Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Anästhesiologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. Michael Georgieff

Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung
Leiter: Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. Peter Radermacher

Untersuchungen zur Wirkung von H_2S auf Raw264.7-Makrophagen: Funktionelle und molekularbiologische Aspekte

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von Benjamin Eilts
aus Ulm
2014

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Radermacher
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Georgia Lahr
Tag der Promotion:	17.07.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis		III-IV
1	**Einleitung**	1
1.1	Immunantwort und Inflammation durch Makrophagen	2
1.2	Apoptose und ihre Bedeutung im Entzündungsvorgang	3
1.3	Ionenkanäle und Immunsystem	4
1.4	ATP-abhängige Kaliumkanäle	4
1.5	Pharmakologie der K_{ATP}-Kanäle	8
1.6	Zielsetzung in diesem Abschnitt	10
2	**Material und Methoden**	11
2.1	Zellkultur	11
2.2	Transfektion von TsA-Zellen	11
2.3	Die Patch-Clamp-Technik	13
2.4	Zellbiologie, Molekularbiologie/ Biochemie	15
2.5	Molekularbiologie	19
2.6	Biochemie	23
2.7	Zellbiologie	27
2.8	Statistik	29
3	**Ergebnisse**	30
3.1	Elektrophysiologische Charakterisierung von K_{ATP}-Kanäle	30
3.2	Funktionelle Untersuchung von K_{ATP}-Kanälen an Makrophagen	35
3.3	Molekularbiologischer Nachweis von K_{ATP}-Kanälen mit der PCR	36
3.4	Induktion der SUR-Untereinheit durch H_2S	38
3.5	Wirkung von H_2S auf pro- und antiapoptotische Proteine	40
3.6	Wirkung von H_2S auf die mitochondrial vermittelte Apoptose	47
4	**Diskussion**	52
4.1	Funktioneller Nachweis von K_{ATP}-Kanälen	53
4.2	PCR-Nachweis von K_{ATP}-Kanälen bei Raw264.7-Makrophagen	54
4.3	Wirkung von H_2S auf K_{ATP}-Kanäle	54
4.4	Wirkung von H_2S auf die Expression von K_{ATP}-Kanäle	55
4.5	Wirkung von H_2S auf die Apoptose	56
4.6	Mitochondrial vermittelte Apoptose	60
4.7	Die Wirkung von H_2S auf Raw264.7-Makrophagen	61

5 Zusammenfassung 63

6 Literaturverzeichnis 64

Danksagung 72

Lebenslauf 73

Abkürzungsverzeichnis

A.dest	Bidestilliertes Wasser
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Aktionspotential
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	„Bcl-2-antagonist of cell death”
Bak	„Bcl-2-antagonist/killer”
Bax	„Bcl-2-associated-X protein”
Bcl	„B-cell leukaemia/lymphoma-related protein”
°C	Temperatur Celcius
cDNA copyDNA	DNA Kopie eines RNA Stückes mit Hilfe der Reversen-Transkriptase
DMSO	Dimethylsulfoxid
E.coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-amino-ethylether)-N,N,N',N',-tetraacetat
FKS	Fötales Kälber-Serum
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-(2-ethansulfonsäure)
K_{ATP} -Kanal	ATP-sensitiver K+ Kanal
IR K -Kanäle	Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (inward rectifying)
M	Molarität (mol/l)
MEM	Minimum Essential Medium
MgADP	Magnesium-gebundenes ADP
MgATP	Magnesium-gebundenes ATP
2 MgCl	Magnesiumchlorid
mito ATP	ATP abhängiger, mitochondrialer K -Kanal
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBF	Nukleotidbindungsfalte

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionen-Konzentration
RT	Raumtemperatur (22°C)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SUR	(Sulfonylurea-Receptor) SulfonylharnstoffrezeptTMD Transmembrandomäne
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
WC	Whole Cell Konfiguration der Patch-Clamp Technik
ZSM	Zellkultur Standard Medium
W	Ohm

1 Einleitung

Schwefelwasserstoff (H_2S) ist ein farbloses, entzündliches und wasserlösliches Gas, das eine Hauptkomponente des Geruchs fauler Eier ausmacht. Dieses Gas ist hochtoxisch und stellt eine ernste Gefahr für die Umwelt dar (Whiteman et al., 2011). Andererseits dient es in sehr kleinen Konzentrationen auch als Signalmolekül, das insbesondere für kardiovaskuläre, neurologische und immunmodulierende Systeme von Bedeutung ist (Zanardo et al., 2006; Whitemann et al., 2011). Innerhalb des Immunsystems sind für H_2S komplexe pro- und anti-inflammatorische Wirkungen beschrieben (Whiteman et al., 2011), die durch verschiedene Zytokine und/oder Chemokine vermittelt werden. Ein pro-inflammatorischer Einfluss von H_2S erfolgt z.B. durch IL-1β, IL-6, IL-18, IFN-α und IFN-β. Eine anti-inflammatorische Wirkung von H_2S ist durch die Beeinflussung der Mediatoren IL-10 und TGF-β möglich (Winyard & Willoughby 2003; Whiteman et al., 2011). Des Weiteren beeinflusst H_2S die Bildung pro- und antiapoptotischer Proteine. Immunologische Prozesse mit der Beteiligung von Proteasen und Apoptose beinflussenden Proteinen sind gut untersucht (Chao et al., 1998). So kann H_2S bei LPS-induzierter Sepsis die Produktion von Caspase-3 bei Makrophagen herabsetzen (Rinaldi et al., 2006). H_2S wirkt auch auf die Aktivierung von polymorphkernigen Leukozyten (PMNL) (Persson et al., 1993; Mariggio et al., 1997; Zanardo et al., 2006). Durch H_2S beeinflusst, wandern PMNL, speziell Makrophagen, bei entzündlichen Prozessen weniger stark ins Gewebe ein (Zanardo et al., 2006). Hierbei scheint die Anwesenheit von ATP-abhängigen Kaliumkanälen eine wesentliche Rolle zu spielen (Yasu et al., 2002). H_2S kann zur Öffnung ATP-abhängiger Kaliumkanäle führen (Rochette et al., 2006; Jin HF et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung von H_2S auf Makrophagen auf verschiedenen Ebenen untersucht.

1.1 Immunantwort und Inflammation durch Makrophagen

Im menschlichen Organismus haben Makrophagen eine herausragende Bedeutung für die Immunantwort. Makrophagen sind wesentlicher zellulärer Bestandteil des angeborenen, unspezifischen Immunsystems und stellen gleichzeitig essentielle Vermittlerzellen für die spezifische, adaptive Immunantwort dar. Im Rahmen der Immunabwehr haben Makrophagen viele unterschiedliche Aufgaben. Eine Inflammation wird durch die Bindung und Phagozythose von bakteriellen, viralen oder fungiziden Pathogenen durch Makrophagen initiiert und gefördert. Durch diese Abwehrreaktion wird eine wirksame Immunabwehr eingeleitet. Chemokine, welche durch Makrophagen ausgeschüttet werden, locken andere Immunzellen wie zum Beispiel neutrophile Granulozyten an den Ort der ablaufenden Inflammation. Gleichzeitig vermitteln sie eine Leukozytenaktivierung über die Produktion von Interleukinen, stellen aber auch Effektorzellen nach Aktivierung durch T-Zellen dar. Zu den wichtigsten proinflamatorischen Funktionen von Makrophagen gehören insbesondere die Prozessierung und Präsentation von pathogenen Antigenen gegenüber T-Zellen sowie die Bildung von Zytokinen. Diese bilden einen unverzichtbaren Induktionsmechanismus für die adaptive Immunantwort (Webster et al., 1982; Caamano et al., 2002; Oberholzer et al., 2001).

Makrophagen haben auch anti-inflammatorische Bedeutung. An der Beendigung von entzündlichen Prozessen sind sie durch die Produktion anti-inflammatorischer Moleküle, Induktion von Apoptose und Elimination apoptotisch-inflammatorischer Zellen beteiligt. Proinflammatorische Signalwege zum Beginn einer Entzündung sowie die Erkenntnisse, dass Makrophagen in die Beendigung einer Entzündungsreaktion involviert werden, sind weitreichend bekannt (Lawrence et al., 2005). Damit das Immunsystem effizient arbeiten kann, ist es besonders wichtig, dass die Makrophagen ihr ganzes funktionelles Repertoire ausbilden können. Zudem müssen Makrophagen aufgrund ihrer effektiven und unterschiedlichen Funktion genau reguliert werden (Oldstone, 1987).

1.2 Apoptose und ihre Bedeutung im Entzündungsvorgang

Der als Apoptose bezeichnete programmierte Zelltod stellt einen wichtigen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase in vielzelligen Organismen dar, über den überschüssige oder potenziell schädliche Zellen entfernt werden können (Kerr et al., 1972). Als aktiver und Energie verbrauchender Prozess verläuft die Apoptose nach einem festgelegten Programm, das in den jeweiligen Zellen über zwei Wege eingeleitet werden kann: Beim extrinsischen Weg ist das Auslösesignal der Apoptose die Bindung von Liganden an Todesrezeptoren auf der Zellmembran (Siegel et al., 2000). Beim intrinsischen Weg wird die Apoptose durch Freisetzung von Cytochrom-c und anderen apoptosefördernden Proteinen aus den Mitochondrien initiiert. Diese Freisetzung kann viele verschiedene Ursachen haben, zum Beispiel Entzug von Wachstumsfaktoren oder Zellschädigungen durch Mikroorganismen und Toxine oder Bestrahlung (Harada et al., 2003)

Beide Wege führen zur Aktivierung von Caspasen (Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen), einer Gruppe von Enzymen, die durch Spaltung von intrazellulären Proteinen oder durch Aktivierung anderer Enzyme die Apoptose ausführen und damit die apoptosetypischen strukturellen Veränderungen der Zelle hervorrufen (Nicholsen et al., 1997). Einen Überblick über die Vorgänge bei der Apoptose gibt Abb. 1.

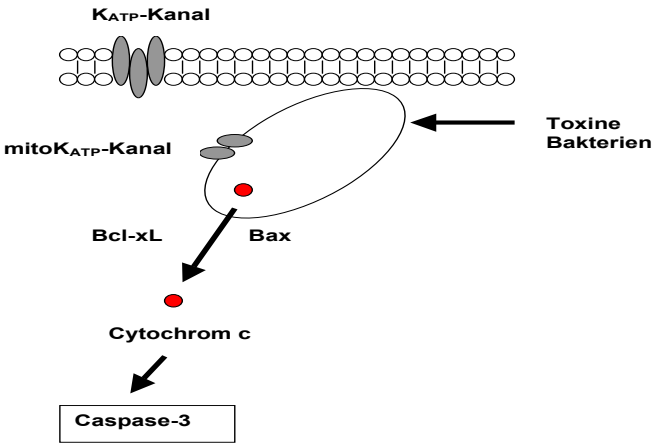


Abb.1: Vorgänge bei der Apoptose (stark vereinfachtes Schema). Freisetzung von Cytochrom-c aus den Mitochondrien (intrinsischer Weg) führen zur Aktivierung einer komplexen Kaskade einer Vielzahl von Caspasen. Die Freisetzung von Cytochrom-c wird unter anderem durch intrazelluläre Proteine der Bcl-2- oder Bax-Familie reguliert.

1.3 Ionenkanäle und Immunsystem

Ionenkanäle sind im Immunsystem genauso vorhanden wie in Nervenzellen, den Herzmuskelzellen, dem Endothel oder anderer Zellarten. Ein großer Unterschied zwischen den Immunzellen und z.B. den Nervenzellen besteht darin, dass Immunzellen elektrisch nicht erregbare Zellen sind. Bei Neuronen können Aktionspotentiale durch spannungsabhängige Natriumkanäle ausgelöst werden, Immunzellen haben weder Natriumkanäle noch können sie Aktionspotentiale auslösen (Hille, 2001). Somit müssen die Ionenkanäle in Immunzellen und hier insbesondere in Makrophagen andere Aufgaben haben. An der Regulation der Zytokinproduktion, der Aktivierung und Chemotaxis von Makrophagen sind Ionenkanäle beteiligt (Fischer et al; 1995; Eder und Fischer, 1997; Khanna et al., 2001; Qiu et al.; 2002). Eine wichtige Rolle spielen hierbei die Kaliumkanäle (Eder et al., 1998).

1.4 ATP-abhängige Kaliumkanäle

ATP-abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP}-Kanäle) sind spezielle Kaliumkanäle, die auf ATP reagieren, welche die zelluläre Aktivität an den metabolischen Zustand der Zelle anpassen. Bei normalen intrazellulären ATP-Konzentrationen sind diese Kanäle geschlossen. Fällt der ATP-Spiegel ab, öffnen diese Kanäle. (Ashcroft & Ashcroft, 1990).

1.4.1 Vorkommen von K_{ATP}-Kanälen

K_{ATP}-Kanäle kommen in sehr unterschiedlichen Zelltypen vor. Entdeckt wurden die K_{ATP}-Kanäle erstmals 1983 durch Noma im Herzmuskel (Noma, 1983; Trube, 1983). Kurz darauf konnte man sie auch in den β-Zellen des Pankreas (Cook & Hales, 1984) und in vielen anderen Geweben nachweisen (Ashcroft & Ashcroft, 1990; Edwards und Weston, 1993; Quast, 1996). Sie sind nicht nur auf die Zellmembran beschränkt, sondern kommen auch in intrazellulären Membransystemen, insbesondere der Mitochondrienmembran vor (Inoue et al.; 1991).

1.4.2 Zusammensetzung und Expression der K_{ATP}-Kanäle

Der Proteinkomplex eines K_{ATP}-Kanals besitzt eine Größe von ~950kDa und ist aus einer α- und einer β-Untereinheit zusammengesetzt. (Clement et al.,1997). In die Plasmamembran werden in vivo nur komplette, aus jeweils vier α- und ß-Untereinheiten zusammengesetzte K_{ATP}-Kanäle eingebaut. Bei der α-Untereinheit handelt es sich um einen einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanal (Kir) bei der β-Untereinheit handelt es sich um den Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR). Für den Einbau eines K_{ATP}-Kanals in die Plasmamembran sorgt ein Retentionsmotiv, bestehend aus den Aminosäuren Arginin-Lysin-Arginin, welches sich sowohl an der Kir6.x- als auch an der SUR-Sequenz befindet (Zerangue et al., 1999). Der Kir6.x hat zwei Transmembranhelices (M1 und M2) (Abb.1). Der Selektivitätsfilter für Kalium liegt zwischen den beiden Transmembranhelices (Inagaki et al., 1995).Von der α-Untereinheit sind beim Menschen die beiden Subtypen Kir6.1 und Kir6.2 bekannt (Inagaki et al., 1995). Die beiden Kir6.x-Subtypen besitzen 71% Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz. Im Vergleich zu Kir6.2 hat die Kir6.1 eine geringere Leitfähigkeit und eine schwächere Reaktion auf ATP (Inagaki et al., 1997). Das menschliche Gen für Kir6.1 (KCNJ8) befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 (nahe dem Gen für SUR2) an Position 12p11.23 mit einer Länge von ~9,7kb. Das daraus entstehende Protein (ca.38 kDa) zeigt eine 98%ige Homologie zum murinen Kir6.1. Der Kir6.1 besitzt drei Exons, die für 424 Aminosäuren kodieren. Elektronenmikroskopische Untersuchungen lassen vermuten, dass Kir6.1 auch in der inneren Mitochondrienmembran vorkommt (Suzuki et al., 1997).

Der Subtyp Kir6.2, auch BIR („β-cell inward rectifier“) genannt, ist ein 390 Aminosäuren langes Protein, dessen intronloses Gen (KCNJ11) beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (in der nähe von SUR1) liegt und in den β-Zellen des Pankreas sehr ausgeprägt exprimiert wird (Suzuki et al., 1997). Werden die 36 C-terminalen Aminosäuren an Kir6.2-Kanälen (Kir6.2ΔC36) und damit das Retentionsmotiv entfernt, so ist auch die alleinige Bildung funktionsfähiger und nur aus Kir6.2 bestehender Kanalproteine möglich. Dies gilt auch für die C-26 verkürzte Mutante KirΔC26 (Trucker et al.,1997).

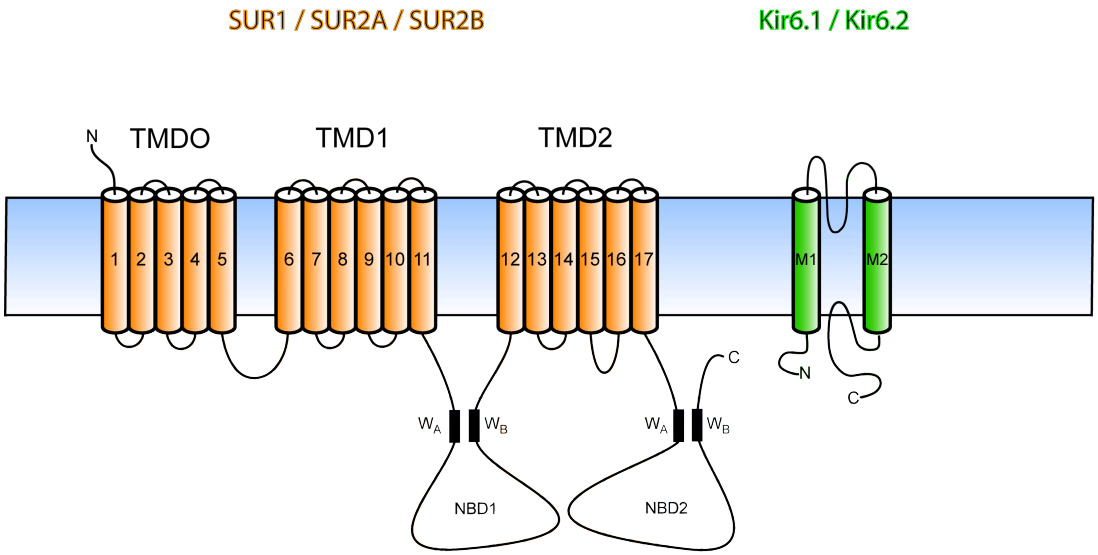


Abb. 2: Struktur eines K_{ATP}-Kanals mit funktionell wichtigen Bereichen. (Kir: Einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal; SUR: Sulfonylharnstoffrezeptor; TMD: Transmembrandomäne; 0-2: Transmembranhelices des SUR (1-17); NBD1/2: Nukleotidbindungdomänen; W_A, W_B: Walker A- und B-Motiv; M1,2: Transmembranhelices des Kir)

Der Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) stellt die β-Untereinheit des K_{ATP}-Kanals dar. Die Namensgebung des SUR kommt durch den pharmakologischen Effekt von Sulfonylharnstoffen wie z.B. Glibenclamid zustande. Diese binden an den SUR und führen zu einer Kanalschließung. Der SUR dient als regulatorische Komponente der Kanalfunktion. Er wurde erstmals aus Pankreaszellen (β-Zellen) kloniert (Aguilar-Bryan et al., 1995). Bisweilen wurden 2 Subtypen der β-Untereinheit genauer identifiziert (Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996): SUR1 und SUR2, deren Gene auf Chromosom 11 (p15.1), bzw. Chromosom 12 (11.23) liegen (Chutkow et al., 1996). SUR1 und SUR2 weisen eine 67%ige Sequenzhomologie auf (Ashcroft und Gribble, 1999).

SUR1 besteht aus 1581 Aminosäuren und wird durch 39 Exons kodiert. SUR2 besteht aus 1549 Aminosäuren und wird durch 38 Exons kodiert (Seino, 1999; Babenko et al., 1999). Durch alternatives Spleißen des Exons 38 gibt es den Subtyp SUR2 in den zwei Varianten SUR2A und SUR2B. SUR2A unterscheidet sich von SUR2B nur in den 42 C-terminalen Aminosäuren (Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996). Auch von SUR1 sind verschiedene Spleißvarianten bekannt

(Hambrock et al., 2002). Ihre physiologische Bedeutung ist aber noch unklar.
In den verschiedenen Organen und Geweben von Säugetieren liegen unterschiedliche Kombinationen und verschieden hohe Expressionsraten der α- und β- Untereinheiten vor. Die in Säugetieren wichtigsten Untereinheitenkombinationen und ihr Vorkommen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Übersicht über die in vivo vorkommenden K_{ATP}-Untereinheitenkombinationen und ihre Vorkommen

K_{ATP}-Untereinheitenkombination	Zellvorkommen	Referenzen
SUR1/Kir6.2	ß-Inselzellen, Neurone	Inagaki et al., 1995 Gribble et al., 1998
SUR2A/Kir6.2	Herzmuskelzellen Skeletmuskelzellen	Inagaki et al., 1996 Okuyama et al., 1998
SUR2B/Kir6.1	Glatte Gefäßmuskelzellen	Yamada et al., 1997
SUR2B/Kir6.2	Glatte Muskelzellen	Isomoto et al., 1996

1.4.3 K_{ATP}-Mischkanäle

Die obige, vereinfachte Beschreibung lässt die Vermutung aufkommen, dass jeweils nur ein Kir- und ein SUR-Subtyp in der jeweiligen Zellart exprimiert wird. Tätsächlich aber werden die beiden Kir-Untereinheiten in einigen Fällen im selben Zelltyp exprimiert. Beispiele hierfür sind Neurone (Zawar et al. 1999) und Endothelzellen von Kapillaren (Mederos y Schnitzler et al., 2000). Ebenfalls wird auch die Co-Expression verschiedener SURs beobachtet. Beispiele hierfür sind Neurone der Substantia nigra, in denen man mRNA für SUR1 und SUR2B findet (Liss et al., 1999). In der Skelettmuskulatur lässt sich in einigen Fällen neben SUR2A auch SUR1 nachweisen (Tricarico et al., 2006). Somit stellt sich die Frage, ob verschiedene Kirs und/oder SURs im selben Kanalkomplex vorliegen können. Babenko et al., 1999 zeigte durch die Fusion von Kir6.2 und Kir6.1 zu Tetrameren, dass diese Konstrukte mit SUR1 funktionelle K_{ATP}-Kanäle ausbilden, deren elektrische Leitfähigkeit das Zahlenverhältnis von Kir6.1- und Kir6.2-Untereinheiten im Kanal widerspiegelt.

