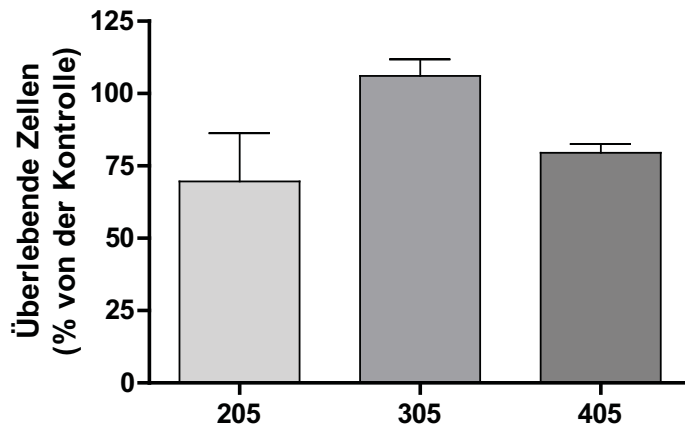


Abbildung 4: Messung der Zellvitalität nach Inkubation mit anisoosmolaren NaCl Konzentrationen mit jeweils 10 µg/ml **Actinomycin D**. Die Zellen werden wie zuvor in der Legende von Abbildung 3 behandelt und zusätzlich zum Mediumwechsel mit 10µg/ml Actinomycin D inkubiert. (n=3)

In regelmäßigen Abständen wurde die Zellvitalität nach 24 h Inkubation mit anisoosmolaren Medien mittels Trypan-Blau Färbung durchgeführt. Die Überlebensrate betrug in diesen Messungen stets über 90 %, meist sogar über 95 %. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Trypanblau Färbung nur diese Zellen markiert, die bereits tot sind und deren Zellwände für den Farbstoff durchlässig geworden sind. Zellen, die sich möglicherweise auf dem Weg in die Nekrose oder Apoptose befinden, aber deren Zellwand noch intakt ist, werden durch diese Färbung nicht erkannt. Allgemeinen deutet eine 95 %ige Überlebensrate auf einen guten Gesamtzustand der Zellen in den Versuchzeiträumen hin.

3.2 Quantifizierung der mRNA Konzentration in H4IIE-Zellen mittels Realtime PCR

3.2.1 Cholindegradation

Die steady-state mRNA Konzentrationen der Enzyme im Cholindegradationsweg wurden untersucht. Neben der Osmolaritätsabhängigkeit wurde die mRNA Expression auch in Abhängigkeit der Inkubationsdauer in anisoosmolarem Medium untersucht.

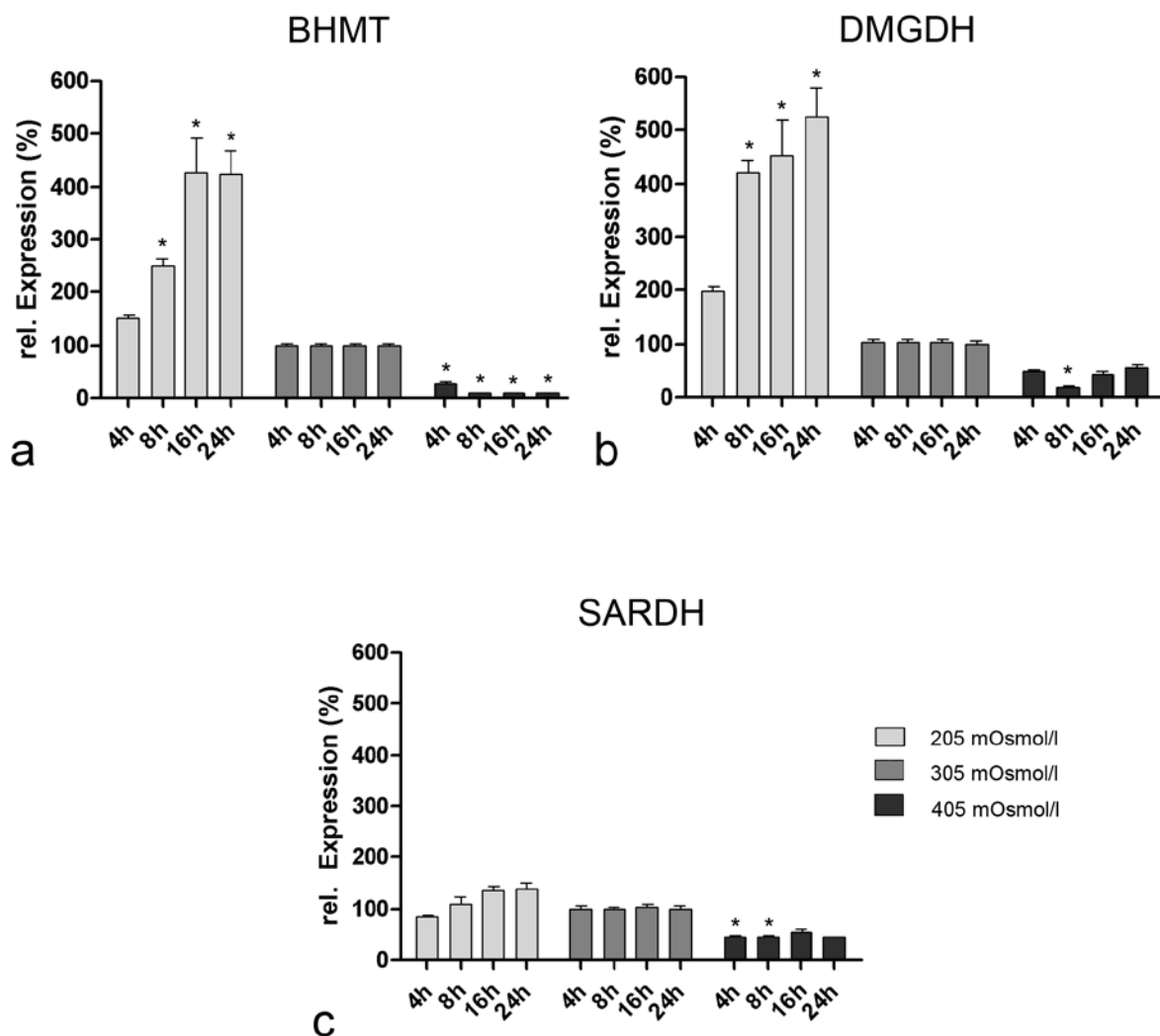


Abbildung 5: **BHMT, DMGDH und SARDH mRNA Expression in H4IIE-Zellen.**

Die Zellen wurden für 4, 8, 16 und 24 h mit hypo- (205 mOsmol/l), normo- (305 mOsmol/l) und hyperosmolarem (405 mOsmol/l) Medium inkubiert. a) BHMT mRNA Expression b) DMGDH mRNA Expression c) SARDH mRNA Expression. Jeder Balken entspricht 3 unabhängigen Versuchen mit Messungen als Triplikat. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Die Werte sind gegen die mRNA Expression der Cytochrom C Oxigenase subunit IV normalisiert. Die CoxIV wird durch die anisoosmolare Inkubation nicht beeinflusst. Die Werte sind relativ zur normosmolaren Kontrolle dargestellt. Signifikante Änderungen sind mit einem * markiert.

Es wird deutlich, dass die DMGDH und die BHMT in Abhängigkeit von der Zeit unter hypoosmolaren Bedingungen eine starke Zunahme und unter hyperosmolaren Bedingungen eine deutliche Abnahme der mRNA Expression zu verzeichnen haben. Die Expression der SARDH zeigt eine ähnliche Tendenz, allerdings in einer deutlich schwächeren Ausprägung.

3.2.2 Phosphatidylcholinsynthese über den Kennedy Weg

Die Cholinase ist das Enzym, welches den ersten Schritt des Cholins in Richtung Phosphatidylcholin-Synthese katalysiert. Die Expression der Cholinase (CHK) zeigt unter hypoosmolarem Stimulus eine schnelle Abnahme, die sich aber bereits nach kurzer Zeit bis fast auf Ausgangsniveau normalisiert. Genau entgegengesetzt ist der Effekt unter hyperosmolaren Bedingungen.

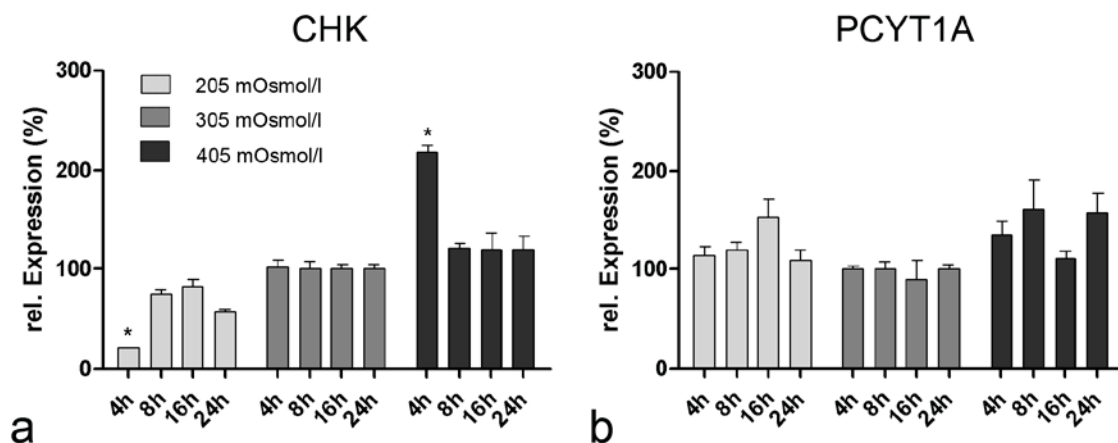


Abbildung 6: **CHK und PCYT1A mRNA Expression in H4IIE-Zellen.**

Die Zellen wurden für 4, 8, 16 und 24 h mit hypo- (205 mOsmol/l), normo- (305 mOsmol/l) und hyperosmolarem (405 mOsmol/l) Medium inkubiert. a) CHK mRNA Expression b) PCYT1A mRNA Expression. Jeder Balken entspricht 3 unabhängigen Versuchen mit Messungen als Triplikat. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Signifikante Änderungen sind mit einem * markiert.

Dort ließ sich ein deutlicher Anstieg der mRNA Konzentration nachweisen, der sich aber ebenfalls wieder nach kurzer Zeit auf einem leicht erhöhten Niveau einpendelte. Die Phosphatidylcytidyltransferase 1a katalysiert den Schritt vom Phosphocholin zum Cytidylphosphocholin und zeigt weder unter hypoosmolaren Bedingungen, noch unter hyperosmolaren Bedingungen eine osmosensible Regulation.

3.2.3 Phosphatidylcholinsynthese über den PEMT Weg

Die PEMT katalysiert die dreistufige Reaktion vom Phosphatidylethanolamin zum Phosphocholin. Als Methylgruppendonator dient S-Adenosyl-Methionin. Die PEMT zeigt unter hypoosmolaren Bedingungen keine und unter hyperosmolaren Bedingungen nur eine kurzfristige Abnahme der Expression.

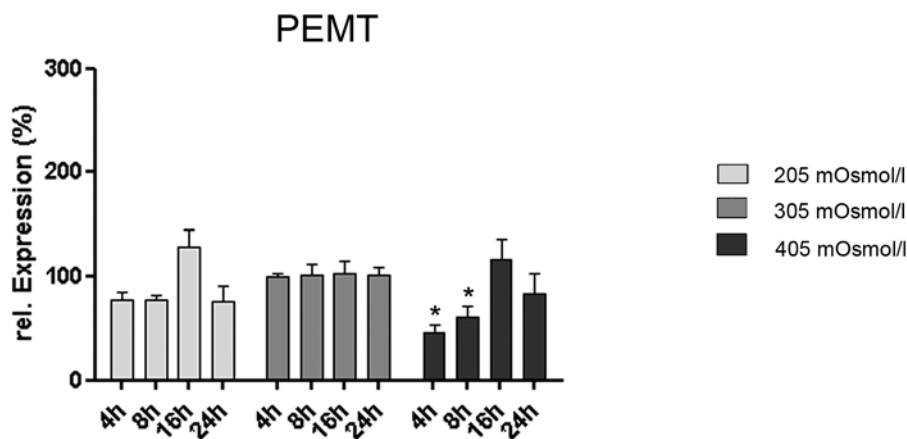


Abbildung 7: **PEMT mRNA Expression in H4IIE-Zellen.**

Die Zellen wurden für 4, 8, 16 und 24h mit hypo- (205 mOsmol/l), normo- (305 mOsmol/l) und hyperosmolarem (405 mOsmol/l) Medium inkubiert. Jeder Balken entspricht 3 unabhängigen Versuchen mit Messungen als Triplikat. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Signifikante Änderungen sind mit einem * markiert.

3.2.4 Transsulfurierung und Folsäure-abhängige Remethylierung

Die Enzyme des Folsäure-abhängigen Remethylierungsweges Methioninsynthase (MS) und Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) (68), sowie das Schlüsselenzym für die Transsulfurierung von Homocystein nach Cystathionin, die Cystathionin-beta-Synthase (CBS) (69), wurden ebenfalls auf ihre mRNA Expression unter osmotischem Stress untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Expression der CBS sowie die Expression der Methioninsynthase keine eindeutige Abhängigkeit von der Umgebungsmolarität aufweist. Die MTHFR hingegen zeigt einen Trend zur Expressionssteigerung unter hyperosmolaren Bedingungen.

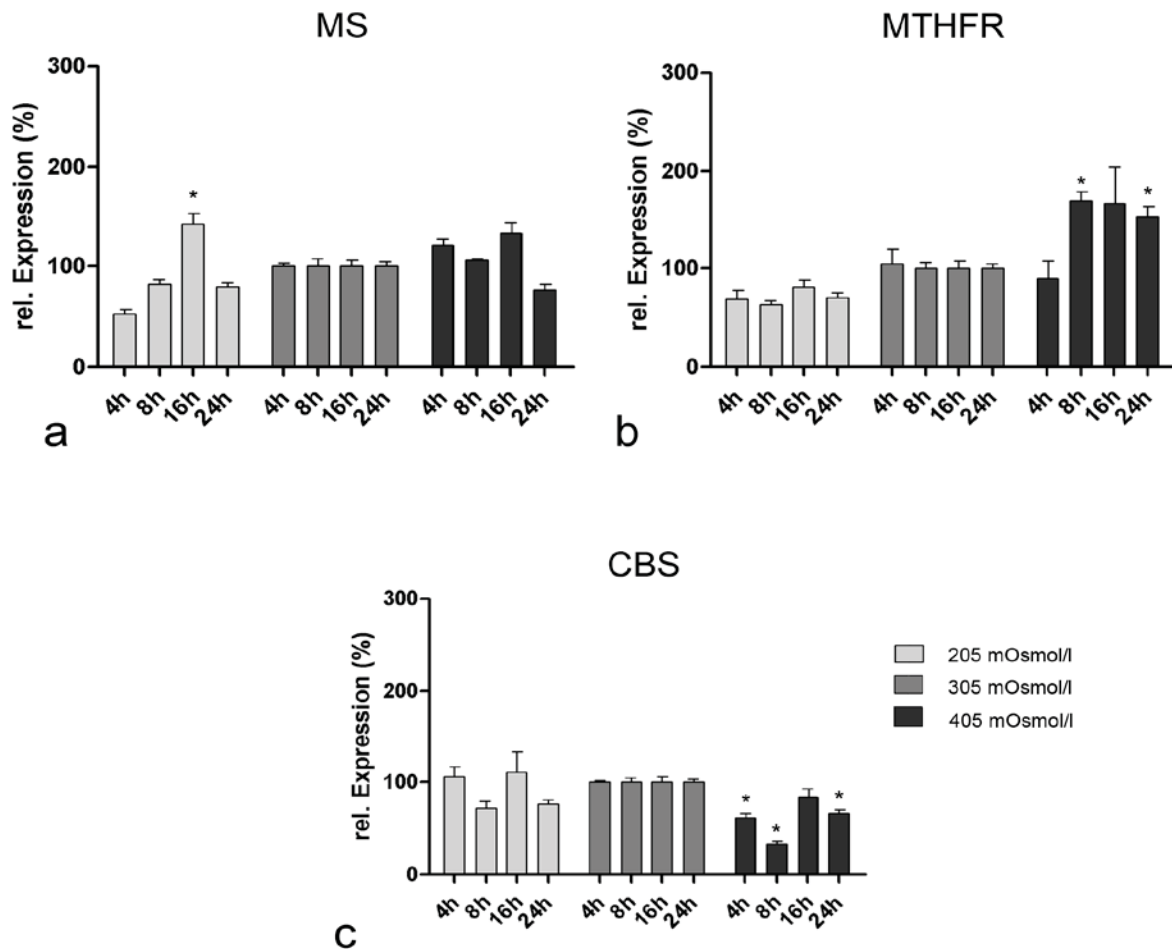


Abbildung 8: **MS, MTHFR und CBS mRNA Expression** der Schlüsselenzyme für die Transsulfurierung und die Folsäure-abhängige Transmethylierung in H4IIE-Zellen.

Die Zellen wurden für 4, 8, 16 und 24h mit hypo- (205 mOsmol/l), normo- (305 mOsmol/l) und hyperosmolarem (405 mOsmol/l) Medium inkubiert. a) MS mRNA Expression b) MTHFR mRNA Expression. c) CBS mRNA Expression. Jeder Balken entspricht 3 unabhängigen Versuchen mit Messungen als Triplikat. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Signifikante Änderungen sind mit einem * markiert.

Dadurch dürften der Zelle verstärkt Methylgruppen aus dieser Quelle zur Verfügung stehen, wodurch sich möglicherweise das Verhältnis zwischen Folsäure-abhängiger Remethylierung und Betain-abhängigen Remethylierung zu Gunsten der Remethylierung via Methioninsynthase verschiebt. Unter hypoosmolaren Bedingungen sehen wir einen Trend zur Expressionsminderung der MTHFR was möglicherweise das Remethylierungsverhältnis in Richtung BHMT verschiebt.

3.3 Sensitivität der Zellvolumen-vermittelten Regulation

Wie bereits gezeigt wurde, reagiert die BHMT Expression der Leberzelle sensitiv auf geringe Osmolaritätsänderungen (43). Ein vergleichbarer Versuchsansatz sollte die Frage klären, ob die Expression der DMGDH ebenso sensitiv auf fein abgestufte Osmolaritätsänderungen anspricht. Die Expressionsmessungen mittels Realtime PCR zeigen, dass in einem Bereich von 205 mOsmol/l bis 305 mOsmol/l kleine Unterschiede in der Umgebungsosmolarität äquivalente Änderungen in der mRNA Expression der DMGDH nach sich ziehen. Im Bereich von 305 mOsmol/l bis 405 mOsmol/l hat sich ergeben, dass sich bereits wenig unterhalb der normosmolaren Situation ein Maximum der Supression von 20-40 % einstellt, welches sich bis 405 mOsmol/l nicht mehr verändert.

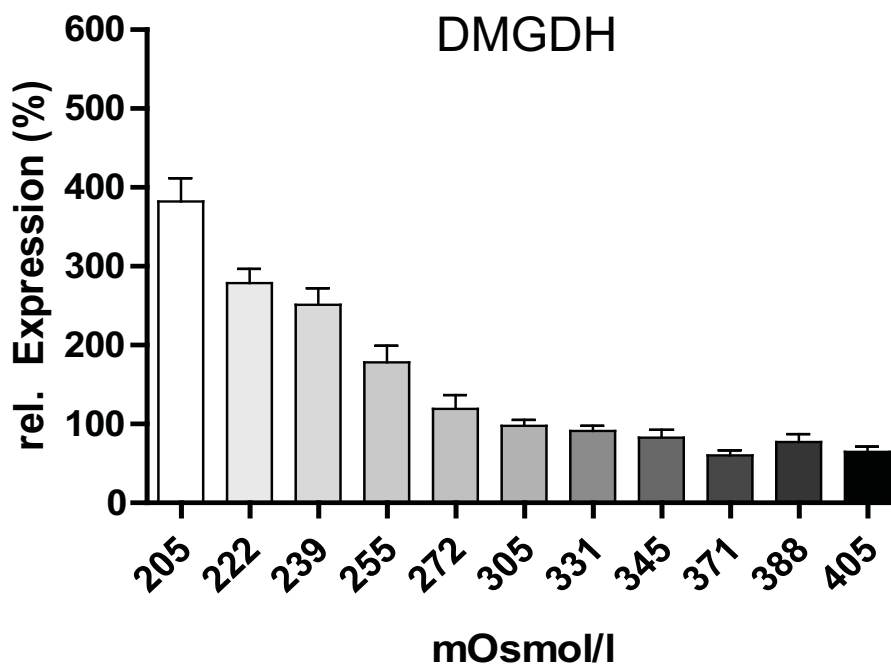


Abbildung 9: Sensitivität des osmotischen Effektes auf die **DMGDH mRNA Expression**.

Die Medien mit den oben angegebenen Osmolaritäten wurden für 24h auf den Zellen belassen. Die Expression der DMGDH mRNA wurde mittels Realtime PCR gemessen. (n=3)

3.4 Einfluss der Umgebungsosmolarität auf die Stabilität der mRNA

Bei der Diskussion um die Ab- und Zunahme der mRNA Konzentration durch die Umgebungsosmolarität, muss auch die Stabilität der mRNA unter diesen Bedingungen berücksichtigt werden. Dazu wurde einen Stabilitätstest durchgeführt, der darauf abzielt die Neusynthese von mRNA auszuschalten und nach definierten Zeitabständen zu messen, wie viel von der entsprechenden mRNA noch vorhanden ist. Um genügend mRNA bei Versuchsbeginn vorliegen zu haben, werden die Zellen vor der Actinomycin D Zugabe mit hypoosmolarem Medium stimuliert. Anschließend werden die Zellen durch einen Mediumwechsel auf hypo-, normo- und hyperosmolare Bedingungen gesetzt und gleichzeitig die mRNA Synthese durch Actinomycin D ausgeschaltet.

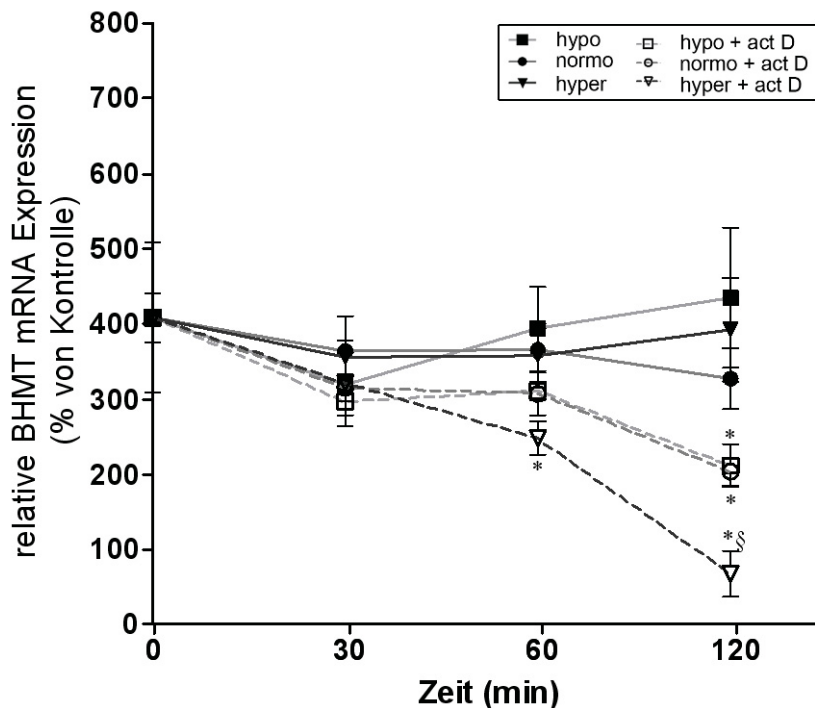


Abbildung 10: Anisoosmotische Effekte auf die Stabilität der **BHMT mRNA**.

Die BHMT mRNA Menge wurde durch 24h Inkubation in hypoosmolarem Medium erhöht. Dann wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 30, 60 und 120 Minuten unter hypo- normo- und hyperosmolarer Inkubation mit und ohne Actinomycin D (10 µg/ml) gehalten. Die Expression wurde mittels Realtime PCR gemessen wie unter Methoden beschrieben. Der Zeitpunkt 0 min der normosmolaren Kontrolle wurde als 100 % gesetzt. Signifikante Änderungen von der identischen Situation ohne Actinomycin D werden mit einem * gekennzeichnet. Der Unterschied in der hyperosmolaren Expression mit act D von der hypo- und normosmolaren Expression mit act D wurde mit einem § markiert.

Die Zellen werden nach 30, 60 und 120 Minuten lysiert und die RNA Konzentration via Realtime PCR bestimmt. Die Grafik zeigt, dass die Zugabe von Actinomycin D, unabhängig von der Osmolarität des Mediums, zu einer stetigen Abnahme der BHMT mRNA führt. 120 Minuten nach Actinomycin D Zugabe, war die mRNA Konzentration

der BHMT unter hyperosmolaren Bedingungen signifikant geringer als bei den hypo- und normosmolaren Versuchsansätzen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Abnahme der mRNA Expression unter hyperosmolaren Bedingungen zu einem gewissen Teil durch Destabilisierung oder aktive Degradierung der mRNA ausgelöst wird.

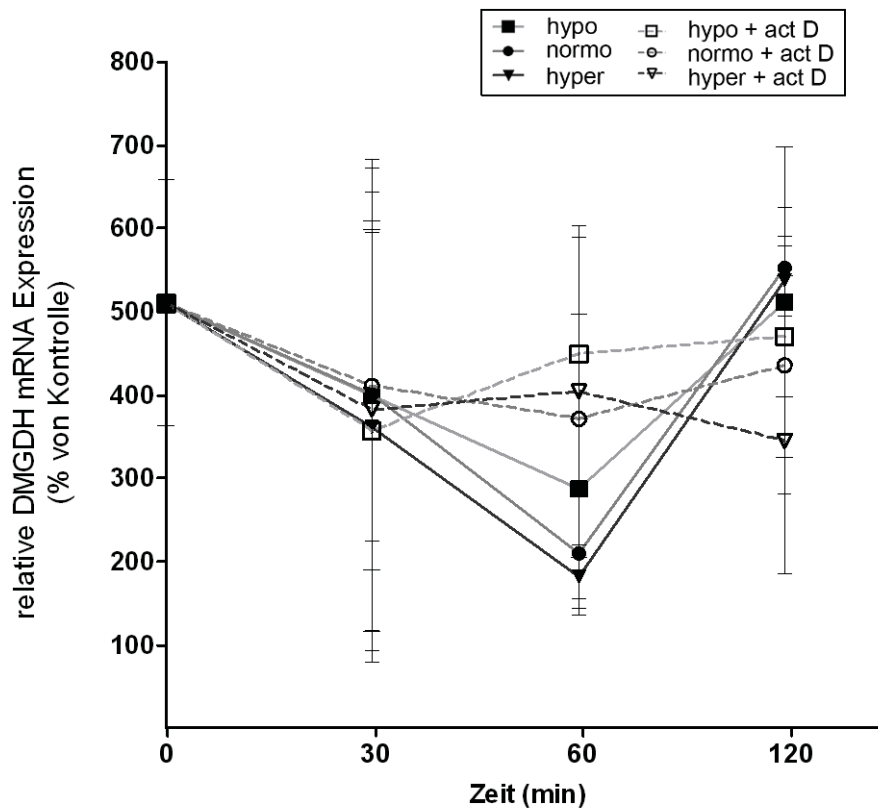


Abbildung 11: Anisoosmotische Effekte auf die Stabilität der **DMGDH mRNA**.