1.4.4 Mito-K_{ATP}-Kanal

Ein Sonderfall stellt der K_{ATP}-Kanal der Mitochondrien (mitoK_{ATP}) dar. Zur Zeit wird über die molekulare Struktur dieses Kanals spekuliert. Die Regulation durch ATP und die Selektivität für Kalium sind die Gemeinsamkeiten der in der Zellmembran befindlichen K_{ATP}- und der mito-K_{ATP}-Kanäle. Der mito-K_{ATP}-Kanal reagiert grundsätzlich ähnlich auf typische K_{ATP}-Kanal-Öffner und -Blocker wie die zellmembrangebunden K_{ATP}-Kanäle. Im detaillierten pharmakologischen Profil entspricht dieser aber keinem der oben beschriebenen K_{ATP}-Kanal-Typen der Plasmamembran (Grover & Garlid, 2000; O`Rounke, 2004).

1.5 Pharmakologie der K_{ATP}-Kanäle

Zu den direkten oder indirekten Regulatoren von K_{ATP}-Kanälen gehören neben ATP und ADP, Phospholipide, langkettige AcetylCoenzym A Ester, die Proteinkinasen A (PKA) und C (PKC) sowie G-Proteine (Seino und Miki, 2003). Wenn ATP an die α-Untereinheit von Kir6.x gebunden ist, liegt der Kanal im geschlossenen Zustand vor. (Antcliff et al., 2005). Je nach Kombination der α- und β-Untereinheit können pharmakologisch wirksame Substanzen ein Öffnen oder Schließen der K_{ATP}-Kanäle erreichen (Tabelle 2). Ein Schließen der K_{ATP}-Kanäle wird auch durch die Sulfonylharnstoffe, mit deren Hauptvertreter Glibenclamid und verschiedenen Gliniden erreicht, welche an die SUR-Untereinheit binden (Bryan et al., 2005). Die K_{ATP}-Kanäle können durch Cyanoguanidine wie Pinacidil, Benzothiadiazine (Diazoxid), Pyridilnitrate (Nicrorandil), Benzopyrane (Levocromakalim, Bimakalim) oder Pyrimidimsulfate (Minoxidilsulfat) geöffnet werden (Hambrock et al., 2001). Als potentieller Aktivierungs-Regulator kann auch Schwefelwasserstoff fungieren (Szabo, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass Schwefelwasserstoff in vivo und in vitro (Rochette et al., 2008) wahrscheinlich durch Öffnung von ATP-abhängigen K^+-Kanälen des Gefäßendothels zu einer Vasodilatation und dadurch zu Hypotension bei Ratten führt (Beltowski und Lowicka, 2004). Inwieweit die Steuerung der K_{ATP}-Kanäle durch H_2S von physiologischer Relevanz ist, bleibt weiter Gegenstand der Forschung.

Tab. 2: Übersicht zur Pharmakologie von K_{ATP}-Kanal-Öffnern und –Schließern bei den in vivo vorkommenden K_{ATP}-Kanalkombinationen

K_{ATP}-Kanalkombination	Pharmakologische Eigenschaften	Referenzen
SUR1/Kir6.2	Aktivierung: Diazoxid; nicht durch Pinacidil. Hemmung: Glibenclamid	Inagaki et al., 1995 Gribble et al., 1997 Russ et al., 2001
SUR2A/Kir6.2	Aktivierung: Pinacidil, Cromakalim, Nicorandil. Geringe Hemmung: Glibenclamid	Aguilar-Bryan et al., 1995 Inagaki et al., 1996 Russ et al, 2001
SUR2B/Kir6.1	Aktivierung: Pinacidil, Diazoxid, Cromakalim und Nicorandil. Geringe Hemmung: Glibenclamid	Isomoto et al., 1996 Yamada et al., 1997
SUR2B/Kir6.2	Aktivierung: Pinacidil, Diazoxid und Cromakalim. Geringe Hemmung: Glibenclamid	Isomoto et al., 1996

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Bislang ist nicht bekannt, ob Schwefelwasserstoff einen Einfluß auf wesentliche Funktionen von Makrophagen ausübt. Dies ist jedoch nicht unwahrscheinlich, da Substanzen, die K_{ATP}-Kanäle modulieren, Einfluß auf physiologische Parameter von polymorphonukleären Leukozyten (PMNL) nehmen. Da Makrophagen ebenfalls zu den PMNLs zählen, könnten K_{ATP}-Kanäle ein wichtiges Target für H_2S darstellen.

In einem ersten Schritt galt es daher funktionelle K_{ATP}-Kanäle in Makophagen nachzuweisen. Da K_{ATP}-Kanäle in der äußeren Zellmembran sowie im Mitochondrium vorkommen, soll die Wirkung von H_2S funktionell und molekularbiologisch untersucht werden.

Dazu sollte zunächst die elektrophysiologische Untersuchungsmethode an heterolog exprimierten K_{ATP}-Kanälen optimiert und dann auf Raw264.7-Makrophagen übertragen werden. Im nächsten Schritt sollen molekularbiologische Untersuchungsmethoden Aufschluss geben, welche K_{ATP}-Kanal Kombination bei Raw264.7-Makrophagen exprimiert wird.

Da Makrophagen wichtige Funktionen im Organismus übernehmen, soll im dritten Schritt untersucht werden, ob H_2S einen Einfluss auf verschiedene Funktionen der Makrophagen hat.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Für die Experimente an K_{ATP}-Kanälen wurden zwei unterschiedliche Zelltypen verwendet. Der Optimierung des elektrophysiologischen Messverfahrens dienten TsA-Zellen, die mit cDNA transfiziert wurden, die für K_{ATP}-Kanäle von Maus und Hamster kodierten. Die TsA201 Zelllinie ist ein Abkömmling der humanen embryonalen Nierenzellinie HEK-293 (ATCC#CRL1537), welche ein T-Antigen gegen das Simian-Virus-40 (SV40) auf der Oberfläche exprimiert. Die Zellen wurden bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 95 % O_2 und 5 % CO_2 kultiviert. Die Nährlösung enthielt MEM mit 50 U Penicilin/ml, 50 ug/ml Streptomycin (Gibco, Eggstein, Deutschland), 2 mM L-Glutamin (Boehringer, Mannheim, Deutschland) und 10 % (v/v) fetales Kälberserum (Gibco).

Für die Untersuchung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen an Makrophagen wurde die Zellinie Raw264.7 (ATCC#TIB-71) eingesetzt. Diese Monozyten/Makrophagen stammen aus der Maus, Stamm BALB/c und exprimieren das H-2d Antigen.

Die gefrorenen Zellen wurden aus -80°C in einem Wasserbad 37°C aufgetaut. Um toxisches DMSO des Einfriermediums (FCS; 15 % DMSO) so schnell wie möglich zu verdünnen, wurden die noch nicht vollständig aufgetauten Zellen in Medium überführt, einmal mit Mediumlösung gewaschen und abzentrifugiert (800 g_E, 5 min). Anschließend wurden die Zellen in Nunc-Zellkulturflaschen bei 37°C in 5 % CO_2 kultiviert. Die Nährlösung enthielt DMEM (invitrogen), 0,11 g/l Na-Pyruvat, Pyridoxin; 10 % FCS (Sigma); 1x L-Alanyl; L-Glutamin (Glutamax (100x) (invitrogen)); 1 % NEAA (invitrogen); 0,02 mg/ml Refobacin (Merck).

2.2 Transfektion von TsA-Zellen

Die in Kultur angezüchteten TsA-Zellen wurden auf Poly-Ornithin beschichteten Schalen kultiviert und wiesen etwa 50% Konfluenz bei der Transfektion auf. Für die Transfektion wurde der Trans-Fektion TM Kit (Biorad) verwendet. Die cDNA`s, welche für K_{ATP}-Kanäle kodieren, wurden freundlicherweise von verschiedenen Wissenschaftlern zur Verfügung gestellt. Die Clone für hSUR1, hSUR2A, hSUR2B, hKir6.1, hKir6.2 waren von J. Bryan (Seattle, USA). Die Clone für mSUR2A, mSUR2B, mKir6.1 stammten von Furutani (Osaka, Japan). Die Clone

für hamSur1 und mKir6.2 waren von M. Vivandon (Grenoble, Frankreich).

2.2.1 Durchführung der Transfektion

Die Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden jeweils 100 µl OPTI-MEM Medium (Gibco) in 2 Eppendorfgefäße (1,2) vorgelegt. Danach wurde in Ansatz 1 ca. 1 µg DNA des jeweiligen Ionenkanals und 0,5 µg DNA von dem Marker Green Fluorescent Protein (GFP) zugegeben. In den Ansatz 2 wurden 6 µl Transfektionsreagenz pipettiert. Nach fünfminütiger Inkubationszeit wurde Ansatz 1 unter Vortexen tropfenweise in Ansatz 2 gegeben. Nach weiteren fünfzehn Minuten Inkubationszeit wurde der Ansatz auf die vorbereiteten Zellen pipettiert. Die Zellen wurden zuvor mit PBS einmal gewaschen und mit 800 µl MEM-Medium überschichtet. Nach 4-5 Stunden wurde der Transfektionsansatz von den Zellen abgegossen und Standardmedium ergänzt. Die transfizierten Zellen wurden am Folgetag für die Messungen verwendet. Am Messtag wurden die Zellen nochmals vereinzelt. Hierzu wurden die Zellen einmal mit PBS gespült und anschließend für fünf Minuten mit Accutase (PAA, Pasching, Österreich) bei 37°C behandelt. Danach wurde die Accutase abgenommen und die Zellen nach Zugabe von Medium durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt und auf mehrere Kulturschalen aufgeteilt.

2.3 Die Patch-Clamp-Technik

Für die funktionelle Prüfung der K_{ATP}-Kanäle in der Zellmembran wurde die Patch-Clamp-Technik herangezogen. Zur Etablierung dieser Metheode wurden transfizierte TsA-Zellen verwendet.

2.3.1 Chemikalien und Reagenzien

Intrazellulär-Lösung: 130 mM KCl; 1 mM $MgCl_2$; 1 mM $CaCl_2$; 5 mM EGTA; 0,3 mM ATPx2Na; 10 mM HEPES; pH 7,2.
Extrazellulär-Lösung: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM$CaCl_2$; 1 mM $MgCl_2$
6 mM Glucose; 12 mM HEPES; pH 7,3.

2.3.2 Geräte und Hilfsmittel:

Glaskapillare GB150-10	Science Products
Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf
Präzisions-Quarzküvette Suprasil	Hellma
DMZ-Universal Puller	Zeitz-Instrumente GmbH München
Zeiss Axiovert135	Zeiss
Mikromanipulator	Eppendorf
Brutschrank	Heraeus

2.3.3 Aufbau der Applikationssysteme

Diazoxid, Glibenclamide, Pinacidil und Na_2S wurden mit Hilfe eines computergesteuerten Substanzapplikationssystems (L/M.SPS-8; List, Darmstadt) zugegeben. In diesem System standen 4 getrennte Vorratsgefäße für Lösungen mit Testsubstanzen zur Verfügung. Um ein sicheres Anfluten der Lösungen zu gewährleisten, wurden sämtliche Vorratsgefäße mit einem Drucksteuersystem (MPCU-3; Lorenz, Lindau) verbunden. Dieses übte zusätzlich zur Schwerkraft einen Druck von zirka 10 – 12 cm H_2O auf die Vorratsgefäße aus. Aus dem Boden der Vorratsgefäße ging jeweils ein Schlauch aus. Die Enden der Schläuche wurden an eine 4-Kanal Perfusionsnadel angeschlossen. Die Spitze der Perfusionsnadel wurde unter Zuhilfenahme eines 3-Achs-Mikromanipulators gegenüber der Absaug-/Überlaufnadel ca. 50-100 µm vom Messfeld entfernt in die Messkammer eingebracht. Durch Magnetventile wurde der Substanzfluss durch die Schläuche gesteuert. Die Steuereinheit gestattete sowohl die manuelle als

auch die computergesteuerte Schaltung der Ventile. Eine konventionelle Petrischale von 35 mm Durchmesser stellt die Messkammer dar. Das Volumen an extrazellulärer Lösung betrug 2 ml und wurde während den Messungen kontinuierlich über eine Schlauchpumpe mit einer Geschwindigkeit von 4,5 ml/min versorgt. Das Volumen der Messkammer wurde sowohl über ein lokales Absaugsystem (zirka 1 ml/min) durch eine Membranpumpe als auch über einen Überlauf durch eine Vakuumpumpe wieder entfernt. Somit konnte zusammen mit dem Zulauf eine kontinuierliche Durchströmung der Messkammer mit extrazellulärer Lösung erzielt werden. Positioniert wurden die Kanülen beider Absaugsysteme zirka 300 µm vom Messfeld entfernt. Dabei befand sich der Überlauf an der Flüssigkeitsoberfläche und die lokale Absaugung am Boden des Messgefäßes knapp oberhalb des Schalenbodens. Der Überlauf gewährleistet einen konstanten Flüssigkeitspegel, unabhängig von der diskontinuierlichen Zuführung der Testsubstanzen. Die lokale Absaugung diente der Verhinderung einer Akkumulation von Testsubstanzen im Messbereich. Die applizierten Substanzen erreichen daher nur eine Fläche von 300 µm x 100 µm innerhalb der Messkammer, so dass ein Kontakt von zu testender Substanz und Zellen, welche sich außerhalb des Testbereiches befanden, weitestgehend ausgeschlossen werden konnte.

2.3.4 Durchführung der Messungen

Die Ableitelektroden wurden aus filamentfreien Glaskapillaren durch einen DMZ-Universalpuller in einem dreistufigen Arbeitsprozess hergestellt. Mit einem Bunsenbrenner wurden die stumpfen Enden der Glaskapillaren geglättet, damit die mit Teflon beschichtete Ableitelektrode des Vorverstärkers nicht beschädigt wurde. Durch Erzeugen eines Unterdrucks mit einer Injektspritze, welche mit einem Silikonschlauch an dem stumpfen Ende der Glaskapillare verbunden war, wurde die Kapillarspitze mit der Innenlösung befüllt. Anschließend wurde mit einer Pipette ebenfalls die Innenlösung in die Kapillare gefüllt. Durch das Eintauchen der Kapillarenspitze in Dimethyldichlorsilan (2% in Methylenchlorid) konnte der Sealing-Prozess erleichtert werden. Über einen Silberdraht wurde die Glaskapillare dann an der Halterung des Vorverstärkers angebracht, um eine elektrische Verbindung der Pipettenlösung mit dem Vorverstärker zu erhalten. Als Referenzelektrode wurde ein chlorierter Silberdraht verwendet, der sich in der

Messkammer befand. Um Anlagerungen von Partikeln jeder Art an die Glaskapillarenspitze zu vermeiden, wurde ein Überdruck von 10 cm H_2O angelegt, bevor die Elektrode in die Messkammer eingetaucht wurde. Die so präparierten Glaskapillaren wiesen einen Pipettenwiderstand von 3-6 MegaOhm auf. Unter Beobachtung mit einem LD-Objektiv wurde eine GFP-positive Zelle ausgesucht. Durch den Mikromanipulator wurde die Glaskapillarenspitze an die Zelle herangeführt. Ein Testpuls in Form einer Rechtecksspannung diente der Bestimmung des Pipettenwiderstandes. Nachdem sich der Pipettenwiderstand nach Annäherung an die Zelle um etwa ein Viertel vergrößert hatte, wurde der Überdruck zurückgenommen und ein Unterdruck eingestellt. Die Spitze der Pipette saugte somit die Zelle an, wodurch bei fast jeder Zelle ein Giga-Seal erreicht wurde. Nach dem Aufbau des Gigaseals wurde der elektrische Kontakt zwischen der Ableitelektrode und dem Inneren der Zelle hergestellt. Hierfür wird der von der Glaspipette begrenzte Membranbezirk mit kurzen Stromstößen aufgebrochen. Nach dem Aufbruch des begrenzten Bezirkes der Zellmembran bestand eine direkte Verbindung der Lösung im Pipetteninneren mit dem Cytoplasma der Zelle, so dass nach der Ausgleichszeit Zell- und Pipetteninhalt identisch waren. Durch diesen Vorgang wurde die Whole-Cell Konfiguration erreicht. Diese Konfiguration wurde bei allen Messungen verwendet. Bei der Whole-Cell-Konfiguration ist eine Erfassung der Ströme durch die gesamte Zellmembran möglich.

Die funktionellen Untersuchungen der K_{ATP}-Kanäle wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik in der Whole-Cell-Konfiguration durchgeführt. Die erforderlichen Messprotokolle wurden zunächst an heterolog exprimierten Rezeptoren optimiert um sie später an Makrophagen anzuwenden. Da zu Beginn der Arbeit unklar war, welche Untereinheitenkombinationen bei den Makrophagen vorliegen könnten, wurden sämtliche Kombinationsmöglichkeiten getestet. In Abwandlung von mehreren in der Literatur beschriebenen Möglichkeiten zur Aktivierung der K_{ATP}-Kanäle (Tang et al., 2005, Zhao et al., 2001) hat sich schließlich folgendes Protokoll als geeignet erwiesen: das Haltemembranpotential wurde auf -60 mV festgelegt; von diesem Potentialwert aus wurde die Zelle für die Dauer von 500 ms auf + 40 mV depolarisiert; anschließend wurde wieder das Haltemembranpotential von -60 mV eingestellt (Abb. 2). Diese Potentialsprünge wurden alle 5 Sekunden wiederholt. Die Substanzapplikation wurde nach folgedendem Schema durchgeführt: Zuerst wurden die Pulsprotokolle unter Kontroll-Lösung

durchgeführt. Danach wurde ein K_{ATP}-Kanalöffner (Pinacidl oder Diazoxid) appliziert. In Gegenwart eines K_{ATP}-Kanalöffners nahm der Strom für gewöhnlich kontinuierlich zu. War kein Stromanstieg zu erkennen, wurde die Zelle verworfen. Im Allgemeinen wurde der Kanalöffner solange appliziert, bis die Stromamplitude ein stabiles Plateau erreichte. Nach Erreichen des Plateaus wurde Glibenclamid 10 µM appliziert, bis sich die Stromamplitude wieder auf einem neuen Werte stabilisierte (Abb. 3). Die Zugabedauer der Kanalöffner bzw. -schließer wurden auf maximal 15 Cyclen begrenzt, da die Zellen mehr Cyclen oft nicht tolerierten.

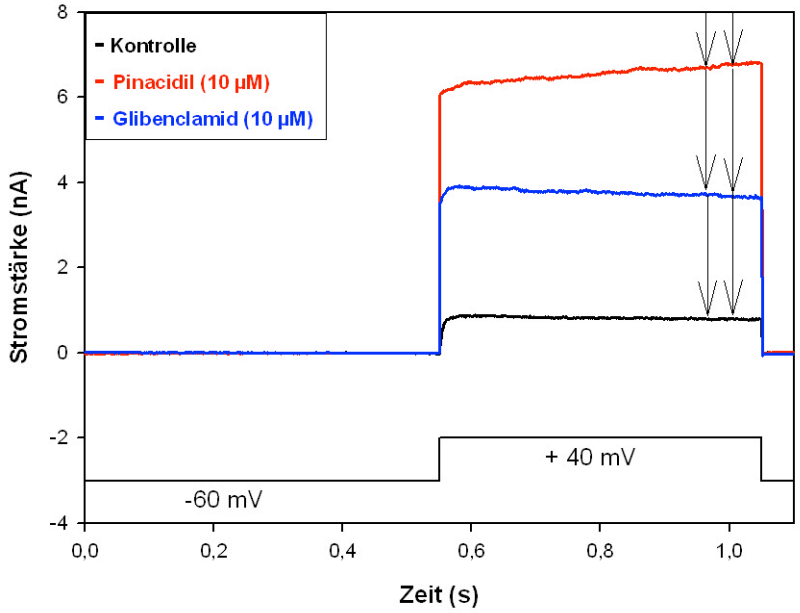


Abb.3 : Schema des Messprotokolls

Pulsprotokoll (unten) und ausgewählte Zellantworten unter Kontrollbedingung, kontinuierliche Einwirkung von Pinacidil (10 µM) und Glibenclamid (10 µM). Pfeile: Ermittlung der Stromamplitude. Messungen an TsA-Zellen, transfiziert mit mSUR2B/mKir.6.1.

2.4. Zellbiologie, Molekularbiologie/biochemische Verfahren

Zum molekularbiologischen Nachweis der K_{ATP}-Kanäle bei Raw264.7-Makrophagen wurde als molekularbiologische Methode die RT-PCR-Technik eingesetzt. Die Veränderung der Expression von apopotoserelevanten Proteinen erfolgte mittels Western Blot Analyse. Änderungen im Membranpotential der Mitochondrienmembran wurde mittels MitoPT™-Test detektiert und durch Durchflusszytometrie untersucht.

2.4.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, falls nicht gesondert aufgeführt von den Firmen Merck, Sigma-Aldrich, Roth, USB, Riedel-de Haen, Fluka und Bio-Rad bezogen. Für die Molekularbiologie wurden Enzyme der Firmen Roche, Invitrogen und Promega verwendet.

Produkt	**Firma**
Ampuwa	Fresenius-Kabi
peqGOLD RNAPure	peqlab
RNase Away	MBP Sandiego
SeaKem LE agarose	camberex
Glibenclamid	Tocris
EZ-Vision	amresco
50mM MgCl2	invitrogen
Primer SUR/Kir	Biomers
Acrylamid-Bis 29:1 30%	Serva
Aqua B. Braun	Braun
Milchpulver	Roth
Bovine Serum Albumin Fraction V	PAA Laboratories GmbH
DNAse I, RNAse-free	Roche
EDTA Dinatrium Dihydrat zur Analyse	AppliChem
Proteinase K	Roche
RNAse, DNAse-free	Roche
Sucrose	Fluka
Staurosporin ready made	Sigma- Aldrich
Bio-Rad Protein Assay	Biorad
Nitrozellulose-Membran	Biorad
Precision plus Protein-Standard Kaleidoscope	Biorad
Super Signal West Femto-Stable Peroxide Buffer	CIB Pierce
Super Signal West Femto-Luminol Enhancer Solution	CIB Pierce
GYY4137	Cayman Chemical

Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

RNase freies Wasser: 2 g DECP ad 1l Aqua dest.

TEB einfach: 0,45 mM Tris Cl; 0,45 mM Na-Borat; 10 mM EDTA pH 8,0

TBS 10fach: 0,1 M TrisHCL pH 8; 87,7 g NaCl ad 1 l Aqua dest.

Lower Buffer: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,4% SDS add 1 l Aqua dest.

Upper Buffer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,4% SDS add 1 l Aqua dest.

Blotting Buffer: 25 mM Tris; 0,2 M Glycin; 20% Methanol pH 8,5

Running Gel: Lower Buffer, Aqua dest., Acrylamide, Temed, APS

Stacking Gel: Upper Buffer, Aqua dest., Acrylamide, Temed, APS

LB-Medium für E.coli-Kultur:

0,5 % Hefe-Extrakt (Invitrogen); 1 % Trypton (Invitrogen); 0,5 % NaCl add 100 ml Aqua steril (Braun)

Dilutionspuffer für Western Blot:

Erst-Antikörper-Dilutionspuffer: 5 % BSA; 0,1 % Tween 20 in 1x TBS

BlottoA: 5 % Milchpulver; 0,05 % Tween 20 in 1x TBS

BlottoB: 1 % Milchpulver; 1 % BSA; 0,1 % Tween 20 in 1x TBS

Erst-Antikörper

Aktin HRP (c-11) Goat polyclonal IgG

Santa Cruz Biotechnology Sc 1615

1:1500

5 %- 10 % Milchpulver in TBS (1x); 0,05 % Tween 20

Bax

(rabbit polyclonal IgG)

Cell Signaling # 2772

1:1000

Erst-Antikörper- Dilutionspuffer, Blockier- und Waschlösung BlottoB

Bcl-xL

Santa Cruz Biotechnology Sc 11427

1:3000

BlottoA

Caspase-3

(rabbit polyclonal IgG)

Cell Signaling #9661

1:1000

Erst-Antikörper- Dilutionspuffer, Blockier- und Waschlösung BlottoB

Cytochrom-c

(rabbit polyclonal IgG)

Cell Signaling

1:1000

7,5 % Milchpulver in TBS (1x); 0,05 % Tween 20

Zweit-Antikörper

Als Zweit-Antikörper wurden die folgenden Produkte eingesetzt: **HRP rabbit** (goat anti-Rabbit sc 2004); Santa Cruz Biotechnology **HRP Anti-Goat** (sc 2020); Santa Cruz Biotechnology **GAM-HRP** 0,5 m L9701102 Rev C; Bio Rad

2.4.2 Geräte und Hilfsmittel

PowerPac Elektrophoresekammer	Bio-Rad
Gel Doc UV-Eluminater	Bio-Rad
Thermocycler	Roche
Thermomixer	Eppendorf
Combitips	Eppendorf
Entwicklergerät	Kodak
Gel-Blotting-Paper	Schleicher-Schuell
Hypercassette	Amersham Bioscience
Konisches Röhrchen 15ml, 50ml	Becton Dickinson
Magnetrührer MR 2002	Heidoplp
Magnetrührstäbe	PTFE Labware
Medical x-Ray film Cronex 5	Agfa
Messzylinder	Hirschmann
Mikroliter Syringes	Hamilton
Multipipette	Eppendorf
Multiply µStrip	Sarstedt
Parafilm PM 996	Pechiney

Pasteur Pipetten	VWR International
Pinzette	Milipore
Pipetboy	Biosciences
Pipetten	Eppendorf
Präzisionswaage	Satorius AG
Semi-Dry-Blotter	Bio-Rad
Shaker	ELMI
Spacer	Bio-Rad
Stripette 5ml, 10ml, 25ml	Corning
Trans-Blot Transfer Medium	Bio-Rad
Zentrifuge	Eppendorf
Kühlschränke	Liebherr
Gerfrierschrank -20°C	Liebherr
Gerfrierschrank -80°C	Haereus

2.5 Molekularbiologische Experimente RT-PCR

2.5.1 Zellaufbereitung und Präparation der Gesamt-RNA

Die Zellen wurden mit Zellschaber abgekrazt, auf $5x10^6$ verdünnt und bei -80°C gelagert. Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte mit dem *peqlab Gold*® der Firma peqlab. Dabei wurde das vom Hersteller empfohlene Standardprotokoll verwendet. Das Prinzip der Isolation beruht auf der Lyse der Zellen durch einen stark denaturierenden Guanidin-Isothiocyanat-Phenol-haltigen Puffer und einer anschließenden Fällung der RNA. Am Ende der Isolation wurde die Gesamt-RNA in 2x20 µl RNasefreiem Wasser eluiert und der Gesamt-RNA Gehalt photometrisch bestimmt. Anschließend wurde die RNA bei -80°C gelagert.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Konzentrationsbestimmung basiert auf dem Absorptions-maximum der Nukleinsäuren bei 260 nm. Für die Absorption sind dabei die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Die Messung erfolgt in Quarzküvetten, (Schichtdicke 1 cm) mit einer Verdünnung von 1:20.

Die RNA-Konzentration [C] wurde mit folgender Formel über das Photometer (Eppendorf) berechnet:

$C[\mu g/ml] = OD_{260} * V * F$

V: Verdünnungsfaktor, F: Multiplikationsfaktor

Für den Multiplikationsfaktor von RNA wurde nach Vorgabe des Herstellers der Wert 40 verwendet.

Bei der Messung wird auch die Absorption bei der Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Aus dem Verhältnis der OD_{260} und der OD_{280} erhält man eine Aussage über die Proteinkontamination in der Lösung. Für eine saubere RNA-Probe liegt der optimale Quotient zwischen 1,6 und 2,0.

2.5.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Da RNA nicht als Matrize für die Polymerasekettenreaktion eingesetzt werden kann, muss sie zuvor in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Diese Reaktion wird als Reverse Transkription (RT) bezeichnet. Da das reaktionskatalysierende Enzym, eine Reverse Transkriptase, nicht frei an den Templatestrang binden kann, müssen dem Reaktionsansatz Primer zugesetzt werden. Dafür wurden zufällige Hexamerprimer (random hexamers) der Firma Roche eingesetzt. Random hexamer Primer sind Oligonukleotide, die alle möglichen Hexamerkombinationen der vier Basen enthalten und somit unspezifisch mit allen RNA Spezies hybridisieren können. Dadurch wird gewährleistet, dass nicht nur mRNA, sondern auch rRNA und tRNA revers transkribiert werden. Das katalysierende Enzym welches im Rahmen dieser Untersuchung gewählt wurde, stammt aus dem moloney murine leukemia virus (MMLV-RT) der Firma Promega.

Bei allen RT-Reaktionen wurden 200 ng RNA in einem 25 µl Ansatz eingesetzt, so dass jeweils, eine 100%ige Transkription vorausgesetzt, von 8 ng/µl cDNA ausgegangen werden konnte.

2.5.4 PCR-Primerauswahl

Für die in dieser Arbeit verwendete PCR-Methode wurden Primerpaare benötigt, die die Exongrenzen überspannen. Damit wird gewährleistet, dass nur cDNA amplifiziert wird und Verunreinigungen mit genomischer DNA nicht zusätzlich zu einem Signal führen. Zur Primersynthese wurden mit Blast 2 Sequences im Internet (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) zunächst die Exon- und Introngrenzen der zu untersuchenden Gene analysiert.

Folgende mRNA- Sequenzen wurden dabei zugrunde gelegt:

Tab. 3: Eingesetzte Primer bei der PCR-Reaktion mit Angabe zur Detektion der jeweiligen α- und β- Untereinheit und der erwarteten Produktlänge der PCR-Amplifikate.

K_{ATP}-Untereinheit	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Produkt-länge
mSUR1	acggggcttctggtgatcctc	caggcgtctcccaaaggcat	384 kb
mSUR2	tccaggctgtccatcattctccag	cgatccgcaaaggctgtcatgac	335 kb
mKir6.1	cccggaggagtatgtgctggc	acagcggactccaggccactc	334 kb
mKir6.2	cgcttcgtgtccaagaaagg	cgtcacaagcatccactcctt	251 kb

2.5.5 cDNA-Quantifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR beruht auf einem Zyklus, der ebenfalls in mehrere Schritte unterteilt werden kann. Der initialen Denaturierung zur Trennung der DNA-Stränge folgt die Anlagerung der Primer an die single-stranded DNA (ssDNA). Mit einem weiteren Schritt, der Elongation, werden die Primer durch eine DNA-Polymerase verlängert, so dass die DNA im Anschluss wieder doppelsträngig vorliegt. Durch mehrfache Wiederholung dieses Zyklus kommt es schließlich zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA-Menge.

Um nun eine DNA-/cDNA-Probe mittels PCR zu untersuchen, ist es notwendig, das Protokoll der PCR so zu wählen, dass die Ampilfikate bei der Auswertung deutlich sichtbar und spezifisch sind. Im Verlauf der PCR wird dies dadurch sichergestellt, dass mit dem PCR-Ansatz für unterschiedlich viele Zyklen eine Gelelektrophorese durchgeführt wird, um anschließend die Bandenstärken auszuwerten. Durch die Darstellung der Bandenintensität als Maß für die Amplifikatmenge in Abhängigkeit von der Zykluszahl ist es dann möglich, die nötige Anzahl der Zyklen zu ermitteln, an dem sich die PCR-Reaktion im linearen Bereich befindet. Für einen Ansatz der PCR wurden 0,2 µl dNTP, 2 mM $MgCl_2$ und 0,1 µM je Primer unter 1x PCR-Pufferbedingungen mit 5 µl der cDNA und 1,25 U Taq-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 25 µl angesetzt.

Nach einer initialen Denaturierung von 5 Minuten bei 95°C wurde folgender Zyklus 30x wiederholt:

Denaturierung: 45 Sekunden bei 94°C

Annealing: 45 Sekunden bei 57°C

Elongation: 45 Sekunden bei 72°C

Die Proben wurden anschließend 10 Minuten auf 72°C erhitzt und abschließend auf eine Temperatur von 4°C abgekühlt. 10 µl der PCR Reaktion wurden im Agarosegel analysiert (siehe 2.5.7).

2.5.6 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese macht man sich die Wanderungseigenschaften der Nukleinsäuren im elektrischen Feld zu Nutze. Die Wanderungsgeschwindigkeit von Nukleinsäuren in einem Gel mit definierter Porengröße ist abhängig von der Länge, der Ladung, der Sekundär- und Tertiärstruktur der Nukleinsäuren. Große DNA-Fragmente durchlaufen Agarosegele langsamer als kleine, da die Agaroseporen kleineren Fragmenten weniger Widerstand entgegensetzen. Für eine gute Auftrennung der Fragmente wählt man je nach zu erwartender Fragmentlänge verschiedene Agarosekonzentrationen. Im Rahmen der Untersuchungen wurde ein 2 %iges Agarosegel eingesetzt. Das Agarosegel wurde hergestellt unter Verwendung des TBS-Puffers und 2 % Agarose. Um die Agarose zu lösen und gelierfähig zu machen, wurde das Gemisch (100 ml) bei 600 W 3 Minuten in der Mikrowelle (Bosch) aufgekocht. Anschließend wurde die Lösung in die Gelkammer, welche mit einem Probetaschenkamm präpariert war, gegossen. Nach Erstarren des Gels, wurde der Probetaschenkamm gezogen und 500 ml TBS-Puffer in die Kammer gegossen.

2.5.7 Auswertung der PCR-Gelelektrophorese

Eine Spannung von 90 V über 1 Stunde trennte die DNA-Banden im Agarosegel auf. Zur Analyse der PCR-Rreaktion wurden die PCR-Produkte 1:5 mit dem Ladepuffer EZ-Vision versetzt. EZ-Vision dient gleichzeitig auch als interkalierender Floureszensfarbstoff für die Auswertung der PCR-DNABanden unter dem UV-Schirm.

Zur Auswertung der DNA-Auftrennung wurde das Agarosegel in den UV-Imager der Firma Biorad eingelegt. Die Auswertung der Gelelektrophorese erfolgte mit dem Programm Gel-DOC der Firma Biorad.

2.5.8 Behandlung der Raw246.7-Makrophagen mit H_2S

Die mit H_2S zu behandelnde Zellen wurden am 2. Tag nach Anlegen der Kultur in eine Begasungskammer gegeben. Die Zellen wurde 200 ppm H_2S ausgesetzt und

24 Stunden lang inkubiert. Danach wurden die Zellen vom Medium abgetrennt und und mit Hilfe der RT-PCR bzw. der Patch-Clamp Methode untersucht.

2.6 Biochemische und Zellbiologische Experimente

2.6.1 Vorbehandlung der Raw264.7-Makrophagen

Für die biochemischen Experimente wurden Raw246.7-Makrophagen 12h vor dem ersten Stimulationszeitpunkt, wie unter 2.1 beschrieben, in Zellkulturflaschen ausgesät.
Die Vorbehandlung mit erfolgte mit GYY4137 300 µmol. Als K_{ATP}-Kanal Schließer wurde 5-Hydroxydecanoat 100 µmol und Glibenclamid 100 µmol verwendet. Die Zugabe erfolgte 2h vor der Stimulation mit E.coli.

2.6.2 Stimulation mit E.coli

Die Raw264.7-Makrophagen wurden nach der Vorbehandlung mit H_2S und Glibenclamid bzw. 5-Hydroxydecanoat für eine Stunde mit 5x10*6 E.coli Top10 inkubiert. Dies entspricht einer 1:100 verdünnten E.coli-Suspension mit einer optischen Dichte zwischen 0,5 und 0,6. Nach der Stimulation mit E.coli wurden die Raw246.7-Makrophagen mit PBS und Präkonditionierungssubstanz.

2.6.3 Gesamzelllysat

Raw264.7-Makrophagen wurden in Medium abgekratzt und mit PBS durch Zentrifugation zweimal gewaschen. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Zellen wurden mindestens 30 min auf Eis mit 2 fach konzentriertem Puffer für Gesamtzelllysat (100 mM Tris pH 7,6; 500 mM NaCl; 6 mM EDTA; 6 mM EGTA; 1 % Triton-X-100; 0,5 % NP 40; 10 % Glycerol; Protease-Inhibitoren (β-Glycerolphosphat 2 mM; DTT 4 mM; Leupeptin 20 µM; Natriumorthovanadat 0,2 mM)) lysiert. Anschließend wurde das Lysat 30 min bei 20000 gE und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet aus Zellresten verworfen.
Die Proteinmenge des Gesamtzelllysats wurde photometrisch bestimmt und die Proben wurden so eingestellt, dass eine Endkonzentration von 0,5 µg/µl vorlag. Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen 2fach Probenpuffer (2 % SDS; 125 mM Tris-HCL (pH 6,8 bei 25°C); 10 % Glycerol; 50 mM DTT; 0,01 %

Bromophenolblau) versetzt und anschließend 5 min bei 95°C gekocht. Die erhaltenen Gesamtzelllysate wurden ausschließlich für Western Blots eingesetzt.

2.6.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Bio-Rad Protein-Assay Dye Reagent Concentrate (450 ml, Bio-Rad Laboratories GmbH). Der Assay beruht auf dem Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford. Der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250 verlagert bei Proteinbindung sein Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm. Als Proteinstandard diente bovines Serumalbumin. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Herstellerangaben und ermöglichte die Konzentrationsbestimmung im linearen Bereich einer Eichgeraden. Die Messung wurde am Spektrophotometer GeneQuant pro durchgeführt.

2.6.5 Proteinauftrennung und Transfer

Für das Auftrennen der Proteine wurden 10%ige und 15%ige Polyacrylamid-Trenngele (29:1) verwendet, je nach Größe des zu untersuchenden Proteins. Dem eigentlichen Trenngel war nach der Methode nach Lämmli ein Sammelgel vorgeschaltet, dessen pH-Wert um zwei Einheiten tiefer liegt als im Trenngel. Dies führt zu einer Verschärfung der Proteinbanden und somit zu einer besseren Trennung. Für die Proteinauftrennung wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:1 mit zweifach Probenpuffer (2% SDS; 125 mMTris-HCl pH 6,8, 10% Glycerol, 50 mM DTT, 0,01% Bromphenolblau) gemischt und anschließend bei 95°C gekocht. Dadurch konnte eine vollständige Denaturierung der Proteine gewährleistet werden. Außerdem lagen die Proteine dadurch gleichmäßig negativ geladen vor. Somit erfolgte eine Trennung ausschließlich anhand der Molekülgröße. Das Volumen pro Tasche betrug 10 µl. Als Marker wurden 8 µl Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (Bio-Rad) aufgetragen. Die Proteintrennung erfolgte für 15 min bei 90 V und für ca. 35 min bei 180 V. Die aufgetrennten Proteine wurden mittels Halbtrockenverfahren auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Hierzu wurde das Gel auf eine mit Blottpuffer getränkte Nitrozellulose-Membran gelegt. Der Transfer fand bei 20 V für 60 min statt. Die Gleichmäßigkeit der Proteinladung wurde anschließend mithilfe der Ponceau-Färbung überprüft.

2.6.5 Antikörperinkubation

Fertige Blots wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockpuffer blockiert. Sofern nicht anders beschrieben, diente der Blockpuffer gleichzeitig als Waschpuffer und Antikörperdiluent. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach dieser Inkubationszeit wurde der Blot sechsmal sieben Minuten lang gewaschen. Der zweite Antikörper wurde eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit dem Blot inkubiert. Nach Abwaschen des ungebundenen Zweitantikörpers wurde der Blot noch zweimal sieben Minuten mit PBS bzw. TBS pH 7,6 oder pH 8,0 gewaschen. Die Detektion des Zweitantikörpers erfolgte mit dem Chemilumineszenz-Reagenz Supersignal (CellSignaling) nach Herstellerangaben. Die Exposition erfolgte auf Agfa Cronex-5-Filmen. Die einzelnen Proteinbanden wurden mittels Adobe Photoshop aus dem Film ausgeschnitten, anschließend erfolgte eine densitometrische Auswertung der Western Blots mittels des frei verfügbaren Programmes ImageJ, welches durch das National Institute of Health entwickelt wurde. Die Analyse geschah entsprechend der Programmanleitung.

2.6.6 Sulfidbestimmung

Zur Sulfidbestimmung wurde ein Gaschromatographie / Massenspektrometrie-Verfahren unter Verwendung eines Bis-pentafluorobenzyl-Derivat eingesetzt. Dieses Verfahren ermöglicht eine Bestimmung von Sulfid in kleinen Probenvolumina unter milden chemischen Bedingungen. Die Probe wird in eine Mischung, bestehend aus 400 ul internem Standard (5 µg/ml Tribrombenzol in Isooctan), 200 ul Alkylierungsreagenz (10 µl/ml Pentafluor-Benzylbromid in Isooctan) und 400 ul des Phasentransferkatalysator (2mg/ml tetradecyldimethylbenzylammoniumchlorid in Natrium-Tetraborat gesättigtem Wasser) gegeben. Nach der Probenaufbereitung wurden in einem Agilent 5890/5970 Gaschromatographie / Massenspektrometrie Instrument die Probe untersucht. Die Sulfid-Freisetzung aus GYY4137 wurde über 24 Stunden im Zellkulturmedium gemessen.

2.7 Zellbiologische Experimente

Die Initierung der zellulären Apoptose kann anhand einer mitochondrialen Permeabiltäts-Tests (MitoPT™) sichtbar gemacht werden. Durch eine Änderung des Membranpotentials der mitochondrialen Membran, kann frühzeitig die

Einleitung der Apoptose detektiert werden.
Das mitochondriale Membranpotential wurde mit Hilfe des Farbstoffes JC-1 gemessen. Bei dem Farbstoff handelt es sich um ein membranpermeables Cyanid mit einer delokalisierten positiven Ladung. Der Farbstoff kann sowohl in monomerer Form als auch in Aggregatform vorliegen. Die monomere Form wird in die Mitochondrienmatrix eingeschleust. Da es sich um ein positiv geladenes Molekül handelt, nimmt der Einstrom mit dem Anstieg des mitochondrialen Membranpotentials zu. Bei einem Schwellenwert des Membranpotentials von 80 bis 100 mV werden reversibel JC-1-Aggregate gebildet. Die monomere Form des JC-1 emittiert nach Laseranregung Licht einer Wellenlänge von 527 nm im grünen Bereich, die Aggregatform orange-rotes Licht einer Wellenlänge von 590 nm. Somit weisen Zellen mit hohem mitochondrialem Membranpotential eine orange-rote Fluoreszenz, Zellen mit niedrigem mitochondrialem Membranpotential eine grüne Fluoreszenz auf.

2.7.2 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die beiden Tragstege der Zählkammer wurden hierzu mit etwas Wasser benetzt und das Deckglas mit leichtem Druck über die Kammer geschoben, bis das Erscheinen der Newtonschen Ringe auf den Stegen den korrekten Abstand anzeigten. Die Zellsuspension wurde mittels Kapillarkräften zwischen Zählkammer und Deckglas gegeben. Die Zahl der Zellen von vier Großquadraten wurde am Mikroskop bestimmt.
Zur Färbung der Mitochondrien wurden jeweils $1x10^6$ Zellen verwendet.

2.7.3 Floureszensfärbung der Mitochondienmembran

Für die einzelnen Versuche mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 dienten vorbereitete Aliquots: 20 µl JC-1 wurden mit 980 µl Tris-HCL (5mM, pH 8,2 + 1%DMSO) verdünnt und sorgfältig gelöst. Danach erfolgte das kurze Abzentrifugieren bei 12000 rpm für 20 Sekunden. Der daraus gewonnene Überstand wurde von dem schlecht lösbaren Anteil JC-1 getrennt, in ein neues Eppendorfhütchen überführt und in kleine Portionen à 20-50 µl aliquotiert. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei -20 °C.
Der Fluoreszenzfarbstoff JC-1 wurde dann mit der Menge von 25 µl unter stark

lichtreduzierten Arbeitsbedingungen in 500 µl entsprechend vorbehandelten Raw264.7-Makrophagen Zellsuspension pipettiert.
Die Zellen wurden für die Dauer von 15 Minuten mit dem JC- 1 Farbstoff im Brutschrank bei 37° C und 5%-iger CO_2 Atmosphäre inkubiert. Nach Ablauf der Zeit schloss sich unmittelbar eine fünfminütige Zentrifugation an, die bei 1500 rpm erfolgte. Um den Anteil an extrazellurären Farbstoffaggregaten zu minimieren, wurden die Proben hiernach 3x mit 1000 µl PBS gewaschen. Danach wurden die Proben unmittelbar mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei wurden je 10.000 Zellen je Probe hinsichtlich ihrer Fluoreszenz analysiert.