Die DMGDH mRNA Menge wurde durch 24h Inkubation in hypoosmolarem Medium erhöht. Dann wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 30, 60 und 120 Minuten unter hypo- normo- und hyperosmolarer Inkubation mit und ohne Actinomycin D (10 µg/ml) gehalten. Die Expression wurde mittels Realtime PCR gemessen wie unter Methoden beschrieben. Der Zeitpunkt 0 min der normosmolaren Kontrolle wurde als 100 % gesetzt. Der Versuch ergab keine signifikanten Änderungen.

Ein identischer Versuchsablauf wurde auch für die Messung der Stabilität der DMGDH-mRNA gewählt. Auch in die DMGDH-mRNA nimmt unter den Versuchsbedingungen im Vergleich zur Kontrolle ab, wobei die mRNA der DMGDH unter hyperosmolaren deutlich weniger abnimmt, als es bei der BHMT zu sehen ist. Die mRNA Expressionen unterscheiden sich nach 120 Minuten nicht signifikant voneinander. Aus unbekannten Gründen trat nach 60 Minuten reproduzierbar ein Abfall der mRNA Menge in allen Kontrollproben auf.

3.5 Osmolytabhängigkeit der Genexpression

In den vorangegangenen Versuchen wurde die Osmolarität für hyperosmolares Medium ausschließlich durch NaCl eingestellt. Um aber auszuschließen, dass die Effekte nur durch die permeablen Ionen Na^+ und Cl^- zustande kommen, wurde das normosmolare Medium mit Raffinose und Harnstoff auf den Wert von 405 mOsmol/l gebracht. Der impermeable Osmolyt Raffinose erhöht also die Osmolarität, ohne in die Zelle eindringen zu können. Dadurch können direkte Effekte der Substanz auf die Genexpression ausgeschlossen werden.

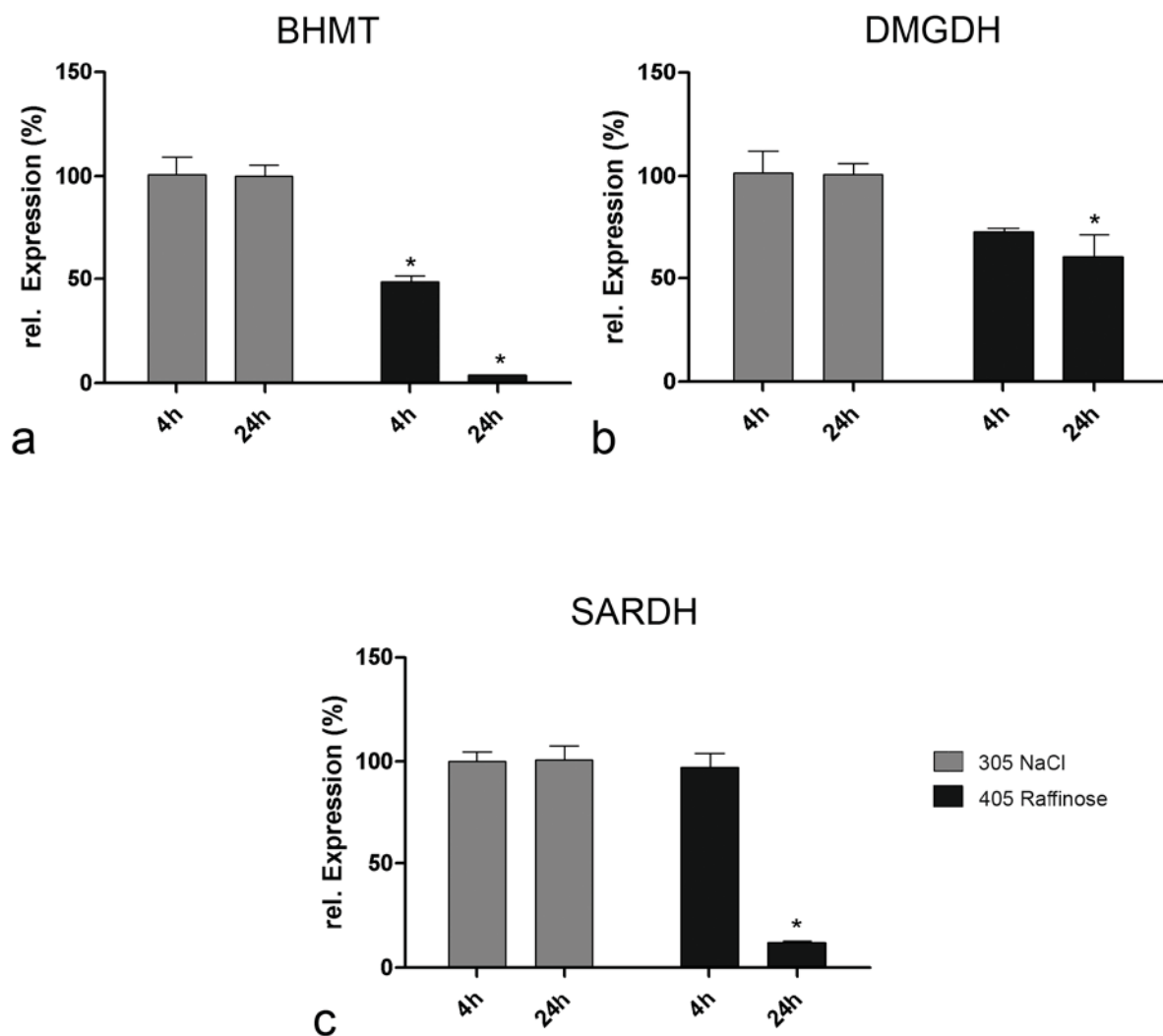


Abbildung 12: **BHMT, DMGDH und SARDH mRNA Expression** unter hyperosmolaren Bedingungen mit Raffinose als Osmolyt.

Die Zellen wurden für 4h bzw. 24h in normo- (305 mOsmol/l) und hyperosmolarem (405 mOsmol/l) Medium inkubiert. a) BHMT b) DMGDH c) SARDH. Jeder Balken entspricht 3 unabhängigen Versuchen mit Messungen als Triplikat. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Signifikante Änderungen sind mit einem * markiert.

Es zeigte sich, dass die Abnahme der mRNA Expression unter hyperosmolaren Bedingungen durch Raffinose bei BHMT, DMGDH und SARDH leicht zeitverzögert genauso stark war, wie zuvor mit NaCl als alleiniger Osmolyt. Des Weiteren wurde Harnstoff als alternativer Osmolyt eingesetzt. In diesem Versuch wurde normosmolares Medium mit Harnstoff auf 405 mOsmol/l eingestellt und für 24h auf die Zellen gegeben. Harnstoff ist ein permeabler Osmolyt und sollte die Osmolarität erhöhen, ohne dass dadurch das Volumen der Zelle verändert wird.

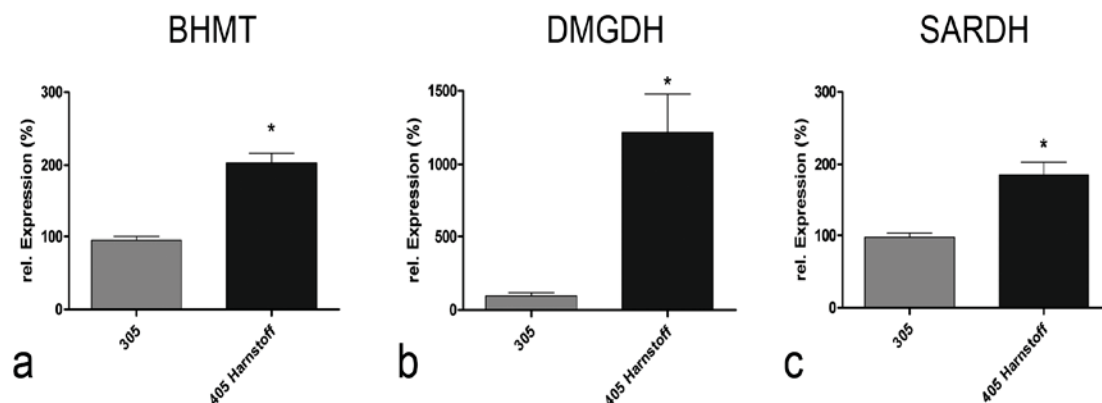


Abbildung 13: **BHMT, DMGDH und SARDH mRNA Expression** unter hyperosmolaren Bedingungen mit Harnstoff als Osmolyt. Die Zellen wurden für 24h in hyperosmolarem (405mOsmol/l) Medium inkubiert. a) BHMT b) DMGDH c) SARDH. Jeder Balken entspricht 3 unabhängigen Versuchen mit Messungen als Triplikat. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Signifikante Änderungen sind mit einem * markiert.

Überraschenderweise zeigte sich unter 405mOsmol/l nach 24h für BHMT und SARDH eine Zunahme der mRNA Expression, wie man sie vorher bei hypoosmolarer Stimulation gefunden hatte. Die DMGDH zeigte in dieser Reihe eine Besonderheit. Die DMGDH wurde durch die Stimulation mit Harnstoff um mehr als das 10fache stärker stimuliert, als bisher durch Hypoosmolarität.

3.6 Proteinexpression der Enzyme DMGDH und SARDH

Nachdem sich herausstellte, dass der Westernblot aus Gesamtlisat zu viele unspezifische Reaktionen hervorbrachte, wurden die Zellen über ein Fraktionierungskit in verschiedene Zellkompartimente aufgetrennt. Für die folgenden Westernblots wurde die Fraktion der Membranproteine verwendet. Die anderen Fraktionen haben beim Westernblot ein negatives Ergebnis gezeigt. (Daten nicht gezeigt)

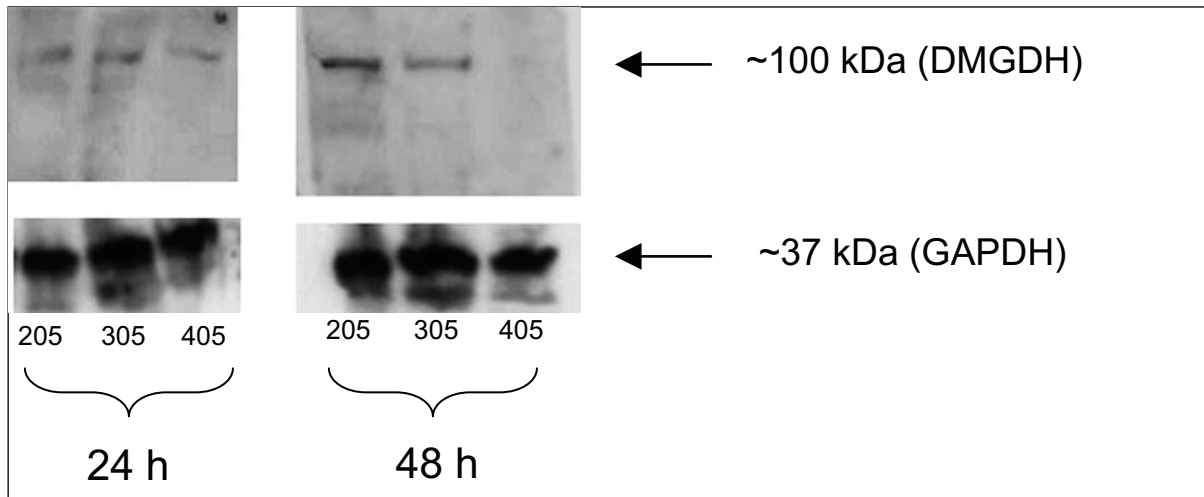


Abbildung 14: **Westernblot-Analyse der DMGDH.** Die Zellen wurden für 24 h bzw. 48 h in den anisoosmolaren Umgebungen inkubiert und anschließend in vier verschiedene Zellkompartimente fraktioniert. Es wurden ca. 8 mg Protein aus der Fraktion F2 (Membranproteine) auf einem Gel getrennt und auf PVDF Membran geblottet. Die Immunodetektion wurde mit anti-DMGDH-Serum durchgeführt. Zur Visualisierung wurden die DMGDH Antikörper durch einen HRP-gekoppelten goat-anti-mouse-Zweitantikörper markiert und mittels Chemolumineszenz auf einen ECL-fähigen Film detektiert und automatisiert entwickelt.

Auf das Gel wurden ca. 8 mg Protein der Membranproteinfraktion (F2) geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die getrennten Proteine durch Westernblot auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Die Immunodetektion wurde mit zwei Antisera durchgeführt, welche die Arbeitsgruppe Brandsch (Freiburg) aus Kaninchen hergestellt haben (70). Die Zellen wurden mit hypo-, normo- und hyperosmolarem Medium für 24 und 48 Stunden inkubiert und anschließend wie beschrieben aufgearbeitet.

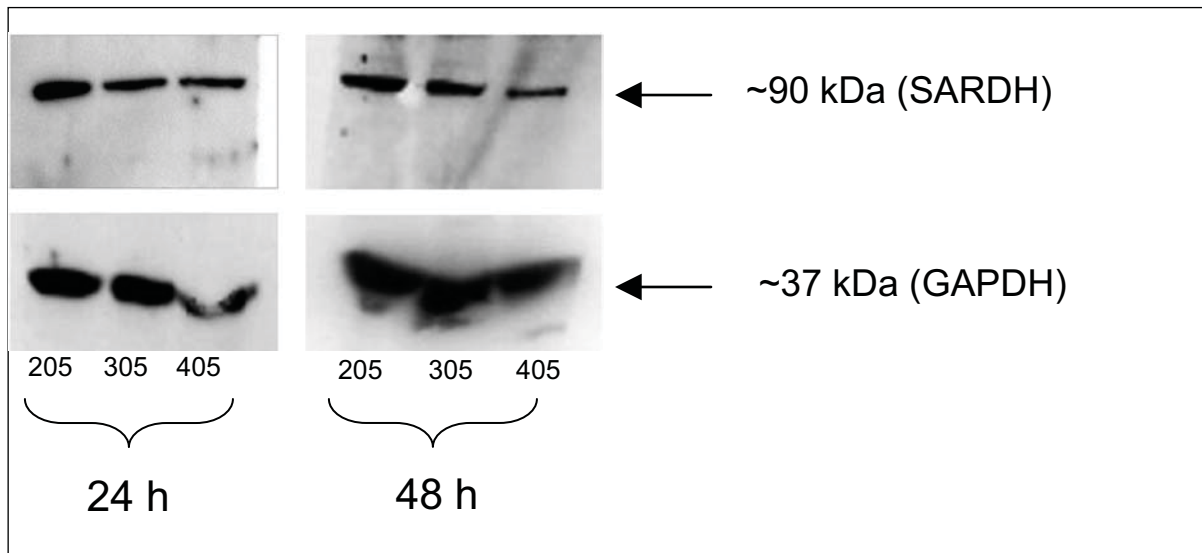


Abbildung 15: **Westernblot-Analyse SARDH.** Die Zellen wurden für 24 h bzw. 48 h in den anisoosmolaren Umgebungen inkubiert und anschließend in vier verschiedene Zellkompartimente fraktioniert. Es wurden ca. 8 mg Protein aus der Fraktion F2 (Membranproteine) auf einem Gel getrennt und auf PVDF Membran geblottet. Die Immunodetektion wurde mit anti-SARDH-Serum durchgeführt. Zur Visualisierung wurden die SARDH Antikörper durch einen HRP-gekoppelten goat-anti-mouse-Zweitantikörper markiert und mittels Chemolumineszenz auf einen ECL-fähigen Film detektiert und automatisiert entwickelt.

Unter hypoosmolaren Bedingungen ist die mRNA Expression der DMGDH zwar erst nach 24 Stunden maximal, aber bereits nach 8 Stunden konnte im Realtime PCR-Versuch gezeigt werden, dass die Expression schon auf etwa 400% angestiegen ist. Unter hyperosmolaren Bedingungen sieht man bereits nach 4 Stunden eine Minderung der mRNA Expression. Trotz der schnellen Änderung der mRNA Expression zeigt das Ergebnis der Westernblots, dass die Proteinexpression nach 24 Stunden noch keine signifikante Veränderung zum normosmolaren Vergleichswert aufweist.

Bei der SARDH spiegelt sich das Muster der mRNA Expression bereits nach 24 Stunden in der Proteinmenge wieder. Das Expressionsmuster bleibt auch bei den 48 Stundenwerten bestehen.

3.7 Pharmakologische Charakterisierung der Zellvolumen-vermittelten Modulation der Genexpression

Wie bereits einleitend beschrieben dienen die Integrine als Übersetzer der mechanischen Information aus der Zellvolumenänderung in ein chemisches Signal welches die Signalkaskaden zu den verschiedenen Genen anspricht. Um die komplexen Signalwege zu entwirren und herauszufinden, welche Signal-komponenten für die osmotisch vermittelte Regulation eine Rolle spielen könnten,

wurden Inhibitoren eingesetzt, die mehr oder weniger spezifisch einzelne Komponenten bekannter Signalwege ausschalten können. Die Auswirkungen der Inhibitoren wurden anhand der Expression der BHMT und DMGDH unter den osmotischen Bedingungen hypo-, normo- und hyperosmolar untersucht.

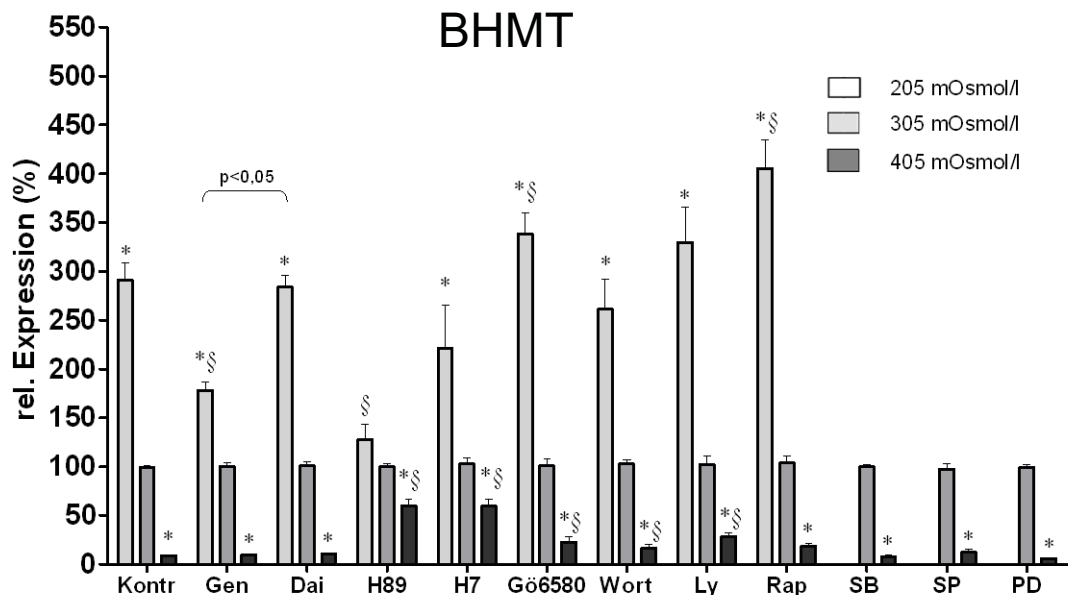


Abbildung 16: Pharmakologische Charakterisierung der Osmosensitivität der **BHMT mRNA Expression**. H4IIE Zellen wurden für 8h in hypo- (205mOsmol/l), normo- (305mOsmol/l) und hyperosmolarem (405mOsmol/l) Medium ohne weitere Vorbehandlung (Kontrolle) bzw. mit einer 20 minütigen Vorbehandlung mit Genistein (Gen, 50µmol/l), Daidzein (Dai, 50µmol/l), H89 (10µmol/l), H7 (20µmol/l), Gö6580 (10µmol/l), Wortmannin (Wort, 500nmol/l), LY294002 (Ly, 20µmol/l), Rapamycin (Rap, 500nmol/l), SB220025 (SB, 20µmol/l), PD098059 (PD, 50µmol/l). Die Inhibitoren blieben während der gesamten Versuchsdauer anwesend. Jeder Balken entspricht 3 unabhängigen Versuchen mit Messungen als Triplikat. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Signifikante Änderungen von der jeweiligen normosmolaren Situation sind mit einem * markiert. Das § markiert signifikante Änderungen der mRNA Expressionen ohne Inhibitor der vergleichbaren Osmolarität. (n=3). Die Klammer markiert die Unterschiede zwischen dem aktiven Inhibitor Genistein und dessen inaktiver Form Daidzein unter hypoosmolaren Bedingungen.

Die Ergebnisse zeigen, dass Genistein, ein Tyrosinkinase-Inhibitor (71), die hypoosmolare Stimulation der BHMT deutlich reduziert. Das inaktive Analogon Daidzein zeigte diesen Effekt nicht. Jedoch hatten weder Genistein noch Daidzein einen Effekt auf die hyperosmolare Abnahme der BHMT mRNA Konzentration. H89, ein cAMP-abhängiger Proteinkinase A-Inhibitor (72) und der relativ unspezifische Proteinkinaseinhibitor H7 konnten den Anstieg der hypoosmolaren BHMT Expression verhindern. Zusätzlich war H89 in der Lage auch den hyperosmolaren Abfall der BHMT Expression zu unterbinden. Beide Inhibitoren wurden in einer Dosis eingesetzt, die im Bereich der K_i -Werte von PKA, cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG) und Proteinkinasen C (PKC) lagen. Der PKC Inhibitor Gö6890 (73) hatte nur geringe Auswirkungen auf die BHMT Expression, was vermuten lässt, dass die PKC für die osmotische Regulation der BHMT keine Rolle spielt. Die Inhibitoren der PI3-Kinase, Wortmannin und LY 294002 (74,75), welche in der eingesetzten

Konzentration das Insulinsignalling in H4IIE Zellen unterbinden konnten (76), hatten auf das Osmosignalling der BHMT nur einen geringen Effekt. Der hochspezifische mTOR Inhibitor Rapamycin (77) welcher das Signalling zu den stromabwärts von mTOR gelegenen Komponenten 4E-BP1 und p70-S6 Kinase in H4IIE Zellen blockierte, beeinflusste das Osmosignalling zur BHMT nur zu einem geringen Teil. Es ist bekannt, dass bei Hyperosmolarität die extrazellulär-regulierten Kinasen (Erk1/Erk2), c-Jun Kinase (Jnk) und p38-mitogen-aktivierten Proteinkinasen (p38-MAPK) aktiviert werden (78). Hypoosmolarität aktiviert die MAPKinasen nicht (76,79). Obwohl diese Substanzen in H4IIE Zellen wirksam sind, haben sie keinen Einfluss auf die Minderung der BHMT mRNA Expression unter hyperosmolaren Bedingungen.

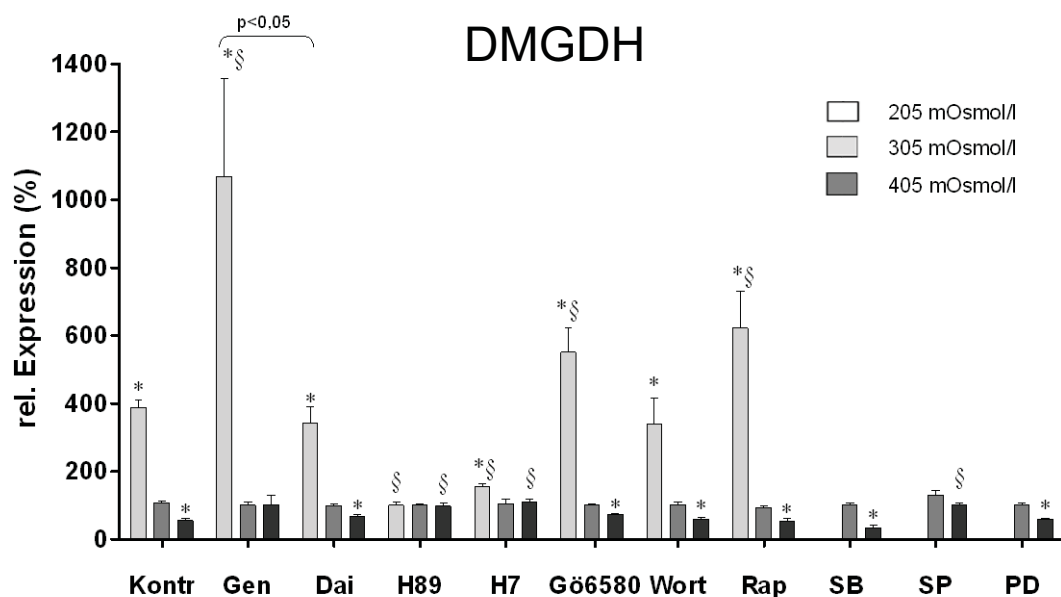


Abbildung 17: Pharmakologische Charakterisierung der Osmosensitivität der **DMGDH mRNA Expression**. H4IIE Zellen wurden für 8h in hypo- (205mOsmol/l), normo- (305mOsmol/l) und hyperosmolarem (405mOsmol/l) Medium ohne weitere Vorbehandlung (Kontrolle) bzw mit einer 20 minütigen Vorbehandlung mit Genistein (Gen, 50µmol/l), Daidzein (Dai, 50µmol/l), H89 (10µmol/l), H7 (20µmol/l), Gö6580 (10µmol/l), Wortmannin (Wort, 500nmol/l), Ly294002 (Ly, 20µmol/l), Rapamycin (Rap, 500nmol/l), SB220025 (SB, 20µmol/l), PD098059 (PD, 50µmol/l). Die Inhibitoren blieben während der gesamten Versuchsdauer anwesend. Jeder Balken entspricht 3 unabhängigen Versuchen mit Messungen als Triplikat. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Signifikante Änderungen von der jeweiligen normosmolaren Situation sind mit einem * markiert. Das § markiert signifikante Änderungen der mRNA Expressionen ohne Inhibitor der vergleichbaren Osmolarität. (n=3). Die Klammer markiert die Unterschiede zwischen dem aktiven Inhibitor Genistein und dessen inaktiver Form Daidzein unter hypoosmolaren Bedingungen.

Die Charakterisierung der DMGDH zeigte ein teilweise anderes Bild. Überraschend war die starke Stimulation der hypoosmolaren Expressionsänderungen um ein Vielfaches durch Genistein und die vollständige Aufhebung der hyperosmolaren Expressionminderung durch Genistein. Möglicherweise ist dieses Ergebnis durch einen Artefakt verzerrt, da die Variabilität der jeweiligen Ergebnisse aus den drei unabhängigen Versuchen höher war als bei den Versuchen zur BHMT. Der Genistein-Effekt ist daher nicht überzubewerten. Das inaktive Analogon Daidzein

bleibt wie erwartet, in beiden Fällen, ohne Effekt. Parallel zur BHMT zeigt auch die DMGDH eine deutliche Reaktion bei den Proteinkinaseinhibitoren. Sowohl bei H89 als auch bei H7 werden die anisoosmolaritätsinduzierten Expressionsänderungen vollständig unterbunden. Im Gegensatz zur BHMT haben Rapamycin und auch Gö6580 bei der hypoosmolaren Expressionsänderung der DMGDH einen stärkeren Effekt. Ein weiterer Unterschied zur BHMT ist die Wirkung des Jnk- Inhibitors SP600125. Die hyperosmolare Abnahme der DMGDH mRNA Expression wird durch den Jnk- Inhibitor fast vollständig aufgehoben.