2.7.4 Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Analysen wurden mit Hilfe eines Durchflusszytometers mit der Bezeichnung FACS Canto der Firma Becton Dickinson (BD) Biosciences durchgeführt. Die Abkürzung FACS steht hierbei für *fluorescence-activated cell sorting*. Diese Technik ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren. Die Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse eignet sich daher als Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage ist die Antigen-Antikörper- Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung einzeln an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenmenge, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Zusätzlich werden durch die Beugung und Streuung des Lichtes Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (z.B. Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns) der Zellen gewonnen. Eine gleichzeitige FACS - Messung mit verschiedenen

Fluoreszenzfarbstoffen wie JC-1 ist möglich, da sich die eingesetzten Farbstoffe zwar häufig bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emmissionsspektren verfügen. Für die bei dieser Untersuchung durchgeführten Versuche wurden je Probe 10.000 Zellen auf die beschriebene Weise analysiert. Die anschließende Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit der Software *FACS Diva* (BD Biosciences).

2.8 Statistische-Verfahren Molekularbiologie, Biochemie und Zellbiologie

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die Mittelwerte sowie die Standartabweichung werden dargestellt. Die Berechnung dieser Werte erfolgte mit Microsoft Excel und Sigma Stat. Anschließend wurde eine deskriptive Statistik durchgeführt. Die statistische Beratung erfolgte durch das Institut für Biometrie der Universität Ulm.

3 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Untersuchung zum Einfluss von H_2S auf die K_{ATP}-Kanäle von Raw267.4-Makrophagen vorgestellt. Dabei werden in Kapitel 3.1 und 3.2 zunächst die funktionellen Untersuchungen zu zellwandgebundenen K_{ATP}-Kanälen behandelt. Die molekularbiologische Untersuchung der K_{ATP}-Kanäle an Raw264.7-Makrophagen wird in Kapitel 3.3 beschrieben. Kapitel 3.4 bis 3.7 beschäftigt sich mit der Auswirkung der K_{ATP}-Kanal –Öffner und –Schliesser sowie H_2S auf biochemische und zellbiologische Prozesse von Raw264.7-Makrophagen.

3.1 K_{ATP}-Kanälen in der Zellmembran

Die funktionellen Untersuchungen der K_{ATP}-Kanäle wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik in der Whole-Cell-Konfiguration durchgeführt.

3.1.1 mSUR2B/mKir6.1

Während beim Haltemembranpotential von -60 mV keine nennenswerten Ströme vorlagen, traten während der Depolarisation auf +40 mV auch in Abwesenheit von spezifischen Aktivatoren von K_{ATP}-Kanälen bereits deutliche Auswärtsströme auf (Abb. 3, schwarze Linie). Dieser Strom blieb bei mehrfacher Wiederholung des Sprungprotokolls unter Kontrollbedingungen bei einer Zelle konstant (Abb. 3, schwarze Punkte). Bei der Beispielmessung, die mit der Untereinheitenkombination mSUR2B/mKir6.1 durchgeführt wurde, lag der unspezifische Strom bei 0,6 nA. Dieser Werte wurde unmittelbar vor Ende der Depolarisation ermittelt (s. Abb. 2, Pfeile). Bei 5 weiteren Zellen variierte dieser Strom zwischen 0,4 und 0,6 nA um einen Mittelwert von 0,5 nA ± 0,1 nA. Die Natur dieser nativ vorhandenen potentialabhängigen Kaliumkanäle wurde nicht weiter untersucht. Da diese Ströme klein und für den funktionellen Nachweis der einzelnen Untereinheiten unerheblich waren, wurden in den folgenden Darstellungen die Sginalamplituden für diesen unspezifischen Wert nicht korrigiert. Bei Zugabe des K_{ATP}-Kanalöffners Pinacidil (10 µM) kam es dann zu einer zeitabhängigen Zunahme des Auswärtsstroms (Abb. 3,3; rot). Die Geschwindigkeit mit der die ATP-abhängigen Kalium-Kanäle durch Zugabe von Pinacidil öffneten, war in geringem Umfang variabel. Im Allgemeinen wurde nach 5-10

Wiederholungen (Gesamteinwirkdauer von Pinacidil ca. 30-60 Sekunden) ein annährend konstanter Wert erreicht. Bei der angegebenen Kombination lag dieser Wert bei 7,9 ± 1,2 nA (n=6). Durch den Wechsel auf Glibenclamid (10 µM) kam es zum Schließen der K_{ATP}-Kanäle, was sich wiederum an einer zeitabhängigen Abnahme des Auswärtsstromes zeigte (Abb. 3; blau). Nach 5-10 Sprungprotokollen unter Glibenclamid stabilisierte sich die Stromamplitude auf einem konstanten Wert. Dieser lag bisweilen sogar unter dem anfänglichen Kontrollwert, was darauf hindeutet, dass entweder zu Beginn der Messung nicht alle ATP-abhängigen Kaliumkanäle geschlossen waren oder aber, dass Glibenclamid auch die anderen, nicht näher spezifizierten Kaliumkanäle teilweise blockierte.

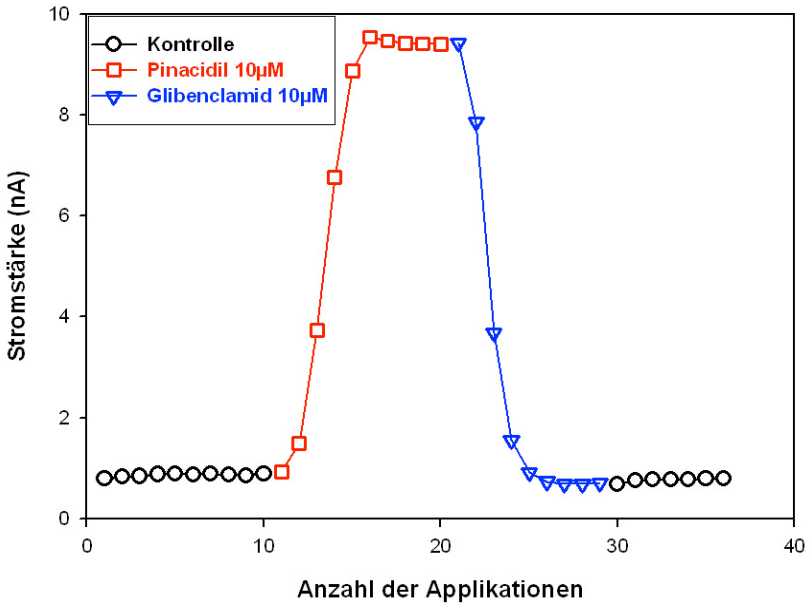


Abb. 4 : K_{ATP} – vermittelte Ströme bei mSUR2B/mKir.6.1

Verlauf der Stromamplituden unter den in Abb. 3 angegebenen Bedingungen bei der Applikation von K_{ATP}-Kanal -Öffner bzw. -Schließer. Die Stromamplitude wurde jeweils kurz vor Ende des Depolarisationssprungs auf +40 mV ermittelt. Die Applikation von Pinacidil bzw. Glibenclamid ist farbig hervorgehoben. Die Messungen wurden an TsA-Zellen gewonnen, die mit der Untereinheitenkombination mSUR2B/mKir.6.1 transfiziert wurden.

3.1.2 mSUR2B/mKir6.2

Bei den Untersuchungen der Untereinheitenkombination mSUR2B/mKir6.2 lagen die Werte unter Kontrollbedingung bei 0,3 ± 0,1 nA (n=6). Nach der Applikation von Pinacidil 10 µM wurde ein Plateau von 5,9 ± 2,1 nA (n=6) errreicht. Durch die Applikation von Glibenclamid 10 µM wurden die Ausgangsströme wie auch bei der K_{ATP}-Kanalkombination mSUR2B/mKir6.1 teilweise unterschritten.

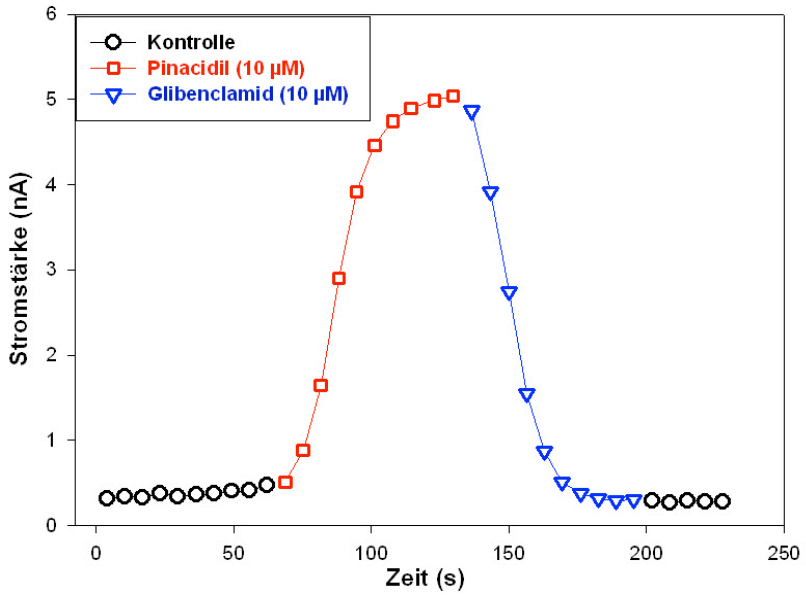


Abb. 5: K_{ATP} – vermittelte Ströme bei mSUR2B/mKir.6.2

Zeitlicher Verlauf der Stromamplituden unter den in Abb. 2 angegebenen Bedingungen. Die Stromamplitude wurde jeweils kurz vor Ende des Depolarisationssprungs auf +40 mV ermittelt. Die Applikation von Pinacidil bzw. Glibenclamid ist farbig hervorgehoben. Die Messungen wurden an TsA-Zellen gewonnen, die mit der Untereinheitenkombination mSUR2B/mKir.6.2 transfiziert wurden.

3.1.3 mSUR1/mKir6.2

Die Messung von der K_{ATP}-Kanalkombination mSUR1/mKir6.2 wurde mit Diazoxid 10 µM als Kanalöffner und Glibenclamid 10 µM als Kanalschließer durchgeführt. Bei der Verwendung von Pinacidil (10 µM) war keine Kanalöffnung zu erzielen (ohne Darstellung). Bei 6 Messungen lagen die Ausgangsströme bei der Applikation Kontrollösung bei 0,6 ± 0,2 nA (n=6). Durch die Applikation von Diazoxid 10 µM wurde eine Plateau mit Strömen von 9,3 ± 1,1 nA erreicht. Mit der Applikation von Glibenclamid 10 µM wurde der Kanaltyp mSUR1/mKir6.2 sehr rasch und mit wenigen Zyclen geschlossen.

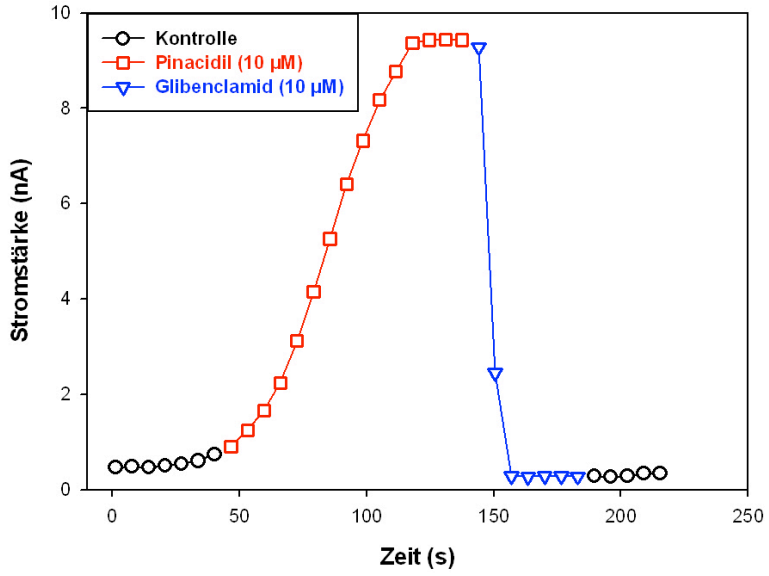


Abb. 6: K_{ATP} – vermittelte Ströme bei mSUR1/mKir.6.2

Zeitlicher Verlauf der Stromamplituden unter den in Abb. 2 angegebenen Bedingungen. Die Stromamplitude wurde jeweils kurz vor Ende des Depolarisationssprungs auf +40 mV ermittelt. Die Applikation von Diazoxid bzw. Glibenclamid ist farbig hervorgehoben. Die Messungen wurden an TsA-Zellen gewonnen, die mit der Untereinheitenkombination mSUR1/mKir.6.2 transfiziert wurde.

3.1.4 mSUR2A/mKir6.2

Bei der K_{ATP}-Kanalkombination mSUR2A/mKir6.2 wurde die Messung mit Pinacidil 10 µM als Kanalöffner und Glibenclamid 10 µM als Kanalschließer durchgeführt. Mit Pinacidil 10 µM konnten Ströme von 5,5 ± 1,2 nA (n=4) beim Öffnen der Kanäle bei dieser K_{ATP}-Kanalkombination erreicht werden. Durch die Applikation von Glibenclamid 10 µM konnten die Zellen wieder auf die Ausgangswerte der Kontrollösung gebracht werden. Insgesamt waren alle Zellen dieser Kanalkombination bei den Messungen sehr instabil. Viele der Zellen mussten während der Messung aufgrund von spontanen Kanalöffnungen bei der Applikation von der Kontrollösung verworfen werden.

Insgesamt können mit den gewählten Protokollen sämtliche in vivo bekannte Kanalkombinationen können durch das etablierte Messprotokoll erfaßt werden. Unterschiede bezüglich der Kanalöffner und relativer Signalstärke sind in Tabelle 4 nochmals zusammengefasst.

Tab. 4: Zusammenfassung der Messergebnisse der transfizierten TsA-Zellen. Qualitatitve Bewertung der Kanalöffner und -schließer für die untersuchten Untereinheitenkombination

Untereinheit / Wirkstoff	mSUR1/ mKir6.2	mSUR2A/ mKir6.2	mSUR2B/ mKir6.2	mSUR2B/ mKir6.1
Diazoxid 10 µM	**+**	**-**	**(+)**	**(+)**
Pinacidil 10 µM	**-**	**+**	**+**	**+**
Glibenclamid 10 µM	**+++**	**+**	**+**	**+**

3.1.5 Die Wirkung von H_2S auf ATP-abhängige Kaliumkanäle

Um die Eigenschaften von H_2S als K_{ATP}-Kanalöffner zu untersuchen, wurde Na_2S (Natriumsulfid) in einer Konzentration von 10 -100 µM anstelle von Diazoxid oder Pinacidil appliziert. Na_2S wirkt in wässriger Lösung als H_2S Donator. Um das starke Ausgasen von H_2S aus der Applikationslösung zu verringern und somit die eingesetzte Konzentration so konstant wie möglich zu halten, wurde die Lösung für jede Messung neu zubereitet. Bei den Voruntersuchungen zeigte sich, dass Na_2S bei einer Konzentration von 100 µM ähnliche Wirkung wie die beiden K_{ATP}-Kanalöffner zeigte. Der Wirkung von Na_2S 100 µM als K_{ATP}-Kanalöffner trat langsamer ein als die Wirkung von Diazoxid 10 µM oder Pinacidil 10 µM. Somit war nach den vorgegebenen 15 Cyclen noch kein stabiler Endwert erreicht. Wurde nach der Applikation von Na_2S 100 µM noch Pinacidil 10 µM bzw. Diazoxid 10 µM verabreicht, so konnten die Stromamplituden noch weiter gesteigert werden (Abb. 6). Dadurch konnten wie bei der Kanalkombination mSUR2B/mKir6.2 mit der Applikation von 10 µM Pinacidil üblich, Ströme um 5,5 ± 1,1 nA (n=6) gemessen werden. Nach Erreichen des Plateauwertes konnten die Kaliumkanäle mit Glibenclamid wieder vollständig geschlossen. Somit ist gezeigt, dass die Stromzunahme durch Na_2S (100 µM) auf der Aktivierung von K_{ATP}-Kanälen beruht.

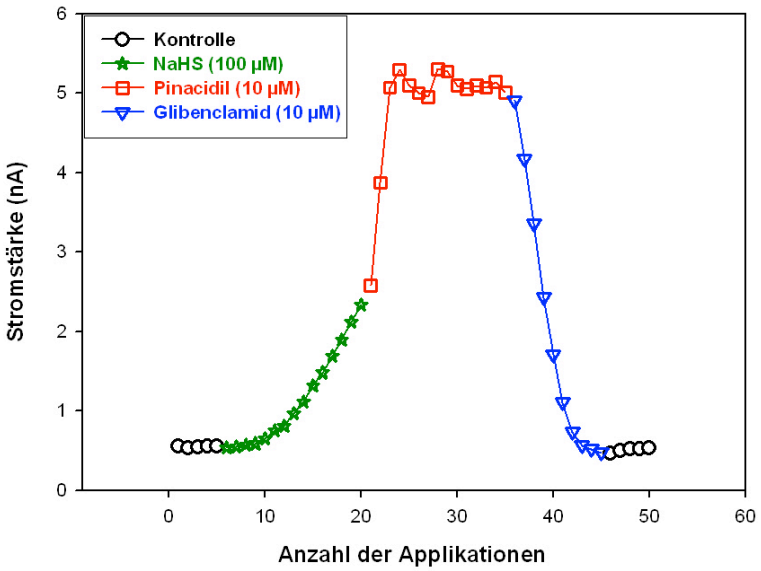


Abb. 7: Messung der K_{ATP} – Kanalströme bei mSUR2B/mKir.6.2

Öffnung und Schließung von K_{ATP}-Kanälen an TsA-Zellen kloniert mit mSUR2B und mKir6.2 mit Na_2S 100 µM, Pinacidil 10 µM und Glibenclamid 10 µM. Die Stromamplitude wurde jeweils kurz vor Ende des Depolarisationssprungs auf +40 mV ermittelt. Die Applikation von Na_2S, Pinacidil bzw. Glibenclamid ist farbig hervorgehoben. Die Wirkung von Na_2S 100µM tritt deutlich langsamer als die Wirkung von Pinacidil 10 µM ein. Nach 15 Applikationen von Na_2S 100µM wurde Pinacidil 10 µM zum weiteren Öffnen der Kaliumkanäle verwendet.

3.2 Funktionelle Untersuchung von K_{ATP}-Kanälen an Raw264.7-Makrophagen

Da in der Literatur das Vorhandensein von K_{ATP}-Kanälen an PMNL beschrieben ist, wurden die Raw264.7-Makrophagen mit dem an klonierten TsA-Zellen etablierten Protokoll untersucht. Mit den beiden Kanalöffnern Diazoxid und Pinacidil konnte selbst bei Konzentrationen bis 100 µM kein nennenswerter Stromanstieg erreicht werden (Abb. 7). Bei der Applikation von Na_2S 100 µM konnte ebenfalls kein Anstieg der Stromstärke erzielt werden. Da durch die Applikation von Glibenclamid auch keine Abnahme des unspezifischen Kaliumstroms erreicht werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass keine K_{ATP}-Kanäle geöffnet waren und die Raw264.7-Makrophagen somit über keine funktionellen K_{ATP}-Kanäle verfügen (Abb. 7).

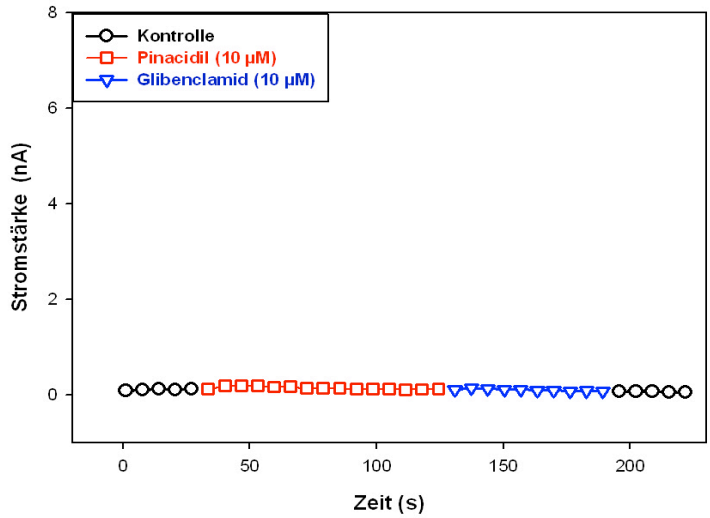


Abb. 8: K_{ATP} – vermittelte Kanalströme bei nativen Raw264.7-Makrophagen

Zeitlicher Verlauf der Stromamplituden unter den in Abb. 2 angegebenen Bedingungen. Die Stromamplitude wurde jeweils kurz vor Ende des Depolarisationssprungs auf +40 mV ermittelt. Die Applikation von Pinacidil bzw. Glibenclamid ist farbig hervorgehoben. Die Messungen wurden an nativen Raw264.7-Makrophagen durchgeführt.

3.3 Molekularbiologischer Nachweis von K_{ATP}-Kanälen mit Hilfe der PCR

Da bei den Makrophagen überraschenderweise keine funktionellen, zellwandgebundene K_{ATP}-Kanäle nachgewiesen werden konnten, sollte mit Hilfe der PCR-Methode geklärt werden, ob und ggf. welche Untereinheiten der K_{ATP}-Kanäle bei den Raw267.4-Makrophagen vorhanden sind.

3.3.1 Nachweis der α- und β-Untereinheiten

Die Überprüfung der Primer und die Optimierung der PCR-Bedingungen erfolgte wiederum an den TsA-Zellen, welche mit den verschiedenen α- und β-Untereinheiten der K_{ATP}-Kanäle transfiziert wurden. Unter den optimierten Bedingungen konnten bei den transfizierten Zellen sämtliche Untereinheiten nachgewiesen werden. Die Positivkontrollen wiesen jeweils eine einzige Bande im erwarteten Größenbereich auf. Nebenprodukte traten nicht auf. Bei nicht-transfizierten TsA-Zellen wurde kein K_{ATP}-Kanal PCR-Produkt nachgewiesen. Bei den Raw264.7-Makrophagen konnte nur bei der Untersuchung auf mKir6.2 ein PCR-Produkt nachgwiesen werden (Abb. 8B). Sowohl bei der Überprüfung auf mSUR1, mSUR2 als auch auf mKir6.1 war kein Amplifikat festzustellen. Mit den Primern für mSUR2 hätten sowohl SUR2A als auch SUR2B detektiert werden können (Abb. 9).

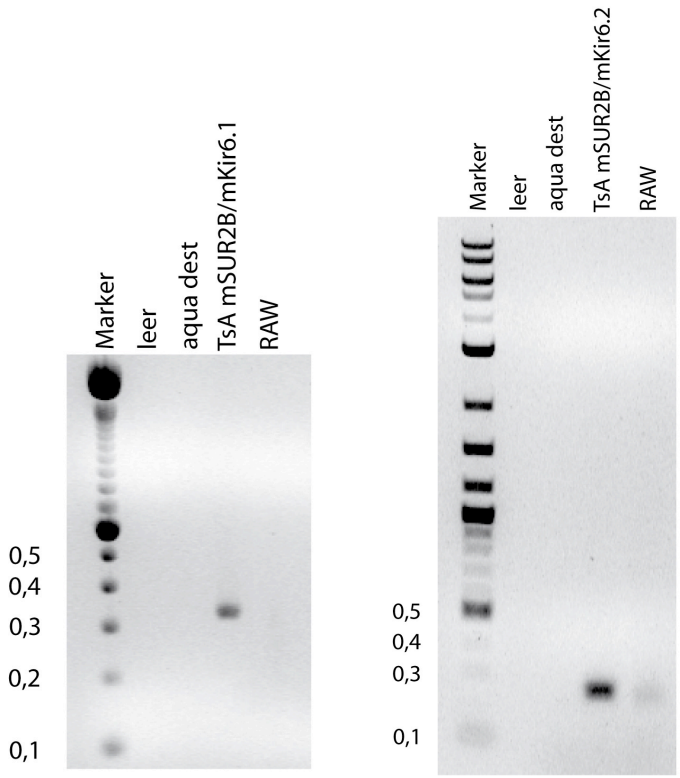


Abb. 9: PCR-Nachweis von mKir6.1 und mKir6.2 Untereinheiten bei Raw264.7-Makrophagen
A) RT-PCR von Raw264.7-Makrophagen zum Nachweis von mKir6.1. Als Positiv-Kontrolle wurden mit mKir6.1 transfizierte TsA-Zellen verwendet. Aqua dest. wurde zur Negativ-Kontrolle im PCR-Protokoll verwendet. Das PCR-Amplifikat der Positiv-Kontrolle erscheint um 334 kb. Bei Raw264.7-Makrophagen erscheint kein PCR-Amplifikat. B) RT-PCR von Raw264.7-Makrophagen zum Nachweis von mKir6.2. Als Positiv-Kontrolle wurden mit mKir6.2 transfizierte TsA-Zellen verwendet. Aqua dest. wurde zur Negativ-Kontrolle im PCR-Protokoll verwendet. Das Ampilfikat erscheint als Einzelbande an der erwarteten Größe. Die Bande des PCR-Amplifikates für mKir6.2 für die Positiv-Kontrolle und dieRaw264.7-Makrophagen erscheint bei einer Größe um 251 kb.

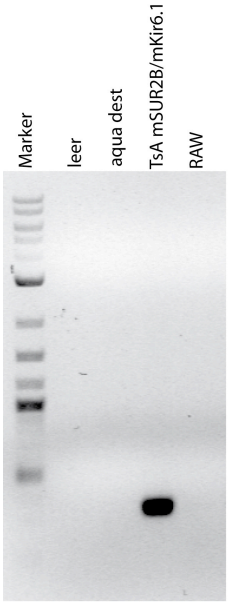


Abb. 10: PCR-Nachweis von mSUR2 Untereinheiten bei Raw264.7-Makrophagen
RT-PCR von Raw264.7-Makrophagen zum Nachweis von mSUR2. Als Positiv-Kontrolle wurden mit mSUR2B transfizierte TsA-Zellen verwendet. Die Negativ-Kontrolle zur Protokollprüfung ist Aqua dest.. Das PCR-Amplifikat der Positiv-Kontrolle erscheint bei einer Größe um 335 kb. Bei Raw264.7-Makrophagen erscheint keine Bande bei der erwarteten Größe.

3.4 Induktion der SUR-Untereinheit durch H_2S

Aus Untersuchungen anderer Organsysteme ist bekannt, dass H_2S seine Wirkung in unterschiedlichen Zeitfenstern entfalten kann. Für den Herzmuskel ist bekannt, dass H_2S eine Hochregulation der K_{ATP}-Untereinheiten bewirkt (Bian et al., 2006). In einem nächsten Schritt wurde nun untersucht, ob H_2S bei den Makrophagen vergleichbares bewirken kann. Dazu wurden Raw264.7-Makrophagen 24 Stunden lang einer H_2S Konzentration von 200 ppm ausgesetzt. Anschließend wurde die RNA der Makrophagen nach dem Standardprotokoll extrahiert. Es folgte die PCR-Analyse der mSUR1/mSUR2 und mKir6.1/mKir6.2 Untereinheiten.

Das im 2 %igen Agarosegel visualisierte PCR-Amplifikat zeigt bei allen H_2S behandelten Zellen Doppelbanden. Durch die Behandlung der Makrophagen mit H_2S erscheint die Untereinheit mSUR2 und mKir6.1 annähernd an der erwarteten Amplifikatsgröße. PCR-Amplifikate der Untereinheit mKir6.2 (nicht gezeigt), welche auch bei unbehandelten Raw264.7-Makrophagen detektiert wurden, zeigten sich ebenfalls bei H_2S-behandelten Raw264.7-Makrophagen, allerdings mit der Bildung von Dopplebanden. An Raw264.7-Makrophagen konnte mit diesem PCR-Protokoll mSUR1 nicht nachgewiesen werden.

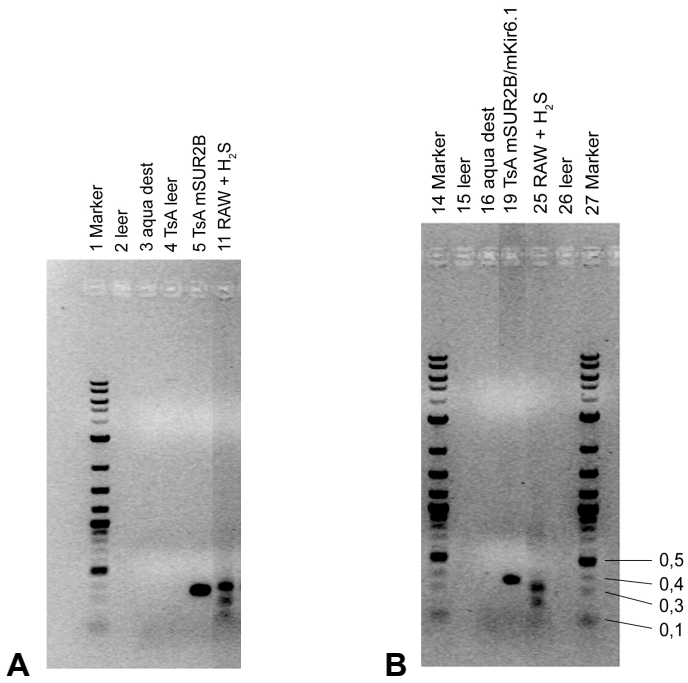


Abb. 11: Ausschnitt der PCR-Nachweise von Raw264.7-Makrophagen nach 24h H_2S Behandlung.

Expression und Aktivierung der K_{ATP}-Untereinheiten mSUR2 und mKir6.1. Das 2%ige Agarosegel zeigt einen Ausschnitt der mit H_2S 200 ppm präkonditionierten Raw264.7-Makrophagen. A: Auf Bahn 5 erscheint das PCR-Amplifikat im Bereich um 335 kb für die mSUR2 Positiv-Kontrolle bei transfizierten TsA-Zellen. Auf Bahn 11 erscheint das PCR-Amplifikat für Raw264.7-Makrophagen nach 24h H_2S Behandlung etwas unterhalb der erwarteten Größe von 335 kb mit Doppelbanden. B: Auf der Bahn 19 erscheint das PCR-Amplifikat der Positiv-Kontrolle für mKir6.1 im Bereich von 334 kb. Auf der Bahn 25 erscheint das PCR-Amplifikat für Raw264.7-Makrophagen nach 24h H_2S Behandlung etwas unterhalb des erwarteten Bereiches um 334 kb mit Doppelbanden. Zur übersichtlicheren Darstelllung der Ergebnise wurden die Spuren aus einem Gel ausgeschnitten und zusammengefügt.

3.5 Wirkung von H_2S auf pro- und antiapoptotische Proteine bei Raw264.7-Makrophagen

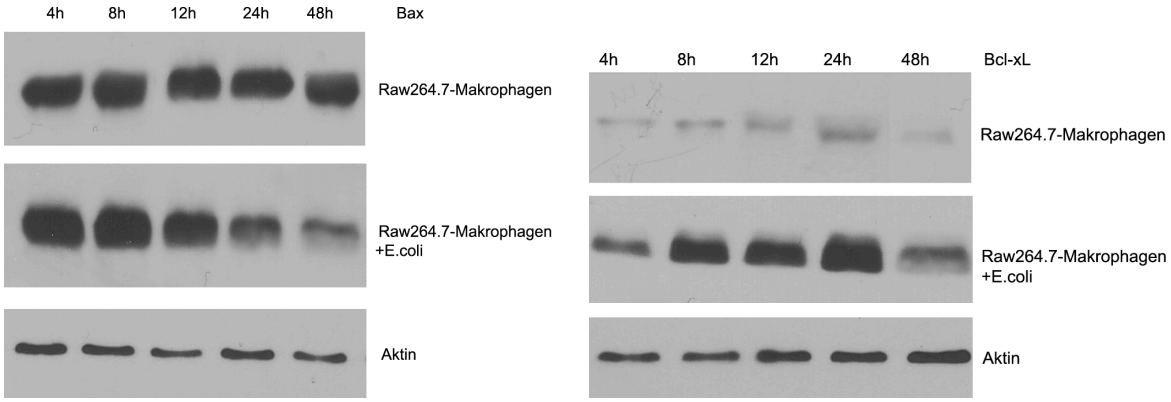
Eine wichtige Funktion von Makrophagen besteht u.a. darin bakterielles Material durch Phagozytose zu eliminieren. Wenn die Phagozytose der Bakterien den programmierten Zelltod (Apoptose) der Makrophagen einleitet, spricht man von einer Phagozytose-induzierten Apoptose. Im Gegensatz zu einer Nekrose ist der Vorgang einer Apoptose immer mit einer veränderten Genexpression verschiedener Proteine verbunden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen auf die Proteine Caspase-3, Bcl-xL, Bax und Cytochrom-c fokussiert.

Da bereits aus früheren Studien bekannt war, dass H_2S einen Einfuß auf die Expression pro- und antiapoptotischer Proteine ausübt, wurde im Folgenden untersucht, ob K_{ATP}-Kanäle an der Vermittlung dieser Wirkung beteiligt sind.

Hierzu wurden zunächst die entsprechenden Assays etabliert und anschließend geprüft, ob H_2S als K_{ATP}-Kanal Öffner und Glibenclamid als Schließer der K_{ATP}-Kanäle die Expression der entsprechenden Proteine beeinflusst.

3.5.1.1 Stimulation der Phagozytose-induzierten Apoptose bei Raw267.4-Makrophagen durch E. coli

Die initialen Versuche waren so aufgebaut, dass Raw264.7-Makrophagen für 1 Stunde mit E. coli behandelt wurden und zu den Zeitpunkten 4-, 8-, 12-, 24- und 48 Stunden die Expression verschiedener pro- und antiapoptotischen Proteine bestimmt wurde. Es hat sich gezeigt, dass die Expression der proapoptotischen Proteine Caspase-3 und Cytochrom-c zeitabhängig zunimmt und diejenige von Bax abnimmt (Abb. 12A). Als anti-apoptotisches Protein wurde Bcl-xL untersucht. Bcl-xL könnte pro-apoptotische Proteine, wie z.B. Bax, durch heterodimerisierung beeinflussen. Die Expression von Bcl-xL nimmt zeitabhängig zu (Abb. 12B). Da die Effekte bereits nach 24h sehr ausgeprägt waren, wurde dieser Zeitpunkt allen weiteren Untersuchungen zugrunde gelegt.



A **B**

Abb. 12: Zeitabhängige Änderung von Bax und Bcl-xL unter Kontrollbedinungen und nach Stimuation mit E. coli. (A) Expression von Bax unter Kontrollbedingungen (oben) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einer 1 stündigen Stimulation mit E. coli (Top 10) (unten). (B) Expression von Bcl-xL unter Kontrollbedingungen (oben) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einer 1 stündigen Stimulation mit E. coli (Top 10) (unten). Die Expression von Aktin dient der Ladungskontrolle.

3.5.1.2 Behandlung der Raw264.7-Makrophagen mit H_2S

Die Handhabung von gasförmigem H_2S ist sehr schwierig. Dies trifft auch für dessen Anwendung bei Zellkultursystemen zu. Das Hauptproblem liegt darin eine annährend gleichbleibend konstante Konzentration von H_2S über einen längeren Zeitraum im Medium sicher zu stellen. Aus diesem Grund wurden die anstehenden Versuche mit der Substanz GYY4137 durchgeführt. Bei GYY4137 handelt es sich um eine Festsubstanz, die über einen Zeitraum von wenigstens 24 Stunden H_2S in konstanter Rate freisetzen soll (Abb 13). Um dies zu überprüfen, wurde eine bestimmte Menge an GYY4137 in Kulturmedium aufgelöst und die Sulfidkonzentration im Medium zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit der GC-MS Methode bestimmt.

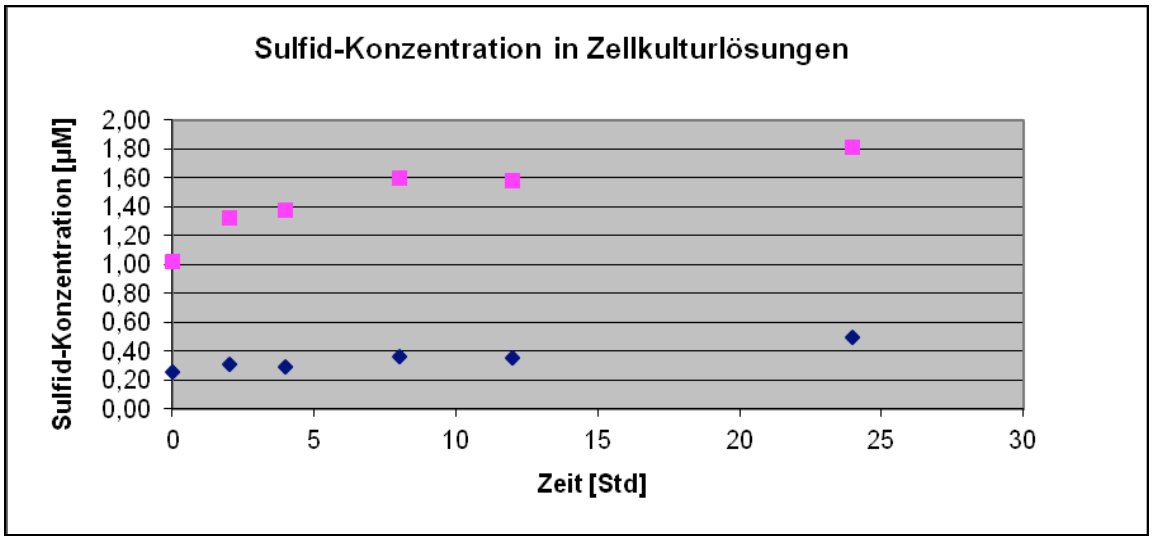


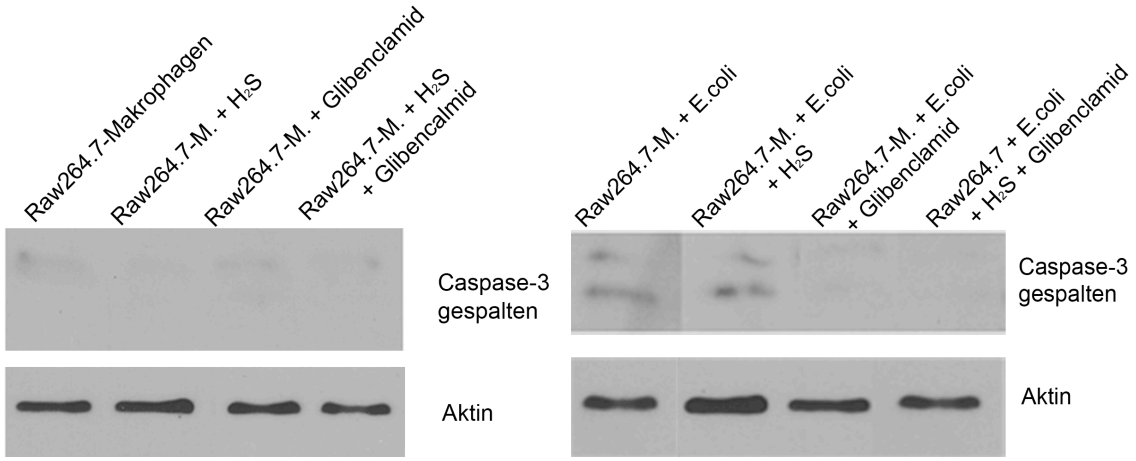
Abb 13: GCMS-Messung der Sulfidkonzentration nach einmaliger Applikation von GYY4137
Die Sulfidkonzentration wurde ohne (blau) und mit (rot) Zugaben von 300 µmol GYY4137 zu den Zeitpunkten 0h, 4h, 8h, 12h, 24h mittels GCMS aus dem Vollnährmedium der Raw264.7-Makrophagen bestimmt.

3.5.1.2 Vorbehandlung der Raw264.7-Makrophagen

Durch eine 2-stündige Vorbehandlung mit H_2S (GYY4137, 300 µM) konnte eine veränderte Expression von pro- und antiapoptotischen Proteinen nach der Phagozytose von E.coli gezeigt werden. Zur Überprüfung, ob H_2S direkt oder indirekt über K_{ATP}-Kanäle wirkt, wurde die Expression der entsprechenden Proteine aus einer unbehandelten Kontrolle, nach alleiniger Behandlung mit H_2S oder Glibenclamid oder der Kombinationszugabe ermittelt. Bei der Kombinationszugabe wurde Glibenclamid (100 µM) jeweils 15 Minuten vor H_2S (GYY4137, 300 µM) zugegeben. Diese Untersuchungen wurden sowohl ohne als auch mit E.coli Stimulation durchgeführt.

3.5.2 Caspase-3

Eine Aktivierung von Caspasen ist für die Apoptose typisch. Dabei kommt besonders der Caspase-3 als einer der End-Caspasen im Signalweg der Caspaseaktivierung eine Schlüsselrolle zu.



A: ohne E.coli **B: mit E.coli**

Abb. 14: Effekt von H_2S und Glibenclamid auf die Caspase-3 Expression im Gesamtzellextrakt (TCL) von Raw264.7-Makrophagen

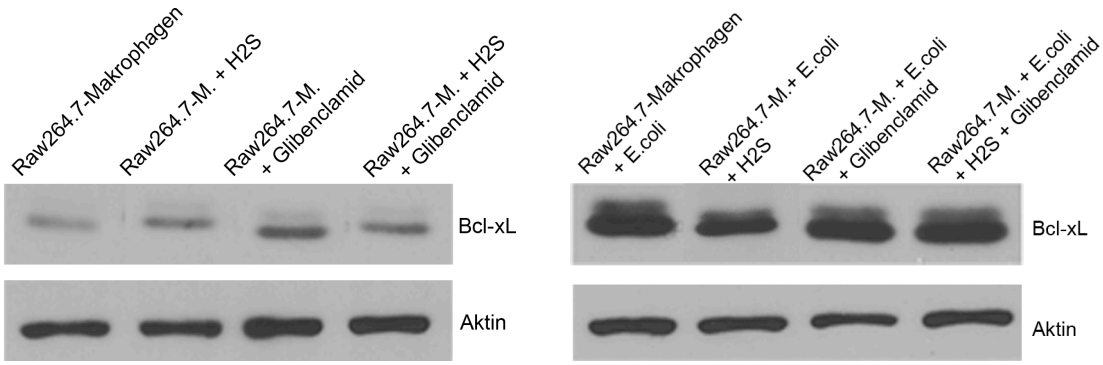
A: Western Blot: TCL nach 24 Stunden aus Raw264.7-Makrophagen, Vorbehandlung mit H_2S 300 µM und Glibenclamid 100 µM. Aktin =Ladungskontrolle.

B: Western Blot: TCL nach 24h aus Raw264.7-Makrophagen, Vorbehandlung mit H_2S 300 µM und Glibenclamid 100 µM. Stimulation (1h) mit E.coli. Aktin =Ladungskontrolle.

Ohne E.coli Stimulation zeigen Raw264.7-Makrophagen nur eine sehr geringe Expression von Caspase-3 (Abb. 14A). Unter diesen Bedingungen führen weder H_2S noch Glibenclamid noch deren Kombinationszugabe zu einer signifikanten Änderung der Caspase-3 Expression. Durch E.coli Stimulation kommt es zu einer deutlichen Zunahme von Caspase-3. Die Caspase-3 ergibt im Western Blot Raw264.7-Makrophagen typsicherweise Doppelbanden (Abb. 14B). Die Vorinkubation mit H_2S hat keinen Einfluß auf die Expression von Caspase-3, wohingegen in Gegenwart von Glibenclamid (allein oder in Kombination mit H_2S) die Expression der Caspase-3 komplett unterdrückt wird.

3.5.3 Bcl-xL

Die Proteine der Bcl-2- Familie sind von entscheidender regulativer Bedeutung bei der mitochondrial vermittelten Apoptose. Als anti-apoptotisches Protein wurde an Raw264.7-Makrophagen die Expression von Bcl-xL untersucht. Bcl-xL kann die Apoptose durch zwei verschiedene Mechanismen beeinflussen: Es kann den apoptotischen Effekt von pro-apoptotischen Proteinen durch Heterodimerisation reduzieren und es hält das mitochondriale Membranpotential in kritischen Situationen aufrecht.