3.8 Einfluss der Umgebungsmolarität auf die Promotoraktivität des BHMT Gens

Um die Osmosensitivität der BHMT Promotoraktivität zu untersuchen wurde ein Plasmid, bei dem der komplette menschliche BHMT-Promotor vor ein Reportergen (Luciferase) kloniert wurde in die H4IIE Zellen eingebracht. Anschließend wurden die Zellen mit hypo-, normo- und hyperosmolarem Medium behandelt. Die dabei entstehende Menge Luciferase wird danach über einen Luciferase - Assay in einem Luminometer bestimmt. Die Menge der Luciferase wird der Aktivität des Promotors gleich gesetzt. Wie in Abbildung 18 gezeigt, erhöht hypoosmolares Medium die Aktivität des Promotors um etwa das 5fache. Zum Vergleich wurde ein 400 bp langes Fragment des Promotors in die Zellen gebracht. Durch hypoosmolares Medium wurde die Transkription der Luciferase mit diesem gekürzten Promotorfragment nur gering stimuliert. Das deutet darauf hin, dass es zwischen der Position -3179 und -400 im BHMT Promotor weitere responsiven Elemente zu finden sein müssen, die an der osmosensiblen Regulation beteiligt sind. Durch Hyperosmolarität nahm die Promotoraktivität des kompletten Promotors ab, während das kurze Promotorfragment einen leichten Anstieg in der Aktivität aufwies. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass hypoosmolares Anschwellen der Zelle die BHMT Expression auf der Transkriptionsebene beeinflusst und dass es vermutlich mehr als nur ein TonE-Element im menschlichen BHMT Promotor gibt.

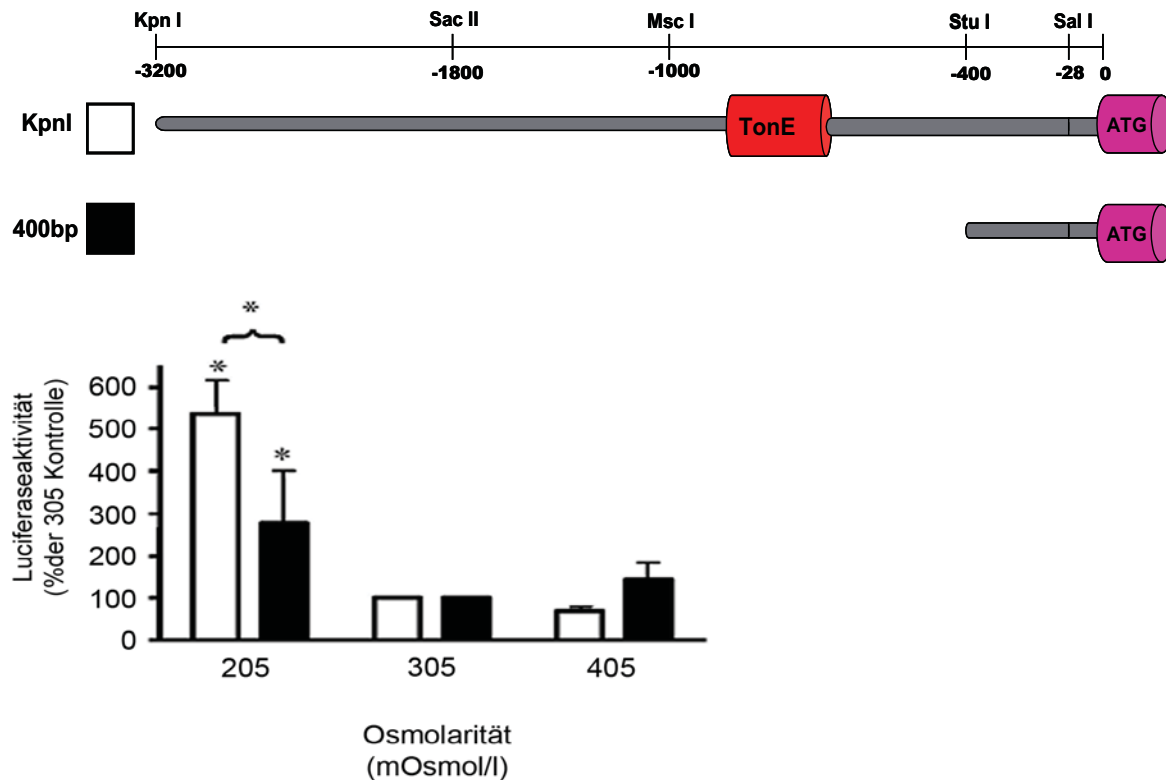


Abbildung 18: Osmosensitive Regulation des humanen **BHMT Promotors**.

H4IIE Zellen die mit einem Reporter- und einem Kontrollvektor kotransfiziert wurden, sind für 24 h hypo- normo- und hyperosmolaren Konditionen ausgesetzt worden. Die Promotoraktivität wurden mittels eines Dual-Luciferase Tests gemessen, wie unter Material und Methoden beschrieben. Die Luciferaseaktivität wurde durch eine Transfektionskontrolle normalisiert und als Maß für die Promotoraktivität genommen. Der Graph zeigt die Aktivität relativ zur Luciferaseaktivität der 305mOsmol/l – Kontrollsituation. Das Bild zeigt die Mittelwerte $\pm$ SEM von drei unabhängigen Versuchen. Der * markiert signifikante Abweichungen der Luciferaseaktivität von der entsprechenden normosmolaren Kontrolle bzw zwischen den beiden Konstrukten. Die Konstrukte sind schematisch dargestellt. Detailinformationen sind unter Material und Methoden zu finden.

3.9 Quantifizierung der mRNA Expression in primären Hepatozyten mittels Realtime PCR

Zelllinien stellen aufgrund oft weitreichender Aberrationen des Genotyps (meist Chromosomendeletionen) verglichen mit der Ursprungszelle ein artifizielles System dar. Obwohl die H4IIE Zelllinie als geeignetes Modell für die Leber gilt, wurden die Ergebnisse aus dieser Zelllinie in einem System überprüft, welches eine größere Relevanz für Aussagen *in vivo* besitzt. Zu diesem Zweck wurden primäre Hepatozyten den gleichen Versuchsbedingungen unterzogen, wie zuvor die H4IIE Zellen.

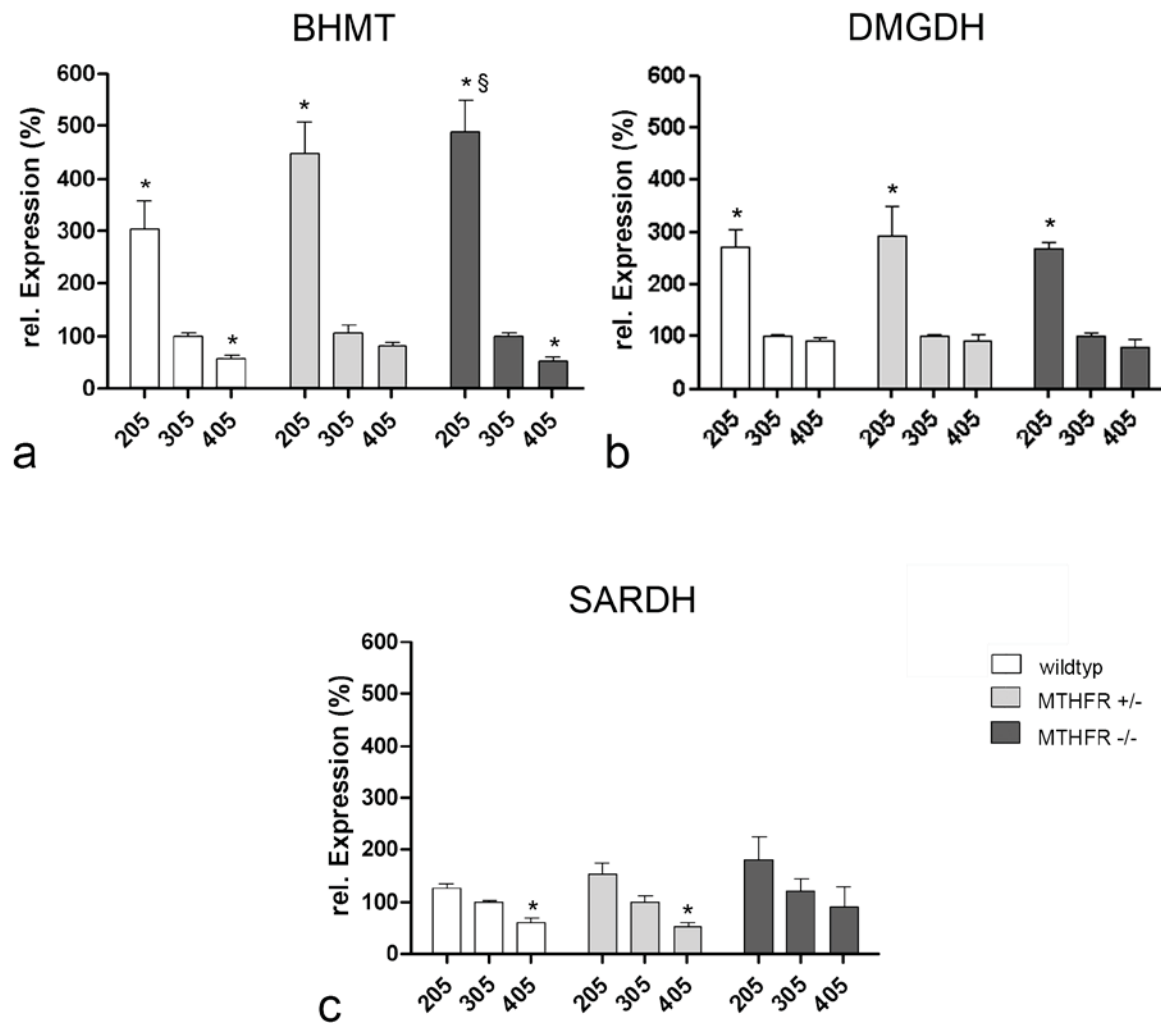


Abbildung 19: **BHMT, DMGDH und SARDH mRNA Expression** in Abhängigkeit des Genotyps in primären Leberzellen. Die Zellen wurden für 24h mit hypo- (205 mOsmol/l), normo- (305 mOsmol/l) und hyperosmolarem (405 mOsmol/l) Medium inkubiert. a) BHMT mRNA Expression. b) DMGDH Expression. c) SARDH mRNA Expression. Jeder Balken entspricht 3 unabhängigen Versuchen mit Messungen als Triplikat. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Signifikante Änderungen sind mit einem * markiert.

Betrachtet man zunächst nur die Wildtyp-Grafik (weiße Balken) so findet man in den primären Hepatozyten ein identisches Muster zu dem, welches sich in den H4IIE Zellen zeigte (Abbildung 5) Somit können Zellkulturartefakte oder störende Veränderungen der Zellen durch die Immortalisierung als Grund für die Expressionsänderungen ausgeschlossen werden. Die Expression der BHMT und SARDH mRNA in primären Hepatozyten zeigt unter hypoosmolaren Bedingungen eine Abhängigkeit vom Genotyp und dies wird im homozygoten Knockout-Tier noch einmal verstärkt. Die durch hyperosmolares Medium bedingte Abnahme der mRNA Expression scheint nicht vom Genotyp beeinflusst zu sein. Die DMGDH weist keine Genotyp-abhängige Expressionsänderung in den primären Hepatozyten auf.

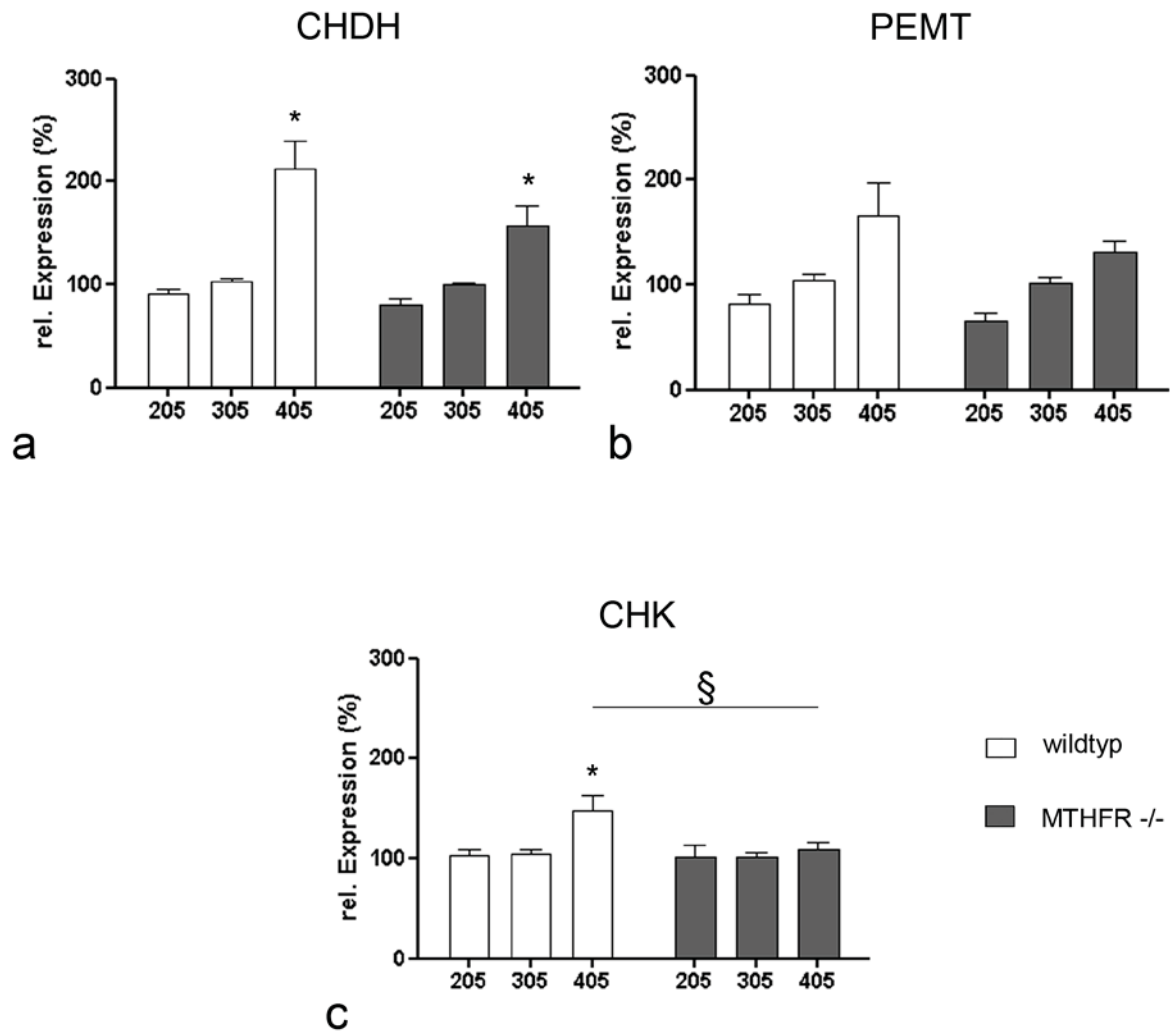


Abbildung 20: **CHDH, PEMT und CHK mRNA Expression** in Abhängigkeit des Genotyps in primären Leberzellen. Die Zellen wurden für 24h mit hypo- (205 mOsmol/l), normo- (305 mOsmol/l) und hyperosmolarem (405 mOsmol/l) Medium inkubiert. a) CHDH mRNA Expression. b) PEMT mRNA Expression. c) CHK mRNA Expression. Jeder Balken entspricht 3 unabhängigen Versuchen mit Messungen als Triplikat. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Signifikante Änderungen sind mit einem * markiert. Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen sind mit § gekennzeichnet.

Die Cholindehydrogenase (Abbildung 20a), die in H4IIE Zellen nicht untersucht wurde, zeigt in den primären Hepatozyten eine signifikante Steigerung der mRNA Expression unter hyperosmolaren Bedingungen. Im Knockout-Tier scheint dieser Effekt weniger stark ausgeprägt zu sein. Die PEMT, die in H4IIE Zellen kurzfristig eine Abnahme der Expression aufwies (Abbildung 7), zeigt in den primären Hepatozyten eine leichte Zunahme der Expression bei hyperosmolarer Stimulation und eine leichte Tendenz zur Expressionsminderung in hypoosmolaren Bedingungen. Ebenso lässt die Grafik erahnen, dass die Effekte Genotyp-abhängig leicht zurückgehen (Abbildung 20b). Die Expression der CHK in den Wildtyp-Zellen zeigt eine leichte Expressionssteigerung unter dem Einfluss eines hypertonen Mediums, was den Ergebnissen aus den H4IIE-Zellen (Abbildung 6a) gleichzusetzen

ist. In den primären Hepatozyten der Knockout-Tiere verschwindet dieser Effekt völlig. Eine hypotone Mediumosmolarität hat weder in Wildtyp noch in Knockout-Hepatozyten einen Einfluss auf die Expression.

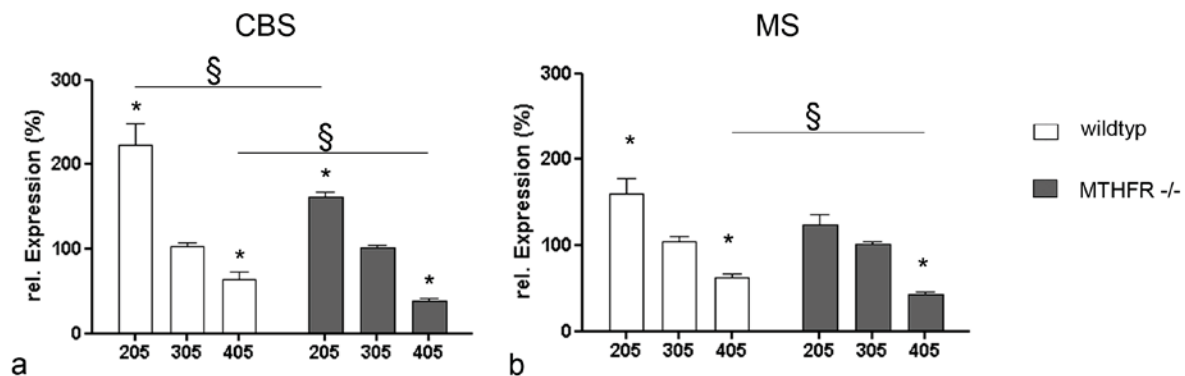


Abbildung 21: **CBS und MS mRNA Expression** in Abhängigkeit des Genotyps in primären Leberzellen. Die Zellen wurden für 24h mit hypo- (205 mOsmol/l), normo- (305 mOsmol/l) und hyperosmolarem (405 mOsmol/l) Medium inkubiert. a) CBS mRNA Expression. b) MS Expression. Jeder Balken entspricht 3 unabhängigen Versuchen mit Messungen als Triplikat. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM. Signifikante Änderungen sind mit einem * markiert. Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen sind mit § gekennzeichnet.

Während die CBS in den H4IIE Zellen (Abbildung 8c) ein inhomogenes Expressionsmuster zeigte, zeichnet sich in den primären Hepatozyten ein eindeutige Expressionssteigerung unter hypoosmolaren Bedingungen und eine Expressionsminderung unter hyperosmolaren Bedingungen ab. Zudem sind die Änderungen auch dem Einfluss des Genotyps unterworfen. Gleiches gilt auch für das Expressionsmuster der Methioninsynthase (Abbildung 8a). Die MS zeigt eine signifikante Expressionssteigerung unter hypotonem Einfluss im Wildtyp. Dieser Effekt fällt im Knockout-Tier geringer aus und die unter hypertonem Einfluss zu beobachtende signifikante Expressionsminderung im Wildtyp-Tier ist im Knockout-Tier sogar noch verstärkt vorhanden.

3.10 Quantifizierung von Metaboliten im Zelllysat von H4IIE-Zellen

Die Messung einiger wichtiger Metabolite rund um die Remethylierung von Homocystein zu Methionin sollte Aufschluss darüber geben, welche physiologischen Auswirkungen der osmotische Stress auf die Leberzelle hat. Dazu wurden mittels Tandem-MS die Substanzen Cholin, Betain, Dimethylglycin, Sarkosin, Homocystein und Methionin aus dem Lysat der H4IIE Zellen quantifiziert. Die Zellen wurden für 24 Stunden in hypo-, normo- oder hyperosmolarem Medium gehalten. Um Transportvorgänge nachvollziehen zu können wurden die Metabolite auch im

Mediumüberstand der jeweiligen Zellkultur gemessen. Die Konzentration der bereits im Medium enthaltenen Substanzen wie z.B. Cholin, wurden aus dem Katalog des Mediumherstellers (Gibco) entnommen und über die Messung von frischen Mediumproben ohne Zellkontakt bestätigt.

Cholin

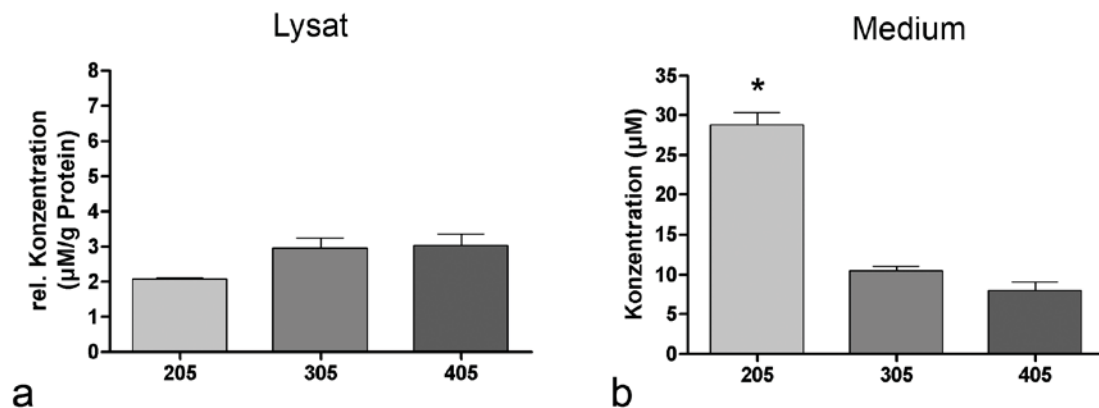


Abbildung 22: Intrazelluläre **Cholinkonzentration** in H4IIE Zellen und im Mediumüberstand. Die Zellen wurden für 24 h in Kulturmedium mit 205 mOsmol/l, 305 mOsmol/l und 405 mOsmol/l gehalten. Die Cholinkonzentration im Zelllysate und im Mediumüberstand wurde durch HPLC-Tandem-Massenspektrometrie ermittelt. Die intrazelluläre Cholinkonzentration wurde auf den Proteingehalt normiert. Der Mediumüberstand wurde mit dem Medium ohne vorherigen Zellkontakt verglichen. Der Graph zeigt die Mittelwerte $\pm$ SEM von 5 unabhängigen Versuchen. Signifikante Abweichungen von der normosmolaren Kontrolle werden mit einem * markiert. a)) Lysatmessung b) Mediummessung

Die Ergebnisse für die Cholinmessung zeigen im Lysat unter hypoosmolaren Bedingungen eine geringe Konzentrationsabnahme und eine deutliche Konzentrationszunahme im Medium. Die Abnahme des Cholins passt zur Theorie der gesteigerten Remethylierung über BHMT. Die Abnahme des Cholins kann als Ausdruck eines vermehrten Verbrauchs von Betain über die BHMT-vermittelte Remethylierung gedeutet werden. Der gesteigerte Cholinexport ins Medium verringert darüber hinaus die Bildung organischer Osmolyte wie z.B. von Betain oder Glycerophosphocholin.

Betain

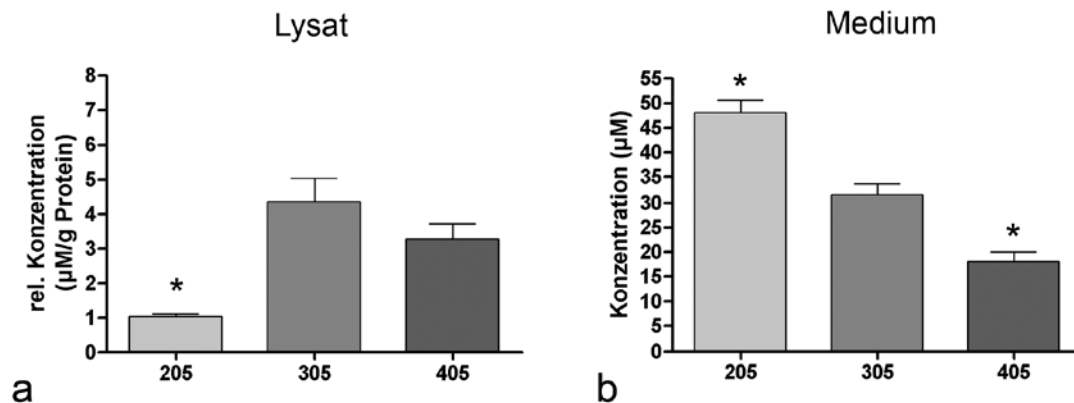


Abbildung 23: Intrazelluläre **Betainkonzentration** in H4IIE Zellen und im Mediumüberstand.

Die Zellen wurden für 24 h in Kulturmedium mit 205 mOsmol/l, 305 mOsmol/l und 405 mOsmol/l gehalten. Die Betainkonzentration im Zelllysate und im Mediumüberstand wurde durch HPLC-Tandem-Massenspektrometrie ermittelt. Die intrazelluläre Betainkonzentration wurde auf den Proteingehalt normiert. Der Mediumüberstand wurde mit dem Medium ohne vorherigen Zellkontakt verglichen. Der Graph zeigt die Mittelwerte $\pm$ SEM von 5 unabhängigen Versuchen. Signifikante Abweichungen von der normosmolaren Kontrolle werden mit einem * markiert. a) Lysatmessung b) Mediummessung

Die Betainmessung im Lysat zeigt uns in hypoosmolarem Medium eine deutliche Abnahme der Konzentration, während sie unter hyperosmolaren Bedingungen nahezu unverändert bleibt. Unterstützend wird unter hypoosmolaren Bedingungen mehr und unter hyperosmolaren Bedingungen weniger Betain aus der Zelle ins Medium transportiert.

DMG

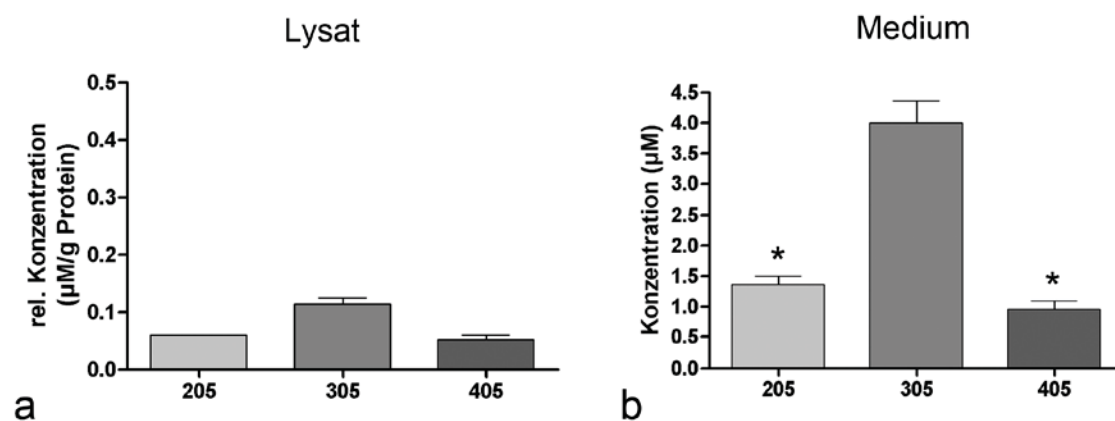


Abbildung 24: Intrazelluläre **DMG Konzentration** in H4IIE Zellen und im Mediumüberstand.

Die Zellen wurden für 24 h in Kulturmedium mit 205 mOsmol/l, 305 mOsmol/l und 405 mOsmol/l gehalten. Die DMG Konzentration im Zelllysate und im Mediumüberstand wurde durch HPLC-Tandem-Massenspektrometrie ermittelt. Die intrazelluläre DMG Konzentration wurde auf den Proteingehalt normiert. Der Mediumüberstand wurde mit dem Medium ohne vorherigen Zellkontakt verglichen. Der Graph zeigt die Mittelwerte $\pm$ SEM von 5 unabhängigen Versuchen. Signifikante Abweichungen von der normosmolaren Kontrolle werden mit einem * markiert. a) Lysatmessung b) Mediummessung

DMG ist ein Metabolit, der sowohl im Lysat, als auch im Medium nur in sehr geringer Konzentration vorkommt. Die Messungen ergeben, dass DMG unter anisoosmolaren Bedingungen sowohl im Lysat, als auch im Medium abnehmen. Die absoluten Konzentrationen sind insgesamt jedoch nur sehr gering.