A: ohne E.coli **B: mit E.coli**

Abb. 15: **Effekt von H_2S und Glibenclamid auf die Bcl-xL Expression im Gesamtzellextrakt (TCL) von Raw264.7-Makrophagen**

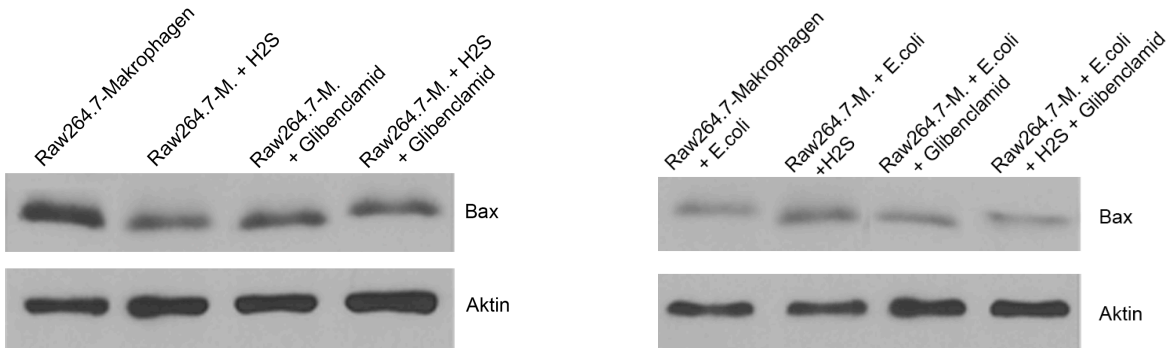
A: Western Blot: TCL nach 24 Stunden aus Raw264.7-Makrophagen, Vorbehandlung mit H_2S 300 µM und Glibenclamid 100 µM. Aktin =Ladungskontrolle.

B: Western Blot: TCL nach 24h aus Raw264.7-Makrophagen, Vorbehandlung mit H_2S 300 µM und Glibenclamid 100 µM. Stimulation (1h) mit E.coli. Aktin =Ladungskontrolle.

Die Behandlung der Raw264.7-Makrophagen mit H_2S und Glibenclamid führt zu einer leicht gesteigerten Expression von Bcl-xL gegenüber den unbehandelten Raw264.7-Makrophagen (Abb. 15A). Werden Raw264.7-Makrophagen mit E.coli stimuliert, so steigt die Expression von Bcl-xL gegenüber den unstimulierten Zellen stark an (Abb. 15B). Durch die Vorbehandlung der Raw264.7-Makrophagen mit H_2S, konnte die Bcl-xL Expression nach Stimulation mit E.coli gesenkt werden. Gleibenclamid allein hat keinen Einfluß auf die gesteigerte Bcl-xL Expression nach E. coli Stimulation. Es kann auch die H_2S vermittelte Unterdrückung der Expression nicht aufheben.

3.5.4 Bax

Das klassische pro-apoptotische Protein Bax führt zur Bildung von Oligomeren in der äußeren Mitochondrienmembran. Es entstehen Poren, über die pro-apoptotische Proteine ins Zytosol gelangen.



A:ohne E.coli **B:mit E.coli**

Abb. 16: Effekt von H_2S und Glibenclamid auf die Bax Expression im Gesamtzellextrakt (TCL) von Raw264.7-Makrophagen

A: Western Blot TCL aus Raw264.7-Makrophagen, nach der Vorbehandlung mit H_2S 300 µM und Glibenclamid 100 µM. Aktin =Ladungskontrolle.

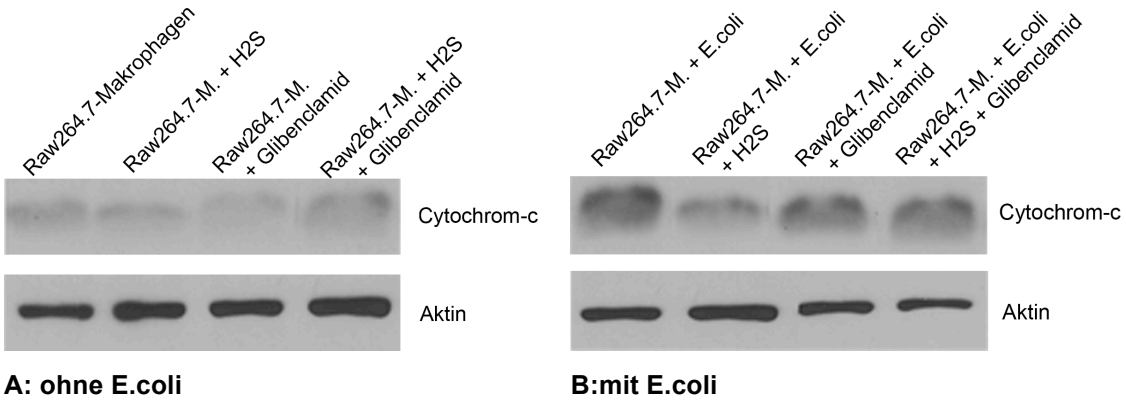
B: Western Blot TCL aus Raw264.7-Makrophagen, nach der Vorbehandlung mit H_2S 300 µM und Glibenclamid 100 µM. Stimmulation (1h) mit E.coli. Aktin =Ladungskontrolle.

In Abwesenheit von E. coli führen sämtliche Behandlungen (H_2S, Glibenclamid und deren Kombination) zu einer verminderten Expression von Bax gegebenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 16A).

Werden Raw264.7-Makrophagen mit E.coli stimuliert, so nimmt die Expression von Bax gegenüber den unstimulierten Zellen stark ab. In Gegenwart von H_2S fällt diese Abnahme weniger stark aus. Glibenclamid hat keinen Einfluß auf die Abnahme der Expression. Es zeigt sich eine ähnliche Expression von Bax, wie bei der alleinigen Stimulation mit E.coli. Es kann jedoch die Wirkung von H_2S unterdrücken(Abb. 16B).

3.5.5 Cytochrom-c

Bei Beschädigung der Mitochondrien wird Cytochrom-c durch die äußere Membran hindurch ins Zytosol abgegeben. Über eine Signalkaskade löst Cytochrom-c den programmierten Zelltod (Apoptose) aus.



A: ohne E.coli **B:mit E.coli**

Abb. 17: Effekt von H_2S und Glibenclamid auf die Cytochrom-c Expression im Gesamtzellextrakt (TCL) von Raw2647-Makrophagen

A: Western Blot TCL aus Raw264.7-Makrophagen, nach der Vorbehandlung mit H_2S 300 µM und Glibenclamid 100 µM. Aktin =Ladungskontrolle.

B: Western Blot TCL aus Raw264.7-Makrophagen, nach der Vorbehandlung mit H_2S 300 µM und Glibenclamid 100 µM. Stimmulation (1h) mit E.coli. Aktin =Ladungskontrolle.

Ohne E. coli Stimulation bewirken weder H_2S noch Glibenclamid bzw. der Kombination eine Änderung der Cytochrom-c Expression (Abb. 17A). Bei E. coli Stimuation kommt es zu einer deutlichen Steigerung der Expression von Cytochrom-c (Abb. 17B). Diese E.coli induzierte Steigerung kann durch H_2S teilweise unterdrückt werden. Glibenclamid allein hat keinen Einfluß und kann auch die Wirkung von H_2S nicht aufheben (Abb. 17 B).

Tab. 5: Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Western Blot-Analyse zur Expression von pro- und antiapoptotischen Proteine. Qualitatitve Bewertung der Vorbehandlung und Stimulation für die untersuchten Proteine

Vorbehandlung + Stimulation Expression	E.coli	H_2S + E.coli	Glibenclamid + E.coli	Glibenclamid + H_2S + E.coli
Caspase-3	↑	(↑)	↓	↓
Bcl-xL	↑	↓	↑	↑
Bax	↓	↑	↓	↓
Cytochrom-c	↑	↓	↑	↑

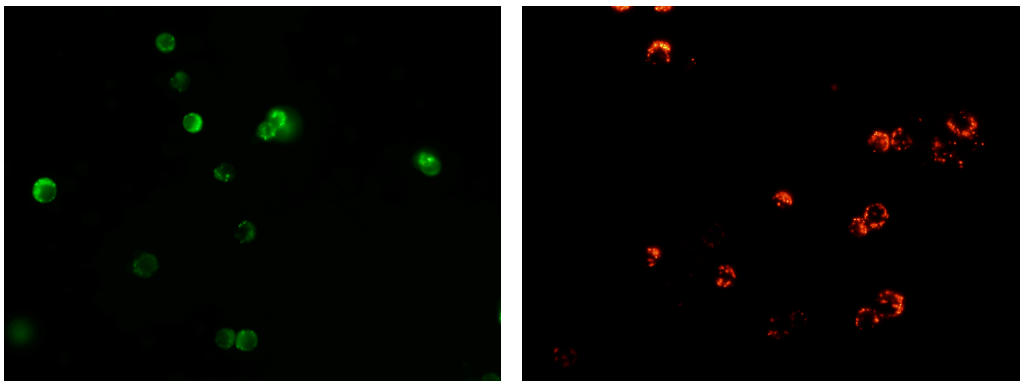
3.6 Wirkung von H_2S auf die mitochondrial vermittelte Apoptose

Im folgenden sollten auch die bis heute noch unbekannten mitoK_{ATP}-Kanäle, welche ebenfalls ein Target für H_2S darstellen könnten, untersucht werden. Bei der Phagozytose-induzierten Apoptose kommt es u.a. zu einem Einbau von Poren in die innere Membran aufrechterhalten) Mitochondrienmembran was zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führt. Für die anstehenden Untersuchungen wurde daher die Anzahl an apoptotischen Zellen nach der Phagozythose von E.coli mit dem Farbstoff JC-1 bestimmt.

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes JC-1 lässt sich das Membranpotential von Mitochondrien bestimmen (Reers et al., 1991). In funktionellen Mitochondrien wird der Farbstoff in die Matrix transportiert, wo er stark fluoreszierende Agglomerate bildet. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung der Fluoreszenz von grün (JC-1 Monomere außerhalb des Mitochondriums) zu rot. Ist das Membranpotential gestört, so wird der Farbstoff nicht aufgenommen und kann nicht akkumulieren, die Fluoreszenz bleibt grün. Diese Fluoreszenzverschiebung lässt sich als Anstieg der JC-1-Fluoreszenz bei 590 nm darstellen.

3.6.1 Stimulation der Apoptose in Raw267.4-Makrophagen

In den ersten Versuchen zeigte sich, dass die Anzahl an apoptotischen Raw264.7-Makrophagen durch eine 1-stündige Stimulation mit Escherichia coli nach einem 24-stündigem Zeitintervall ansteigt.



A B

Abb.18: Fluoreszfärbung von Raw264.7-Makrophagen mit JC-1 Farbstoff. Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials an Raw264.7-Makrophagen nach Floureszensfärbung mit JC-1 Floureszensfarbstoff. Apoptotische Zellen fluoreszieren im Fluoreszensmikroskop grün, gesunde Zellen fluoreszieren rot.

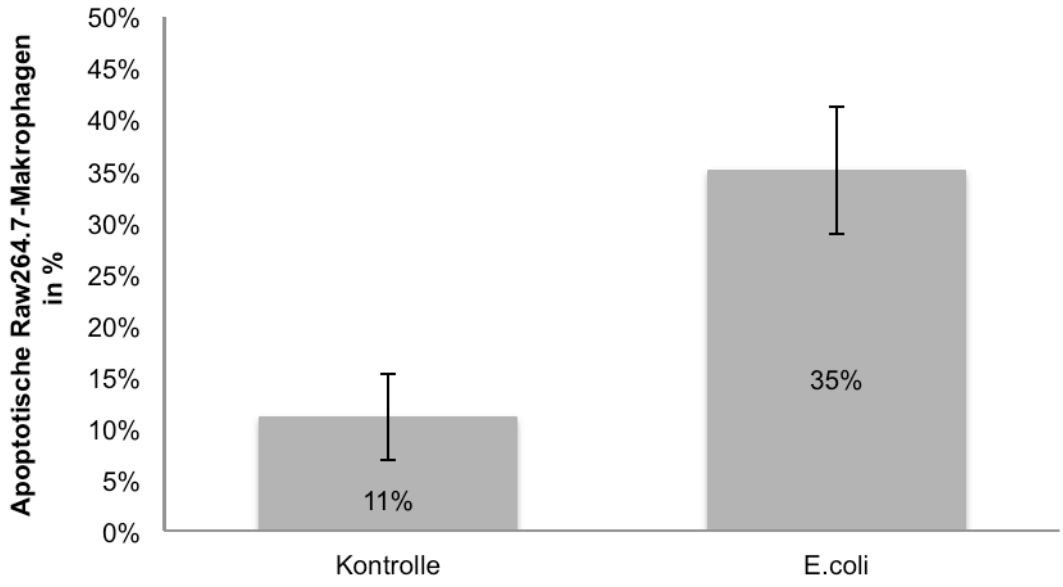


Abb. 19: Anstieg der apoptotischen Zellen von Raw264.7-Makrophagen nach Phagozythose von E.coli. Durchflusszytometrische Messung zur Änderung des mitochondrialen Membranpotentials durch Färbung mit JC-1.

Unter Kontrollbedinungen findet man bei kultivierten Raw264.7-Makrophagen 11% ± 4,2% (n=3) apoptotische Zellen. Durch die Stimulation der Raw264.7-Makrophagen mit E.coli steigt die Anzahl der apoptotischen Zellen auf 35% ± 6,2% (n=3) an.

3.6.2 Basale Apoptoserate Vorbehandlung der Raw264.7-Makrophagen mit H_2S und 5-Hydroxydekanoat

Um den Effekt von H_2S auf die mitochondrial vermittelte Apoptose zu untersuchen, wurde eine 2-stündige Vorbehandlung mit H_2S (GYY4137, 300 µM) und dem selektiven mitoK_{ATP}-Kanal-Schliesser 5-Hydroxydecanoat 100 µM durchgeführt.
Durch die Vorbehandlung wurde die Anzahl an apoptotischen Raw264.7-Makrophagen durch H_2S um 3% ± 0,4% (n=3), durch 5-Hydroxydecanoat um 2% ± 1,8% (n=3) und durch die Kombination von H_2S und 5-HD um 4% ± 2,7 (n=3) erhöht.

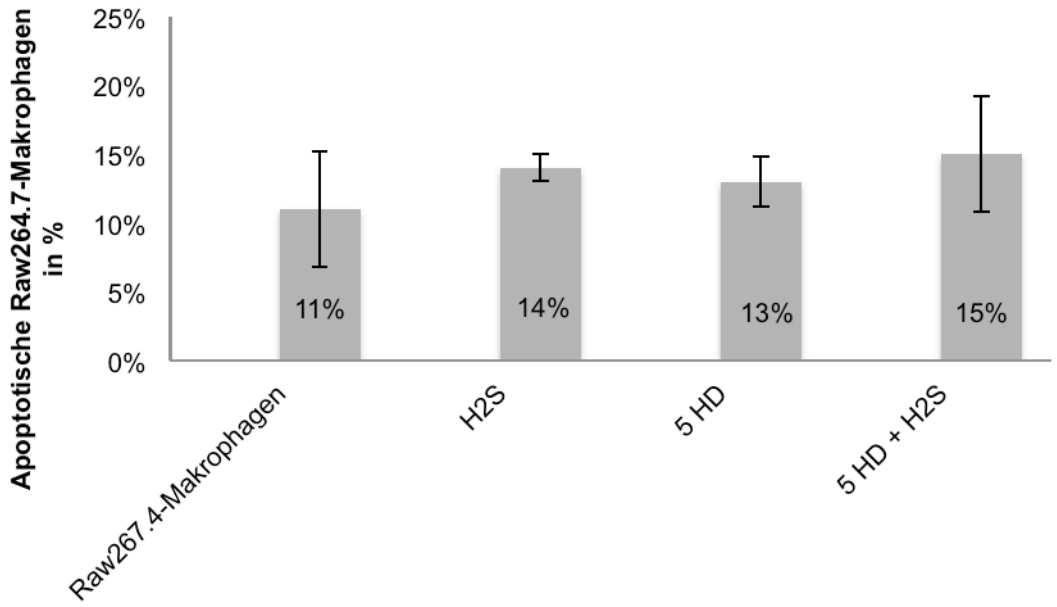


Abb. 20: Anzahl der apoptotischen Zellen ohne Stimulation mit E.coli, nach Vorbehandlung mit H_2S (GYY4137) 300 µM und 5-Hydroxydecanoat 100 µM. Durchflusszytometrische Messung zur Bestimmung der Anzahl an apoptotischen Raw264.7-Makrophagen durch Färbung mit JC-1.

3.6.3 Apoptoserate nach Vorbehandlung der Raw264.7-Makrophagen mit H_2S und 5-Hydroxydekanoat und Stimulation mit E.coli

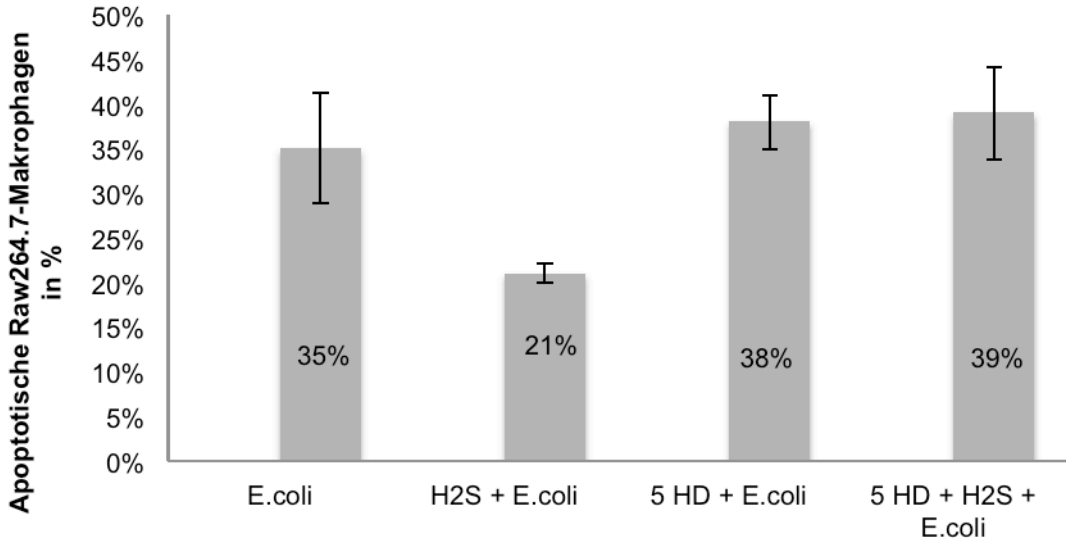


Abb.21: Darstellung der Mittelwerte apoptotischer Raw264.7-Makrophagen nach Vorbehandlung mit H_2S (GYY4137) 300 µM und 5-Hydroxydecanoat 100 µM. Stimulation mit E.coli. Durchflusszytometrische Messung zur Änderung der Anzahl an apoptotischen Zellen durch Färbung mit JC-1.

Nach Stimulation der Raw264.7-Makrophagen mit E.coli steigt die Zahl der apoptotischen Zellen auf 35% ± 6,1% (n=3) an. Durch die Vorbehandlung mit H_2S wird die Anzahl der apoptotischen Raw264.7-Makrophagen nach Stimulation mit E.coli auf 21% ± 2,1% (n=3) gesenkt. Somit zeigt sich, dass H_2S eine protektive Wirkung auf die phagozytose-induzierte Apoptose bei Raw264.7-Makrophagen hat. Durch die Vorbehandlung mit dem spezifischen $mito_{KATP}$-Schliesser 5-Hydroxydecanoat kann die Anzahl der apoptotischen Zellen nicht gesenkt werden. Zudem verhindert 5-Hydroxydecanoat die Wirkung von H_2S, da bei der Vorbehandlung mit 5-Hydroxydecanoat und H_2S nach Stimulation mit E.coli 39% ± 5,1% (n=3) apoptotische Zellen zu finden sind.
Somit könnten die $mito_{KATP}$-Kanäle ein Target für H_2S sein.

Tab. 6: Zusammenfassung der Ergebnisse aus der mitochondrialen Membranpotential-Messung. Qualitatitve Bewertung der Vorbehandlung und Stimulation für die Anzahl der apoptotischen Raw264.7-Makrophagen.

Vorbehandlung + Stimulation Zellzahl	E.coli	H_2S + E.coli	5-Hydroxy-decanoat + E.coli	5-Hydroxy-decanoat + H_2S + E.coli
Anzahl der apoptotischen Raw264.7-Makrophagen	↑	↓	↑	↑

4 Diskussion

Die Rolle von H_2S bei Makrophagen ist bisher ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Signalwege untersucht werden, über die H_2S eine Wirkung auf Makrophagen ausüben könnte. Der erste Abschnitt dieser Arbeit widmet sich der Frage, ob H_2S indirekt via zellwandgebundenen K_{ATP}-Kanäle, einen Einfluss auf Raw264.7-Makrophagen ausübt. Für die anstehenden Untersuchungen kamen elektrophysiologische (Patch-Clamp-Technik) und molekularbiologische Methoden (RT-PCR) zum Einsatz. Die jeweilige Methodenetablierung wurde an heterolog exprimierten Ionenkanälen vorgenommen, wozu verschiedene Untereinheitenkombination in TsA Zellen transfiziert wurden. Anschließend wurden die optimierten Versuchbedingungen zur Untersuchung der Raw264.7-Makrophagen verwendet.

Die Phagozytose ist ein wesentlicher Mechanismus des angeborenen Immunsystems zur Eliminierung von Pathogenen. Es ist bekannt, dass die Phagozytose von Pathogenen wie z.B. E.coli zur Induktion eines programmierten Zelltods führen kann (Dockrell et al., 2001) (Hacker et al., 2002). Hierzu wurde im zweiten Teil der Arbeit untersucht, ob H_2S eine direkte oder indirekte Wirkung über K_{ATP}-Kanäle auf die phagozythose induzierte Apoptose bei Raw264.7-Makrophagen hat. Nach einer Vorbehandlung mit H_2S bzw selektiven K_{ATP}-Kanal-Schliessern und der Stimulation mit E.coli wurden pro- und antiapoptotische Proteine mittels Western Blot- Verfahren untersucht. Zur der Wirkung von H_2S als Target für mitoK_{ATP}-Kanäle, wurde die mitochondrial vermittelte Apoptose untersucht. Dabei wurde nach Phagozythose von E.coli die Änderung des mitochondrialen Membranpotentials gemessen.

4.1 Funktioneller Nachweis von K_{ATP}-Kanälen

Die Rolle von H_2S als K_{ATP}-Kanalöffner ist bereits in zahlreichen Studien beschrieben worden (Cheng et al., 2004; Lowincka & Beltowski 2007). Aufgrund dieser Tatsache werden H_2S protektive Eigenschaften zugeschrieben (Bian et al., 2006). Yasu et al., 2002 konnten zeigen, dass K_{ATP}-Kanalöffner die Einwanderung von PMNL ins Gewebe bei Ischämie reduzieren und somit protektiv wirken können. Da K_{ATP}-Kanalöffner und -schließer auch das Verhalten von Makrophagen beeinflussen, liegt es nahe anzunehmen, dass Makrophagen über K_{ATP}-Kanäle verfügen (Yasu et al., 2002; Zanardo et al., 2006), über die eine Wirkung von H_2S vermittelt werden könnte. Um die K_{ATP}-Känale funktionell bestimmen zu können, wurden die in vivo vorkommenden α- und β-Untereinheiten der ATP-abhängigen Kaliumkanäle in TsA-Zellen heterolog transfiziert. Die elektrophysiologischen Messungen wurden dem Messprotokoll von Tang et al., 2006 und Zhao et al., 2001 angepasst. Damit konnte mit Hilfe von Diazoxid und Pinacidil das Öffnen und mit Glibenclamid das Schließen der K_{ATP}-Kanäle aufgezeichnet werden (Abb.3-6). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass sich die transfizierten K_{ATP}-Kanäle je nach Kanalkombination mit Pinacidil oder Diazoxid öffnen und mit Glibenclamid schließen lassen. Der K_{ATP}-Kanalöffner H_2S wurde nach der Etablierung des Testsystems eingesetzt. In dieser Untersuchung konnten bei den heterolog exprimierten Ionenakäle die K_{ATP}-kanalöffnende Wirkung von H_2S bestätigt werden. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit den Arbeiten von Tang et al., 2005. Aufgrund der hohen Dichte von K_{ATP}-Kanälen in den heterolog transfizierten TsA-Zellen konnten sehr große Ströme von bis zu 10 nA durch die Applikation von Pinacidil 10 µM bzw. Diazoxid 10 µM gemessen werden. Bei nativen Zellen, wie zum Beispiel glatten Gefäßmuskelzellen, ist mit einer weniger hohen Dichte von K_{ATP}-Kanälen zu rechnen. Tang et al., 2005 konnten durch die Appilkation von H_2S (300 µM) bzw. Pinacidil (10 µM) an einzelnen Gefäßmuskelzellen Ströme von 250-300 pA messen.

Im Vergleich zu den Kanalöffnern Pinacidil und Diazoxid tritt in dem hier gezeigten Experiment die kanalöffnende Wirkung von H_2S (100 µM) deutlich langsamer ein. In den Experimenten mit H_2S hätte die Anzahl von 15 Applikationen noch erhöht werden sollen um einen stabilen Plateauwert zu erreichen.

An den Raw264.7 Makrophagen konnten weder mit Pinacidil noch mit Diazoxid eine Zunahme des basalen Stromes festgestellt werden. Auch eine Abnahme des basalen Stromamplitude nach der Gabe von Glibenclamid war nicht zu verzeichnen. Somit kann daraus geschlossen werden, dass die Raw264.7-Makrophagen über keine funktionsfähige K_{ATP}-Kanäle verfügen.

4.2 PCR-Nachweis von K_{ATP}-Kanälen bei Raw264.7 Makrophagen

Da sich durch Funktionsuntersuchungen überraschenderweise keine K_{ATP}-Kanäle bei Makrophagen nachweisen ließen, sollte durch PCR geklärt werden, ob und ggf. welche Untereinheiten der K_{ATP}-Kanäle vorhanden sind. Es hat sich gezeigt, dass bei Raw264.7-Makrophagen weder mSUR1, mSUR2 noch mKir6.1. vorhanden ist. Nur mKir6.2 konnte nachgewiesen werden. Diese Befunde stehen in Einklang mit Untersuchungen an PMNL's, bei denen auch keine SUR Untereinheiten detektiert werden konnten. Während bei den Makrophagen nur die Kir6.2 Untereinheit vorhanden ist, scheinen bei PMNL's sowohl Kir6.1 als auch Kir6.2 vorhanden zu sein (Yasu et al., 2002).

4.3 Wirkung von H_2S auf K_{ATP}-Kanäle

Ähnlich wie Sulfonylharnstoff, bindet auch H_2S an die regulatorische Untereinheit der K_{ATP}- Kanäle (SURs) und bewirkt ein Öffnen dieser Kanäle (Tang et al., 2005). In den Experimenten von Cao et al., 2002 konnte gezeigt werden, dass H_2S über SUR1 (rvSUR1) seine kanalöffnende Wirkung entfaltet. Die Untereinheiten SUR1 und SUR2 konnten bis heute noch nicht an PMNL`s nachgewiesen werden. Der Nachweis von Kir6.1 und Kir6.2 ist in der Arbeit von Yasu et al., 2006 gelungen. Die Wirkung von H_2S auf Makrophagen über einen K_{ATP}-Kanal wird auch in der Arbeit von Zhao et al., 2011 zur Unterdrückung der Schaumzellbildung von Makrophagen in Betracht gezogen. Da bei den PMNL`s keine SUR-Untereinheit, dafür die Kir6.1- und Kir6.2-Untereinheit nachgewiesen ist (Yasu et al., 2002), wurde die Wirkung von H_2S an den Raw264.7-Makrophagen trotzdem untersucht, um eventuell unbekannte K_{ATP}-Kanalkombination, über welche H_2S seine kanalöffnende Wirkung entfalten könnte, zu erfassen. An den Raw264.7-Makrophagen konnte auch mit H_2S keine Öffnung der K_{ATP}-Kanäle aufgezeichnet werden. Die Anzeichen, dass K_{ATP}-Kanäle vorhanden sein könnten, könnte durch

unbekannte Kaliumkanäle, welche vorgeben, K_{ATP}-Kanäle zu sein, immitiert werden (Yasu et al., 2002). Wie die Wirkung der K_{ATP}-Kanal aktiven Substanzen zu erklären ist, bleibt daher Spekulation. Es gibt folgende Möglichkeiten: Zum einen besteht die erworbene Kenntnis, dass Kir6.2ΔC26 und Kir6.2ΔC36-Kanäle (d.h. Kir-Kanäle bei denen die 26 C bzw. die 36 C-terminalen Aminosäuren entfernt waren) trotzdem in der Lage waren, kaliumspezifische-Ströme bei alleiniger Expression zu erzeugen (Tucker et al.,1997). Diese verkürzte Form des Kir6.x, welche durch Proteolyse entstehen kann, ist möglicherweise sensitiv für H_2S. Zum andern könnte die Möglichkeit bestehen, dass mKir6.2, welcher in Raw264.7-Makrophagen exprimiert wird, mit einer bisher unbekannten SUR-Untereinheit einen funktionellen K_{ATP}-Kanal bilden kann. Denkbar ist auch, dass mitoK_{ATP}-Kanäle, mit noch nicht bekannten SUR-Untereinheiten eine Rolle spielen könnten.

4.4 Wirkung von H_2S auf die Expression von K_{ATP}-Kanäle bei Raw264.7-Makrophagen

Bei Herzmuskelzellen konnte gezeigt werden, dass H_2S seine protektive Wirkung über K_{ATP}-Kanäle ausführt (Bian et al., 2006). Um zu überprüfen, ob Vergleichbares für Raw264.7-Makrophagen zutrifft, wurden diese einer entsprechenden H_2S-Behandlung (24 h, 200 ppm) unterzogen. Nun konnten auch Raw264.7-Makrophagen PCR-Amplifikate mit den Primern für mSUR2 und mKir6.1 gezeigt werden. Diese PCR-Amplifikate erschienen etwas unterhalb der erwarteten Amplifikatgröße und zeigten zudem Doppelbanden. Die Ursache für die Doppelbanden ist bisher unklar. Auch durch Variation des PCR-Protokolls hinsichtlich der Annealing-Temperatur und der MgCl-Konzentration gelang es nicht die Doppelbanden zu eliminieren. Sollte durch die Behandlung mit H_2S tatsächlich mSUR2 induziert worden sein, könnten auch funktionsfähige K_{ATP}-Kanäle vorliegen.

4.5 Wirkung von H_2S auf die Phagozytose-induzierte Apoptose bei Raw264.7-Makrophagen

Durch die Phagozytose von E.coli kann in Makrophagen die Apoptose induziert werden (Hacker et al., 2002). Dabei werden pro- und antiapototische Proteine verschieden reguliert.

Um zwischen einer direkten oder indirekten Wirkung von H_2S auf pro- und antiapoptotische Proteine unterscheiden zu können, wurden die Raw264.7-Makrophagen einer Vorbehandlung mit H_2S und Glibenclamid unterzogen. Da H_2S als K_{ATP}-Kanal Öffner gilt (Tang et al., 2005) wurde mit Hilfe von Glibenclamid, ein hochspezifischer K_{ATP}-Kanal Schlieser (Gribble et al., 1997), die indirekte Wirkung von H_2S über eventuell vorhandene K_{ATP}-Kanäle untersucht.

Da der Umgang mit H_2S sehr schwierig ist und es sich im Zellkulturnährmedium sehr ungleichmäßig verteilt, wurde nach einem anderen Sulfid-Donor gesucht. Na_2S lässt sich leichter verarbeiten, gibt aber das Sulfid nicht gleichmäßig und über einen längeren Zeitraum frei. GYY4137 hingegen, ist leicht zu verarbeiten und gibt Sulfid über einen längeren Zeitraum gleichmäßig ab. GYY4137 wurde in einer Konzentration von 300 µmol eingesetzt. Im Zellnährmedium wurde nach 5 Stunden eine Sulfidkonzentration von 16 µM gemessen. Diese Konzentration wurde bis zu 24h aufrecht erhalten, dies entspricht auch den Werten der Arbeit von Lee et al, 2011. Der K_{ATP}-Kanal Schliesser Glibenclamid und 5-Hydroxydecanoat wurde zur Vorbehandlung der Raw264.7-Makrophagen 100 µM eingesetzt. Das diese doch sehr hohe Dosis nicht toxisch für die Zellen ist, zeigte auch Schmidt et al., 2011 an Monozyten. Zur Vorbehandlung wurde die jeweilige Substanz jeweils 2 Stunden vor der Stimulation mit E.coli in das Nährmedium der Makrophagen gegeben. Die Substanzen wurden auch dem PBS zum waschen der Zellen zugegeben. Hierbei könnte es dazu gekommen sein, dass GYY4137 noch nicht ausreichend Sulfid in das jeweilige Medium abgegeben haben könnte. Wurden Glibenclamid bzw. 5-Hydroxydecanoat und H_2S kombiniert, so wurde Glibenclamid bzw. 5-HD 15 Minuten vor der Zugabe von H_2S in das Zellmedium gegeben. Somit hätte eine direkte Wirkung von H_2S auf Raw264.7-Makrophagen detektiert werden können (Hu et al., 2008).

Der Weg der Apoptose wird durch mehrere Proteine, welche auch eine Wirkung auf die äußeren Mitochondrienmembran haben, geregelt. Während die Proteine der Bcl-2-Familie (z.B. Bcl-2, Bcl-xL) antiapoptotische Wirkung haben, stimulieren die Proteine Bax, Caspase-3 und Cytochrom-c die Apoptose. Bax ist ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2-Proteinen, welches in den Mitochondrien lokalisiert ist und den programmierten Zelltod reguliert (Wolter et al., 1997). Bax transloziert nach Induktion der Apoptose in die Mitochondrien Dieses translokations Verfahren ist schnell und tritt in schon in einem frühen Stadium der Apoptose ein (Wolter et al., 1997). In dieser Arbeit ist deutlich zu erkennen, dass bei den Raw264.7-Makrohagen im frühen Stadium der Apoptose, das Protein Bax nach Stimulation mit E.coli deutlich abnimmt. Es wandert und bindet wahrscheinlich an die Mitochondrienmembran. In der Zeitreihe nach Stimulation mit E.coli ist zu erkennen, dass die Expression von Bax 4h nach Stimulation mit E.coli zunimmt und danach stark abnimmt. Dies entspricht auch der Arbeit von Hu et al., 2008, hier wurde die Apoptose durch Rotenon induziert.

Werden die Raw264.7-Makrophagen vor der Stimulation mit E.coli mit H_2S vorbehandelt, so steigt die Expression von Bax gegenüber den unvorbehandelten Makrophagen deutlich an. Dies könnte darauf hindeuten, dass Bax weniger stark an die Mitochondrienmembran transloziert und eher frei im Zytosol zu finden ist. Die Vorbehandlung der Makrophagen mit Glibenclamid scheint keine Effekt auf die Expression von Bax gegenüber den unvorbehandelten Makrophagen zu haben. Werden Glibenclamid und H_2S zur Vorbehandlung eingesetzt, so scheint Glibenclamid den Effekt von H_2S auf die Steigerung der Expression von Bax zu verhindern.

Durch die Bindung von Bax an die Mitochondrienmembran, entstehen in dieser Poren. Hierdurch und kommt es zur Freisetzung von Cytochrom-c (Desagher et al, 1999).

Das antiapoptotische Protein Bcl-xL verhindern z.B. die Freisetzung von Cytochrom-c aus den Mitochondrien. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Überexpression von antiapoptotischen Proteinen, wie Bcl-xL, die Funktion der pro-apoptotischen Proteinen wie z.B. Bax aufhebt und somit eine schützende Wirkung auf die Wirtszelle hat (Lindsay et al., 2011).

Durch die Phagozytose-induzieret Apoptose mit E.coli steigt die Expression des

anti-apoptotischen Protein Bcl-xL bei Raw264.7-Makrophagen stark an. Werden die Zellen vor der Stimulation mit E.coli durch H_2S vorbehandelt, so steigt die Expression von Bcl-xL nicht so stark an, wie bei Makrophagen, welche nicht vorbehandelt wurden.

Da bei den nativen Raw264.7-Makrophagen eine geringe Expression von Bcl-xL natürlicher weise vorkommt, scheint die Vorbehandlung mit H_2S einen Anstieg der Expression von Bcl-xL nach Stimulation mit E.coli zu verhindern. Sieht man nun Bax und Bcl-xL als Gegenspieler an, so schein die Vorbehandlung mit H_2S ein Gleichgewicht zwischen dem pro-apoptotischen Protein Bax und dem anti-apoptotischen Protein Bcl-xL herzustellen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Hu et al., 2008.

Durch die Vorbehandlung mit Glibenclamid zeigt sich keine Änderung der Expression von Bcl-xL im Vergleich zu den unbehandelten, mit E.coli stimulierten, Raw264.7-Makrophagen. Werden H_2S und Glibenclamid zur Vorbehandlung der Makrophagen kombiniert und mit E.coli stimuliert, so scheint Glibenclamid die Wirkung von H_2S zu inhibieren. Üblicherweise wird zusätzlich die Expression beider Proteine im Verhältnis zueinander betrachtet, indem die sogenannte Bax/Bcl-xL Ratio bestimmt wird. Dadurch wird berücksichtigt, dass beide Proteine miteinander interagieren, wobei das antiapoptotische Bcl-xL die Wirkung des proapoptotischen Bax antagonisiert. Da in dieser Arbeit einer deskriptiven Statistik zugrunde liegt, wurde die Bax/Bcl-xL Ratio nicht bestimmt.

Bcl-xL verhindert die Freisetzung von Cytochrom-c und hemmt die Aktivierung von Cystein-Proteasen (Caspasen), welche die apoptotischen Prozesse (Kluck et al, 1997) auslösen. Im Gegensatz zu Bcl-xL- induziert Bax die Entstehung von Poren in die mitochondriale Membran, wodurch die Freisetzung von Cytochrom-c erfolgt und Apoptose über die Caspasen induziert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde Cytochrom-c im Gesammtzelllysat (TCL) bestimmt. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die Expression von Cytochrom-c nach Stimulation mit E.coli deutlich ansteigt. Eine Vorbehandlung der Raw264.7-Makrophagen mit H_2S senkt die Expression von Cytochrom-c nach der Stimulation mit E.coli.

Somit werden die Ergebnisse der Expression von Bax und Bcl-xL in dieser Arbeit bestätigt.

Die Freisetzung von Cytochrom-c aus den Mitochondrien ist ein besonders wichtiges Ereignis in der Induktion der Apoptose. Sobald Cytochrom-c in das Cytosol freigesetzt worden ist, interagiert es mit einem Protein namens Apaf-1. Dies führt zur Rekrutierung von Pro-Caspase 9 in einen Multi-Protein-Komplex mit Cytochrom-c und Apaf-1 genannt Apoptosome. Die Bildung der Apoptosome führt zur Aktivierung der Caspase 9 somit zur Induktion der Apoptose durch Caspase-3 (Jiang et al., 2000).

Arbeiten von Rinaldi et al., 2006, belegen die antiapoptotische Wirkung von H_2S-Behandlungen bei PMNL. Es konnte nachgewiesen werden, dass Schwefelwasserstoff Caspase-3 inhibierte (Rinaldi et al., 2006). Nach der Vorbehandlung der Raw264.7-Makrophagen mit H_2S und Stimulation mit E.coli wurde eine verminderte Expression von Caspase-3 festgestellt. Es existieren jedoch auch Anhaltspunkte für proapoptotische Wirkungen. Eine Untersuchung glatter Muskelzellen zeugt von einer konzentrationsabhängigen Erhöhung des Gehalts an Caspase-3 und damit einer gesteigerten Apoptoserate (Richards et al.,1963). Allerdings muss bei einem Vergleich der Studien berücksichtigt werden, dass sehr unterschiedliche Dosen von H_2S angewendet wurden, die den physiologischen Bereich teils überschreiten. Die Auswirkungen von H_2S scheinen wie oben erwähnt ebenfalls abhängig von der Stimulationsart und dem Zelltyp zu sein. Auch Glibenclamid besitzt antiinflammatorische Eigenschaften. Simard et al., 2009, zeigten, dass Glibenclamid als K_{ATP}-Kanal Schliesser eine Reduktion der Caspase-3 Expression bewirkt. Diese Eigenschaft wurde auch nach der Phagozytose-induzierten Apoptose an den Raw264.7-Makrophagen nachgewiesen. Die Wirkung von Glibenclamid auf die Expression von Caspase-3 nach der Phagozytose-induzierten Apoptose scheint stärker zu sein als die Wirkung von H_2S. Glibenclamid wirkt am SUR 1 (Simard et al, 2009), diese K_{ATP}-Kanal Untereinheit konnte aber bei den Raw264.7-Makrophagen nicht detektiert werden. Somit scheint, das Glibenclamid seine Caspase-3 senkende Eigenschaften evtl. auch noch über andere Wege entfalten kann.

4.6 Mitochondrial vermittelte Apoptose

Es ist bekannt, dass mitochondriale Dysfunktionen sehr schnell zur Apoptose der Zelle führen können (Lemasters et al., 2002). Durch die Phagozytose von E.coli konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es bei Raw264.7-Makrophagen zu einer Verschiebung des mitochondrialen Membranpotentials kommt. Die Einschränkung der mitochondrialen Funktion durch Abfall des mitochondrialen Membranpotentials kann als Folge einer Mitochondrienschädigung betrachtet werden (Polo et al. 2003). Das sinkende mitochondriale Membranpotential wird mit der Erhöhung der mitochondrialen Membranpermeabilität und der daraus resultierenden Apoptoseinduktion in Verbindung gebracht (Badley et al. 2003).
Dadurch entsteht eine Permeabilität der Mitochondienmembran, wodurch apoptoserelevante Proteine ins Zytosol gelangen können (Essick et al., 2010). Die Anzahl der apoptotischen Zellen steigt durch dieses Ereignis stark an. Dieses Ergebnis stehen mit der Arbeit von Fiskum et al. 2003, im Einklang.
Werden die Raw264.7-Makrophagen vor der Stimulation durch E.coli mit H_2S vorbehandelt, so zeigt sich deutlich, dass die Anzahl der apoptotischen Zellen auf dem Niveu der basalen Kontrolle liegt. Dies zeigte, dass H_2S effektiv Zellschädigungen verhindert.
Da in Mitochondrien $mito_{KATP}$-Kanäle vorhanden sind, könnten diese ein Target für H_2S darstellen. H_2S gilt als K_{ATP}-Kanal Öffner und könnte eine indirekt Wirkung über $mito_{KATP}$-Kanäle auf die Apoptose bei Makrophagen haben.
Diese indirekte Wirkung wurde untersucht, indem der $mito_{KATP}$-Kanal Schliesser, 5-Hydroxydecanoat, vor der Behandlung mit H_2S zu den Raw264.7-Makrophagen gegeben wurde. Nach der Stimulation mit E.coli zeigte sich, dass durch die Zugabe von 5-Hydroxydecanoat, die antiapoptotische Wirkung von H_2S gehemmt wurde. Dieses Ergebnis lässt sich mit Untersuchungen von Jiang et al., 2013, bestätigen.

4.7 Wirkung von H_2S auf Raw264.7-Makrophagen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass H_2S eine indirekte Wirkung über K_{ATP}- und $mito_{KATP}$-Kanäle auf Raw264.7-Makrophagen hat. Jedoch ist nicht bekannt, wie die K_{ATP}-Kanäle in Raw264.7-Makrophagen zusammengesetzt sind.
Die β-Untereinheit Kir6.2 konnte mit Hilfe der RT-PCR an den Makrophagen naschgewiesen werden. Es konnte jedoch keine α-Untereinheit nachgewiesen werden. Diese ließ sich jedoch durch eine Behandlung mit H_2S induzieren. Somit könnten nach Behandlung mit H_2S funktionsfähige K_{ATP}-Kanäle vorhanden sein. Über diese induzierten K_{ATP}-Kanäle, könnte H_2S als K_{ATP}-Kanal Öffner eine indirekt, anti-apoptotische Wirkung haben. Jedoch ist fraglich, in welcher Menge, die so gebildeten K_{ATP}-Kanäle in der Zellmembran exprimiert werden. und ob die gebildeten K_{ATP}-Kanäle voll funktionsfähig sind. Die Induktion der Bildung von K_{ATP}-Kanälen ist jedoch stark von der Dosis des eingesetzten H_2S abhängig. In dieser Arbeit wurden die Raw264.7-Makrophagen mit 300 µM GYY4137 behandelt, wodurch eine über den gewählten Zeitraum konstante Sulfidkonzentration von 1-2 µM im Medium erreicht wurde. In anderen Arbeiten wurde Natriumsulfid zur Vorbehandlung eingesetzt (Zanardo et al., 2006). Jedoch lässt sich mit Na_2S nur sehr schwer ein konstanter Sulfid-Level im Medium erreichen.
Bis heute ist die genau Kanalkombination der $mito_{KATP}$-Kanäle nicht bekannt. Jedoch ist bekannt, dass H_2S als Öffner und 5-Hydroxydecanoat als Schliesser auf $mito_{KATP}$-Kanälen wirkt (Elrod et al., 2007) (Hu et al., 2009). Die Vorbehandlung mit H_2S hat positive Eigenschaften auf die phagozytose-induzierte Apoptose bei raw264.7-Makrophagen.
Nach der Vorbehandlung der Makrophagen mit 5-Hydroxydecanoat wird die anti-apoptotische Wirkung von H_2S stark gehemmt.
Somit scheinen die anti-apototischen Eigenschaften von H_2S auf Raw264.7-Makrophagen eher indirekt über $mito_{KATP}$-Kanäle zu wirken.
Ein Öffne der $mito_{KATP}$-Kanäle, wie sie durch H_2S erfolgt, scheint sich somit positiv auf die phagozytose-induzierte Apoptose auszuwirken. Dies könnte noch durch die Verwendung $mito_{KATP}$-Kanal Öffners wie z.B. Diazoxid überprüft werden. Jedoch muss Berücksichtigt werden, dass Diazoxid und 5-HD auch die K_{ATP}-

Kanäle in der Zellmembran beeinflussen und die Zusammensetzung der $mito_{KATP}$-Kanäle Zurzeit noch unbekannt ist. Somit steht Zurzeit kein selektiver $mito_{KATP}$-Kanal-Öffner bzw. Schliesser zur Verfügung.