Sarkosin

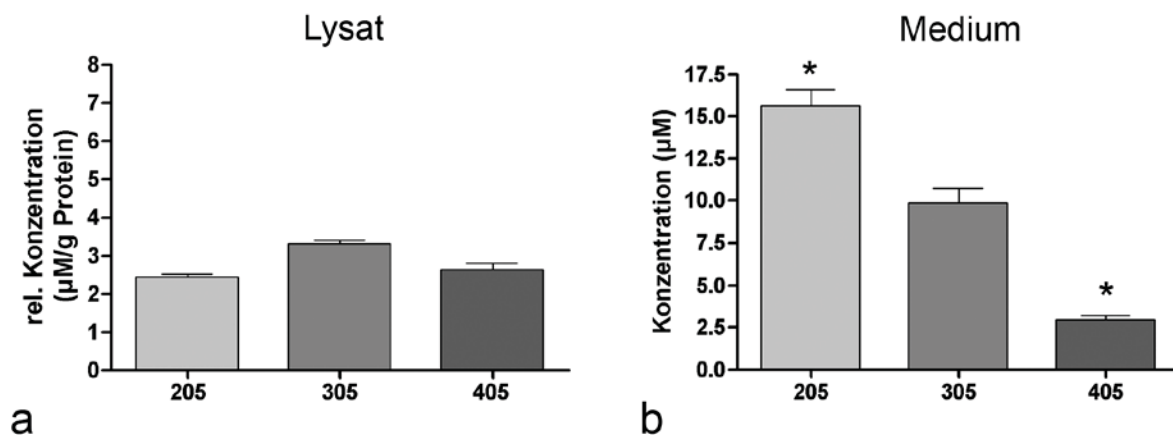


Abbildung 25: Intrazelluläre **Sarkosinkonzentration** in H4IIE Zellen und im Mediumüberstand. Die Zellen wurden für 24h in Kulturmedium mit 205mOsmol/l, 305mOsmol/l und 405mOsmol/l gehalten. Die Sarkosinkonzentration im Zelllysate und im Mediumüberstand wurde durch HPLC-Tandem-Massenspektrometrie ermittelt. Die intrazelluläre Sarkosinkonzentration wurde auf den Proteingehalt normiert. Der Mediumüberstand wurde mit dem Medium ohne vorherigen Zellkontakt verglichen. Der Graph zeigt die Mittelwerte $\pm$ SEM von 5 unabhängigen Versuchen. Signifikante Abweichungen von der normosmolaren Kontrolle werden mit einem * markiert. a) Lysatmessung b) Mediummessung

Die Sarkosinkonzentration nimmt im Lysat unter anisoosmolaren Bedingungen leicht ab. Unter hypoosmolarem Einfluss wird mehr und unter hyperosmolarem Einfluss weniger Sarkosin ins Medium abgegeben. Sarkosin dient als Puffer für überschüssige labile Methylgruppen bei Überangebot von Methionin. Die Akkumulation von Sarkosin unter hypoosmolaren Bedingungen zeigt daher ein Überangebot von S-Adenosylmethionin an, vermutlich durch gesteigerte BHMT-Aktivität. Dem scheint die gemessene Methioninkonzentration zu widersprechen. Interessanterweise sind die Sarkosin-Ergebnisse schlecht mit der konventionell diskutierten Regulation des Methylgruppenhaushaltes zu vereinbaren. Es scheint einen Effekt der anisoosmolaren Regulation zu geben, der über den metabolischen Zweck hinausgeht.

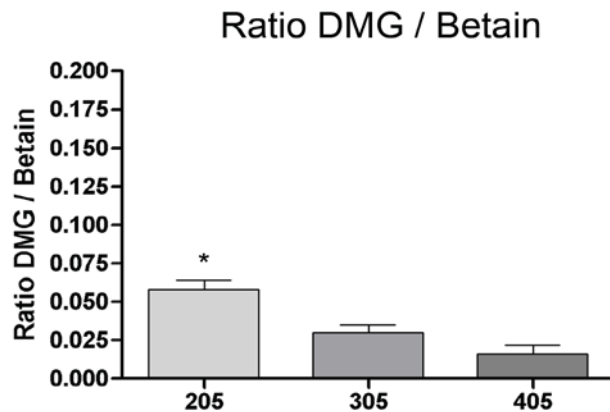


Abbildung 26: Dieser Graph zeigt das **Verhältnis der DMG Konzentration zur Betainkonzentration** in der Zelle. Dieser Wert stellt ein Maß für die BHMT Aktivität in der Zelle dar.

Die intrazelluläre Ratio aus Betain und DMG Konzentration gibt einen ungefähren Anhaltspunkt über die BHMT Aktivität unter diesen Bedingungen. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die BHMT, in Ergänzung zu der gesteigerten Expression, auch eine höhere Aktivität aufweist. Damit konnte die Aktivitätsmessung aus der Arbeit (43) bestätigt werden.

Die Konzentration des Homocysteins im Lysat verändert sich unter anisotischem Stress praktisch nicht. Im Medium nimmt sie allerdings unter Hypoosmolarität leicht zu während sie unter Hyperosmolarität deutlich zurückgeht.

Homocystein

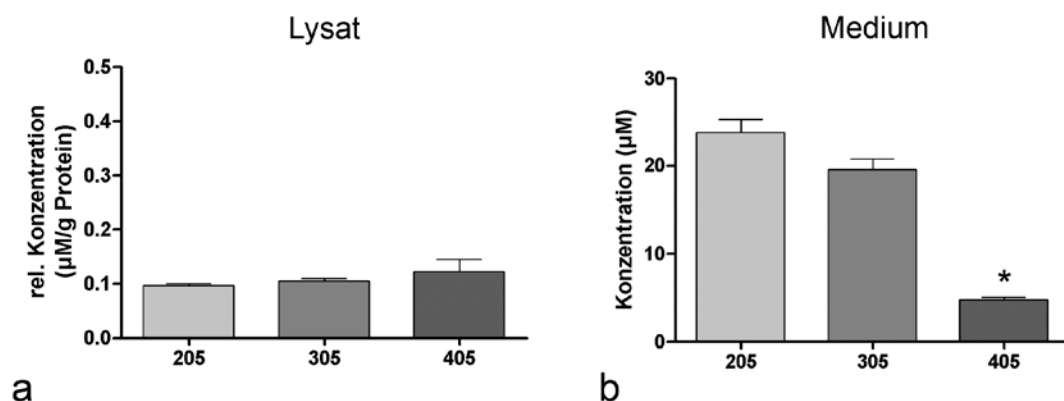


Abbildung 27: Intrazelluläre **Homocysteinkonzentration** in H4IIE Zellen und im Mediumüberstand. Die Zellen wurden für 24 h in Kulturmedium mit 205 mOsmol/l, 305 mOsmol/l und 405 mOsmol/l gehalten. Die Homocysteinkonzentration im Zelllysate und im Mediumüberstand wurde durch HPLC-Tandem-Massenspektrometrie ermittelt. Die intrazelluläre Homocysteinkonzentration wurde auf den Proteingehalt normiert. Der Mediumüberstand wurde mit dem Medium ohne vorherigen Zellkontakt verglichen. Der Graph zeigt die Mittelwerte $\pm$ SEM von 5 unabhängigen Versuchen. Signifikante Abweichungen von der normosmolaren Kontrolle werden mit einem * markiert. a) Lysatmessung b) Mediummessung

Da intrazellulär gebildetes Homocystein vorwiegend exportiert wird und die Remethylierung unter hypoosmolaren Bedingungen gesteigert abläuft, muss unter diesen Bedingungen entweder die Homocysteinproduktion durch vermehrte Transmethylierung im Rahmen anaboler Prozesse gesteigert sein oder der Abbau von Homocystein durch die Transsulfurierung vermindert ablaufen. Umgekehrtes muss dann für die hyperosmolare Exposition gelten.

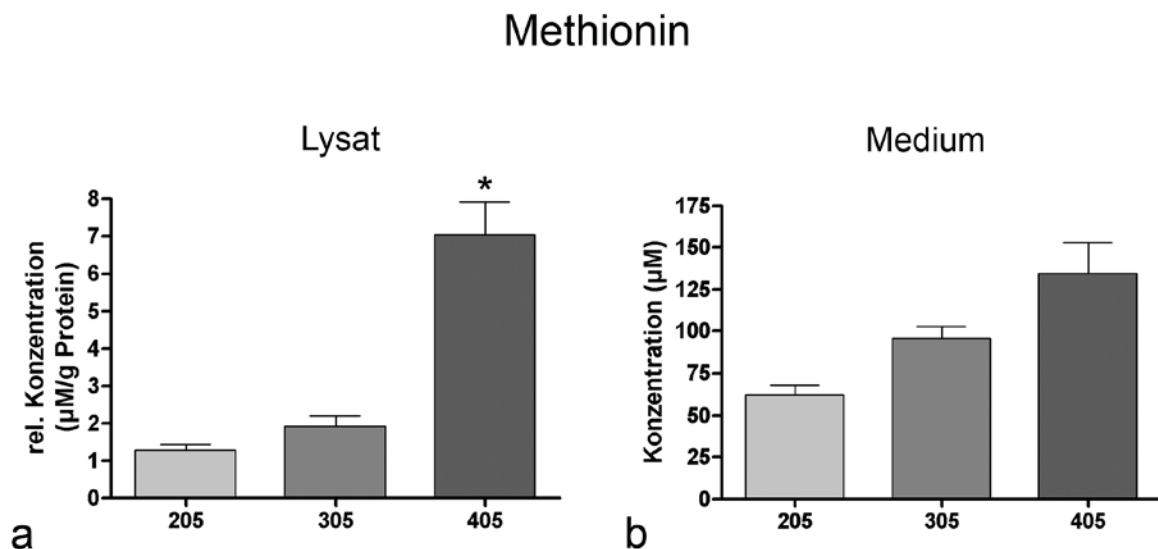


Abbildung 28: Intrazelluläre **Methioninkonzentration** in H4IIE Zellen und im Mediumüberstand. Die Zellen wurden für 24 h in Kulturmedium mit 205 mOsmol/l, 305 mOsmol/l und 405 mOsmol/l gehalten. Die Methioninkonzentration im Zelllysate und im Mediumüberstand wurde durch HPLC-Tandem-Massenspektrometrie ermittelt. Die intrazelluläre Methioninkonzentration wurde auf den Proteingehalt normiert. Der Mediumüberstand wurde mit dem Medium ohne vorherigen Zellkontakt verglichen. Der Graph zeigt die Mittelwerte $\pm$ SEM von 5 unabhängigen Versuchen. Signifikante Abweichungen von der normosmolaren Kontrolle werden mit einem * markiert. a) Lysatmessung b) Mediummessung

Die Methioninkonzentration lässt im Lysat unter hypoosmolaren Bedingungen leicht nach, während sie unter hyperosmolaren Bedingungen deutlich ansteigt. Im Medium sieht man, dass die Konzentration durch Hypoosmolarität zurückgeht und unter Hyperosmolarität ansteigt. Hier scheint sich die vermehrte Transmethylierung unter Verbrauch von Methionin bei hypoosmolaren Bedingungen zu bestätigen.

3.11 Quantifizierung von Metaboliten in der Leber und im Plasma von MTHFR-Mäusen

Zum Vergleich der physiologischen Auswirkungen zwischen dem sehr artifiziiellen *in vitro* Zellkulturmodell der H4IIE-Zellen und dem *in vivo* Tiermodell, wurden Wildtyp und MTHFR-Knockout-Tieren Blut aus dem Herzen und die Leber entnommen. Nach entsprechender Aufreinigung und Vorbereitung wurden die Metabolite mittels Tandem-Massenspektrometrie quantifiziert. Dabei wurden die Proben jedes Tieres separat gemessen und nicht gepoolt. Es wurden keine Plasma-Metabolite bei heterozygoten Tieren gemessen.

Betain

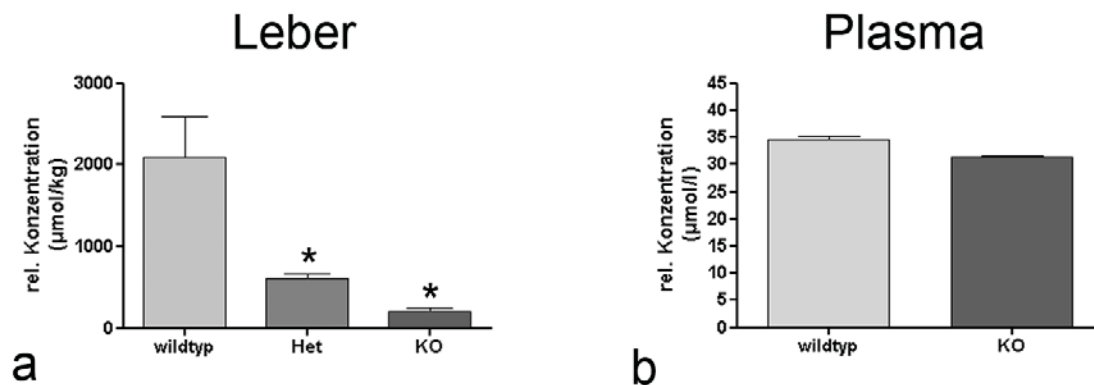


Abbildung 29: **Betain** Bestimmung aus dem Lebergewebe und dem Plasma der Mäuse.

Für die Versuche wurden n=4 Wildtypen, n=3 Heterozygote und n=5 homozygote K.O-Tiere verwendet und jeweils im Duplikat gemessen. Die Konzentrationen in der Leber sind gegenüber dem Gewicht der Leberprobe normalisiert. Die Konzentrationen im Plasma sind über eine genormte Standardmessreihe normiert. Die Werte sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben. Signifikante Änderungen sind mit einem * markiert. a) Betain-Konzentration in der Leber b) Betain-Konzentration im Plasma

Wie man in Abbildung 29 sieht, nimmt die Betainkonzentration in der Leber der Knockout-Tiere massiv ab und zeigt im Plasma eine leichte aber nicht signifikante Tendenz zur Konzentrationsabnahme. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die MTHFR-Knockout-Maus als Modell einer Langzeit-Betaindepletion beschrieben wurde (56). Auch die Heterozygoten zeigen bereits eine deutliche Abnahme der Betainkonzentration im Lebergewebe.

Cholin

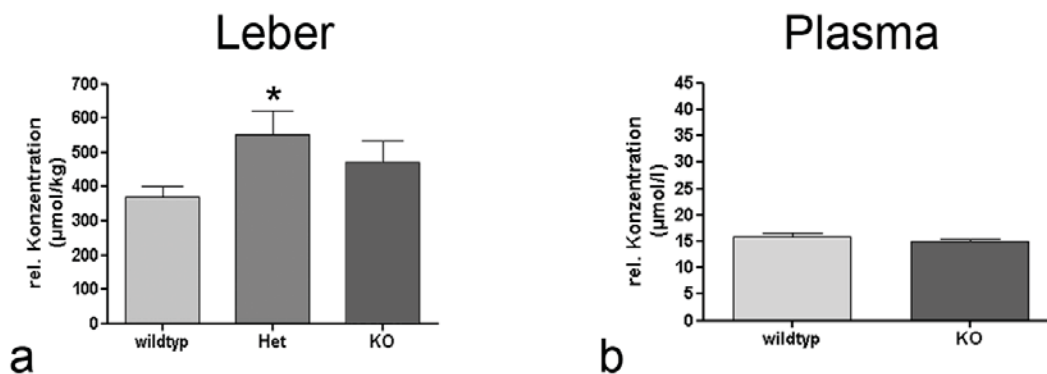


Abbildung 30: **Cholin** Bestimmung aus dem Lebergewebe und dem Plasma der Mäuse.

Für die Versuche wurden n=4 Wildtypen, n=3 Heterozygote und n=5 homozygote K.O-Tiere verwendet und jeweils im Duplikat gemessen. Die Konzentrationen in der Leber sind gegenüber dem Gewicht der Leberprobe normalisiert. Die Konzentrationen im Plasma sind über eine genormte Standardmessreihe normiert. Die Werte sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben. Die Werte in diesen Messungen zeigen keine signifikanten Änderungen a) Cholinkonzentration in der Leber b) Cholinkonzentration im Plasma

Gleichzeitig ist zu erwarten, dass die Ausgangssubstanz für Betain, nämlich das Cholin, aufgrund des starken Betainmangels ebenfalls einen deutlich Konzentrationsrückgang aufweist. Wie in Abbildung 30 gezeigt ist das aber nicht der Fall. Im Plasma bleibt die Konzentration des Cholins gleich und im Lebergewebe nimmt sie sogar tendenziell zu. In den heterozygoten Tieren ist diese Zunahme signifikant.

DMG

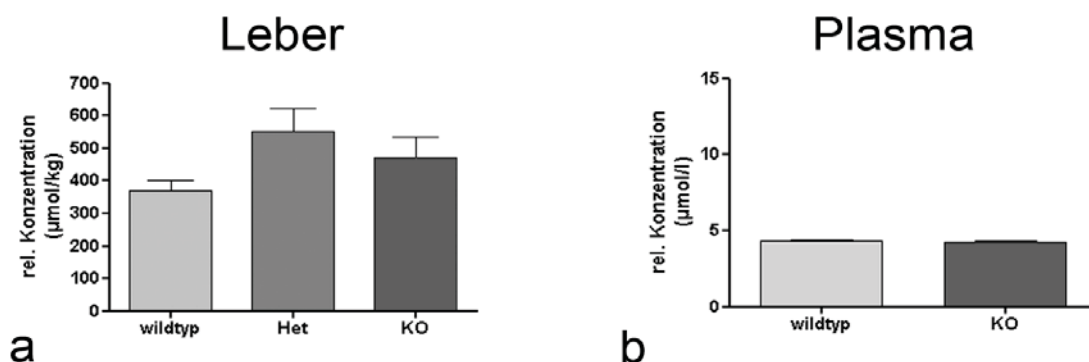


Abbildung 31: **DMG** Bestimmung aus dem Lebergewebe und dem Plasma der Mäuse.

Für die Versuche wurden n=4 Wildtypen, n=3 Heterozygote und n=5 homozygote K.O-Tiere verwendet und jeweils im Duplikat gemessen. Die Konzentrationen in der Leber sind gegenüber dem Gewicht der Leberprobe normalisiert. Die Konzentrationen im Plasma sind über eine genormte Standardmessreihe normiert. Die Werte sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben. Signifikante Änderungen sind mit einem * markiert. a) DMG-Konzentration in der Leber b) DMG-Konzentration im Plasma

Durch die massive Abnahme des Betains liegt es nahe zu vermuten, dass große Mengen DMG anfallen. Eine hohe DMG-Konzentration wirkt sich allerdings negativ auf die BHMT Aktivität aus (67). Obwohl sich die Expression der DMGDH nicht in Abhängigkeit vom Genotyp verändert, nimmt die DMG Konzentration in der Leber des Heterozygoten und Knockout-Tiers nur tendenziell zu und bleibt im Plasma auf einem konstant niedrigen Niveau (Abbildung 31). Es ist anzunehmen, dass die DMGDH unter üblichen Bedingungen nicht gesättigt ist und das vermehrt anfallende DMG nahezu vollständig metabolisiert wird und somit nicht akkumuliert.

Homocystein

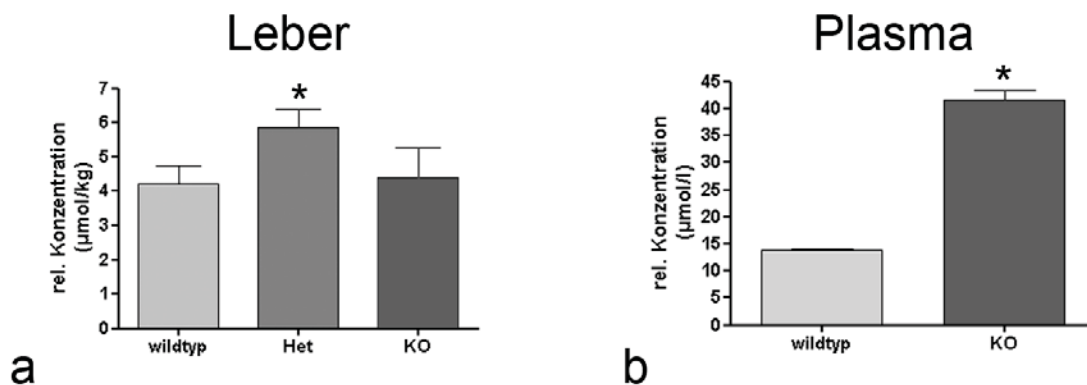


Abbildung 32: **Homocystein** Bestimmung aus dem Lebergewebe und dem Plasma der Mäuse. Für die Versuche wurden n=4 Wildtypen, n=3 Heterozygote und n=5 homozygote K.O-Tiere verwendet und jeweils im Duplikat gemessen. Die Konzentrationen in der Leber sind gegenüber dem Gewicht der Leberprobe normalisiert. Die Konzentrationen im Plasma sind über eine genormte Standardmessreihe normiert. Die Werte sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben. Signifikante Änderungen sind mit einem * markiert. a) Homocystein-Konzentration in der Leber b) Homocystein-Konzentration im Plasma

Die humane MTHFR Defizienz zeichnet sich, neben der Betaindepletion auch durch einen Anstieg in der Plasma-Homocysteinkonzentration aus (56). Diese Tatsache findet man im Tiermodell wieder, wo in der Leber die Homocysteinkonzentration konstant bleibt, während die Plasmakonzentration des Homocysteins deutlich ansteigt. In der Leber von heterozygoten Mäusen fanden sich leicht erhöhte Homocysteinkonzentrationen.

Methionin

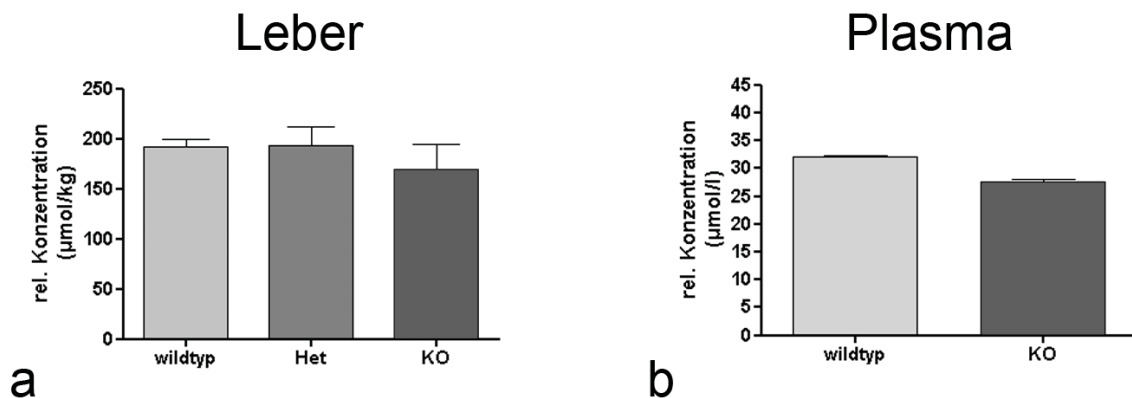


Abbildung 33: **Methionin** Bestimmung aus dem Lebergewebe und dem Plasma der Mäuse.

Für die Versuche wurden n=4 Wildtypen, n=3 Heterozygote und n=5 homozygote K.O-Tiere verwendet und jeweils im Duplikat gemessen. Die Konzentrationen in der Leber sind gegenüber dem Gewicht der Leberprobe normalisiert. Die Konzentrationen im Plasma sind über eine genormte Standardmessreihe normiert. Die Werte sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben. Die Werte in diesen Messungen zeigen keine signifikanten Änderungen. a) Methionin-Konzentration in der Leber b) Methionin-Konzentration im Plasma

Ein Anstieg der Homocysteinkonzentration in System deutet auf einen Rückgang der Methylierung von Homocystein zu Methionin hin. Daher war zu erwarten, dass die Methioninkonzentration in der Leber und im Plasma abnimmt. In den vorliegenden Versuchen zeigte sich dieser Effekt nur als leichte Tendenz und ist zu keinem Zeitpunkt signifikant (Abbildung 33).

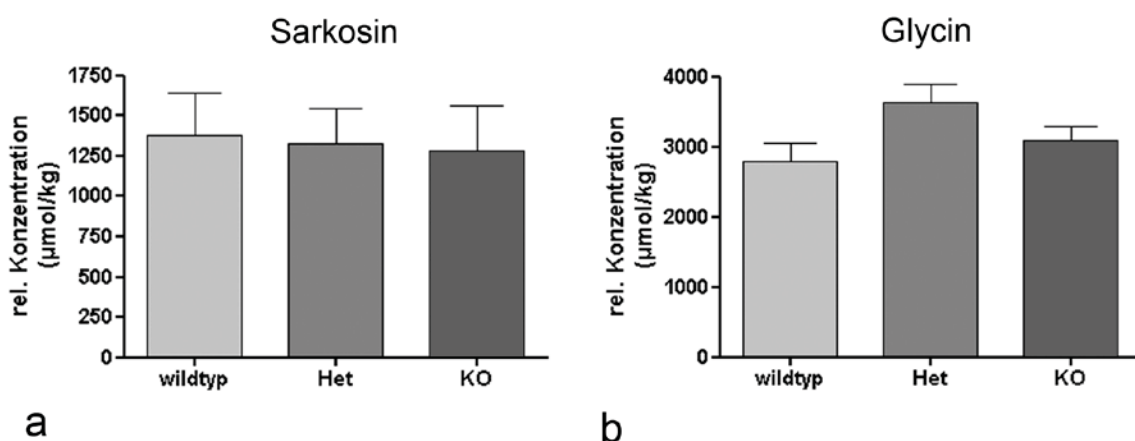


Abbildung 34: **Sarkosin und Glycin** Bestimmung der aus dem Lebergewebe der Mäuse.

Für die Versuche wurden n=4 Wildtypen, n=3 Heterozygote und n=5 homozygote K.O-Tiere verwendet und jeweils im Duplikat gemessen. Die Konzentrationen in der Leber sind gegenüber dem Gewicht der Leberprobe normalisiert. Die Werte in diesen Messungen zeigen keine signifikanten Änderungen. a) Sarkosin-Konzentration in der Leber b) Glycin-Konzentration in der Leber.

Eine Quantifizierung der Metabolite Sarkosin, Glycin, GPC und Taurin war zum Zeitpunkt der Plasmamessungen technisch nicht möglich. Eine spätere

Quantifizierung konnte nicht mehr durchgeführt werden, daher gibt es für diese vier Metabolite keine Plasmadaten.

Sarkosin und Glycin zeigen keine Änderungen aufgrund der Betainmangelsituation in der Leber der Knockout-Tieres. Bemerkenswert sind aber die hohen Konzentrationen dieser beiden Metabolite.

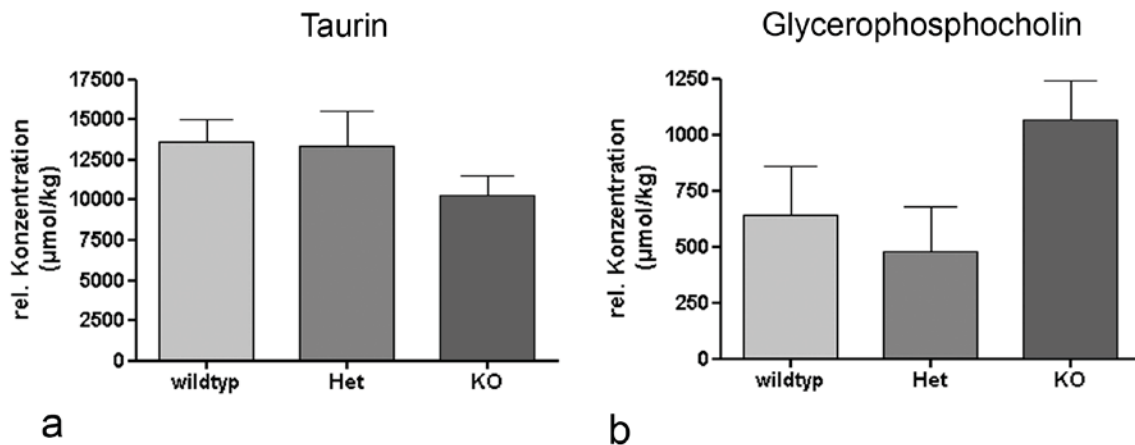


Abbildung 35: **Taurin und GPC** Bestimmung der aus dem Lebergewebe der Mäuse.

Für die Versuche wurden n=4 Wildtypen, n=3 Heterozygote und n=5 homozygote K.O-Tiere verwendet und jeweils im Duplikat gemessen. Die Konzentrationen in der Leber sind gegenüber dem Gewicht der Leberprobe normalisiert. Die Werte in diesen Messungen zeigen keine signifikanten Änderungen. a) Sarkosin-Konzentration in der Leber b) Glycin-Konzentration in der Leber.

Die Konzentration des Osmolyten Taurin nimmt in der Leber der MTHFR-Knockout-Maus ab, während sie in der heterozygoten Maus im Vergleich zum Wildtyp konstant bleibt. Der potente Osmolyt GPC nimmt im heterozygoten Tier leicht ab, und im Knockout-Tier zu. Aufgrund der Variabilität der Konzentrationen ergibt sich hier allerdings keine signifikante Abweichung.

3.12 Bestimmung der Proteolyserate in perfundierten Mauslebern

Zur Bestimmung der Proteolyserate-Änderung in Abhängigkeit vom Genotyp, wurden die mit ^3H -Leucin vorbehandelten Tiere hypoosmolar perfundiert wodurch das in die Leber aufgenommene und in die körpereigenen Proteine eingebaute Leucin wieder freigesetzt und herausgespült wird. In der Zeit von 100 bis 160 Minuten der gesamten Perfusionszeit wurde die Leber mit einer hypoosmolaren (185 mOsmol/l) Pufferlösung perfundiert. Mit steigender Dauer der hypoosmolaren Perfusion nimmt die Proteolyserate kontinuierlich in beiden Genotypen ab. Nach Beendigung der hypoosmolaren Perfusion bleibt die Proteolyserate konstant. Aus Abbildung 36 wird ersichtlich, dass die Abnahme der Proteolysetätigkeit bei Wildtyp- und Knockout-

Tieren gleichermaßen abnimmt. Die Unterschiede zwischen beiden Genotypen sind zu keinem Zeitpunkt signifikant. Hypoosmolare Perfusion hemmt die hepatische Proteolyse unabhängig vom Genotyp. Die Betaindepletion der k.o.-Maus hat also keine Auswirkung auf die Kompensationsfähigkeit der Leber gegenüber hypoosmolarer Exposition in diesem Modell.

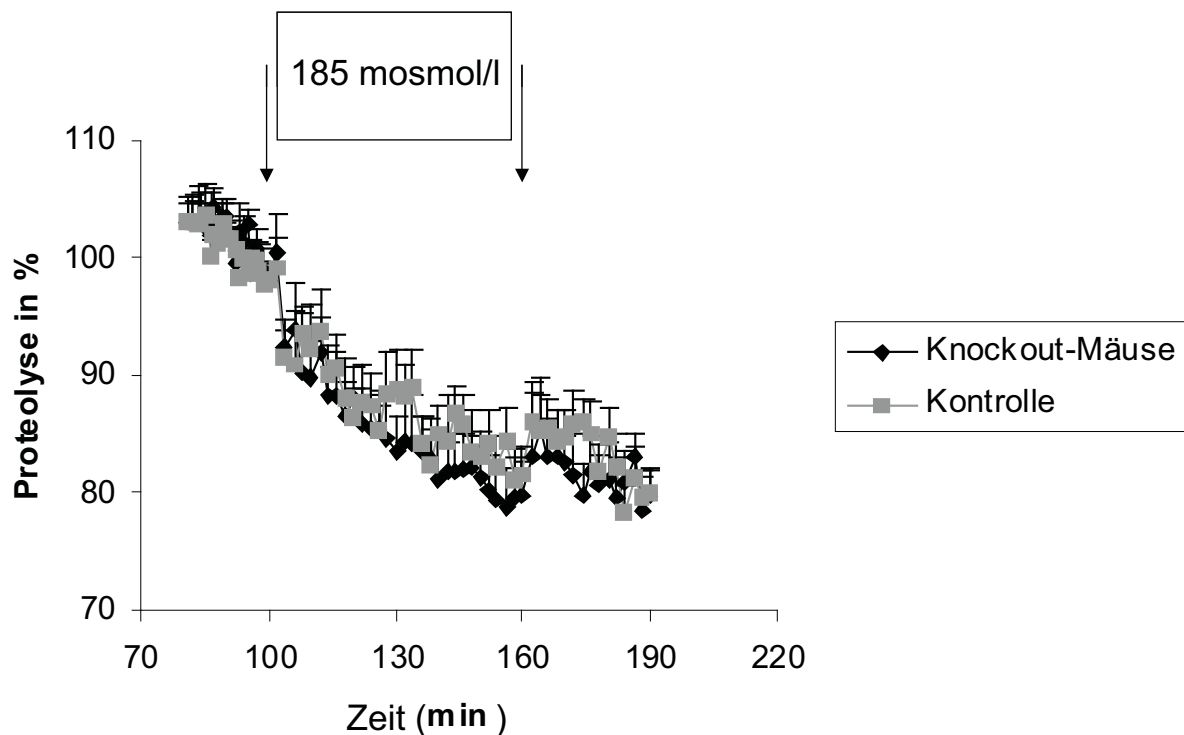


Abbildung 36: Bestimmung der **Proteolyserate** in perfundierten Mauslebern
Für jeden Genotyp wurden n=5 Mäuse eingesetzt. Den Tieren wurde zuvor ^3H -Leucin i.p. injiziert. Am Versuchstag wurden die Tiere für zwischen 100 und 160 Minuten mit hypoosmolarem Puffer (185 mOsmol/l) perfundiert. Ab einer Perfusionszeit von 80 Minuten wurden alle zwei Minuten eine Probe des Eluats genommen und anschließend auf den Leucingehalt untersucht. Die Messungen wurden im Triplikat durchgeführt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte $\pm$ SEM im zeitlichen Verlauf.

3.13 Screening auf osmosensitiv regulierte Genen

Wie die Metabolit-Analysen von Lebergewebe und Plasma (Kapitel 3.11) gezeigt haben, sind die Konzentrationen wichtiger Osmolyte, wie Betain und GPC, in der MTHFR-knockout-Maus verringert. Vorangegangene Versuche mit primären Hepatozyten konnten zeigen, dass die Expression der Gene des Cholinabbaus (BHMT, DMGDH und SARDH) durch die Auswirkungen der MTHFR-Defizienz der Maus beeinflusst werden. Ein Screeningverfahren auf Veränderungen der „steady-state“ mRNA Konzentrationen in der Leber mittels DNA-Microarray sollte weitere

Aufschlüsse liefern, welche Expressionsänderungen in Abhängigkeit vom MTHFR Genotyp auftreten und ob sich weitere Zusammenhänge mit dem Osmolyt-stoffwechsel nachweisen ließen.

Für die Untersuchung der stoffwechselrelevanten Gene im Mausmodell wurde ein „custom“-Chip verwendet, der nicht eine genomweite Gensammlung aufweist, sondern eine selektive Auswahl hepatischer Gene trägt. Im Microarray Experiment wurde die hepatische Expression relevanter Gene in der MTHFR-Knockout-Maus mit der Expression in der Wildtyp-Maus verglichen.

Tabelle 4: Analyse der Genexpressionsänderungen durch die Betaindepletion in MTHFR-Knockout-Mäusen. DNA Arrays wurden hybridisiert mit fluoreszenzmarkierter cDNA, welche die Genexpression in MTHFR K.O.-Mäusen und Wildtyp-Mäusen widerspiegeln. Die Expressionsänderungen sind als logarithmisches Verhältnis zwischen Wildtyp (WT) und Knockout (K.O.) dargestellt. Eine Ratio von $\pm 0,19$ wurde als nicht reguliert betrachtet. Bei einer Ratio von $\geq 0,19$ wurde das als Expressionssteigerung verstanden und eine Ratio $\leq -0,18$ wird als Expressionsminderung gewertet. Die Arrays wurden mit Epoxisilan-beschichteten Glaträgern durchgeführt auf welche die Oligonucleotide als Sonden gespottet wurden. a) In dieser Tabelle sind die Gene aufgelistet, die eine WT/K.O. Ratio unter $-0,19$ aufweisen und somit in den K.O.-Tieren als herabreguliert gelten. b) Diese Tabelle listet alle Gene mit einer WT/K.O. Ratio zwischen $-0,18$ und $+0,18$ auf und gelten daher als nicht reguliert. c) In dieser Tabelle finden sich die Gene, die eine WT/K.O. Ratio von mehr als $0,19$ zeigen und somit in den K.O.-Tieren als hochreguliert angesehen werden.

Name Tabelle 4:a	NCBI - SYMBOL	NCBI - Accession	WT/K.O. Ratio Median
Procollagen, type III, alpha 1	Col3a1	NM_009930	-0,55
poly(A) binding protein, nuclear 1	Pabpn1	U93050.1 IMMU93050	-0,44
ubiquitin C	Ubc	NM_019639	-0,34
Cysteine sulfinic acid decarboxylase	Csad	NM_144942	-0,31
cysteine sulfinic acid decarboxylase Oligo 1	Csad	NM_144942	-0,30
Mus musculus mRNA for titin cap protein	titin cap	Y15845	-0,29
Ribosomal protein S28	Rps28	U11248	-0,28
ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	Abcc2	NM_013806	-0,24
mitochondrial ribosomal protein L27	Mrpl27	NM_053161	-0,24
programmed cell death 8; apoptosis-inducing factor	Pdcd8	NM_012019	-0,22
ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5	Abcc5	NM_013790	-0,22
myoglobin (neu)	Myoglobin	NM_013593	-0,21
cathepsin L	Ctsl	NM_009984	-0,19
Glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	Glul	NM_008131	-0,19
Ribosomal protein L30	Rpl30	K02928	-0,19
Apolipoprotein C-II	Apoc2	NM_009695	-0,19
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2, mitochondrial hydroxymethylglutaryl-CoA synthase precursor (HMG-CoA synthase)	Hmgcs2	NM_008256	-0,19

Die Tabelle 4a zeigt die Ergebnisse für die Gene, die nach der festgelegten Konvention als herunterreguliert gelten. Erwähnenswert ist die Cysteinsulfinsäure Decarboxylase (CSAD), welche den Schritt von Cysteinsulfat zu Hypotaurin katalysiert, welches umgehend zum wichtigen organischen Osmolyten Taurin oxidiert wird (80). Ausserdem zeigt das „Multi-drug-resistant“-Protein 5 (Abcc5) eine Expressionsminderung im Knockout-Tier. Dieses sorgt als Exportpumpe für die Ausschleusung von Glutathion-Konjugaten (81,82) und zyklischen Nukleotiden (cAMP,cGMP) (83).

Name Tabelle 4:b	NCBI - SYMBOL	NCBI - Accession	WT/K.O. Ratio Median
Apolipoprotein H	ApoH	NM_013475	-0,18
ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	Abcc3	XM_358306	-0,17
Aquaporin 8	Aqp8	NM_007474	-0,16
Apolipoprotein C-IV	Apoc4	NM_007385	-0,16
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11; BSEP, P-glycoprotein sister	Abcb11	NM_021022	-0,14
Bile acid-Coenzyme A: amino acid N-acyltransferase	Baat	NM_007519	-0,13
soluble guanylate cyclase beta-1 subunit	sGC-b1	AF297083	-0,12
Apolipoprotein C-I	Apoc1	NM_007469	-0,12
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapd	NM_001001303	-0,11
Serine-Hydroxymethyltransferase1, (soluble)	Shmt1	NM_009171	-0,11
microglobulin alpha 1, bikunin	Ambp	NM_007443	-0,10
diazepam binding inhibitor (DBI)	Dbi	NM_007830	-0,10
Glucose-6-phosphatase, catalytic	G6pc	NM_008061	-0,09
fatty acid binding protein 1	Fabp1	NM_017399	-0,09
eukaryotic translation initiation factor 5	Eif5	NM_173363.1	-0,09
Methionine Adenosyltransferase 2, beta	Mat2b	NM_134017	-0,09
mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 5	Mapkapk5	NM_010765	-0,08
Apolipoprotein C-III	Apoc3	NM_023114	-0,08
Arginase 1, liver	Arg1	NM_007482	-0,06
solute carrier family 22, member A1 (organic cation transporter)	Slc22a1	NM_009202	-0,05
ribosomal protein S27	Rps27	NM_027015.1	-0,04
Mus musculus erythropoietin	EPO	NM_007942	-0,03
ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	Atp1b1	NM_009721	-0,03
aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A2	Aldh3a2	U14390	-0,03
ubiquitin B	Ubb	NM_011664	-0,03
Heat shock protein 1 (chaperonin); heat shock 60kD protein	Hspd1	NM_010477	-0,03
Cystathionine-beta Synthase, transcript variant 2	Cbs	NM_178224	-0,02
Solute carrier family 38, member 3; amino acid transport system NAT2	Slc38a3	NM_023805	-0,02
Myosin IB	Myo1b	NM_010863	-0,02
Bcl-xL	Bcl-xL	L35049	-0,01
Ferritin light chain 1	Ftl1	NM_010240	-0,01
superoxide dismutase 1, soluble	Sod1	M35725	-0,01
Solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1	Slc10a1	NM_011387	-0,01
expressed in non-metastatic cells 2, protein	Nme2	X68193	-0,01
Choline Kinase beta	Chkb	NM_007692	0,00
NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3	Ndufs3	XM_130347	0,00
electron transferring flavoprotein, dehydrogenase	Etfdh	K075673	0,01
Methionine Adenosyltransferase 1, alpha	Mat1a	NM_133653	0,01
mitochondrial ribosomal protein L52	Mrpl52	NM_026851.1	0,01
ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide	Atp1a1	NM_144900	0,02
Actin, beta, cytoplasmic	Actb	NM_007393	0,03
superoxide dismutase 2, mitochondrial	Sod2	NM_013671	0,04
Paraoxonase 1	Pon1	NM_011134	0,04
ribosomal protein L23	Rpl23	BC025918	0,05
vascular cell adhesion molecule 1	VCAM-1 (CD 106)	X67783	0,05
ribosomal protein L13	Rpl13	NM_016738	0,05
Alpha-2-HS-glycoprotein; fetuin-A	Ahsg	NM_013465	0,05
Albumin 1	Alb1	NM_009654	0,06
Gap junction membrane channel protein beta 1; Connexin 32	Gjb1	NM_008124	0,06
Protease, serine, 25; serine protease OMI	Prss25	NM_019752	0,07
Glutathione Synthetase	Gss	NM_008180	0,09
Peptidylprolyl isomerase A; cyclophilin	Ppia	NM_008907	0,09
Glycine N-methyl Transferase	Gnmt	NM_010321	0,09
dipeptidyl peptidase IV (DPPIV ; DPP4); bile canaliculus domain-specific membrane glycoprotein; gp110 glycoprotein	Dpp4	NM_010074	0,09
Dimethylglycine Dehydrogenase	Dmgdh	NM_028772	0,09

Apolipoprotein A-V	Apoa5	NM_080434	0,10
catalase	Cat	L25069	0,10
enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial	Echs1	XM_133949	0,10
cathepsin C	Ctsc	NM_009982	0,10
lipopolysaccharide binding protein	Lbp	NM_008489	0,10
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 24	Ddx24	NM_020494.1	0,11
Atrialer Natriuretischer Faktor	ANF	K02781	0,11
Vimentin	Vim	NM_011701	0,11
ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6	Abcc6	NM_018795	0,11
Macrophage stimulating 1 (Mst1)	Mst1	NM_008243	0,12
Pyruvate carboxylase	Pcx	NM_008797	0,13
X-box binding protein 1; hepatocarcinogenesis-related transcription factor	Xbp1	NM_013842	0,13
Heat shock protein 1 (chaperonin 10)	Hspe1	NM_008303	0,13
Cystathionine-gamma Lyase	Cth	NM_145953	0,13
hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit	Hadhb	AK033462	0,13
isovaleryl coenzyme A dehydrogenase	Ivd	NM_019826	0,13
Cysteine dioxygenase, type1	Cdo1	NM_033037	0,14
Phosphatidyl Ethanolamin N-Methyltransferase,transcript Variant 1	Pemt	NM_008819	0,14
Fibronectin 1	Fn1	XM_129845	0,14
Cystathionine-beta Synthase, transcript variant 1	Cbs	NM_144855	0,16
Glutathione reductase 1	Gsr	NM_010344	0,16
Gap junction membrane channel protein beta 2; Connexin 26	Gjb2	NM_008125	0,16
Sorbitol dehydrogenase	Sdh1	NM_146126	0,18

Die Tabelle 4b zeigt die Ergebnisse für die Gene, die schwache aber nach der Konvention als nicht signifikant geltende Expressionsunterschiede zwischen Genotypen aufweisen. Darunter z.B. das „Housekeeping“ Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GADPDH). Bemerkenswert sind aber ebenfalls die Methioninadenosyltransferase, MAT2b und MAT1a, welche eine Methylgruppe auf Methionin übertragen und somit den wichtigen Methylgruppendonor S-Adenosyl-Methionin bereitstellen. Eine kleine Überraschung ist das Expressionsverhalten der CHK. Wie man in den primären Hepatozyten sehen konnte (Abbildung 20c) nahm die Expression dort im Knockout-Tier, gegenüber dem Wildtyp-Tier ab. Der Microarray Versuch zeigt jedoch keine Expressionsänderung für diesen Genotyp.

Die CBS besitzt in der Maus drei Transkriptvarianten, von denen zwei nicht von Genotyp-bedingten Veränderungen beeinflusst werden.

Die Expression der PEMT, die bereits in primären Hepatozyten nur tendenziell vom Genotyp beeinflusst wurde (Abbildung 20b) zeigt diese Tendenz auch im Arrayversuch. Aufgrund unserer Konvention gilt die PEMT aber als nicht reguliert. Die DMGDH zeigt wie erwartet keine Genotyp-spezifische Expressionsänderung.

Weiterhin interessant ist die Cystein Dioxygenase (CDO1) die den ersten Schritt zur Glutathion- und Taurinsynthese katalysiert.

Die Glutathionreduktase reduziert die oxidierte Form des Glutathions und trägt somit zur Bereitstellung des wichtigen Antioxidanten Glutathion (GSH) bei. Die GSH Reduktase gilt als nicht reguliert, zeigt aber eine Tendenz zur Expressionssteigerung im Knockout-Tier.

Die Expression der Sorbitol Dehydrogenase (SDH1) liegt am Schwellenwert zur Regulationsänderung. Sorbitol gehört zur Klasse der Polyole und ist ein organischer Osmolyt, der aus Fructose oder Glucose synthetisiert wird. Die Sorbitol Dehydrogenase katalysiert die Hin- und Rückreaktion von der Fruktose zum Sorbitol und hat somit direkten Einfluss auf die Bereitstellung dieses Osmolyten. Selbst wenn die SDH1 in dieser Konvention als nicht reguliert gilt, so zeigt sie zumindest eine Tendenz zur Expressionssteigerung im Knockout-Tier.

Name Tabelle 4:c	NCBI - SYMBOL	NCBI - Accession	WT/K.O. Ratio Median
Serine-Hydroxymethyltransferase2 (mitochondrial)	Shmt2	NM_028230	0,19
Ribosomal protein L3	Rpl3	Y00225	0,20
Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	Slc6a6	NM_009320	0,22
Ribosomal Protein S3a	Rps3a	NM_016959	0,23
calreticulin	Calr	NM_007591	0,32
Aquaporin 1	Aqp1	NM_007472	0,25
Apolipoprotein A-IV	Apoa4	NM_007468	0,26
<i>glutaminase 2, liver mitochondrial</i>	Gls2	XM_125928	0,26
Apolipoprotein A-I	Apoa1	NM_009692	0,28
Angiotensinogen	atg	NM_007428	0,41
cathepsin B Oligo 2	Ctsb	NM_007798	0,31
AU RNA binding protein/enoyl-coenzyme A hydratase	Auh	NM_016709	0,32
Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	Timp2	NM_011594	0,33
cathepsin H	Ctsh	NM_007801	0,35
Actin, gamma, cytoplasmic	Actg	NM_013798	0,36
Growth factor, erv1 (S. cerevisiae)-like (augmenter of liver regeneration)	Gfer	NM_023040	0,37
Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 3N	Serpina3n	NM_009252	0,38
Aquaporin 4	Aqp4	NM_009700	0,42
adenosine kinase	AdK	U26589	0,43
ribosomal protein S2	Rps2	NM_008503	0,47
Solute carrier family 38, member 4; Ata3, mATA3	Slc38a4	NM_027052	0,48
S-Adenosylhomocysteine Hydrolase	Ahcy	NM_016661	0,51
Sarcosine Dehydrogenase	Sardh	NM_138665	0,52
Heat shock protein 1, alpha; heat shock 90kD protein, HSP84	Hspca	NM_010480	0,55
carboamyl-phosphate synthetase 1	Cps1	XM_129769	0,56
cystathionine beta-synthase	CBS	NM_144855	0,58
heat shock protein 1; heat shock 27kD protein	Hspb1	NM_013560	0,67
S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase	AHCY	NM_016661	0,72
prosaposin	Psap	XM_192668.2	0,74
<i>Similar to alpha-1-B glycoprotein; liver regeneration-related protein 1</i>		XM_128290	0,76
betaine-homocysteine methyltransferase	Bhmt	NM_016668	0,80
Metallothionein 1	Mt1	NM_013602	0,93

In der Tabelle 4c sind die Gene aufgelistet, die eine WT/K.O. Ratio von über 0,18 aufweisen und somit im Knockout-Tier als hochreguliert gelten.

Zu den auffälligen Genen gehört die dritte Transkriptionsvariante des CBS die im Knockout eine deutliche Expressionssteigerung zeigt. In den primären Hepatozyten zeigte die CBS eine Verminderung der Expression im Knockout-Tier, obwohl auch dort aus biochemischer Sicht eine Expressionssteigerung zu erwarten wäre.

Die SARDH, deren Expression bereits in den primären Hepatozyten Genotyp-abhängig hochreguliert wurde, zeigt diese Tendenz im Microarray Versuch noch ausgeprägter. Interessant sind auch die Expressionssteigerung der beiden Transkriptvarianten der S-Adenosyl-Homocystein Hydrolase, welche die reversible Abspaltung der Adenosylgruppe katalysiert und damit wichtig für die Elimination von Homocystein ist und des Metallothionin 1, welches eine Rolle bei der Abwehr von toxischen Substanzen und bei der Radikalabwehr spielt (84).

Ausserdem zeigt sich die PEMT im Microarray deutlich hochreguliert, während sie in den primären Hepatozyten eine leichte, Genotyp-abhängige Expressionsminderung verzeichnete.

Aus den vorliegenden Microarray Daten kann man in Verbindung mit den Expressionsdaten aus den primären Hepatozyten folgende stoffwechselrelevanten Ergebnisse kombinieren und zusammenfassen.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Expressionsdaten aus dem Microarray Versuch mit Mäusen und Realtime PCR der primären Hepatozyten. Die Pfeilrichtung gibt an ob die Gene hoch-, herunter- oder nicht reguliert sind.

Name	WT/KO Expressionsänderung in prim. Hepatozyten	WT/KO Expressionsänderung in Mäusen
BHMT	↑	↑
DMGDH	↔	↔
SARDH	↑	↑
PEMT	↓	↑
CBS	↓	↔/ ↑
CHK	teilweise ↓	↔

Die Tabelle 5 zeigt, dass sich das Expressionsverhalten von PEMT, CBS und CHK unterscheiden, während die BHMT-, DMGDH- und SARDH-Expressionsmuster bestätigt wurden. Die RNA als Ausgangsmaterial für beide Versuchsreihen stammen zwar aus der selben Tierlinie, jedoch sind Expressionsänderungen zu erwarten wenn Zellen aus dem Gewebeverband gelöst werden. Zu erwähnen sind auch die Gene,

die im Arrayversuch kein Ergebnis geliefert haben. Die PCYT1A, Methioninsynthase, Cholindehydrogenase und die MTHFR konnten in diesem Versuch nicht nachgewiesen werden. Zwar wurde das Ausbleiben der MTHFR in den Knockout-Tieren erwartet, jedoch hätte zumindest in den Wildtyp-Tieren die MTHFR nachweisbar sein müssen. Dieses Gen weist jedoch eine konstitutionell niedrige Expression auf.

4 Diskussion

4.1 Identifizierung neuer osmotisch regulierter Gene

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten mehrere neue Gene identifiziert werden, die durch die tonizitätsinduzierte Volumenänderung in ihrer Expression und Aktivität moduliert werden. Nachdem durch einen Vitalitätsassay gezeigt wurde, dass die Zellen die gegebenen Versuchsbedingungen gut überleben können (Abbildung 3), konnte zunächst die Hypothese der osmotischen Regulation der BHMT bestätigt werden, wie sie in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe und einer anderen Arbeitsgruppe (42) beschrieben wurde. Die Realtime PCR Ergebnisse in H4IIE Zellen und in primären Hepatozyten haben gezeigt, dass die BHMT zeitabhängig ihre mRNA Expression den osmotischen Gegebenheiten anpasst (Abbildung 5a, Abbildung 19a). In einer ersten Publikation zusammen mit einer kooperierenden Arbeitsgruppe (43) wurde gezeigt, dass auch die Proteinexpression und die Enzymaktivität diesem Muster folgen. Eine Bestätigung der anisoosmotisch induzierten Veränderung der Enzymaktivität erbrachten auch die Daten der DMG/Betain-Ratio in den H4IIE Zellen (Abbildung 26).

Ein weiteres eindeutiges Ergebnis ergab sich für das Enzym Dimethylglycine Dehydrogenase. Dieses Enzym, welches die Reaktion von DMG zu Sarkosin katalysiert zeigte in H4IIE Hepatomzellen eine eindeutige, zeitabhängige Expressionssteigerung durch hypoosmotische Inkubation und eine Expressionsabnahme bei hyperosmolarer Stimulation (Abbildung 5b). In primären Leberzellen ist dieser signifikante Effekt ebenfalls zu sehen (Abbildung 19b).

In Abbildung 14 sieht man, dass auch die Proteinexpression zeitabhängig reguliert wird und dass die osmotisch bedingten Veränderungen der Proteinexpression zeitlich deutlich versetzt zur mRNA Expression auftreten. Eine Messung der DMGDH Aktivität wurde nicht durchgeführt, aber die Metabolitenmessung von DMG und Sarkosin zeigen, dass die Substanzmengen sich bereits innerhalb der ersten 24 Stunden nach Inkubation in anisoosmolarem Medium deutlich vom Normalzustand in den Zellen unterscheiden. Wenn man in Betracht zieht, dass die DMGDH Proteinexpression erst später sichtbar wird, könnte der verstärkte Abbau des DMG durch einen vermehrten Fluss durch Änderungen der Substratverfügbarkeit und/oder

Steigerung der DMGDH Aktivität durch Regulation der Enzymaktivität zu erklären sein.

Die SARDH ist das Enzym, welches Sarkosin in Glycin umwandelt und dabei eine weitere Methylengruppe auf ein assoziiertes Tetrahydrofolat überträgt um somit den Methylgruppendedonator 5,10-Methylenetetrahydrofolat für die Nukleotidsynthese oder, nach Reduktion für Methylierungsreaktionen bereitzustellen. In der Charakterisierung mittels Realtime PCR zeigte sich die Genexpression der SARDH ebenfalls durch osmotisch induzierte Zellvolumenänderungen regulierbar, wenngleich die Stärke dieses Effekts in den H4IIE Zellen deutlich schwächer ausfiel, als bei BHMT und DMGDH (Abbildung 5c). Auch die mRNA Expression der SARDH in primären Hepatozyten verhält sich unter anisoosmolarer Stimulation der Zellen vergleichbar zur Expression in H4IIE Zellen.

Die Expression der SARDH auf Proteinebene zeichnet das Expressionsmuster auf mRNA Ebene nach und ändert sich zwischen 24 und 48 Stunden nicht mehr. Die Daten lassen darauf schließen, dass die Expressionsänderung der SARDH unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nach spätestens 24 Stunden ein Plateau erreicht und nicht weiter ansteigt.

Die CHDH leitet die Cholindegradation ein und bestimmt damit die Betainbereitstellung. In den primären Hepatozyten, zeigt sich, dass die CHDH auch auf die veränderte Umgebungsosmolarität reagiert. In Abbildung 20a sieht man dass die CHDH Expression in hypertonem Medium eine deutliche Steigerung verzeichnet, während sie unter hypotonem Einfluss keine Änderung aufweist, was ein Indiz dafür ist, dass Cholin verstärkt zu Betain umgesetzt wird. Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass die Leberzelle Betain als organischen Osmolyten in die Strategie zur Anpassung an hyperosmolare Zustände einbezieht. Gleichzeitig ist die Zelle unter hypoosmolarem Einfluss bestrebt, Betain als Osmolyt zu entfernen, was die Expressionssteigerung der BHMT und DMGDH nahelegen. Die Tatsache, dass der Cholinstoffwechsel an zwei unterschiedlichen Stellen, nämlich der CHDH und der BHMT/DMGDH, entgegengesetzt reguliert werden kann, zeigt, dass die Zelle sehr effizient und fein abgestuft auf osmotischen Stress reagieren kann und dass Betain ein wichtiger Bestandteil der Osmolytstrategie der Leber ist. Im Modell der H4IIE Zellen konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden.

Die Tatsache, dass die Expression der genannten Enzyme in primären Hepatozyten im wesentlichen auf die gleiche Weise reagiert, wie in den immortalisierten H4IIE Hepatomzellen (Abbildung 19, jeweils a,b und c, Wildtyp) lässt darauf schließen, dass diese Zelllinie grundsätzlich als Modell für die Untersuchung der osmosensitiven Regulation des Cholinstoffwechsels geeignet ist und die gemessenen Effekte echte regulatorische Änderungen sind und nicht durch pathologische Veränderungen in der Zelllinie hervorgerufen wurden.

Wie bereits in der Einleitung anhand des Schaubildes (Abbildung 2) gezeigt wurde, ist die Oxidation nicht das einzige Schicksal des Cholins. In Konkurrenz dazu steht die Phosphatidylcholinsynthese über den Kennedy Syntheseweg. In diesem Weg wird das Cholin durch die Cholinkinase phosphoryliert und es entsteht Phosphocholin. Das Phosphocholin wird durch das Enzym Phosphocholin-Cytidyltransferase (PCYT1A) zu Cytidylphosphocholin umgesetzt. Diese beiden Schritte bilden den Anfang dieser Phosphatidylcholinsynthese. Das Phosphatidylcholin kann anschließend weiter prozessiert werden und den organischen Osmolyten Glycerophosphocholin bilden. Die mRNA Expression der Cholinkinase zeigte sich in den Realtime PCR Versuchen nur kurz nach Beginn der osmotischen Stresssituation reguliert (Abbildung 6a). Das Expressionsmuster der PCYT1A wies keine eindeutige Regulation auf (Abbildung 6b). Die Expression der CHK in den primären Hepatozyten, die nur nach 24 Stunden untersucht wurden, wies ein vergleichbares Muster zu dem in H4IIE-Zellen auf (Abbildung 20c, Wildtyp). Das bedeutet, dass die CHK kurzfristig zu Beginn sehr stark auf osmotische Reize reagiert, längerfristig aber nur eine geringe Expressionssteigerung unter hyperosmolaren Bedingungen beibehält. Einerseits ist das ein Indiz für die Zellvolumen-induzierte Genregulation der CHK, andererseits ist der Effekt relativ klein, so dass es fraglich ist, ob die Expressionsänderung tatsächlich physiologische Auswirkungen hat. Um diese Frage zu beantworten müssten Protein- und Aktivitätsmessungen folgen. Die Cholinkinase verschiebt Cholin in Richtung PtdCholin sowie GPC und da die PCYT1A, welche die Anschlussreaktion katalysiert, nicht reguliert scheint (Abbildung 6b), liegt der Schluss nahe, dass sie keine regulatorische Schlüsselfunktion in dieser Reaktion einnimmt oder möglicherweise noch nicht substratgesättigt vorliegt. Die PCYT1A ist das geschwindigkeits-bestimmende Enzym für die PtdCholinsynthese über den Kennedy-Pathway. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass die PCYT1A anderen

Regulations-mechanismen unterliegt, die ihre Aktivität regulieren. Der gesteigerte Cholinbedarf des Kennedy-Stoffwechselweges unter hypertonen Bedingungen steht mit der CHDH des cholindegradierenden Stoffwechselweges in Konkurrenz um das vorhandene Cholin. Zum einen stellt Cholin aufgrund des umfangreichen Cholinpools aus Phospholipiden keine limitierende Ressource in der Leber dar und zum anderen haben die Ergebnisse eine zeitliche Staffelung der Effekte aufgezeigt. Es besteht also durchaus die Möglichkeit, dass die Zelle sehr schnell nach Eintreten der osmotischen Stresssituation mit der GPC Synthese beginnt und erst im späteren Verlauf verstärkt das Cholin zur Betainsynthese verwendet.

In den vorliegenden Ergebnissen wurde weiterhin festgestellt, dass die PEMT ein ähnliches Expressionsmuster zeigt, wie die CHK (Abbildung 7 und Abbildung 20b, Wildtyp). Die PEMT ist das Schlüsselenzym für einen weiteren Phosphatidylcholin-Syntheseweg, der in drei aufeinanderfolgende Methylierungsreaktionen aus Phosphoethanolamin Phosphatidylcholin synthetisiert. Während die Expression der PEMT in den H4IIE Zellen in den ersten Stunden des hypo- und hyperosmolaren Reizes eine Expressionsminderung zeigt, normalisiert sich dieser Effekt im Verlauf des Versuchs. In primären Hepatozyten zeigte die PEMT eine leichte Expressionssteigerung unter dehydrierenden Bedingungen und blieb unter hypoosmolaren Bedingungen praktisch unverändert.

Die Expressionsänderungen der Schlüsselenzyme der Phosphatidylcholinsynthese CHK und PEMT fallen moderat aus. Es ist möglich, dass die Enzyme anderen Regulationsmechanismen unterliegen, die z.B. ihre Aktivität beeinflussen. Es wurden allerdings keine Daten zur Enzymmenge und Enzymaktivität erhoben.

Die Remethylierung ist für die endogene Bildung von Methionin aus Homocystein verantwortlich. Zusammen mit der Folsäure-abhängigen Remethylierung wird über die BHMT das Homocystein-Kohlenstoffgerüst als Methylgruppenträger wieder verwendet und in Methionin umgewandelt (56). Wie bereits erwähnt tragen unter normalen Bedingungen beide Remethylierungswege zu gleichen Teilen zur Remethylierung bei. Die Cobalamin-abhängige Methioninsynthase (MS) ist dabei das ausführende Enzym, während die MTHFR das Schlüsselenzym für die Bereitstellung des Methylgruppendonors 5-methyl-Tetrahydrofolat ist und darüber die Aktivität der Methioninsynthase kontrolliert. Die MTHFR ist die einzige Quelle aus denen das 5-

methyl-THF für die Methylierungsreaktion bezogen werden kann. Das 5,10-Methylen tetrahydrofolat kommt jedoch aus vielen Quellen im gesamten Organismus. Die gesteigerte BHMT Expression und Aktivität unter hypoosmolaren Bedingungen, sorgt für eine gesteigerte Remethylierungsrate, während ein Rückgang der BHMT Expression auch einen Rückgang der Remethylierung zur Folge hat. Die Methioninsynthase katalysiert die Folat-abhängige Remethylierung die alternativ zur Betain-abhängigen Remethylierung etwa die Hälfte der Remethylierungsvorgänge bewältigt. In den primären Hepatozyten sind die tonizitätsinduzierten Expressionsänderungen zwar gering, jedoch signifikant (Abbildung 21b, Wildtyp) und nähern sich tendenziell dem Expressionsmuster der BHMT an. Demnach nimmt die MS Expression unter hypoosmolaren Bedingungen zu und unter hyperosmolaren Bedingungen ab. Im Gegensatz dazu zeigt die Methioninsynthase-Expression in H4IIE Zellen kein einheitliches Expressionsmuster (Abbildung 8a). Auch die MS scheint für eine koordinierte Regulation weiterer Faktoren zu benötigen, die im H4IIE Zellkulturmodell fehlen.

Die MTHFR, stellt aus 5,10-Methylen Tetrahydrofolat (THF) das 5-Methyl Tetrahydrofolat her. Während das 5,10-Methylen-THF für die Nukleotidsynthese verwendet wird, reguliert die MTHFR über die Bereitstellung des Methylgruppendonors 5-Methyl Tetrahydrofolat, die Remethylierungsaktivität der Methioninsynthase. Die MTHFR ist ein wichtiger Schalter zwischen diesen beiden Wegen indem es die verfügbare Menge an 5-Methyl-THF steuert und in seiner Aktivität durch SAM inhibiert wird. Die MTHFR Expression zeigt in H4IIE-Zellen leichte Tendenzen zur Expressionsminderung unter hypoosmotischen Zuständen und eine signifikante Expressionssteigerung unter hyperosmolaren Bedingungen. Das könnte bedeuten, dass die Methioninsynthase, durch die gesteigerte Bereitstellung von Methylgruppendonoren unter hyperosmolaren Bedingungen verstärkt die Remethylierungsarbeit übernimmt, während die BHMT herunterreguliert wird, um Betain als organischen Osmolyten in der Zelle halten zu können. Dem widerspricht jedoch das Expressionsverhalten der MS. Angesichts dieser scheinbar widersprüchlichen Expressionsmuster ist die Rolle der Folat-abhängigen Remethylierung im Zusammenhang mit osmotischen Stresssituationen unklar. Da sich unter hyperosmolaren Bedingungen eine Akkumulation von Methionin in der Zelle zeigt (Abbildung 28) liegt möglicherweise eine gestörte Aktivierung des

Methionins zu S-Adenosyl-Methionin vor. Belege für diese Theorie gibt es derzeit jedoch nicht.

Andererseits ist es beachtenswert, dass die Expressionsmuster von MTHFR und MS gegenläufig zu sein scheinen. Tonizitätsinduzierte Effekte auf Folat-abhängige und Betain-abhängige Remethylierung führen in der Summe zu einer Verschiebung der jeweiligen Anteile. Somit könnte die Remethylierung von Homocystein zu Methionin aufrecht gehalten und trotzdem die Betainkonzentration der Umgebungsmolarität angepasst werden.

Jedoch ist unter hyperosmolaren Bedingungen weniger anabole Proteinsynthese und Transmethylierungsaktivität zu erwarten, was zu einer Akkumulation von Methionin führen würde, wodurch die Remethylierung gebremst ablaufen würde. Die niedrigen Sarkosin- und Homocysteinkonzentrationen sprechen für diese Hypothese. Eine wichtige Stellgröße in diesem Regelsystem, das SAM, konnte nicht gemessen werden. Damit bleiben viele Zusammenhänge noch ungeklärt. Wenn jedoch Methionin ansteigt, aber wenig remethyliert und transmethyliert wird, ist der Methylgruppenumsatz gering und Homocystein muss nicht transsulfuriert werden. Falls eine gebremste MAT-Aktivität vorläge und nur wenig SAM vorhanden ist, könnte das in dieser Situation die gesteigerte MTHFR-Expression erklären.

Homocystein kann aber nicht nur in den Remethylierungskreislauf eintreten, sondern auch durch Transsulfurierung aus diesem Zyklus entfernt werden. Die Transsulfurierung führt über Cystein zur Synthese des Antioxidants Glutathion und des Osmolyten Taurin. Das Schlüsselenzym für die Transsulfurierung ist die Cystathionin-beta-Synthase (CBS). In primären Hepatozyten ähnelt das CBS Expressionsmuster dem Expressionsmuster der BHMT und gleichzeitig steigt die Expression unter hypoosmolaren Bedingungen an (Abbildung 21a, Wildtyp). Die CBS zeigt in H4IIE-Zellen ein unbeständiges Expressionsmuster (Abbildung 8c), das unter hyperosmolaren Bedingungen teilweise signifikante Expressionsminderungen aufweist.

Dieses Expressionsverhalten der CBS ist nicht erklärbar, da eine verstärkte Transsulfurierung unter hypoosmolaren Bedingungen dazu führen könnte, dass der Syntheseweg in Richtung Glutathion und Taurin unter hypoosmolaren Bedingungen begünstigt wird, was nicht im Sinne der Zelle wäre, die eigentlich die intrazelluläre Osmolytkonzentration vermindern sollte.

Die Übersicht (Abbildung 37) zeigt, dass unter hypoosmolaren Bedingungen die Remethylierungswege verstärkt werden und dadurch möglicherweise die Entfernung organischer Osmolyte erleichtert wird, während unter hyperosmolaren Bedingungen die Produktionswege für Betain und Glycerophosphocholin verstärkt werden, was den Aufbau und die Akkumulation dieser organischen Osmolyten begünstigt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass konsistente und koordinierte osmolaritätsbedingte Expressionsänderungen im cholinabbauenden Stoffwechselweg zu finden sind, während die Phosphatidylsynthese und Folat-abhängige Remethylierung nur leichte Expressionsänderungen aufgrund der Änderung der Umgebungsmolarität aufweisen.

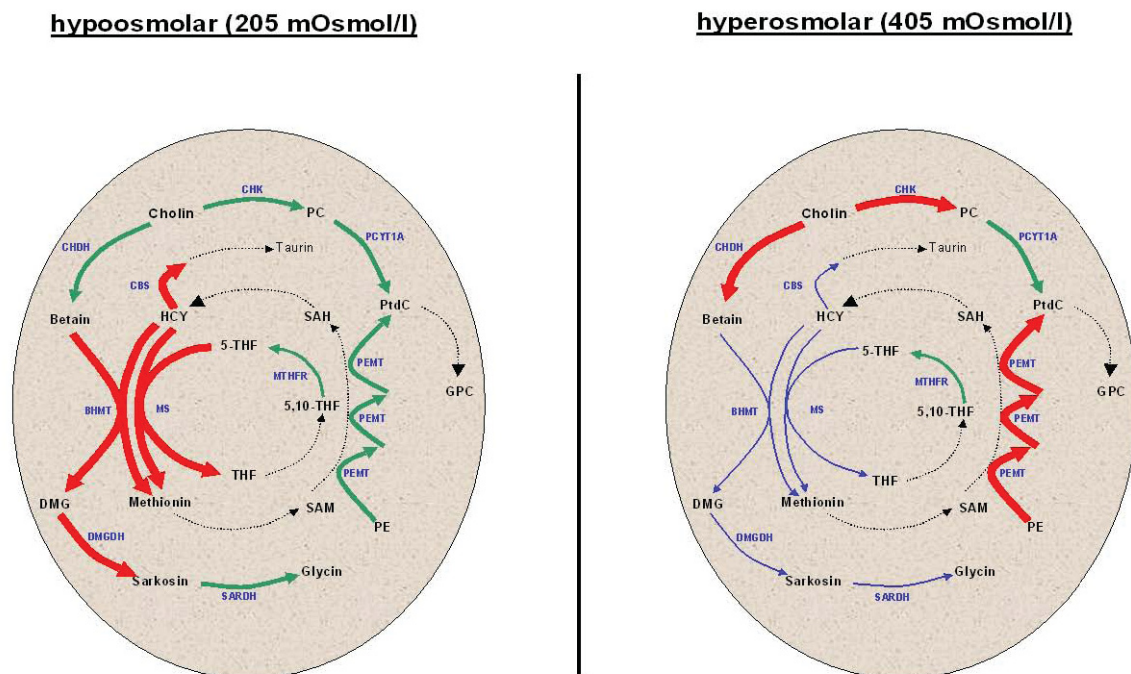


Abbildung 37: Vergleich der Genregulation bei hypo- und hyperosmolarer Umgebung. Die Breite der Pfeile spiegelt die Expressionsstärke des jeweiligen Enzyms wieder, wobei ein dicker roter Strich eine gesteigerte Expression und ein dünner blauer Strich eine reduzierte Expression darstellt. Nicht regulierte Enzymreaktionen sind mit mittlerer Strichdicke in grün dargestellt. Die Reaktionen, deren Enzyme in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, sind als gepunktete Linie dargestellt.

In Abbildung 37 sind die Erkenntnisse der Expressionsanalysen noch einmal grafisch zusammengefasst und für die beiden osmotischen Stresssituationen im systematischen Zusammenhang dargestellt.

Die Grafik macht deutlich, dass die veränderte osmotische Umgebung weitreichende Änderungen im Expressionsmuster der verschiedenen Stoffwechselwege zur Folge hat.

4.2 Einfluss der Umgebungsosmolarität auf die Promotoraktivität

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, benötigt die osmotisch vermittelte Regulation der Genexpression spezifische Transkriptionsfaktoren, die das chemische Signal der Signalkaskade in einen genetischen Effekt umwandelt. Diese TonEBPs binden an TonE-Elemente in der Promotorregion des Gens und können dort positiv oder negativ auf die Transkription des Gens Einfluss nehmen. Auch im Promotor der BHMT vermutete man diese TonE-Elemente, und konnte eine vermutliche TonE-Sequenz mit Hilfe der publizierten Konsensussequenz lokalisieren. Durch die Promotoranalysen in dieser Arbeit ist es gelungen, die Struktur der TonE-Elemente im Promotorbereich der BHMT etwas genauer zu beschreiben. Die Analyse der Promotorfragmente hat ergeben, dass es im BHMT Promotor offensichtlich osmosensitive Elemente gibt, die Einfluss auf die Genexpression der BHMT nehmen können. Die Reporterger Experimente haben gezeigt, dass der BHMT Promotor in der Lage ist, das Reporterger unter hypoosmolaren Bedingungen verstärkt exprimieren zu lassen (Abbildung 18). Das beweist die Funktionalität des Promotorkonstrukts. Die stark verkürzte Promotorsequenz zeigte, einen deutlich schwächeren Effekt auf die hypoosmolare Expressionssteigerung. Diese Ergebnisse zeigen, dass im Bereich -3179 bis -28 des humanen BHMT Promotors tatsächlich funktionelle Tonizitäts-responsive Elemente liegen. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse, dass die verkürzte Fassung immer noch eine osmotisch induzierte Expressionsänderung hervorrief. Die Grafik in (Abbildung 18) zeigt das putative Enhancerelement. Bisher konnte mit der Konsensussequenz noch kein weiteres Element eingegrenzt werden, aber die Versuche lassen den Schluss zu, dass es weitere osmosensitive Elemente im BHMT Promotor geben muss, die nicht in das Schema der Konsensussequenz passen.

Wenngleich diese Konsensussequenz über verschiedene Spezies hinweg konserviert erscheinen, so hat die Erfahrung gezeigt, dass jedes osmotisch regulierte Gen scheinbar ein einzigartiges Profil für die Bindung mit den Transkriptionsfaktoren / Enhancern hat. Somit liegt die Vermutung nahe, dass auch die TonEBPs für jedes osmotisch regulierte Gen unterschiedlich sind oder unterschiedlich funktionieren, denn so wie die Suche nach den TonE-Elementen im BHMT Promotor noch nicht abgeschlossen ist, gibt es auch noch keine gesicherten Erkenntnisse zu den TonE-Elementen im DMGDH Promotor obwohl es, angesichts

der starken osmosensitiven Regulation der DMGDH, sehr wahrscheinlich ist, dass es dort diese TonE-Elemente gibt (unveröffentlichte Daten).

4.3 Physiologische Auswirkungen osmotischer Regulation

Die Messung der Metabolite im Zelllysat von H4IIE-Zellen ermöglicht einen Einblick in den Fluss der Metabolite und skizziert grob die physiologischen Zusammenhänge. Betrachten man zunächst die Zelle in normosmolarem Medium so kann man folgende Zusammenhänge erkennen.

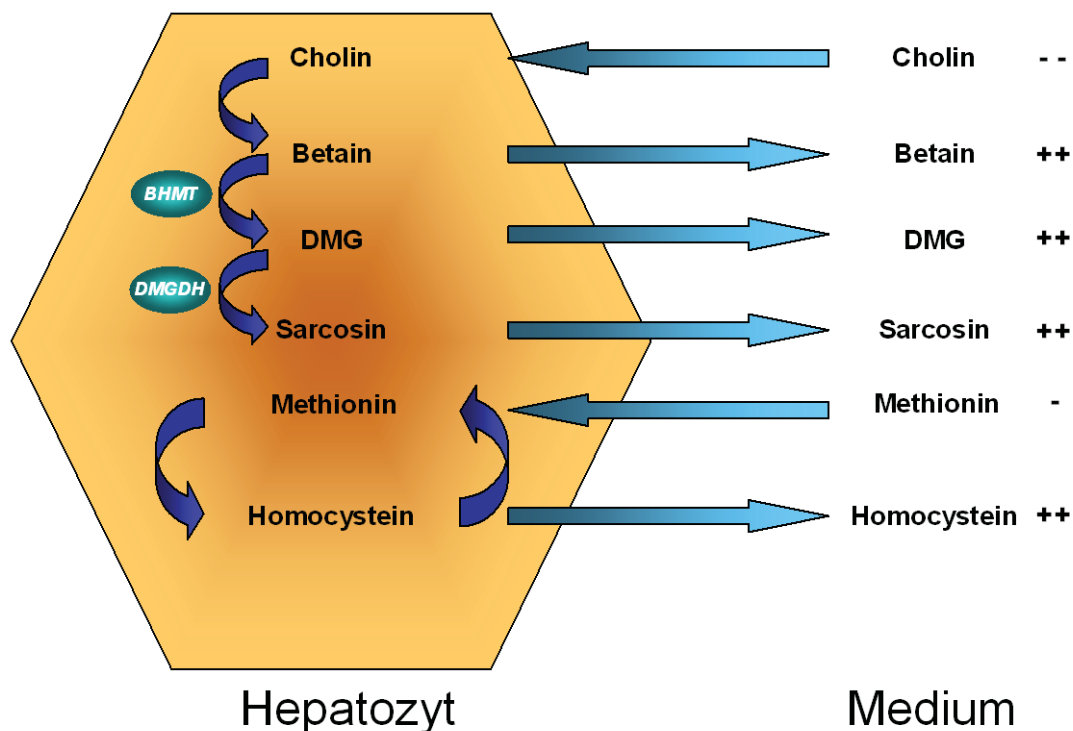


Abbildung 38: Schema des Metabolitenflusses in H4IIE Zellen unter **normosmolaren** Bedingungen. Die Konzentrationsänderungen sind durch - bzw. + angedeutet. Die Grafik beschreibt die Änderungen der Metabolitkonzentration im Medium nach 24h Kultur im Vergleich zum Ausgangsmedium ohne Zellkontakt.

In Kultur mit normosmolarem Medium kommt es zu einer Nettoaufnahme von Cholin und Methionin aus dem Medium in die Zelle. Dagegen werden Betain, DMG, Sarkosin, und Homocystein in das umgebende Medium exportiert. Im Medium sind standardmäßig Cholin und Methionin enthalten und stellen keine begrenzende Ressource dar. Die Zellen sind für Methionin auxotroph und sind somit auf die Methioninaufnahme aus dem Medium angewiesen. Obwohl Cholin in die Zelle aufgenommen wird, werden DMG und Sarkosin aus der Zelle ausgeschleust. Das ist entweder ein Ausdruck für einen Cholinüberschuss, oder ein Zeichen dafür, dass die Remethylierungskapazität nicht ausreicht um einerseits das anfallende Homocystein

zu senken und andererseits genügend Methionin für die Zelle bereitzustellen. Das Homocystein akkumuliert jedoch nicht in der Zelle, sondern wird zu einem großen Teil an das umgebende Medium abgegeben. In der Zelle scheint die Homocysteinmenge konstant zu bleiben. Das ist ein Schutzmechanismus der Zelle, sich gegenüber einem Homocysteinüberschuss, zu retten. Eine zu hohe Konzentration des Homocysteins innerhalb der Zelle dürfte langfristig gesehen den Untergang der Zelle bedeuten. Werden die Zellen für 24 Stunden mit hypoosmolarem Medium inkubiert, ändert sich dieses Bild.

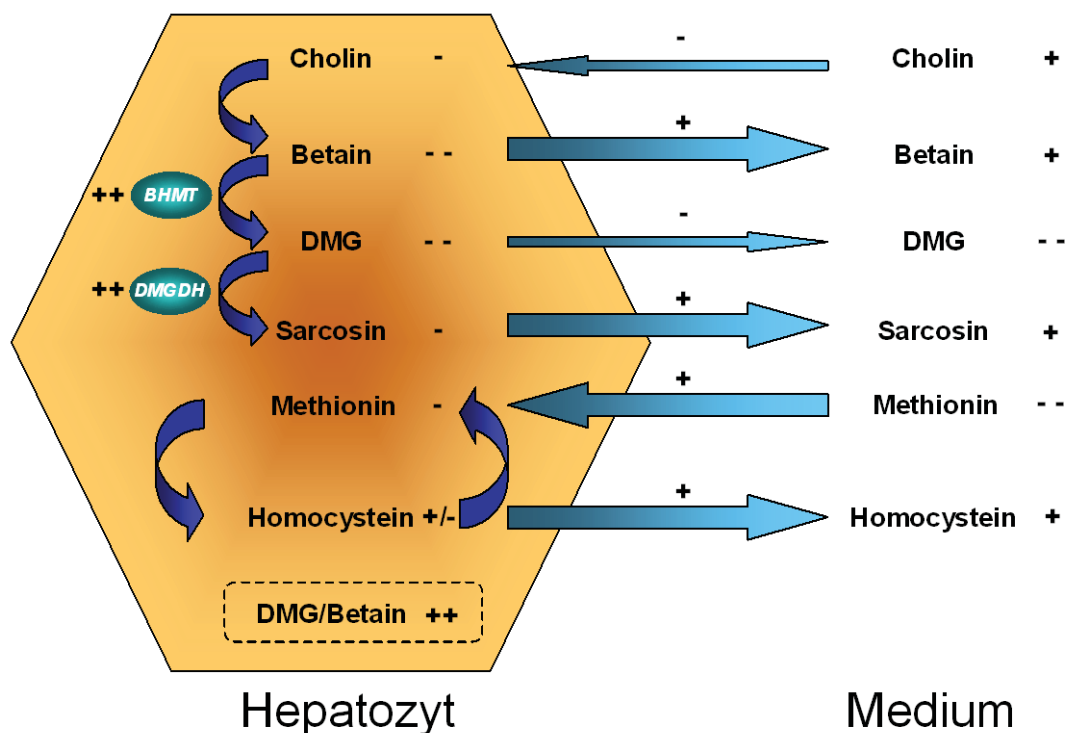


Abbildung 39: Schema des Metabolitenflusses in H4IIE Zellen unter **hypoosmolaren** Bedingungen. Die Konzentrationsänderungen sind durch - bzw. + angedeutet. Das + Symbol neben den Enzym-Symbolen soll die durch Realtime PCR in Kapitel bestimmten Expressionsänderungen darstellen.

In dieser Situation ist die langfristige Strategie der Zelle, überflüssige Osmolyte loszuwerden und keine neuen Osmolyte zu produzieren. Dazu wird die Zufuhr von Cholin gesenkt und Betain verstärkt abgebaut. Da die BHMT im Zytosol lokalisiert ist und die DMGDH in den Mitochondrien muss es einen Transport von DMG in die Mitochondrien geben, wo es dann weiter abgebaut wird. Kürzlich wurden einige Transportproteine identifiziert, die unterschiedliche Substratspezifitäten für Cholin besitzen. Derzeit ist noch wenig bekannt darüber, wie diese Systeme in der veränderten osmotischen Situation reagieren. Der Transporter OCT-1 (Organic Cation Transporter-1) hat eine niedrige Substratspezifität für Cholin und andere

organische Ionen und ist in der Leber exprimiert (85). Es gibt ausserdem hoch spezifische Cholintransporter die in gehäuft in neuronalen Zellen zu finden sind und dort Cholin exklusiv für die Acetylcholinsynthese bereitstellen (85). Des weiteren wurde ein Cholin Transporter mit mittlerer Affinität für Cholin entdeckt (CTL1). Dieser Transporter wird in verschiedenen Geweben und Zelltypen exprimiert und dient in erster Linie der Produktion des mengenmäßig größten Metaboliten von Cholin, dem Phosphatidylcholin (85). Einflüsse auf Aktivität und Expression in Abhängigkeit von osmotischen Umgebungsänderungen sind jedoch noch nicht beschrieben. Es muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass mehr oder weniger spezifische Transporter verschiedene Metabolite aus der Zelle oder in Mitochondrien transportieren könnten und dass diese Transportvorgänge auch durch den Einfluss der äußeren Osmolarität reguliert sein könnten. Die Messungen zeigen lediglich eine Momentaufnahme der Vorgänge in der Zelle. Zum Zeitpunkt der Messung kann man feststellen, dass nach der Inkubationsphase in der Zelle und im Medium weniger DMG vorhanden ist, als zu Beginn. Da die Expressionsdaten zeigen, dass die DMGDH hochreguliert wird, ist ein verstärkter Abbau von DMG zu Sarkosin anzunehmen, welches anschließend verstärkt aus der Zelle ausgeschleust wird. Scheinbar spielt der Transport von DMG in die Mitochondrien für den DMG-Abbau keine limitierende Rolle. Das entstehende Sarkosin wird entweder weiter zu Glycin abgebaut oder direkt aus der Zelle heraustransportiert. Die Homocysteinkonzentration in der Zelle bleibt konstant. Da jedoch vermehrt Homocystein aus der Zelle ausgeschleust wird, muss man auf eine verminderte Homocysteinproduktion, z.B. durch einen Rückgang der Remethylierung aufgrund von Betain- und Cholinmangel, schließen. Der Methioninbedarf der Zelle steigt und es wird mehr Methionin in die Zelle aufgenommen. Trotzdem nimmt die Methioninkonzentration auch intrazellulär ab. Auch SAM hat ein negatives Feedback auf die BHMT (86). Die Expressionsteigerung wird also durch den Methioninmangel in der Zelle begünstigt oder verstärkt. Insgesamt sieht man einen Methylgruppenexport. Intrazellulär steigt die DMG/Betain-Ratio, was auf eine verstärkte BHMT Aktivität hindeutet. Das stimmt mit den bisherigen Erkenntnissen überein. Wenn man die Zellen für 24 Stunden in hyperosmolarem Medium inkubiert, dann bietet sich einem folgendes Bild.

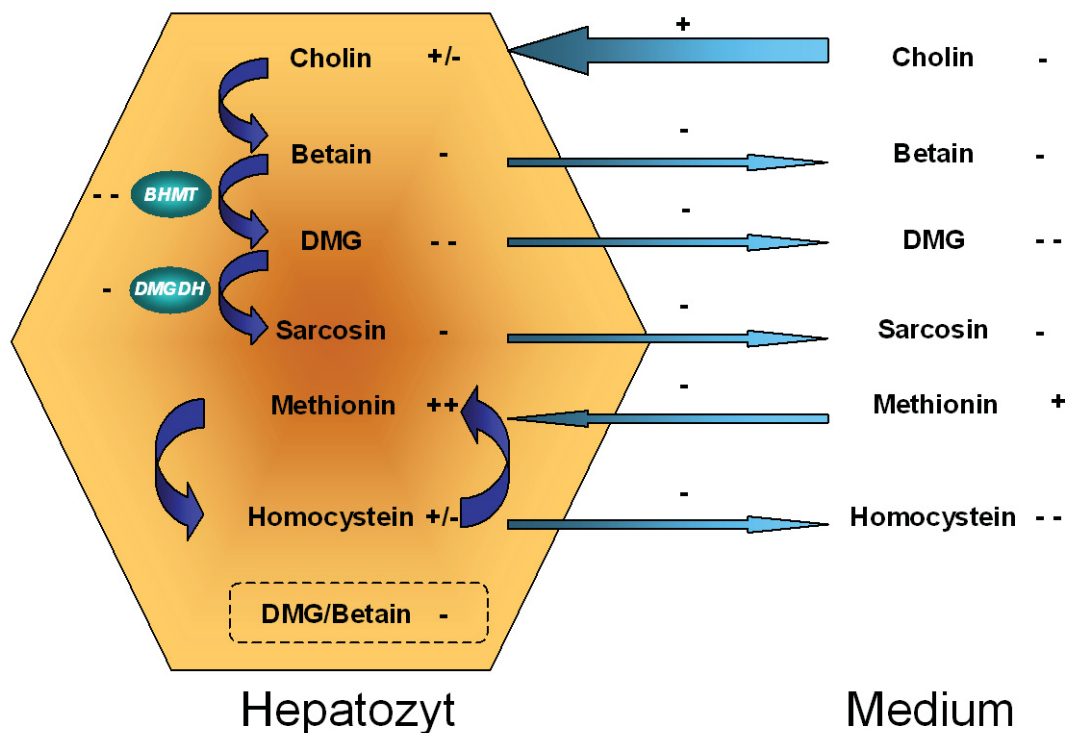


Abbildung 40: Schema des Metabolitenflusses in H4IIE Zellen unter **hyperosmolaren** Bedingungen. Die Konzentrationsänderungen sind durch - bzw. + angedeutet. Das + Symbol neben den Enzym-Symbolen sollen die durch Realtime PCR in Kapitel bestimmten Expressionsänderungen darstellen.

Der Cholinpiegel in der Zelle bleibt konstant, obwohl aus dem Medium verstärkt Cholin aufgenommen wird. Es wird also mehr Cholin oxidiert. Da bereits gezeigt wurde, dass unter diesen osmotischen Bedingungen die an der Remethylierung beteiligten Enzyme deutlich verringert werden und vermutlich auch ihre Aktivität reduzieren, liegt die Vermutung nahe, dass das Cholin einen anderen Weg einschlägt und nicht der Remethylierung zu geführt wird. Die Expressionsdaten der CHK deuten darauf hin, dass die Zelle vermehrt Cholin in die Phosphatidylcholin Synthese bzw. Glycerophosphocholin Synthese leitet und - zumindest in primären Hepatozyten - gleichzeitig die Oxidation von Cholin vermehrt abläuft (Abb. 20). Das würde der Strategie der Zelle entsprechen anorganische Osmolyte gegen zellverträgliche organische Osmolyte auszutauschen. Gleichzeitig könnte es sich hier möglicherweise um eine Stressantwort handeln, vergleichbar der gesteigerten Ceramidsynthese, um Rafts zu produzieren, welche die Apoptose begünstigen (87). Betain akkumuliert nicht unter hyperosmolaren Bedingungen in H4IIE Zellen und es liegen keine Daten zur Expressionsänderung der Gene in H4IIE Zellen vor, die für die Cholinoxidation zu Betain verantwortlich sind. H4IIE Zellen verfügen nicht über einen Betaintransporter, der eine aktive Aufnahme von Betain aus dem Medium vermitteln könnte und in dem hier verwendeten Medium ist kein Betain vorhanden. Auch eine

Supplementation des Mediums mit Betain führte nicht zu einer Akkumulation von Betain in der Zelle (Daten nicht gezeigt). Die interne Betainproduktion der Zelle reicht also trotz Drosselung des Betainkatabolismus nicht aus um die intrazelluläre Konzentration unter hyperosmolaren Bedingungen anzuheben. Daraus ist zu schließen, dass Betain keine wichtige Rolle als organischer Osmolyt in H4IIE Zellen spielen kann.

Sarkosin und DMG nehmen intrazellulär trotz Hemmung ihres Katabolismus ab. Hierfür ist vermutlich die verringerte Verfügbarkeit von Betain verantwortlich. Die Homocysteinkonzentration im Medium nimmt ab; es wird weniger Homocystein aus der Zelle transportiert. Da Methionin intrazellulär ansteigt, muss eine verringerte Transmethylierungsaktivität angenommen werden.

Erhöhte Methioninkonzentrationen führen über erhöhte S-AM Konzentrationen wiederum zur Hemmung der BHMT Aktivität. Das belegt auch das sinkende Verhältnis von DMG zu Betain.

4.4 Volumen-vermittelte Regulation im hepatischen Osmolytstoffwechsel ex vivo

Im Falle der Stoffwechselerkrankung Hyperhomocysteinämie, bei dem die Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) oder die Methioninsynthase (MS) defekt sind, ist dieser Remethylierungsweg gestört und wird ausschließlich über den Cholin-abhängigen Weg via BHMT, DMGDH und SARDH kompensiert (56). Bei dieser Form der Remethylierung werden große Mengen Cholin aus dem System abgezogen um die Remethylierung in Gang zu halten, damit die toxische Aminosäure Homocystein nicht akkumuliert. Dies führt zu einem bedeutend höheren Cholinbedarf, welcher bei mangelnder Substitution für die bei Homocystinurie beobachteten Leberschädigung mit verantwortlich sein kann. Werden jedoch ausreichend Methylgruppendonoren in Form von Cholin oder Betain zugeführt, kann die Remethylierung über diesen alternativen Weg den Ausfall des Cobalamin-abhängigen Remethylierungsweges zumindest in Leber und Niere teilweise kompensieren, ohne, dass dabei langfristig Schäden entstehen (56).

Es erscheint möglich, dass die Betainmangelsituation zu einer langfristigen Störung der Anpassung an anisotone Stresszustände führen kann. Aus diesem Grund wurde die Genexpression und die physiologischen Auswirkungen auch in einem Modell der schweren Hyperhomocysteinämie untersucht um zu klären welchen Einfluss diese

Mangelsituation auf den Stoffwechsel und die Genexpression *in vivo* haben kann. Die Ergebnisse des Microarray Versuchs sind ein breitgestreuter Einblick in das Expressionsmuster in einem Modell der chronischen Betaindepletion. Die MTHFR-Maus weist eine hepatische Betaindepletion auf, wenn das MTHFR-Gen homozygot mutiert ist. Die Ergebnisse des Microarrays spiegeln die Expressionsdaten in einem intakten Gewebeverband wider. Anders als in den isolierten Systemen wie der Hepatomzelllinie oder den primären Hepatozyten wird die Genexpression im Tier von weitaus mehr Variablen beeinflusst als nur der Osmolarität des Mediums. Außerdem hat ein Zellverbund von Hepatozyten und nicht hepatozytären Zellen vielfältigere Kompensationsmechanismen, als eine Monolayer-Zelllinie.

So zeigte sich in den Versuchen, dass die BHMT und die SARDH im homozygoten Knockout-Tier deutlich hochreguliert sind, während die DMGDH im Tier scheinbar nicht durch den Betainmangel beeinflusst wird. Dieses Ergebnis für die BHMT und DMGDH deckt sich mit dem Ergebnis aus der Realtime PCR mit mRNA aus primären Hepatozyten, wo ebenfalls keine Unterschiede zwischen der Expression im Wildtyp-Tier und K.O.-Tier auftraten (Abbildung 19). Das Ergebnis der SARDH unterscheidet sich deutlich. Während die Realtime PCR keine eindeutigen genotypischen Unterschiede zeigte, ist die SARDH im Array deutlich als Genotyp-abhängiges Gen zu erkennen. Auch Enzyme wie die Cystathionin-gamma-Lyase, die die Eliminierung von Homocystein in der Transsulfurierung katalysiert und S-Adenosyl-Homocystein Hydrolase, die eine Methylgruppe vom SAH abspalten kann und Homocystein bildet, werden im K.O.-Tier verstärkt exprimiert.

In den Microarray Ergebnissen zeigt sich die CBS deutlich reguliert, was jedoch nicht mit den Ergebnissen aus den H4IIE-Zellen und primären Hepatozyten übereinstimmt. Es ist bekannt, dass die CBS vielfältig reguliert wird. Unter anderem durch den Redoxstatus der Zelle, den Methylgruppendonator SAM, sowie durch das Substrat Homocystein (88).

Die Glutathion Synthetase, die den Schritt vom L-gamma-glutamyl-Cystein zum Glutathion katalysiert und somit den letzten Schritt der Antioxidantien-Synthese darstellt, ist ebenfalls nicht durch die Betaindepletion betroffen.

Eines der auffälligsten Enzyme in der Liste der Gene, die in der Leber der MTHFR-K.O.-Maus eine Expressionsminderung aufweisen, ist die Cysteinsulfinsäure Decarboxylase (CSAD). Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von Cysteinsulfinat

zu Hypotaurin (88) und einen alternativen Stoffwechselweg im Abbau von Homocystein über Homocysteinsulfinsäure.

Die Cystathionin Dioxygenase (CDO), welche den Schritt von Cystein zu Cysteinsulfinat katalysiert, wird als Schlüsselenzym für die Taurinsynthese angesehen (88). In unserem Modell der Betainverarmung blieb die CDO unbeeinflusst, die Taurinkonzentration in der Leber war jedoch vermindert. Insofern könnte die Suppression der CSAD-Expression doch funktionelle Auswirkungen haben. Möglicherweise wird die Expression von CSAD auch durch erhöhte Homocysteinkonzentrationen beeinflusst.

Die S-Adenosyl-L-Homocystein Hydrolase (AHCY) katalysiert die Hin- und Rückreaktion von S-Adenosyl Homocystein zu Homocystein. Unter hypoosmolaren Bedingungen wurde im System ein Anstieg der Homocysteinkonzentration im System festgestellt (Abbildung 32). Der Anstieg der AHCY- Expression in der MTHFR-K.O.-Maus ist in dem Sinn zu deuten, dass verstärkt SAH zu Homocystein umgewandelt wird, welches die Zelle exportiert um sich vor schädlichen Konzentrationen des SAH zu schützen.

Betrachtet man zum Vergleich noch einmal die Ergebnisse der Leberperfusion (Abbildung 36), so zeigte sich, dass die Proteolyserate in der Mausleber mit chronischer Betaindepletion nicht von der Proteolyserate der Wildtyp-Leber abwich. Obwohl auf molekularer Ebene viele Gene durch die chronische Betainverarmung in ihrer Expression verändert werden bleibt die Kompensationsfähigkeit der Leber bei hypoosmolarer Exposition erhalten. Somit muss man die anfänglich erwähnte Hypothese, dass die Leber durch chronische Betainverarmung in ihrer Kompensationsfähigkeit gegenüber hypoosmolarem Stimulus beeinträchtigt wird, revidieren.

4.5 Mechanismen und Strategien osmotischer Regulation

Die Leber verfolgt mehrere Strategien bei der Anpassung an anisoosmolare Situationen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Regulation der Genexpression und somit die Synthese und Degradation von organischen Osmolyten oder essentiellen Metaboliten und Methyldonoren eine Überlebensstrategie der Zelle ist. Die Mechanismen dieser Regulationsvorgänge sind vielfältig und komplex. Die Arbeit hat gezeigt, dass in der Zelle der Effekt auf die Genexpression von BHMT, DMGDH

und SARDH nicht explizit durch NaCl ausgelöst wird, sondern dass auch Raffinose als impermeabler Osmolyt vergleichbare Effekte hervorruft (Abbildung 12).

Harnstoff als permeabler Osmolyt zeigte diesen Effekt nicht. Die hyperosmolare Stimulation mit Harnstoff führte zu einem deutlichen Anstieg der mRNA Expression. Ungeachtet der Auswirkungen, die hohe Konzentrationen von Harnstoff auf die Zelle haben können, zeigen die Ergebnisse, dass weder die Anhebung der Ionenstärke, noch ein Anstieg der Osmolarität *per se*, eine Verringerung der Expression zur Folge haben. Das stützt die Theorie, dass nicht der Osmolyt selbst, sondern die Volumenänderung der Zelle durch die Integrine in den Zellwänden den Signalweg in Richtung Expressionsänderung in Gang setzt.

Diese Signalwege sind extrem komplex vernetzte Kaskaden, bei denen die Signale teilweise über identische Komponenten laufen und trotzdem unterschiedliche physiologische Auswirkungen haben, was nur funktioniert, wenn die Signale räumlich oder zeitlich voneinander getrennt auftreten. In dieser Arbeit wurde, durch den Einsatz mehr oder weniger spezifischer Inhibitoren für einzelne Komponenten der Signalkaskaden, versucht, die komplexen Signalstrukturen, die an der Volumen-induzierten Expressionsänderung von BHMT und DMGDH beteiligt sind, aufzuklären.

Die Charakterisierung des BHMT-Signalings (Abbildung 16) unterstützt die Theorie, dass Genistein-sensitive Tyrosinkinasen und cAMP-abhängige Proteinkinasen an der Regulation beteiligt sind. Auffällig ist, dass zwar cAMP-abhängige Proteinkinasen, nicht aber MAP-Kinasen, PKC, PI3-Kinase und mTOR, welche bei der osmosensitiven Regulation der PEP-Kinase - mRNA Expression ebenfalls beteiligt sind, eine Rolle in H4IIE Zellen spielen. Diese wird jedoch, im Gegensatz zur BHMT oder DMGDH unter hyperosmolaren Bedingungen heraufreguliert (89, 90).

Für die DMGDH zeigt sich ein ähnliches Bild (Abbildung 17). Auch die Expressionsänderungen der DMGDH lassen sich durch Inhibitoren der cAMP-Proteinkinase beeinflussen. Die hypoosmolare Expressionszunahme wird durch den Inhibitor noch einmal deutlich gesteigert und die hyperosmolare Expressionsabnahme wird durch Genistein vollständig aufgehoben. Jedoch hat es in dieser Versuchsreihe methodisch nicht erklärbare „Ausreisser“ in der Messung gegeben, die sich in den hohen Standardabweichungen niederschlagen und die Aussagekraft der Ergebnisse abschwächen. Außerdem scheint der Einfluss von mTOR auf die DMGDH größer zu sein, als bei der BHMT. Anders als bei der BHMT

zeigte sich, dass der Inhibitor der c-Jun-Kinase (Jnk) die hyperosmolare Expressionsminderung vollständig verhindert, was auf einen deutlichen Einfluss der Jnk schließen lässt. Zusammen mit der Möglichkeit, dass der Genisteineffekt auf die DMGDH anders ausfällt, als es zuvor bei der BHMT zu sehen war, kann man vermuten, dass beiden Enzyme trotz ihrer engen funktionellen Koppelung, teilweise von identischen und teilweise von unterschiedlichen Signalkomponenten angesprochen werden.

Eine weitere Möglichkeit der osmotisch induzierten Kontrolle der Genexpression ist die Stabilisierung oder Degradation der mRNA. Die bisherigen Daten weisen darauf hin, dass Hypoosmolarität die BHMT und DMGDH-mRNA Menge durch Stimulation der Transkription erhöht, während die hypoosmolare Umgebung durch Destabilisierung an der Reduzierung der mRNA Menge beteiligt ist. Zumindest für die Stabilität der DMGDH mRNA kann man jedoch festhalten, dass die Destabilisierung nicht im vollem Umfang für die Reduzierung der Expression verantwortlich ist, sondern dass ein Rückgang der Transkription den größten Anteil an den Effekten der DMGDH Expression haben wie sie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden.

Wie bereits beschrieben, werden für den Versuch die Zellen in hypoosmolarem Medium vorinkubiert um eine maximale RNA Menge zum Versuchsbeginn zu haben. Von dort aus wird durch Zugabe von act D die Transkription unterbrochen und in regelmäßigen Abständen den Abfall der RNA Menge gemessen. An diesem Punkt kann man nicht vollständig ausschließen, dass die hypoosmolare Vorstimulation selbst die Stabilität der BHMT und DMGDH mRNA beeinflusst.

4.6 Funktion der Osmoregulation und Interaktion mit dem Methylgruppenstoffwechsel

Welche Funktion hat die osmosensitive Regulation der Cholindegradation und in wie weit hat diese Regulation Einfluss auf die Remethylierung von Homocystein in der Leber? Die Parenchymzellen der Leber synthetisieren das Betain, welches von nicht-parenchymalen Zellen (91), wie z.B. Kupffer Zellen (92) und Sternzellen (93) als Osmolyt akkumuliert wird.

Die Inaktivierung der parenchymalen BHMT unter dehydrierenden Bedingungen hat eine Abnahme der Betainabgabe ins Medium zur Folge, während sich die Betainkonzentration intrazellulär nicht ändert. Die gesteigerte CHDH Expression

deutet auf eine gesteigerte Betainproduktion hin. Da aber die Metabolitenmessungen keinen Anstieg der Betainkonzentration zeigen bleibt es fraglich ob auf diese Weise mehr Betain zur Verfügung gestellt wird. Durch die verminderte Expression der DMGDH unter hyperosmolaren Bedingungen ist ein verstärkter Abbau von Betain als Ursache für die Konstanz der intrazellulären Betainkonzentration unwahrscheinlich. Die Genexpressionsdaten der BHMT und DMGDH deuten auf eine aktive Anpassung der Betainproduktion an die Umgebungsmolarität hin, die durch die Metabolitendaten nicht untermauert wird. Hier ist anzumerken, dass die Ergebnisse der Metabolitenmessung eine größere Schwankungsbreite als die Expressionsdaten aufweisen.

Es gibt Indizien dafür, dass Betain *in vivo* durchaus eine Rolle als Osmolyt in Leberzellen spielen kann. Die Tatsache, dass die Betainkonzentration sowohl durch intrazelluläre Adaptation, als auch durch Modulation der Ausschleusung den osmotischen Gegebenheiten angepasst wird, ist ein deutlicher Hinweis auf eine biologische Rolle des Betains bei der Anpassung an osmotische Stresszustände. Die H4IIE Zellen selber können sich den Osmolyten unter hyperosmolaren Bedingungen nicht zu Nutze machen, da sie keinen Betaintransporter besitzen. Zudem enthält das DMEM:F12 – Medium, welches in der Zellkultur verwendet wurde, kein Betain. Ein Versuch mit einem Betain-supplementierten Medium hat aber gezeigt, dass die H4IIE Zellen auch bei physiologischen Betainkonzentrationen im Medium kein Betain in der Zelle akkumulieren (Daten nicht gezeigt).

Auf der anderen Seite trägt die Stimulation des Betainabbaus unter hypoosmolaren Bedingungen möglicherweise zur regulatorischen Zellschrumpfung bei. Die vorgelegten Daten zeigen, dass der Betainstoffwechsel synergistisch reguliert wird, legen jedoch keine wesentliche Osmolytfunktion von Betain in Parenchymzellen selbst nahe.

Die DMGDH-Expression wurde in primären Hepatozyten und auch im Microarray Versuch kaum durch den Betainmangel beeinflusst. So ist es nicht verwunderlich, dass die DMG Konzentration in den Hepatozyten und in der Leber nur geringen Genotyp-bedingten Änderungen unterliegt. Interessanterweise scheinen die Metabolite Sarkosin und das Glycin zu akkumulieren (Abbildung 34). In den H4IIE Zellen sieht man, dass Sarkosin bei hyperosmolarer Stimulation verstärkt ausgeschleust wird (Abbildung 25). Die verstärkte Expression der SARDH im

Microarray Versuch zeigt jedoch, dass möglicherweise im intakten System die Leber das Sarkosin verstärkt zu Glycin abbaut anstatt es ins Plasma abzugeben.

Neben seiner möglichen Rolle bei der Volumenregulation der Zelle hat Betain eine wichtige metabolische Rolle im hepatischen Homocysteinmetabolismus. Der Abbau von Betain stellt eine Methylgruppe für viele essentielle Methylierungsreaktionen zur Verfügung und die nachfolgenden Reaktionen der DMGDH und SARDH stellen weitere Einkohlenstoffeinheiten als Methylengruppen zur Verfügung. Ein Anschwellen der Zelle ist mit einem verstärkten Anabolismus assoziiert, während zelluläre Dehydratation eine katabole Situation hervorruft (94). Eine Verstärkung der BHMT-Expression und -Aktivität sowie der beschleunigte Abbau des DMG als Substrat-Inhibitor der BHMT führt vermutlich zu einer verstärkten Bereitstellung von Methylgruppen für aufbauende Stoffwechselwege. Im Gegensatz dazu sensitiviert hyperosmolare Dehydrierung H4IIE Zellen und primäre Hepatozyten gegenüber proapoptotischen Stimuli (95,96) unterstützt durch den Methylgruppen-mangel aufgrund der reduzierten BHMT- und DMGDH-Expression und -Aktivität.

Es lässt sich festhalten, dass die Zellvolumen-vermittelte Regulation des Cholin- und Betainmetabolismus damit wohl doch weitreichenden Einfluss auf die Funktionen in der Zelle und dem gesamten System hat. Weiterhin zeigen die vorliegenden Daten, trotz einiger fehlender Parameter (wie z.B. SAM-Konzentration in H4IIE und primären Hepatozyten), dass es eine koordinierte Regulation des Betainstoffwechsels gibt.

Das kann als Hinweis darauf gewertet werden kann, dass die engmaschige Regulation von Synthese und Abbau des Betains essentiell für die Funktion der Zelle und der schnellen Reaktion auf osmotische Stresszustände ist.

5 Zusammenfassung

Durch die Identifizierung der BHMT als osmotisch reguliertes Enzym wurde klar, dass nicht nur Transportvorgänge, sondern auch metabolische Vorgänge durch tonizitätsvermittelte Volumenänderungen der Zelle beeinflusst werden. Die enge Verknüpfung der wichtigsten hepatischen organischen Osmolyte mit dem Cholin- und Methylstoffwechsel in der Leber ließ vermuten, dass die Umgebungsmolarität weitreichenden Einfluss auf den Stoffwechsel und die übrigen Funktionen der Leber hat. Durch die Expressionsanalysen konnte die tonizitätsinduzierte Regulation der BHMT bestätigt und gleichzeitig eine solche Regulation der Enzyme DMGDH und SARDH neu identifiziert werden. Die Ergebnisse zeigten eine fein abgestufte Sensitivität gegenüber osmotischen Veränderungen der DMGDH und für alle drei Enzyme eine zeitabhängige Veränderung ihrer mRNA Expression, die sich auch in der Proteinexpression wiederfand. Durch den Einsatz alternativer Osmolyte wurde gezeigt, dass die Stoffwechselenzyme BHMT, DMGDH und SARDH durch die Zellvolumenänderung reguliert werden und nicht durch die Ionenstärke oder die Osmolaritätsänderung *per se*, was auf eine Signalübertragung durch Integrine hinweist. Die Enzyme CHK und PEMT zeigten nur kurzfristige Änderungen in ihrer mRNA Expression in Abhängigkeit von Osmolaritätsänderungen während die Enzyme MS, MTHFR, CBS und PCYT1A keine oder nur geringfügige Änderungen zeigten. Mit Hilfe von Inhibitoren ließen sich Hinweise auf die beteiligten Signaltransduktionswege für die Regulation der BHMT und DMGDH finden. Durch die Quantifizierung relevanter Stoffwechselmetabolite wurde versucht die komplexen Zusammenhänge zwischen Genregulation und physiologischem Effekt aufzuzeigen, was nur teilweise gelang. Es traten Diskrepanzen zwischen dem Zellkulturmodell und dem Tiermodell auf, was darauf schließen lässt, dass sowohl die physiologischen als auch die genregulatorischen Auswirkungen *in vivo* von weiteren Faktoren beeinflusst werden. Durch die koordinierte Regulation des Cholin und Methylstoffwechsels durch anisoosmolare Reize ist davon auszugehen, dass organische Osmolyte auch in den Parenchymzellen der Leber eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Zellvolumens spielen und dass Zellvolumenänderungen durchaus funktionelle Bedeutung für die gesamte Methylierung haben. Daraus folgt, dass eine gestörte Bereitstellung von Betain und anderer organischer Osmolyte zu chronischen Schädigungen der Leber beitragen kann, wie sie in angeborenen Störungen der Methylierung gefunden werden.

6 Lebenslauf

Name	Lars Hoffmann
Geburtsdatum	17. Januar 1973
Geburtsort	Neuss
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1979 - 1983	Grundschule Nievenheim
1983 - 1992	Leibniz-Gymnasium Dormagen-Hackenbroich

Hochschulbildung

1993 - 2002	Studium der Biologie an der Heinrich Heine Universität in Düsseldorf, Abschluss mit Diplom
2002 - 2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am DDFI Düsseldorf
2004 - 2008	Promotionsstudiengang an der Klinik für Allgemeine Pädiatrie im Universitätsklinikum der Heinrich Heine Universität in Düsseldorf

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

1)

Häussinger D, Lang F.

The mutual interaction between cell volume and cell function: a new principle of metabolic regulation.

Biochem Cell Biol. 1991 Jan;69(1):1-4. Review.

2)

Häussinger D, Schliess F.

Cell volume and hepatocellular function.

J Hepatol. 1995 Jan;22(1):94-100. Review.

3)

Häussinger D, Wettstein M, Warskulat U, vom Dahl S, Noé B, Schliess F.

Cell volume signalling, osmolytes and liver function.

Digestion. 1997;58 Suppl 1:21-3. Review.

4)

Schliess F, Häussinger D.

The cellular hydration state: a critical determinant for cell death and survival.

Biol Chem. 2002 Mar-Apr;383(3-4):577-83. Review.

5)

Parker JC.

In defense of cell volume?

Am J Physiol. 1993 Nov;265(5 Pt 1):C1191-200. Review.

6)

Burg MB, Kwon ED, Kültz D.

Regulation of gene expression by hypertonicity.

Annu Rev Physiol. 1997;59:437-55. Review.

7)

McManus ML, Churchwell KB, Strange K.

Regulation of cell volume in health and disease.

N Engl J Med. 1995 Nov 9;333(19):1260-6. Review.

8)

Häussinger D.

Regulation and functional significance of liver cell volume.

Prog Liver Dis. 1996;14:29-53. Review

9)

Häussinger D.

The role of cellular hydration in the regulation of cell function.

Biochem J. 1996 Feb 1;313 (Pt 3):697-710. Review.

10)

Lang F, Busch GL, Ritter M, Völkl H, Waldegger S, Gulbins E, Häussinger D.

Functional significance of cell volume regulatory mechanisms.

Physiol Rev. 1998 Jan;78(1):247-306. Review.

11)

Häussinger D, Schliess F.

Osmotic induction of signaling cascades: role in regulation of cell function.

Biochem Biophys Res Commun. 1999 Feb 24;255(3):551-5. Review.

12)

vom Dahl S, Schliess F, Reissmann R, Görg B, Weiergräber O, Kocalkova M, Dombrowski F, Häussinger D.

Involvement of integrins in osmosensing and signaling toward autophagic proteolysis in rat liver.

J Biol Chem. 2003 Jul 18;278(29):27088-95.

13)

Häussinger D, Kurz AK, Wettstein M, Graf D, Vom Dahl S, Schliess F.

Involvement of integrins and Src in tauroursodeoxycholate-induced and swelling-induced choleresis.

Gastroenterology. 2003 May;124(5):1476-87.

14)

Schliess F, Reissmann R, Reinehr R, vom Dahl S, Häussinger D.

Involvement of integrins and Src in insulin signaling toward autophagic proteolysis in rat liver.

J Biol Chem. 2004 May 14;279(20):21294-301. Epub 2004 Feb 24.

15)

Ingber DE.

Integrins, tensegrity, and mechanotransduction.

Gravit Space Biol Bull. 1997 Jun;10(2):49-55. Review.

16)

Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL.

Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins.

Pharmacol Rev. 1998 Jun;50(2):197-263. Review

17)

Hynes RO, Lively JC, McCarty JH, Taverna D, Francis SE, Hodivala-Dilke K, Xiao Q.

The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2002;67:143-53. Review

18)

Miranti CK, Brugge JS.

Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction.
Nat Cell Biol. 2002 Apr;4(4):E83-90. Review.

19)

Hsu SL, Cheng CC, Shi YR, Chiang CW.

Proteolysis of integrin alpha5 and beta1 subunits involved in retinoic acid-induced apoptosis in human hepatoma Hep3B cells.
Cancer Lett. 2001 Jun 26;167(2):193-204.

20)

Torimura T, Ueno T, Kin M, Harada R, Nakamura T, Kawaguchi T, Harada M, Kumashiro R, Watanabe H, Avraham R, Sata M.

Autocrine motility factor enhances hepatoma cell invasion across the basement membrane through activation of beta1 integrins.
Hepatology. 2001 Jul;34(1):62-71.

21)

Yasunobu Okada, Emi Maeno, Takahiro Shimizu, Katsuya Dezaki, Jun Wang and Shigeru Morishima

Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD)
J Physiol. 2001 Apr 1;532(Pt 1):3-16.

22)

Warskulat U, Weik C, Häussinger D.

myo-Inositol is an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells) but not in RAW 264.7 mouse macrophages.
Biochem J. 1997 Aug 15;326 (Pt 1):289-95.

23)

Warskulat U, Wettstein M, Häussinger D.

Betaine is an osmolyte in RAW 264.7 mouse macrophages.
FEBS Lett. 1995 Dec 11;377(1):47-50.

24)

Zhang Z, Ferraris JD, Brooks HL, Brisc I, Burg MB.

Expression of osmotic stress-related genes in tissues of normal and hyposmotic rats.
Am J Physiol Renal Physiol. 2003 Oct;285(4):F688-93.

25)

Ou WB, Park YD, Zhou HM.*Effect of osmolytes as folding aids on creatine kinase refolding pathway.*

Int J Biochem Cell Biol. 2002 Feb;34(2):136-47.

26)

Yamauchi A, Uchida S, Kwon HM, Preston AS, Robey RB, Garcia-Perez A, Burg MB, Handler JS.*Cloning of a Na(+)- and Cl(-)-dependent betaine transporter that is regulated by hypertonicity.*

J Biol Chem. 1992 Jan 5;267(1):649-52.

27)

Denkert C, Warskulat U, Hensel F, Häussinger D.*Osmolyte strategy in human monocytes and macrophages: involvement of p38MAPK in hyperosmotic induction of betaine and myoinositol transporters.*

Arch Biochem Biophys. 1998 Jun 1;354(1):172-80.

28)

Uchida, S., Kwon, H. M., Yamauchi, A., Preston, A. S., Marumo, F., and Handler, J. S. (1992)*Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na⁺ - and Cl⁻-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity.*Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 8230.8234

29)

Smith, K. E., Borden, L. A., Wang, C. D., Hartig, P. R., Branchek, T. A., and Weinshank, R. L. (1992)*Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain.*Mol. Pharmacol. **42**, 563.569

30)

Liu, Q. R., Lopez-Corcuera, B., Nelson, H., Mandian, S., and Nelson, N. (1992)*Cloning and expression of a cDNA encoding the transporter of taurine and β -alanine in mouse brain.*Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 12145.12149

31)

Vinnacota, S., Qian, X., Egal, H., Sarthy, V., and Sarkar, H. K. (1997)*Molecular characterization and in situ localization of a mouse retinal taurine transporter.*J. Neurochem. **69**, 2238.2250

32)

Ramamoorthy, S., Leibach, F. H., Mahesh, V. B., Han, H., Yang-Feng, T., Blakely, R. D., and Ganapathy, V. (1994)*Functional characterization and chromosomal localization of a cloned taurine transporter from human placenta.*Biochem. J. **300**, 893.900

33)

Warskulat U, Wettstein M, Häussinger D.*Osmoregulated taurine transport in H4IIE hepatoma cells and perfused rat liver.*
Biochem J. 1997 Feb 1;321 (Pt 3):683-90.

34)

Kwon HM, Yamauchi A, Uchida S, Preston AS, Garcia-Perez A, Burg MB, Handler JS.*Cloning of the cDNA for a Na⁺/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein.**J Biol Chem.* 1992 Mar 25;267(9):6297-301.

35)

Nakanishi T, Burg MB.*Osmoregulatory fluxes of myo-inositol and betaine in renal cells.**Am J Physiol.* 1989 Nov;257(5 Pt 1):C964-70.

36)

Kwon HM, Yamauchi A, Uchida S, Preston AS, Garcia-Perez A, Burg MB, Handler JS.*Cloning of the cDNA for a Na⁺/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein.**J Biol Chem.* 1992 Mar 25;267(9):6297-301.

37)

Shetty HU, Schapiro MB, Holloway HW, Rapoport SI.*Polyol profiles in Down syndrome. myo-Inositol, specifically, is elevated in the cerebrospinal fluid.**J Clin Invest.* 1995 Feb;95(2):542-6.

38)

Häussinger D, Laubenberger J, vom Dahl S, Ernst T, Bayer S, Langer M, Gerok W, Hennig J.*Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy.**Gastroenterology.* 1994 Nov;107(5):1475-80.

39)

Burg MB.*Molecular basis of osmotic regulation.**Am J Physiol.* 1995 Jun;268(6 Pt 2):F983-96. Review.

40)

Finkelstein, J. D., Martin, J. J. (1984)*Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways.**J. Biol. Chem.* 259, 9508.9513

41)

Warskulat U, Schliess F, Häussinger D.*Compatible organic osmolytes and osmotic modulation of inducible nitric oxide synthetase in RAW 264.7 mouse macrophages.**Biol Chem.* 1998 Jul;379(7):867-74.

42)

Delgado-Reyes CV, Garrow TA.*High sodium chloride intake decreases betaine-homocysteine S-methyltransferase expression in guinea pig liver and kidney.**Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 Jan;288(1):R182-7.

43)

Schäfer C, Hoffmann L, Heldt K, Lornejad-Schäfer MR, Brauers G, Gehrmann T, Garrow TA, Häussinger D, Mayatepek E, Schwahn BC, Schliess F.*Osmotic regulation of betaine homocysteine-S-methyltransferase expression in H4IIE rat hepatoma cells.**Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Apr;292(4):G1089-98.

44)

Zhu X, Mar MH, Song J, Zeisel SH. 2004.*Deletion of the Pemt gene increases progenitor cell mitosis, DNA and protein methylation and decreases calretinin expression in embryonic day 17 mouse hippocampus.**Brain Res. Dev. Brain Res.* 149:121–29

45)

Albright CD, Tsai AY, Friedrich CB, MarMH, Zeisel SH. 1999.*Choline availability alters embryonic development of the hippocampus and septum in the rat.**Brain Res.* 113:13–20

46)

Craciunescu CN, Albright CD, Mar MH, Song J, Zeisel SH. 2003.*Choline availability during embryonic development alters progenitor cell mitosis in developing mouse hippocampus.**J. Nutr.* 133:3614–18

47)

Loy R, Heyer D, Williams CL, Meck WH. 1991.*Choline-induced spatial memory facilitation correlates with altered distribution and morphology of septal neurons.**Adv. Exp. Med. Biol.* 295:373–82

48)

Meck WH, Williams CL. 2003.

Metabolic imprinting of choline by its availability during gestation: implications for memory and attentional processing across the lifespan.
Neurosci. Biobehav. Rev. 27:385–99

49)

Mellott TJ, Williams CL, Meck WH, Blusztajn JK. 2004.

Prenatal choline supplementation advances hippocampal development and enhances MAPK and CREB activation.
FASEB J. 18:545–47

50)

Fisher MC, Zeisel SH, Mar MH, Sadler TW. 2001.

Inhibitors of choline uptake and metabolism cause developmental abnormalities in neurulating mouse embryos.
Teratology 64:114–22

51)

Shaw GM, Carmichael SL, Yang W, Selvin S, Schaffer DM. 2004.

Periconceptional dietary intake of choline and betaine and neural tube defects in offspring.
Am. J. Epidemiol. 160:102–9

52)

Zeisel SH, Blusztajn JK. (1994)

Choline and human nutrition.
Annu. Rev. Nutr. 14:269–96

53)

Binzak BA, Wevers RA, Moolenaar SH, Lee YM, Hwu WL, Poggi-Bach J, Engelke UF, Hoard HM, Vockley JG, Vockley J.

Cloning of dimethylglycine dehydrogenase and a new human inborn error of metabolism, dimethylglycine dehydrogenase deficiency.
Am J Hum Genet. 2001 Apr;68(4):839–47. Epub 2001 Feb 28.

54)

Mudd, S. H., Poole, J. R. (1975)

Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens.
Metabolism 24, 721.735

55)

Storch, K. J., Wagner, D. A., Young, V. R. (1991)

Methionine kinetics in adult men: effects of dietary betaine on l(2H3-methyl-1-13C)methionine.
Am. J. Clin. Nutr. 54, 386.394

56)

Schwahn BC, Chen Z, Laryea MD, Wendel U, Lussier-Cacan S, Genest J Jr, Mar MH, Zeisel SH, Castro C, Garrow T, Rozen R.

Homocysteine-betaine interactions in a murine model of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency.

FASEB J. 2003 Mar;17(3):512-4.

57)

Hill CS, Treisman R.

Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity.

Cell. 1995 Jan 27;80(2):199-211. Review.

58)

Häussinger D, Roth E, Lang F, Gerok W.

Cellular hydration state: an important determinant of protein catabolism in health and disease.

Lancet. 1993 May 22;341(8856):1330-2.

59)

Schliess F, Heinrich S, Häussinger D.

Hyperosmotic induction of the mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP-1 in H4IIE rat hepatoma cells.

Arch Biochem Biophys. 1998 Mar 1;351(1):35-40.

60)

Miyakawa H, Rim JS, Handler JS, Kwon HM.

Identification of the second tonicity-responsive enhancer for the betaine transporter (BGT1) gene.

Biochim Biophys Acta. 1999 Sep 3;1446(3):359-64.

61)

Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM.

Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Mar 2;96(5):2538-42.

62)

Miyakawa H, Woo SK, Chen CP, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM.

Cis- and trans-acting factors regulating transcription of the BGT1 gene in response to hypertonicity.

Am J Physiol. 1998 Apr;274(4 Pt 2):F753-61.

63)

Jeon US, Kim JA, Sheen MR, Kwon HM.

How tonicity regulates genes: story of TonEBP transcriptional activator.

Acta Physiol (Oxf). 2006 May-Jun;187(1-2):241-7. Review.

64)

Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, Lussier-Cacan S, Chen MF, Pai A, John SW, Smith RS, Bottiglieri T, Bagley P, Selhub J, Rudnicki MA, James SJ, Rozen R.

Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. Hum Mol Genet. 2001 Mar 1;10(5):433-43.

65)

Davis PK, Ho A, Dowdy SF.

Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells. Biotechniques. 2001 Jun;30(6):1322-6, 1328, 1330-1. Review.

66)

Park EI and Garrow TA.

Interaction between dietary methionine and methyl donor intake on rat liver betaine-homocysteine methyltransferase gene expression and organization of the human gene. J Biol Chem 274: 7816-7824, 1999.

67)

Skiba WE, Taylor MP, Wells MS, et al: Human hepatic methionine biosynthesis.

Purification and characterization of Betaine:homocysteine S-methyltransferase. J Biol Chem 257:14944–14948, 1982

68)

Finkelstein, J. D. (1974)

Methionine metabolism in mammals: the biochemical basis for homocystinuria. Metabolism 23, 387.398

69)

Finkelstein JD.

The metabolism of homocysteine—pathways and regulation. Eur J Pediatr 157: S40–S44, 1998.

70)

Lang H, Polster M, Brandsch R.

Rat liver dimethylglycine dehydrogenase. Flavinylation of the enzyme in hepatocytes in primary culture and characterization of a cDNA clone. Eur J Biochem. 1991 Jun 15;198(3):793-9

71)

Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M and Fukami Y.

Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases.
J Biol Chem 262: 5592-5595, 1987.

72)

Findik D, Song Q, Hidaka H and Lavin M.

Protein kinase A inhibitors enhance radiation-induced apoptosis.
J Cell Biochem 57: 12-21, 1995.

73)

Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marmé D and Schächtele G.

Selective inhibition of protein kinase C isoenzymes by the indolocarbazole Gö6976.
J Biol Chem 268: 9194-9197, 1993.

74)

Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J and Kahn CR.

Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of p70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation.
Mol Cell Biol 14: 4902-4911, 1994.

75)

Cross DA, Alessi DR, Vandenheede JR, McDowell HE, Hundal HS and Cohen P.

The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulinlike growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf.
Biochem J 303: 21-26, 1994.

76)

Lornejad-Schäfer MR, Schäfer C, Graf D, Häussinger D and Schliess F.

Osmotic regulation of insulin-induced mitogen-activated protein kinase phosphatase (MKP-1) expression in H4IIE rat hepatoma cells.
Biochem J 371:609-619, 2003

77)

Davies SP, Reddy H, Caivano M and Cohen P.

Specificity and mechanisms of action of some commonly used protein kinase inhibitors.
Biochem J 351:95-105, 2000.

78)

Schliess F, Heinrich S and Häussinger D.*Hyperosmotic induction of the mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP-1 in H4IIE rat hepatoma cells.**Arch Biochem Biophys* 351: 35-40, 1998.

79)

Wiese S, Schliess F and Häussinger D.*Osmotic regulation of MAP-kinase activities and gene expression in H4IIE rat hepatoma cells.**Biol Chem* 379:667-671, 1998.

80)

Ueki I, Stipanuk MH.*Enzymes of the taurine biosynthetic pathway are expressed in rat mammary gland.**J Nutr.* 2007 Aug;137(8):1887-94.

81)

Wijnholds J, Mol CA, van DL, de HM, Scheffer GL, Baas F:*Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs.**Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(13):7476-7481.

82)

Sadzuka Y, Sugiyama T, Suzuki T, Sonobe T:*Enhancement of the activity of doxorubicin by inhibition of glutamate transporter.**Toxicol Lett* 2001;123 (2-3):159-167.

83)

Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D:*The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides.**J Biol Chem* 2000;275:30069-30074.

84)

Menno van Lookeren Campagne^{*,†}, Harold Thibodeaux^{*,‡}, Nick van Bruggen[§], Belinda Cairns[¶], Robert Gerlai[§], James T. Palmer[§], Simon P. Williams[§], and David G. Lowe*Evidence for a protective role of metallothionein-1 in focal cerebral ischemia**Neurobiology* Vol. 96, Issue 22, 12870-12875, October 26, 1999

85)

Michel V, Yuan Z, Ramsuvar S, Bakovic M.*Choline transport for phospholipid synthesis.**Exp Biol Med* (Maywood). 2006 May;231(5):490-504. Review.

86)

Sunden SL, Renduchintala MS, Park EI, Miklasz SD, Garrow TA.*Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene.**Arch Biochem Biophys.* 1997 Sep 1;345(1):171-4.

87)

Reinehr RM, Graf D, Fischer R, Schliess F and Häussinger D.*Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes towards CD95L-induced apoptosis.**Hepatology* 36: 602-614, 2002.

88)

Prudova A, Bauman Z, Braun A, Vitvitsky V, Lu SC, Banerjee R.*S-adenosylmethionine stabilizes cystathionine beta-synthase and modulates redox capacity.**Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Apr 25;103(17):6489-94.

89)

Newsome WP, Warskulat U, Noé B, Wettstein M, Stoll B, Gerok W and Häussinger D.*Modulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase levels by the hepatocellular hydration state.**Biochem J* 304: 555-560, 1994.

90)

Warskulat U, Newsome W, Noé B, Stoll B and Häussinger D.*Anisoosmotic regulation of hepatic gene expression.**Biol Chem Hoppe Seyler* 377: 57-65, 1996.

91)

Weik C, Warskulat U, Bode JG, Peters-Regehr T and Häussinger D.*Compatible organic osmolytes in rat liver sinusoidal endothelial cells.**Hepatology* 27: 569-575, 1998.

92)

Zhang F, Warskulat U, Wettstein M and Häussinger D.*Identification of betaine as an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells).**Gastroenterology* 110: 1543-1552, 1996.

93)

Peters-Regehr T, Bode JG, Kubitz R and Häussinger D.*Organic osmolyte transport in quiescent and activated rat hepatic stellate cells (Ito cells).**Hepatology* 29: 173-180, 1999.

94)

Häussinger D, Kubitz R, Reinehr R, Bode JG and Schliess, F.
Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical hepatology.
JMAM 25: 221-360, 2004.

95)

Reinehr RM, Graf D, Fischer R, Schliess F and Häussinger D.
Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes towards CD95L-induced apoptosis.
Hepatology 36: 602-614, 2002.

96)

Lornejad-Schäfer MR, Schäfer C, Richter L, Grune T, Häussinger D, and Schliess F.
Osmotic regulation of MG-132-induced MAP-kinase phosphatase MKP-1 expression in H4IIE rat hepatoma cells.
Cell Physiol Biochem 16: 193-206, 2005.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

A

AK	Antikörper
act D	Actinomycin D

B

BP	Basenpaar
bzw	Beziehungsweise

C

cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
------	--------------------------------------

D

Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure

E

ECL	Enhanced Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eV	ElektronenVolt

F

FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
FWD	forward

G

GC-Gehalt	Guanin-Cytosin-Gehalt
-----------	-----------------------

H

HRP	Horseradish-Peroxidase
-----	------------------------

K

k.o.	Knock-out
kb	kilobasen

M

MTT	(3-(4, 5- dimethylthiazolyl-2)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromid)
mRNA	messenger-RNA
mTOR	mamalian Target of Rapamycin

N

NaCl	Natriumchlorid
Nd-Fe-B	Neodym-Eisen-Bor-Legierung

O

OD	optische Dichte
----	-----------------

P

PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase Kettenreaktion
PBS	Phosphate buffered Saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PVDF	Polyvinylidendifluorid

Q

Q-PCR	quantitative PCR
-------	------------------

R

Rev	Reverse
Rel	relativ
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription - PCR
rpm	rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure

S

SAM	S-Adenosyl-Methionin
SAH	S-Adenosyl-Homocystein

T

Taq-Pol.	Thermus aquaticus – DNA Polymerase
TBS-T _{0,1%}	Tris-buffered Saline mit 0,1% Tween 20
TonE	Tonicity-responsive Element
TonEBP	Tonicity-responsive Element – Bindungsprotein

T_m Schmelzpunkt-Temperatur
TRIS Tri(hydroxlmethyl)-aminomethan

U
UV-Licht ultraviolettes Licht

W
wt Wildtyp

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der Änderungen der intrazellulären Osmolytkonzentration bei hyperosmotischer bzw. hypoosmotischer Exposition.	5
Abbildung 2: Schema der am Cholin- und Methylgruppenstoffwechsel beteiligten Reaktionen.	9
Abbildung 3: Messung der Zellvitalität unter Einfluss anisoosmolarer NaCl Konzentrationen.	38
Abbildung 4: Messung der Zellvitalität nach Inkubation mit anisoosmolaren NaCl Konzentrationen mit jeweils 10 µg/ml Actinomycin D	39
Abbildung 5: BHMT, DMGDH und SARDH mRNA Expression in H4IIE-Zellen	40
Abbildung 6: CHK und PCYT1A mRNA Expression in H4IIE-Zellen	41
Abbildung 7: PEMT mRNA Expression in H4IIE-Zellen	42
Abbildung 8: MS, MTHFR und CBS mRNA Expression	43
Abbildung 9: Sensitivität des osmotischen Effektes auf die DMGDH mRNA Expression	44
Abbildung 10: Anisoosmotische Effekte auf die Stabilität der BHMT mRNA	45
Abbildung 11: Anisoosmotische Effekte auf die Stabilität der DMGDH mRNA	46
Abbildung 12: BHMT, DMGDH und SARDH mRNA Expression unter hyperosmolaren Bedingungen mit Raffinose als Osmolyt.	47
Abbildung 13: BHMT, DMGDH und SARDH mRNA Expression unter hyperosmolaren Bedingungen mit Harnstoff als Osmolyt.	48
Abbildung 14: Westernblot-Analyse der DMGDH	49
Abbildung 15: Westernblot-Analyse SARDH	50
Abbildung 16: Charakterisierung der Osmosensitivität der BHMT mRNA Expression	51
Abbildung 17: Charakterisierung der Osmosensitivität der DMGDH mRNA Expression	52
Abbildung 18: Osmosensitive Regulation des humanen BHMT Promotors	54
Abbildung 19: BHMT, DMGDH und SARDH mRNA Expression	55
Abbildung 20: CHDH, PEMT und CHK mRNA Expression	56
Abbildung 21: CBS und MS mRNA Expression	57
Abbildung 22: Intrazelluläre Cholinkonzentration in H4IIE Zellen und im Mediumüberstand.	58
Abbildung 23: Intrazelluläre Betainkonzentration in H4IIE Zellen und im Mediumüberstand.	59
Abbildung 24: Intrazelluläre DMG Konzentration in H4IIE Zellen und im Mediumüberstand.	59
Abbildung 25: Intrazelluläre Sarkosinkonzentration in H4IIE Zellen und im Mediumüberstand.	60
Abbildung 26: Verhältnis der DMG Konzentration zur Betainkonzentration in der Zelle.	61
Abbildung 27: Intrazelluläre Homocysteinkonzentration in H4IIE Zellen und im Mediumüberstand.	61
Abbildung 28: Intrazelluläre Methioninkonzentration in H4IIE Zellen und im Mediumüberstand.	62
Abbildung 29: Betain Bestimmung aus dem Lebergewebe und dem Plasma der Mäuse.	63
Abbildung 30: Cholin Bestimmung aus dem Lebergewebe und dem Plasma der Mäuse.	64
Abbildung 31: DMG Bestimmung aus dem Lebergewebe und dem Plasma der Mäuse.	64
Abbildung 32: Homocystein Bestimmung aus dem Lebergewebe und dem Plasma der Mäuse.	65
Abbildung 33: Methionin Bestimmung aus dem Lebergewebe und dem Plasma der Mäuse.	66
Abbildung 34: Sarkosin und Glycin Bestimmung der aus dem Lebergewebe der Mäuse.	66
Abbildung 35: Taurin und GPC Bestimmung der aus dem Lebergewebe der Mäuse.	67
Abbildung 36: Bestimmung der Proteolyserate in perfundierten Mauslebern.	68
Abbildung 37: Vergleich der Genregulation bei hypo- und hyperosmolarer Umgebung.	81
Abbildung 38: Schema des Metabolitenflusses in H4IIE Zellen unter normosmolaren Bedingungen.	83
Abbildung 39: Schema des Metabolitenflusses in H4IIE Zellen unter hypoosmolaren Bedingungen.	84
Abbildung 40: Schema des Metabolitenflusses in H4IIE Zellen unter hyperosmolaren Bedingungen.	86