5 Zusammenfassung

Da bislang noch nicht bekannt ist, ob H_2S einen Einfluß auf wesentliche Funktionen von Makrophagen ausübt, wurde im ersten Abschnitt der Arbeit überprüft, ob H_2S über K_{ATP}-Kanäle auf Makrophagen einwirken kann. Dazu wurde zunächst die elektrophysiologische Untersuchungsmethode an heterolog exprimierten K_{ATP}-Kanälen optimiert und dann auf Raw264.7-Makrophagen übertragen. Hierbei konnten keine funktionsfähigen K_{ATP}-Kanäle an den Raw264.7-Makrophagen festgestellt werden. Durch eine RT-PCR konnte an den Raw264.7-Makrophagen die K_{ATP}-Untereinheit Kir6.2 detektiert werden. Somit besteht die Möglichkeit, dass Raw264.7-Makrophagen über bisher unbekannte K_{ATP}-Kanalkombinationen verfügen. Es konnte gezeigt werden, dass sich durch eine Behandlung mit H_2S, möglicherweise PCR-Ampilifikate von SUR2 und Kir6.1 bei Raw264.7-Makrophagen nachweisen lassen.

H_2S hat eine indirekte, antiapoptotische Wirkung, auf die phagozythoseinduzierte Apoptose bei Raw264.7-Makrophagen. So steigert die Vorbehandlung der Raw264.7-Makrophagen mit H_2S die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-xL und hemmt die Expression der proapoptotischen Proteine Caspase-3, Bax und Cytochrom –c.

Wie sich in den Versuchen zeigte, wirkt H_2S indirekt über K_{ATP}-Kanäle auf die pro und antiapoptotischen Proteine. Hier könnten die durch die H_2S-Behandlung induzierten, funktionsfähigen K_{ATP}-Kanal einen Einfluss auf die pro- und antiapoptotischen Proteine haben.

Durch die Phagozythose von E.coli steigt die Anzahl an apoptotischen Zellen bei Raw264.7-Makrophagen nach 24h stark an. Durch eine Behandlung mit H_2S kommt es zu einem deutlich geringeren Anstieg an apoptotischen Zellen. Hierbei scheint die mitochondrial Vermittelte Apoptose eine Zentrale Rolle zu spielen. Ein weiteres Target für H_2S sind die $mito_{KATP}$-Kanäle. Werden diese durch speziefische $mito_{KATP}$-Kanal Schliessser geblockt, so kann H_2S seine antiapoptotischen Eigenschaften nicht mehr entfalten und die Anzahl der apoptotischen Zellen steigt an.

6 Literaturverzeichnis

1. Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP, Boyd AE, III, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA: Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. Science 268: 423-6 (1995)

2. Antcliff JF, Haider S, Proks P, Sansom MS, Ashcroft FM: Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the KATP channel Kir6.2 subunit. EMBO 26: 229-39 (2005)

3. Ashcroft FM, Gribble FM: ATP-sensitive K+ channels and insulin secretion: their role in health and disease. Diabetologia 42: 903-19 (1999)

4. Ashcroft S.J.H & Ashcroft, FM: Properties and functions of ATP sensitive K+channels. Cell Signal 2: 197-214 (1990)

5. Babenko AP, Gonzalez G, Bryan J: The N-terminus of KIR6.2 limits spontaneous bursting and modulates the ATP-inhibition of KATP channels. Biochem Biophys Res Commun 255: 231-8 (1999)

6. Badley A, Roumier T, Lum J, Kroemer G: Mitochondrion-mediated apoptosis in HIV-1 infection. Trends Pharmacol Sci 24: 298-305 (2003)

7. Bian J, Yong Q, Pan T, Feng Z, Ali M, Zhou S, Moore PK: Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes. J Pharmacol Exp Ther 316: 670–678 (2006)

8. Bryan J, Crane A, Vila-Carriles WH, Babenko AP, Aguilar-Bryan L: Insulin secretagogues, sulfonylurea receptors and K(ATP) channels. Curr Pharm Des 11: 2699-716 (2005)

9. Bryan J, Vila-Carriles WH, Zhao G, Babenko AP, Aguilar-Bryan L: Toward linking structure with function in ATP-sensitive K+ channels. Diabetes 53: 104-112 (2004)

10. Caamano J, Hunter CA: NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. Clin Microbiol Rev 15: 414-429 (2002)

11. Cao K, Jiang B, Wang R: Molekular mechanism for H(2)S-induced activation of K(ATP) channels. Am J Hypertens 15: 103A-103A (2002)

12. Cheng Y, J.F. Ndisang G. Tang K. Cao and R. Wang: Hydrogen sulfideinduced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 287: H2316-2323 (2004)

13. Chutkow W, Simon M, Le Beau M, Burant CF: Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular KATP channels. Diabetes 45: 1439-45 (1996)

14. Clement JP, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L and Bryan J: Association and stoichiometry of K_{ATP} channel subunits. Neuron, 18: 827–838 (1997)

15. Cook D, Hales C: Intracellular ATP directly blocks K+ channels in pancreatic B-cells. Nature 311: 271-3 (1984)

16. Denk H, Zatloukal K: Zell- und Gewebsreaktionen. In: Böcker W, Denk H, Heitz PhU: Pathologie. 2. Aufl., 35–68, Urban & Fischer, München (2001)

17. Deshager S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC : Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. J Cell Biol 144: 891-910 (1999)

18. Dockrell D, Lee M, Lynch D, Read R: Immune-mediated phagocytosis and killing of Streptococcus pneumoniae are associated with direct and bystander macrophage apoptosis. J Infec Dis 184: 713-722 (2001)

19. Eder C & Fischer HG: Effects of colony-stimulating factors on voltagegated K+ currents of bone marrow-derived macrophages. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol: 198-202 (1997)

20. Eder C, Klee R, Heinemann U: Involvement of stretch-activated Clchannels in ramification of murine microglia. J Neurosci: 7127-7137 (1998)

21. Edwards G, Weston AH: The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. Annu Rev Pharmacol Toxicol 33: 597-637 (1993)

22. Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C, Kimura H, Chow CW, Lefer DJ: Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. Proc Natl Acad Sci USA 104:15560–5 (2007)

23. Essick E, Sam F: Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders aging and cancer. Oxid. Med. Cell. Longev. 3: 168–177 (2010)

24. Fischer HG, Eder C, Hadding U, Heinemann U: Cytokine-dependent K+ channel profile of microglia at immunologically defined functional states. Neuroscience; 183-191 (1995)

25. Fiskum G, Starkov A, Polster B.M, Chinopoulos C: Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. Ann. N. Y. Acad. Sci 991: 111–119 (2003)

26. Gribble FM, Tucker SJ, Haug T, Ashcroft FM. MgATP activates the β-cell KATP channel by interaction with its SUR1 subunit. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 95: 7185–7190 (1998)

27. Grover G, Garlid K: ATP-sensitive potassium channels: a review of their

cardioprotective pharmacology. J Mol Cell Cardiol 32: 677–695 (2000)

28. Hacker H, Furmann C, Wagner H, and Hacker G: Caspase-9/-3 Activation and Apoptosis Are Induced in Mouse Macrophages upon Ingestion and Digestion of Escherichia coli Bacteria. J Immunol 169: 3172-3179 (2002)

29. Hambrock A, Loffler-Walz C, Quast U. Glibenclamide binding to sulphonylurea receptor subtypes: dependence on adenine nucleotides. Br J Pharmacol 136: 995-1004 (2002)

30. Hambrock A, Loffler-Walz C, Russ U, Lange U, Quast U: Characterization of a mutant sulfonylurea receptor SUR2B with high affinity for sulfonylureas and openers: differences in the coupling to Kir6.x subtypes. Mol Pharmacol 60: 190-9 (2001)

31. Harada H, Grant S: Apoptosis regulators: Rev Clin Exp Hematol 7: 117–138 (2003)

32. Hille B: Ion channels of excitable membranes. Third edition. Sinauer Associates, Inc, Sunderland. (2001)

33. Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J: Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. Science 270: 1166-70 (1995)

34. Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S: A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K+ channels. Neuron 16: 1011-7 (1996)

35. Inagaki N, Seino S: ATP sensitive potassium channels--Kir6.2 gene. Nippon Rinsho 55 Suppl: 452-7 (1997)

36. Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T: ATP-sensitive K+ channel in the mitochondrial inner membrane. Nature 352: 244-7 (1991)

37. Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y, Kurachi Y: A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K+ channel. J Biol Chem 4;271:2 4321-4 (1996)

38. Isomoto, S., Kondo, C., Yamada, M., Matsumoto, S., Higashiguchi, O., Horio, Y., Matsuzawa, Y. & Kurachi, Y: A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K+ channel. Journal of Biological Chemistry 271: 24321-24324 (1996)

39. Jiang X, Huang Y, Lin W, Gao D, Fei Z: Protective effects of hydrogen sulfide in a rat model of traumatic brain injury via activation of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and reduction of oxidative stress. J Surg Res. 184(2): e27-35. doi: 10.1016/j.jss.2013.03.067 (2013)

40. Jiang X, Wang X: Cytochrom c promotes Caspase-9 activation by Inducting nucleotide binding to Apaf-1. J Biol. Chem 275: 31199-31203 (2000)

41. Jin HF, Liang C, Liang JM, Tang CS, Du JB: Effects of hydrogen sulfide on vascular inflammation in pulmonary hypertension induced by high pulmonary blood flow: experiment with rats. Zhonghua Yi Xue Za Zhi 288: 2235–2239 (2008)

42. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: A basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26: 239–257 (1972)

43. Khanna R, Roy L., Zhu X, Schlichter L: K+ channels and the microglial respiratory burst. Am J Physiol Cell Physiol: C796-806 (2001)

44. Kluck R, Bossy-Wetzel E, Green D, Newmeyer D: The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science 275: 1132-6 (1997)

45. Lawrence T, Bebien M, Liu GY, Nizet V, Karin M: IKKα limits macrophage NF-κB activation and contributes to the resolution of inflammation. Nature 434: 1138-1143 (2005)

46. Lee ZW, Zhou J, Chen C-S, Zhao Y, Tan C-H, et al. The Slow-Releasing Hydrogen Sulfide Donor, GYY4137, Exhibits Novel Anti-Cancer Effects In Vitro and In Vivo. PLoS ONE 6(6): (2011)e21077. doi:10.1371/journal.pone.0021077 (2011)

47. Lemasters J, Qian T, He L, Kim J.-S, Elmore S.P, Cascio W.E, Brenner D.A: Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy Antioxid. Redox Signal 4: 769–781 (2002)

48. Li L, Hsu A, Moore PK: Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation – a tale of three gases! Pharmacol. Ther 123: 386–400 (2009)

49. Lindsay J, Esposti M.D, Gilmore A.P: Bcl-2 proteins and mitochondria—Specificity in membrane targeting for death. Biochim. Biophys. Acta 1813: 532–539 (2011)

50. Liss B, Bruns R, Roeper J: Alternative sulfonylurea receptor expression defines metabolic sensitivity of K-ATP channels in dopaminergic midbrain neurons. J EMBO 18: 833-846 (1999)

51. Lowicka, E. and J. Beltowski: Hydrogen sulfide (H2S) - the third gas of interest for pharmacologists. Pharmacol Rep 59: 4-24 (2007)

52. Mariggio MA, Pettini F, Fumarulo R: Sulfide influence on polymorphonuclear functions: a possible role for Ca2+ involvement. Immunopharmacol. Immunotoxico 19: 393–404 (1997)

53. Mederos y Schnitzler M, Derst C, Daut J, Preisig-Müller R: ATP-sensitive

potassium channels in capillaries isolated from guinea-pig heart. Journal of Physiology 525: 307-317 (2000)

54. Nicholson DW, Thornberry NA: Caspases: killer proteases. Trends Biochem Sci 22: 299-306 (1997)

55. Noma A: ATP-regulated K+ channels in cardiac muscle. Nature 305 (5930): 147-8 (1983)

56. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldaer LL: Sepsis syndroms; understanding the role of innate and acquired immunity. Shock 16: 83-96 (2001)

57. Okuyama Y, Yamada M, Kondo C, Satoh E, Isomoto S, Shindo T, Horio Y, Kitakaze M, Hori M, Kurachi Y: The effects of nucleotides and potassium channel openers on the SUR2A/Kir6.2 complex K+ channel expressed in a mammalian cell line, HEK293T cells. Pflügers Archiv 435: 595-603 (1998)

58. Oldstone M. B: Molecular Mimicry and Autoimmune Disease. Cell 1987; 819-820 (1987)

59. O'Rourke B: Evidence for mitochondrial K+ channels and their role in cardioprotection. Circ Res 94: 420–432 (2004)

60. Persson S, Claesson R, Carlsson J: Chemotaxis and degranulation of polymorphonuclear leukocytes in the presence of sulfide. Oral Microbiol. Immunol 8: 46–49 (1993)

61. Polo R, Martinez S, Madrigal P: Factors associated with mitochondrial dysfunction in circulating peripheral blood lymphocytes from HIV-infected people. Journal of Aquired Immune Deficiency Syndromes 34: 32-6 (2003)

62. Qiu MR, Camperbell TJ, Breit SN: A potassium ion channel is involved in cytokine production by activated human macrophages. Clin Exp Immunol 2002: 67-74 (2002)

63. Quast U: ATP-sensitive K+ channels in the kidney. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 54: 213-25 (1996)

64. Reers M, Smith T.W, Chen L.B: J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. Biochemistry 30: 4480-4486 (1991)

65. Rinaldi L, Gobbi G, Pambianco M, Micheloni C, Mirandola P, Vitale M.:Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and Caspase 3. Lab Invest 86: 391–397 (2006)

66. Rochette L, Vergely C: Hydrogen sulfide (H2S), an endogenous gas with odor of rotten eggs might be a cardiovascular function regulator. Ann Cardiol Angeiol 57: 136-138 (2008)

67. Russ U, Hambrock A, Artunc F, Loffler-Walz C, Horio Y, Kurachi Y, Quast U:

Coexpression with the inward rectifier K(+) channel Kir6.1 increases the affinity of the vascular sulfonylurea receptor SUR2B for glibenclamide. Mol Pharmacol 56: 955-61 (1999)

68. Russ U, Lange U, Löffler-Walz C, Hambrock A, Quast U: Interaction of the SU.onylthiourea HMR 1883 With SU.onylurea Receptors and Recombinant ATP-Sensitive K+ Channels: Comparison With Glibenclamide. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 299: 1049-55 (2001)

69. Schmid D, Svoboda M, Sorgner A, Moravcevic I, Thalhammer T, Chiba P, Möslinger T. Glibenclamide reduces proinflammatory cytokines in an ex vivo model of human endotoxinaemia under hypoxaemic conditions. Life Sci 89: 19-20 (2011)

70. Seino S, Miki T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K+ channels. Prog Biophys Mol Biol 81: 133-76 (2003)

71. Seino S. ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. Annu Rev Physiol 61: 337-62 (1999)

72. Siegel R, Chan F, Chun H, Lenardo M: The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. Nat Immunol 1: 469–474 (2000)

73. Simard M, Zhihua G, Kyoon W, Tosun C, Melnichenko L, Gerzanich V: Glibenclamid reduces inflammation, vasogenic edema and caspase-3 activation after subarachnoid haemorrhage. J Cereb Blood Flow Metab 29: 317-330 (2009)

74. Sutton V, Davis J, Cancilla M, Johnstone R, Ruefli A, Sedelies K, Browne K, Trapani J: Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. J Exp Med 192: 1403–1414 (2000)

75. Suzuki M, Fujikura K, Inagaki N, Seino S, Takata K. Localization of the ATP-sensitive K+ channel subunit Kir6.2 in mouse pancreas. Diabetes 46: 1440-4 (1994)

76. Suzuki M, Kotake K, Fujikura K, Inagaki N, Suzuki T, Gonoi T, Seino S, Takata K. Kir6.1: a possible subunit of ATP-sensitive K+ channels in mitochondria. Biochem Biophys Res Commun 241: 693-7 (1997)

77. Szabo C: Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. Nat Rev Drug Discov 6: 917–935 (2007)

78. Tang G, Wu L, Liang W, Wang R: Direct stimulation of K(ATP) channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. Mol Pharmacol 68: 1757-1764 (2005)

79. Tricarico D, Mele A, Lundquist AL, Desai RR, George AL Jr, Conte Camerino D: Hybrid assemblies of ATP-sensitive K^+ channels determine their muscle-

type-dependent biophysical and pharmacological properties. Proc Natl Acad Sci 103: 1118–1123 (2006)

80. Trube G: Potassium channels in isolated patches of cardiac cell membrane. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol 322: R64 (1983)

81. Tucker S, Gribble FM, Zhao C, Trapp S, Ashcroft FM: Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K+ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. Nature 387 (6629): 179-83.116 (1997)

82. Webster G, Leyden J, McGinler K, McArthur W: Suppression of the polymorphonuclear leukocyte chemotactic factor production in Propionibacterium acnes by subminimal inhibitory concentrations of tetracycline, ampicillin, minocycline and erythromycin. Antimicrob Agents Chemother 21: 770–772 (1982)

83. Webster R, Larsen G, Mitchell B, Goins A, Henson PM: Absence of inflammatory lung injury in rabbits challenged intravascularly with complement-derived chemotactic factors. Am Rev Respir Dis 1982: 335-340 (1982)

84. Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Cheung NS, Halliwell B, Moore PK: The novel neuromodulator hydrogensulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? J Neurochem 90: 765-768 (2004)

85. Whiteman M, Winyard PG: Hydrogen sulfid and inflammation: the good, the bad, the ugly and the promising. Expert Rev Clin Pharmacol 4: 13-32 (2011)

86. Winyard PG, Willoughby D: Key Stages in the Acute Inflammatory Response and Their Relevance as Therapeutic Targets. Humana Press 225, NJ, USA (2003)

87. Wolter K, Hsu Y, Smith C, Nechushtan A, Xi X, Youle, R: Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. J Cell Biol 139: 1281-92 (1997)

88. Xu H, Cui N, Yang Z, Wu J, Giwa LR, Abdulkadir L, Sharma P, Jiang C. Direct activation of cloned KATP channels by intracellular acidosis. Journal of Biological Chemistry 276: 12898–12902 (2001)

89. Yamada M, Isomoto S, Matsumoto S, Kondo C, Shindo T, Horio Y, et al. Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K+ channel. J Physiol 499: 715–720 (1997)

90. Yasu T, Nahoko Ikeda N, Ishizuka N, Matsuda E, Masanobu Kawakami M, Kuroki M, Imai N, Ueba H, Fukuda S, Schmid-Schönbein GW, Saito M. Nicorandil and Leukocyte Activation. J Cardiovasc Pharmacol 40: 684-92 (2002)

91. Zanardo R, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace J: Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocytemediated inflammation. Faseb J 20: 2118-2120 (2006)

92. Zawar C, Plant TD, Schirra C, Konnerth A, Neumcke B: Cell-type specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus. Journal of Physiology 514: 327–341 (1999)

93. Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY: A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. Neuron 22: 537-48 (1999)

94. Zhang H., L. Zhi, S. Moochhala, P.K. Moore, and M. Bhatia, Hydrogen sulfide acts as an inflammatory mediator in cecal ligation and punctureinduced sepsis in mice by upregulating the production of cytokines and chemokines via NF-kappaB. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 292: 960-971 (2007)

95. Zhang, H., L. Zhi, S.M. Moochhala, P.K. Moore, and M. Bhatia. Endogenous hydrogen sulfide regulates leukocyte trafficking in cecal ligation and puncture-induced sepsis. J Leukoc Biol 82: 894-905 (2007)

96. Zhang Z, Huang H, Liu P, Tang C, Wang J: Hydrogen sulfide contributes to cardioprotection during isschemia-reperfusion injury by opening KATP-channels. Can J Physiol Pharmacol 85: 1248-1253 (2007)

97. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effects of H2S as anovel endogenous gaseous KATP channel opener. EMBO 20: 6008–6016 (2001)

98. Zhao ZZ, Wang Z, Li GH, Wang R, Tan JM, Cao X, Jiang S and ZS. Hydrogen sulfid inhibits macrophage-derived foam cell formation. Exp. Biol. Med 236: 169-176 (2011)

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Radermacher für die Vergabe des interessanten Themas und die Ermöglichung dieser Dissertation in der Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung bedanken.
Herrn PD Dr. Karl Föhr, Frau Dr. Katja Wagner und Herrn PD Dr. Florian Wagner möchte ich für die intensive Betreuung während der gesamten Zeit danken, für die viele Geduld, mit der das Projekt von Beginn an unterstützt wurde und für die vielen ausführlichen Erklärungen und Tipps.

Margot Authenried, Marina Fink, Rosemarie Mayer, Bettina Stahl und Herrn Ulrich Wachter die mich in die Arbeitsabläufe einführten und ohne deren Hilfe und Rat die Versuche nicht durchführbar gewesen wären.
Vielen Dank!

LEBENSLAUF

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt