**Universität Ulm**

**Institut für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung (APV)**

**Institutsleitung:**

**Prof. Dr. Dr. med. h. c. Peter Radermacher**

# Mitochondriale Effekte des Schwefelwasserstoffdonors AP39 auf Hepatozyten im Rahmen einer Lipopolysaccharid-Stimulation

**Dissertation**
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.) der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von
**Daniel Pascal Kupka**
geboren in Ostfildern (Ruit)
2021

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Enrico Calzia

2. Berichterstatter: PD Dr. Andrea Formentini

Tag der Promotion: 20.05.2022

*Diese Dissertation widme ich meiner Familie.*

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis ..... III

1 Einleitung ..... 1

1.1 Schwefelwasserstoff ..... 1

1.2 Funktionen von $H_2S$ ..... 4

1.3 Applikationsformen von $H_2S$ ..... 13

1.4 Der $H_2S$-Donor AP39 ..... 15

1.5 Zielsetzung ..... 16

2 Material und Methoden ..... 18

2.1 Material ..... 18

2.2 Methoden ..... 27

3 Ergebnisse ..... 55

3.1 Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch ..... 55

3.2 Wasserstoffperoxid-Produktion ..... 59

3.3 Western Blots ..... 63

3.4 Zusammenfassung ..... 73

4 Diskussion ..... 75

4.1 Effekte von AP39 auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch ..... 76

4.2 Effekte von LPS auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch ..... 81

4.3 Effekte von AP39 auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch unter LPS-Stimulation ..... 85

4.4 Effekte von AP39 und LPS auf die mitochondriale $H_2O_2$-Produktion ..... 89

4.5 Effekte von AP39 auf die Proteinexpression ..... 94

4.6 Limitationen ..... 98

4.7 Schlussfolgerung ..... 100

5 Zusammenfassung ..... 102

6 Literaturverzeichnis ..... 104

Danksagung ..... 118

Lebenslauf ..... 119

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| °C | Grad Celsius |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ANOVA | Analysis of variance |
| AP39 | [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid] |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Bax | Bcl-2-associated X Protein |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma 2 |
| $Br^-$ | Brom-Anion |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| C I-IV | Komplex I-IV |
| $Ca^{2+}$ | Calcium-Kation |
| CAT | Cystathionin Aminotransferase |
| CBS | Cystathionin-ß-Synthase |
| CO | Kohlenstoffmonoxid |
| $CO_2$ | Kohlenstoffdioxid |
| COX4 | Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 4 |
| COX5A/B | Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 5A/B |
| CSE | Cystathionin-γ-Lyase |
| Cu | Kupfer |
| $dcO_2$ | Änderung der Sauerstoffkonzentration |
| $dH_2O$ | destilliertes Wasser |
| DMEM/F-12 | Dulbecco‘s Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |

| | |
|---|---|
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DPBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung nach Dulbecco |
| dt | Änderung über die Zeit |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N′,N′-tetraessigsäure |
| et al. | et alii, et aliae, et alia (und andere) |
| ETS | Elektronentransportsystem |
| $FADH_2$ | Flavin-Adenin-Dinukleotid |
| FCCP | Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| GSH | Glutathion, reduziert |
| GSSG | Glutathion, oxidiert |
| GYY4137 | Morpholin-4-ium-4-methoxyphenyl(morpholino)-phosphinodithioate |
| $H^+$ | Wasserstoff-Kation/Proton |
| $H_2O_2$ | Wasserstoffperoxid |
| $H_2S$ | Schwefelwasserstoff |
| $H_2S_2O_3$ | Thiosulfat |
| HCl | Salzsäure |
| HEPES | 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure |
| $HO^{\cdot}$ | Hydroxylradikal |
| $HPO_4^{2-}$ | Hydrogenphosphat |
| HRP | Meerrettichperoxidase |
| $HS^-$ | Hydrogensulfid-Anion |
| IgG | Immunglobulin G |

| | |
|---|---|
| I/K-R | Intensität/Kontroll-Rate |
| IL-1β | Interleukin-1β |
| IL-10 | Interleukin-10 |
| IMM | Innere Mitochondrienmembran |
| ITS | Insulin-Transferrin-Selenium |
| $JO_2$ | Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch |
| $KH_2PO_4$ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| l | Liter |
| LDH | L-Lactatdehydrogenase |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| M | Mol |
| µg | Mikrogramm |
| mg | Milligramm |
| $MgCl_2$ | Magnesiumchlorid |
| MiR05 | Mitochondriales Atmungsmedium 05 |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| $mm^2$ | Quadratmillimeter |
| mM | Millimol |
| 3-MP | 3-Mercaptopyruvat |
| 3-MST | 3-Mercaptopyruvat-Schwefeltransferase |
| MT-CO1 | Mitochondrially encoded Cytochrome-c-Oxidase I |
| µM | Mikromol |
| µM | Mikroliter |
| n | Fallzahl |
| $Na_2S$ | Natriumsulfid |

| | |
|---|---|
| NaCl | Natriumchlorid |
| $NAD^+$ | Nicotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form |
| NADH | Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NaHS | Natriumhydrogensulfid |
| ng | Nanogramm |
| $NH_3$ | Ammoniak |
| $(NH_4)_2SO_4$ | Ammoniumsulfat |
| nmol/ml | Nanomol pro Milliliter |
| NRK | Nierenepithelzellen |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NP40 | Nonyl-Phenoxypolyethoxylethanol |
| $O_2$ | Sauerstoff |
| $O_2^-$ | Superoxid-Anion |
| $OH^-$ | Hydroxidion |
| OxPHOS | Oxidative Phosphorylierung |
| $P^+$ | Phosphor-Kation |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PGC-1α | Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha |
| pmol | Picomol |
| pmol/(s*Mill) | Picomol pro Sekunde mal Millionen |
| PNPP | Para-Nitrophenylphosphat |
| P/S | Penicillin-Streptomycin |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| RSS | Reaktive Schwefelspezies |

| | |
|---|---|
| s | Sekunde |
| $S^{2-}$ | Sulfid-Anion |
| SDH | Succinatdehydrogenase |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| -SH | Thiolgruppe |
| SOD | Superoxid-Dismutase |
| SOU | Sulfid-Oxidation-Unit |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TBS | Tris-gepufferte Kochsalzlösung |
| TMPD | Tetramethylphenylendiamin |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor-α |
| $TPP^{+}$ | Triphenylphosphonium Kation |
| Tween 20 | Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat |
| U | Atomare Masseneinheit |
| ü.N. | über Nacht |
| vs. | Versus (im Gegensatz zu) |

# 1 Einleitung

## 1.1 Schwefelwasserstoff

Schwefelwasserstoff ($H_2S$), ein farbloses Gas mit dem charakteristischen Geruch von faulen Eiern, stellt neben Kohlenstoffmonoxid (CO) und Stickstoffmonoxid (NO) einen der drei wichtigsten Gasotransmitter des menschlichen Körpers dar [138]. Der Ursprung von $H_2S$ reicht Milliarden von Jahren zurück. Es wird angenommen, dass das irdische Leben in den Ozeanen begann. Hierbei dienten aus Tiefseequellen freigesetzte Schwefelverbindungen als Substrate für die Organismen. Dieser Aspekt war essentiell, da Sauerstoff ($O_2$) sowohl in der Atmosphäre als auch im Meerwasser fehlte [14,20]. Viele Lebewesen konnten ihre metabolische Energie gewinnen, indem sie Elektronen von Sulfid-Anionen ($S^{2-}$) auf Sauerstoff übertrugen [61]. Als mehrzellige Organismen waren Röhrenwürmer in der Lage Hydrogensulfid-Anionen ($HS^-$) aus ihrer Umgebung aufzunehmen und im Gegenzug $S^{2-}$ für ihre inneren symbiontischen Bakterien freizusetzen. Diese konnten das Sulfid verwerten und so $H_2S$ als primäre Energiequelle nutzen. Dies ist einer der Gründe, weshalb Sulfid auch als das „Sonnenlicht der Tiefsee“ bezeichnet wird [30]. $H_2S$ kann, durch die im Vergleich zu Wasser ($H_2O$) höhere Löslichkeit in lipophilen Lösungsmitteln, durch Diffusion und ohne spezielle Membrantransporter in Zellen eindringen [88,138]. Daher waren einfache Organismen schon früh in der Lage $H_2S$ aufzunehmen und zu verstoffwechseln. In der biologischen Atmosphäre liegt Sulfid in verschiedenen gebundenen Formen vor. Es kann sowohl in einer säurelabilen, in einer stabil gebundenen Form, als auch als freies $H_2S$ vorkommen. In einer wässrigen Umgebung, wie sie Blut und Plasma darstellen, bildet $H_2S$ ein Gleichgewicht mit seinen beiden Anionen $HS^-$ sowie $S^{2-}$ (**Equation 1**).

$$H_2S \leftrightarrow H^+ + HS^- \leftrightarrow 2H^+ + S^{2-}$$

**Equation 1. Reaktionsgleichung von $H_2S$ mit seinen beiden Anionen $HS^-$ und $S^{2-}$.** $H_2S$ befindet sich mit seinen Anionen $HS^-$ und $S^{2-}$ im Gleichgewicht. $HS^-$ entsteht aus $H_2S$ durch die Abgabe eines $H^+$-Atoms. Durch eine weitere Abgabe eines $H^+$-Atoms entsteht $S^{2-}$.
Abkürzungen: $H^+$: Wasserstoff-Kation/Proton, $H_2S$: Schwefelwasserstoff, $HS^-$: Hydrogensulfid-Anion, $S^{2-}$: Sulfid-Anion

Während im Bereich des physiologischen pH-Wertes $H_2S$ ungefähr zu 20-30 % und $HS^-$ zu 70-80 % vorliegen, macht $S^{2-}$ nur einen vernachlässigbar kleinen Anteil aus [138]. Dabei ist der Anteil des vorliegenden $H_2S$ stets abhängig von der Temperatur sowie dem pH-Wert [22]. Schwefelatome, welche in einer stabilen Verbindung vorliegen, sind kaum reaktiv und können nur schwer durch Säuren aus der Bindung

gelöst werden [134]. Dem gegenüber gibt es säurelabile Sulfidmoleküle, wie Eisen-Schwefel-Cluster und Persulfide. Diese spielen bei Redoxreaktionen in den Mitochondrien sowie im Zytoplasma eine entscheidende Rolle. Polysulfide oder auch elementarer Schwefel können durch Reduktionen $H_2S$ freisetzen [135]. Um die Bioverfügbarkeit aufrechtzuerhalten kann das freie $H_2S$ wieder in diese Formen eingebaut werden [140].

### 1.1.1 Endogene Produktion

In Säugetieren findet die endogene Synthese von $H_2S$ auf zwei verschiedenen Wegen statt – enzymatisch sowie nicht-enzymatisch. Der enzymatische Weg erfolgt ausgehend von der Aminosäure L-Cystein über drei verschiedene Enzyme: Cystathionin-ß-Synthase (CBS), Cystathionin-γ-Lyase (CSE) sowie 3-Mercaptopyruvat-Schwefeltransferase (3-MST) (**Abbildung 1**) [127].

Das Enzym 3-MST ist für einen Großteil der mitochondrialen $H_2S$-Produktion verantwortlich. Lokalisiert ist es jedoch partial mitochondrial, da es ebenfalls im Zytosol vorkommt [114]. Der 3-MST-Syntheseweg beginnt bei L-Cystein und beinhaltet mehrere Enzyme. Das Erste ist die Cystathionin-Aminotransferase (CAT), welche mit Hilfe des Kofaktors a-Ketoglutarat aus L-Cystein 3-Mercaptopyruvat (3-MP) sowie Glutamat bildet. Das 3-MP reagiert daraufhin durch die 3-MST zu Pyruvat, Ammoniak ($NH_3$) sowie einem enzymgebundenen Persulfid. Für die letztliche Freisetzung von $H_2S$ wird ein Reduktionsmittel wie Thioredoxin oder Glutathion benötigt, welches das $H_2S$ aus dem Persulfid löst [67,90,114,142]. Die 3-MST spielt in der Regulation zellulärer Bioenergetik eine entscheidende Rolle. Niedrige Konzentrationen von 3-MP produzieren $H_2S$ und üben damit sowohl in isolierten Mitochondrien als auch in kultivierten Zellen einen stimulierenden Effekt auf bioenergetische Parameter aus. Höhere Konzentrationen der 3-MST hingegen unterdrücken zelluläre bioenergetische Prozesse [1]. Die beiden Enzyme CBS sowie CSE kommen überwiegend im Zytosol vor. Der enzymatische Weg beginnt mit der Ausgangssubstanz Homocystein, welches durch die CBS zu Cystathionin katalysiert wird. Das Cystathionin wiederum kann durch die CSE zu L-Cystein reagieren. Aus dem L-Cystein entsteht entweder unter der enzymatischen Reaktion mithilfe der CBS $H_2S$ und Serin oder durch den enzymatischen Einfluss der CSE das Produkt $H_2S$ unter Abspaltung von $NH_3$ und Pyruvat (**Abbildung 1**). Beide Reaktionen sind von dem Cofaktor Pyridoxalphosphat abhängig [7,91,122].

Bei Zelldysfunktionen sind die CBS und CSE dazu in der Lage, durch eine Translokation zwischen Zytosol und Mitochondrium, eine mitochondriale Schutzwirkung auszuüben [29,131]. Von der CBS synthetisiertes $H_2S$ ist ebenfalls an der Beteiligung von Energieverwertung sowie am Zellwachstum beteiligt. Dieser Aspekt ist vorteilhaft für Dickdarmkrebszellen, da das endogene $H_2S$ energiekonsumierende Prozesse wie die Proliferation, Migration sowie Invasion der Tumorzellen unterstützt. Eine Ausschaltung der CBS hat dementsprechend eine Beeinträchtigung des Tumorwachstums zur Folge [126].

Obwohl die drei Enzyme CBS, CSE sowie 3-MST in vielen Geweben vorkommen, existieren organspezifische Manifestationen. Während die CBS überwiegend im Gehirn, Niere, Leber und Nervensystem, die CSE im kardiovaskulären System, in der Niere und Leber lokalisiert sind, findet sich die 3-MST überwiegend im Gehirn und im Gefäßsystem [1,114,122,129]. Darüber hinaus werden auch im menschlichen Darm große Mengen an $H_2S$ produziert. Dies geschieht jedoch durch anaerobe Bakterien und es werden Konzentrationen erreicht, die bereits in einem toxischen Bereich liegen [33].

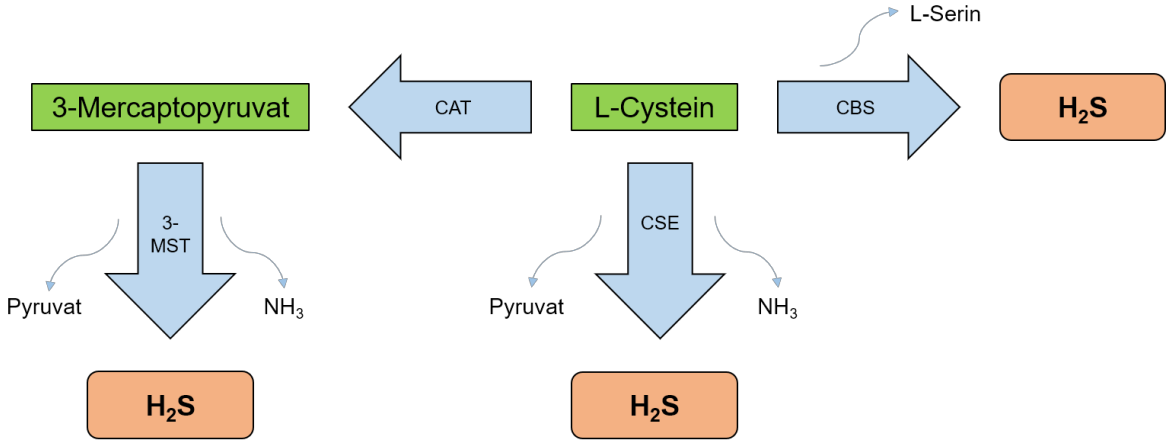



**Abbildung 1. Enzymatische $H_2S$-Synthese *in vivo*.** Aus der Ausgangssubstanz L-Cystein entsteht unter dem Einfluss der CAT das Produkt 3-Mercaptopyruvat, welches durch die 3-MST weiter zu $H_2S$ reagiert. Dabei entstehen Pyruvat und $NH_3$. Durch die CSE wird aus der Ausgangssubstanz L-Cystein, ebenfalls unter der Abspaltung von Pyruvat und $NH_3$, $H_2S$ synthetisiert. Der dritte Weg der $H_2S$-Synthese läuft über das Enzym CBS, welches $H_2S$ aus L-Cystein, unter Abspaltung von L-Serin bildet.
Abkürzungen: CAT: Cystathionin-Aminotransferase, CBS: Cystathionin-ß-Synthase, CSE: Cystathionin-γ-Lyase, $H_2S$: Schwefelwasserstoff, 3-MST: 3-Mercaptopyruvat-Schwefeltransferase, $NH_3$: Ammoniak

Neben der enzymatischen Synthese von $H_2S$ existieren zudem nicht-enzymatische Wege, bei denen $H_2S$ aus Polysulfiden, elementarem Schwefel, Glutathion sowie Glukose entstehen kann. Polysulfide, wie beispielsweise Thiosulfat ($H_2S_2O_3$),

bestehen aus Ketten von Schwefelatomen und gehören zur Gruppe der reaktiven Schwefelspezies (RSS). Laut Giles et al. dienen schwefelhaltige Moleküle als Antioxidationsmittel, denn Thiole können reaktive Sauerstoffspezies (ROS) reduzieren und somit den Redoxzustand der Zelle aufrechterhalten [34]. Villarejo und Westley haben beobachtet, dass $H_2S$ durch das Enzym Rhodanase aus $H_2S_2O_3$ gebildet werden kann [136]. Durch die Reduktion von chemischen Äquivalenten der Glykolyse und des Pentosephosphatwegs, wie beispielsweise Nicotinamidadenindinukleotid($NAD^+$ / NADH) sowie Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), kann aus elementarem Schwefel und Glutathion ebenfalls $H_2S$ entstehen [111].

## 1.2 Funktionen von $H_2S$

Der Gasotransmitter $H_2S$ ist ein physiologisches Botenmolekül mit Einflüssen auf diverse Organe. Die Spanne reicht von Effekten auf das zentrale und periphere Nervensystem, über die Regulation von inflammatorischen Effekten bis hin zu multiplen Effekten auf das kardiovaskuläre System [127]. Charakteristisch ist, dass die Effekte abhängig von der lokalen Konzentration stark variieren. So vermittelt $H_2S$ je nach Gewebe und vorliegender Konzentration pro- oder antiinflammatorische, zytoprotektive oder zytotoxische, pro- oder antiapoptotische sowie vasodilatierende Effekte (**Abbildung 2**).

### 1.2.1 Effekte auf die Atmungskette

Mitochondrien sind Zellorganellen, welche bei Säugetieren in allen Zelltypen mit Ausnahme der roten Blutkörperchen vorkommen und zur Energiegewinnung benötigt werden. Das Mitochondrium ist aus einem doppelten Membransystem aufgebaut. Dieses besteht aus der inneren sowie der äußeren Mitochondrienmembran, welche zusammen den Intermembranraum begrenzen. Der Raum innerhalb der inneren Membran wird als Matrix des Mitochondriums bezeichnet. Die Komplexe der Atmungskette, an denen die mitochondriale Atmung und oxidative Phosphorylierung stattfinden, sind in der inneren Mitochondrienmembran (IMM) lokalisiert. Der Citratzyklus, welcher unter anderem Elektronen für die Atmungskette produziert, läuft in der Matrix des Mitochondriums ab. Die Atmungskette besteht aus vier Proteinkomplexen, Komplex I bis Komplex IV. Da der Elektronentransport bis Komplex V über diese Komplexe stattfindet, bilden sie das Elektronentransportsystem (ETS) [43]. Während der Übertragung der Elektronen von einem Komplex auf den nächsten, werden Protonen über die IMM in den Intermembranraum gepumpt. Dadurch wird ein

zunehmender Protonengradient aufgebaut. Dieser wird schlussendlich am Komplex V, unter der Entstehung von Adenosintriphosphat (ATP), über die oxidative Phosphorylierung abgebaut [42]. Da die Proteinkomplexe in der inneren Membran verankert sind, werden für den Elektronentransfer mobile Coenzyme benötigt. In der Atmungskette übernimmt diese Funktion das Ubichinon sowie das Cytochrom c [39]. Der Komplex I, die NADH-Dehydrogenase, nimmt Elektronen von NADH auf und überträgt diese anschließend auf das Ubichinon. Die Succinatdehydrogenase (SDH) ist nicht nur der zweite Komplex der mitochondrialen Atmungskette, sondern auch ein Komplex des Citratzyklus. Die Elektronen werden hier von Flavin-Adenin-Dinukleotid ($FADH_2$) ebenfalls auf Ubichinon weitergegeben [40]. Am Komplex III, der Cytochrom c-Oxidoreduktase, werden Elektronen von Ubichinol auf Cytochrom c transferiert. Die Cytochrom-c-Oxidase (COX), der vierte Komplex, überträgt Elektronen von Cytochrom c auf $O_2$ und katalysiert so die Reaktion von $O_2$ zu $H_2O$. Die ATP-Synthase vermittelt schlussendlich die Reaktion von Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat zu ATP und $H_2O$ [93]. Ein entscheidender Faktor stellt die biphasische Dosis-Wirkungs-Kurve von $H_2S$ auf die Atmungskette dar. Bei niedrigen Konzentrationen fungiert $H_2S$ als Reservesubstrat in der Atmungskette, indem Elektronen auf Ubichinon übertragen werden. Dies führt zu einem stimulatorischen Effekt der Atmungskette. In höheren Konzentrationen jedoch inhibiert $H_2S$ die mitochondriale COX [51]. Prior et al. zeigten zudem, dass die Toxizität von $H_2S$ vorwiegend von der Konzentration und weniger von der Expositionsdauer abhängt. Kam es zu einem Anstieg der Konzentration, stieg die Letalität verhältnismäßig stärker an. Dies führt zu einer steilen Expositions-Letalitäts-Kurve für $H_2S$ [106].

#### 1.2.1.1 Stimulation der Atmungskette durch $H_2S$

In physiologischen Umgebungen kann bei $H_2S$-Konzentrationen von bis zu 10 µM von einer stimulatorischen Wirkung auf die mitochondriale Atmungskette ausgegangen werden. In diesem Konzentrationsbereich dient $H_2S$ neben den Substraten $FADH_2$ und NADH als Elektronendonor [127]. $H_2S$ spendet mittels einer Sulfidoxidation Elektronen an die Atmungskette [16,51]. Bei der Elektronenübertragung reagieren zwei Moleküle $H_2S$ mit $O_2$ zu $H_2S_2O_3$ [127]. Diese Reaktion erfolgt durch die Sulfid-Chinon-Oxido-Reduktase, einer Untereinheit der Sulfid-Oxidation-Unit (SOU) [51]. Da sich die SOU zwischen den

Komplexen I und III befindet, folgen die Elektronen anschließend dem oxidativen Weg über Komplex III, Cytochrom c, Komplex IV zu Komplex V, um schließlich $O_2$ zu $H_2O$ zu reduzieren [51]. Dabei wird der Protonengradient an den Komplexen III und IV ausgebaut. Da zwei Moleküle $H_2S$ nur zwei Elektronen bereitstellen können, wird für den Aufbau des Protonengradienten im Vergleich zu NADH und $FADH_2$ dreimal mehr $O_2$ benötigt [127]. Dies macht den anorganischen Elektronendonor $H_2S$ im Hinblick auf den Sauerstoffbedarf zu einem ineffektiven Energieträger. Dennoch hat $H_2S$ als Energieträger laut den Autoren Szabo et al. Vorteile. Zum einen kann $H_2S$ frei durch Membranen diffundieren sowie ohne den Einsatz von Transportern das Mitochondrium erreichen. Zum anderen benötigt Schwefel als Energieträger keiner biochemischen Vorbereitung und die Affinität der SOU zu Schwefel ist hoch, sodass annähernd 100 % oxidiert werden können [127].

#### 1.2.1.2 Inhibition der Atmungskette durch $H_2S$

Die Toxizität von $H_2S$ in höheren Konzentrationen ist in erster Linie der Inhibition der Atmungskette geschuldet [16,57,96,107]. Die hemmende Wirkung kann auf die Interaktion von $H_2S$ mit der COX zurückgeführt werden [10,26,51]. Durch die reversible Bindung des $H_2S$ wird die Bindung von $O_2$ an die COX gehemmt. Durch den Ausfall des Komplexes, kommt es innerhalb des ETS zu einem Rückstau von Elektronen, da das reduzierte Cytochrom c nicht oxidiert werden kann [127]. Folglich stellt sich ein komplettes Erliegen der Atmungskette mit Stopp der aeroben ATP-Erzeugung ein, da der zuvor aufgebaute Protonengradient nicht beibehalten werden kann. Dieser Pathomechanismus ist ebenfalls bei der Cyanidvergiftung bekannt. Jedoch kommt es durch das Cyanid zu einer irreversiblen Hemmung der COX [17]. Im Gegensatz dazu führt die reversible Hemmung durch $H_2S$ dazu, dass die Enzymaktivität innerhalb von zehn bis 30 Minuten nach einmaliger Gabe von $H_2S$ auf nahezu ursprüngliche Werte zurückkehrt [127].

#### 1.2.1.3 Künstlich induzierter Ruhezustand

$H_2S$ führt zu einer reversiblen COX-Hemmung und ist daher sowohl die Ursache für die toxischen Effekte als auch für die Induktion eines künstlichen Ruhezustands (suspended animation) (**Abbildung 2**) [8]. Unter einer „suspended animation“ versteht man einen Zustand der induzierten Reduktion von Stoffwechselprozessen mit dem Ziel die Organfunktionen zu erhalten. Bei Nagetieren konnte durch den inhalativen Einsatz von $H_2S$ ein reduzierter, winterschlafähnlicher Stoffwechselzustand erreicht werden, der zu einer Hypothermie sowie einer

Reduktion des Sauerstoffbedarfs geführt hat. Durch den niedrigeren Sauerstoffbedarf konnten die Nagetiere länger hypoxische Bedingungen tolerieren. Blackstone et al. konnten in Experimenten mit Mäusen demonstrieren, dass $H_2S$ den Stoffwechsel um ca. 90 % reduzieren konnte. Dies führte dazu, dass mit $H_2S$ vorbehandelte Mäuse mehr als sechs Stunden in einer hypoxischen Atmosphäre ohne bleibende Schäden überleben konnten [8]. Im Jahr 2008 konnten die Autoren Simon et al. durch die intravenöse Verwendung von $H_2S$-freisetzendem Natriumsulfid ($Na_2S$) ebenfalls einen hypometabolischen Stoffwechselzustand in einem Tiermodell mit Hausschweinen induzieren. Durch die Verabreichung von $Na_2S$ wurde die Herzfrequenz, das Herzzeitvolumen und letztendlich die Kerntemperatur der Tiere reduziert [117]. Weitere Versuche diese Effekte in Großtierexperimenten zu reproduzieren schlugen seitdem jedoch fehl.

### 1.2.2 Radikalfänger

Um Energie zu gewinnen, werden Elektronen in aeroben Organismen am Ende der Atmungskette auf molekularen Sauerstoff übertragen. Dennoch wird ungefähr 5 % des vorliegenden Sauerstoffs zu freien Radikalen reduziert [6]. Als ROS werden reduzierte Sauerstoffspezies wie Superoxid-Anionen ($O_2^-$), Wasserstoffperoxid ($H_2O_2$) sowie Hydroxylradikale ($HO\cdot$) bezeichnet. Diese befinden sich mit den Antioxidantien in einem physiologischen Gleichgewicht. In diesem Setting agieren ROS als wichtige Signalmoleküle, welche die Informationsverarbeitung und Adaptionsvorgänge der Zellen beeinflussen. Kommt es hingegen zu einem Überwiegen der ROS-Konzentrationen, führt dies zu oxidativem Stress. Eine leichte Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der ROS-Konzentrationen führt zu Zelldysfunktionen, während eine starke Verschiebung den Zelltod verursacht [52,82]. Die reaktiven Sauerstoffspezies entstehen durch die sequentielle Reduktion von molekularem Sauerstoff durch jeweils ein Elektron (**Equation 2**) [101].

$$O_2 \text{ -e}^- \rightarrow O_2^- \text{ , } O_2^- \text{ -e}^- \rightarrow H_2O_2 \text{ ; } H_2O_2 \text{ -e}^- \rightarrow HO\cdot \text{ ; } HO\cdot \text{ -e}^- \rightarrow H_2O$$

**Equation 2. Sequentielle Reduktion von $O_2$ zu $H_2O$ unter Entstehung von ROS.** Durch eine sequentielle Aufnahme eines Elektrons entsteht aus $O_2$ das Radikal $O_2^-$**.** Nimmt $O_2^-$ ein Elektron auf, entsteht das Produkt $H_2O_2$. Aus $H_2O_2$ kann durch Aufnahme eines weiteren Elektrons $HO\cdot$ Entstehen. Zusammen bilden $O_2^-$, $H_2O_2$ sowie $HO\cdot$ Die Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies. Durch eine Elektronenübertragung auf $HO\cdot$ Kann $H_2O$ entstehen.
Abkürzungen: $e^-$: Elektron, $H_2O$: Wasser, $H_2O_2$: Wasserstoffperoxid, $HO\cdot$: Hydroxylradikal, $O_2$: Sauerstoff, $O_2^-$: Superoxid-Anion, ROS: Reaktive Sauerstoffspezies

Die Superoxid-Dismutase (SOD) katalysiert dabei die Reaktion von $O_2^-$ zu $O_2$ und $H_2O_2$. Das zweite Enzym, die Katalase, vermittelt die Reaktion von $H_2O_2$ zu $O_2$ und $H_2O$. Intrazellulär kann $H_2S$ mit ROS reagieren und dadurch eine antioxidative Wirkung auf Sauerstoffradikale haben (**Abbildung 2**) [5]. Miranov et al. demonstrierten, dass die endogene Synthese von $H_2S$ Escherichia coli-Bakterien sowohl gegen oxidativen Stress resistenter machte als auch die chromosomale Desoxyribonukleinsäure (DNS) vor oxidativem Schaden schützen konnte. Dabei beruht die antioxidative Wirkung von $H_2S$ weniger auf dem direkten Abfangen der Radikalspezies, sondern eher auf einer Induktion der Glutathionkaskade [92]. Glutathion ist ein Tripeptid, welches aus den drei Aminosäuren Glutamat, Cystein sowie Glycin aufgebaut ist und als reduziertes (GSH) oder oxidiertes (GSSG) Glutathion vorkommt. GSH kann durch Oxidation ROS reduzieren und so die Zelle vor Radikalen zu schützen. Ein intrazellulärer Anstieg von $H_2O_2$ führt zu einer Beeinträchtigung der Aufnahme des Glutamats, welches für die Glutathionsynthese benötigt wird. In physiologischen Konzentrationen kann $H_2S$ die Aufnahme des Glutamats erhöhen [84].

### 1.2.3 Apoptose, Inflammation und Zellfunktion

Hohe Konzentrationen an ROS führen zu oxidativem Stress innerhalb der betroffenen Zellen. Eine Applikation von $H_2S$ kann durch die antioxidativen Effekte dem oxidativen Stress entgegenwirken und antiapoptotisch wirken [5,92]. Darüber hinaus werden weitere antiapoptotische Effekte durch eine vermehrte Expression des antiapoptotischen Faktors B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) vermittelt [65]. In den vergangenen Jahren ist in mehreren *in vitro* Experimenten insbesondere die Zytoprotektivität von $H_2S$ aufgefallen [3,76,98,130]. In zerebralen Endothelzellen, Nierenepithelzellen (NRK) sowie Hepatozyten führte die Behandlung von $H_2S$ zu einer gesteigerten Lebensfähigkeit der betroffenen Zellen [3,76,98]. Die Autoren Le Trionnaire et al. konnten nicht nur die protektiven Effekte nachweisen, sondern auch, dass die gezielte Freisetzung von $H_2S$ innerhalb des Mitochondriums für die schützenden Effekte verantwortlich war. Im Vergleich zu einer nicht zielgerichteten $H_2S$-Gabe, konnte der Einsatz von [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid] (AP39) die schützende Wirkung stark erhöhen [76]. In zerebralen Endothelzellen von Mäusen führte oxidativer Stress zu einer Abnahme der mitochondrialen Aktivität sowie zu einem Abfall der Überlebensfähigkeit der Zellen. Im Extremfall kam es zu einem Verlust

der Zellmembranintegrität mit Freisetzung von L-Lactatdehydrogenase (LDH) sowie zu Nekrosen. Durch die Behandlung mit $H_2S$ konnten die zytotoxischen Wirkungen abgeschwächt werden. Stieg der oxidative Stress der Zelle jedoch weiter an, wurde dieser Effekt nicht mehr nachgewiesen [130]. Gleiche Schlussfolgerungen konnten durch die Autoren Ahmad et al. für NRKs getroffen werden [3]. Auch *in vivo* Experimente zeigten sich zytoprotektive Wirkungen von $H_2S$ [23,120]. Die Behandlung mit $H_2S$ führte zu einer Abschwächung der proinflammatorischen Zytokinspiegel sowie zu einer verbesserten Integrität der mitochondrialen Membran [23,120]. Bei dem Lipopolysaccharid-(LPS-) induzierten akuten Lungenversagen reduzierte $H_2S$ die Rekrutierung und Akkumulation von Neutrophilen im Lungengewebe und hemmte die proinflammatorische sowie oxidative Signalübertragung der Entzündungszellen. Eine Vorbehandlung mit $H_2S$ konnte, durch eine Verringerung der Konzentration des proinflammatorischem Zytokins Interleukin-1β (IL-1β) sowie eine Erhöhung des Konzentrationsspiegels des entzündungshemmenden Interleukin-10 (IL-10), das LPS-induzierte akute Lungenversagen abschwächen [24,27]. Jedoch sind neben den antiinflammatorischen Wirkungen auch proinflammatorische Effekte beschrieben (**Abbildung 2**). In einem *in vitro* Modell mit Azinuszellen von Mäusen konnte durch eine Behandlung mit $H_2S$ eine Apoptose induziert werden. Das verabreichte $H_2S$ führte zu einer Freisetzung von Cytochrom c, steigerte die Translokation des proapoptotischen Proteins Bcl-2-associated X Protein (Bax) in das Mitochondrium und reduzierte die Spiegel von Bcl-2 [2]. In kultivierten humanen gingivalen Fibroblasten induzierte $H_2S$ ebenfalls eine signifikante Apoptose. Dabei waren die Veränderungen abhängig von der verabreichten Dosis und der jeweiligen Behandlungszeit [145]. *In vivo* aggravierte $H_2S$ in Ratten und Mäusen eine LPS-induzierte Endotoxämie und führte sowohl zu einer gesteigerten Inflammation in Lunge und Leber als auch zu einer erhöhten Plasmakonzentration des proinflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) [15,80].

Die Endotoxine LPS sind ein struktureller Bestandteil in der Außenmembran gramnegativer Bakterien. Die Aktivierung von Entzündungszellen ist das Ergebnis einer LPS-Exposition, welche die Sekretion verschiedener entzündungsfördernder Zytokine und Mediatoren, einschließlich TNF-α, IL-1β, Interleukin-6, Cyclooxygenase-2 und der induzierbaren Stickoxidsynthase, fördert [13]. Dies führt letztendlich zu einem akuten Inflammationsprozess und macht LPS zu einem der

stärksten Stimuli für den Organismus [116]. Der Einsatz von $H_2S$ in Makrophagen konnte *in vitro* die LPS-induzierte Freisetzung der Entzündungsmediatoren Prostaglandin E2, NO, TNF-a, sowie IL-1β reduzieren und das entzündungshemmende IL-10 erhöhen. Dadurch kam es zu einer abgeschwächten Inflammationsreaktion [141]. In einem *in vitro* Zellmodell mit Brustepithelzellen von Rindern verringerte die LPS-Exposition die Lebensfähigkeit der Zellen. Die exogene Zufuhr von 10 µM $H_2S$ konnte sowohl die ROS-Produktion als auch die Konzentration proinflammatorischer Zytokine reduzieren und die Lebensfähigkeit der Zellen verbessern [124]. Die Autoren Ahmad et al. konnten in einer Studie zeigen, dass die Exposition von Mäusen mit LPS zu einer gewebeabhängigen Erhöhung von $H_2S$-bildendenden Enzymen führte. Die CBS war in der Milz, die 3-MST in der Leber sowie die CBS, CSE und 3-MST in der Lunge erhöht. Des Weiteren konnten erhöhte Zytokinspiegel gemessen werden und die Gesamtmortalität stieg an [4]. In einer weiteren Studie von Collin et al. stellte sich heraus, dass eine durch LPS verursachte Endotoxämie zu einer hepatozellulären Verletzung und zur Dysfunktion vieler weiterer Organe in Ratten führte. Eine Vorbehandlung mit einem Inhibitor der $H_2S$-Synthese konnte die Leberzellschädigung reduzieren [15]. Für die Applikation von LPS ist darüber hinaus noch ein schädigender Effekt auf Mitochondrien beschrieben. Dieser beruht auf der Tatsache, dass es durch LPS sowohl zu einer mitochondrialen Schwellung als auch zu einem Verlust des Membranpotentials und folglich zu einer erhöhten Permeabilität des Mitochondriums kommt [54].

### 1.2.4 Vasodilatation

$H_2S$ hat eine vasodilatierende Wirkung auf das Endothel des Gefäßsystems (**Abbildung 2**). Ein CSE-Knockout bei Mäusen führte zu einer Hypertension der betroffenen Tiere [143]. Die Vasodilatation wird durch eine Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen vermittelt. Dabei kommt es zu einer Öffnung von ATP-sensitiven Kaliumkanälen in den jeweiligen Zellen [147]. Der Grad der Relaxierung ist unter anderem abhängig von der Konzentration des $H_2S$ sowie vom Vorhandensein eines funktionellen Endothels. Eine Vasodilatation durch Aktivierung des zyklischen Guanosinmonophosphat-Wegs, wie sie für NO typisch ist, spielt bei $H_2S$ nur eine untergeordnete Rolle [132,147].

### 1.2.5 Sauerstoffsensor

Sauerstoffsensorzellen lösen homöostatische Reaktionen auf Hypoxämien aus und kommen unter anderem im Karotiskörper und in den Blutgefäßen vor [100]. Der Karotiskörper misst den Sauerstoffspiegel im arteriellen Blut und stimuliert die Atmung als Reaktion auf eine niedrige Sauerstoffkonzentration. $H_2S$ wird im Karotiskörper durch die CSE gebildet und führt zu einer gesteigerten sensorischen Reaktion auf Hypoxämien. Bei Mäusen mit genetischer CSE-Deletion kam es zum Verlust der $H_2S$-Generation und zu einer fehlenden Stimulation der Atmung [103]. Olson et al. zeigten, dass die Hemmung der $H_2S$-Produktion zu einer Abschwächung der Reaktion der Blutgefäße auf Hypoxämien führte. Umgekehrt konnte durch die Gabe von L-Cystein die vaskuläre Reaktion wiederhergestellt werden [99]. $H_2S$ nimmt somit eine physiologische Rolle in der Regulation von hypoxisch-vermittelten Körperprozessen ein und dient als ein wichtiger Sauerstoffsensor (**Abbildung 2**).

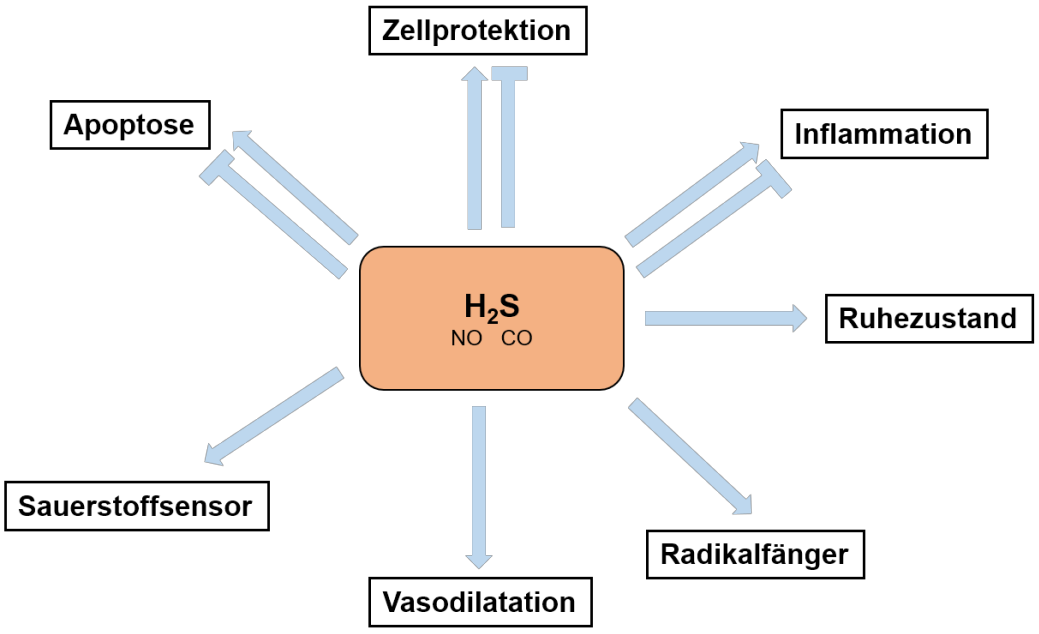



**Abbildung 2. Physiologische Effekte des Gasotransmitters $H_2S$**. Zu der Gruppe der Gasotransmitter gehören CO, $H_2S$ sowie NO. $H_2S$ wirkt sowohl pro- und antiapoptotisch, zytoprotektiv und zytotoxisch, pro und antiinflammatorisch als auch als Radikalfänger und Sauerstoffsensor. Darüber hinaus bewirkt es eine Vasodilatation und kann eine Art winterschlafähnlichen Ruhezustands induzieren.
Abkürzungen: CO: Kohlenstoffmonoxid, $H_2S$: Schwefelwasserstoff, NO: Stickstoffmonoxid

### 1.2.6 $H_2S$ in der Leber

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des Körpers. Ihre Stoffwechselkapazität erhält sie durch die Hepatozyten, welche ungefähr 80 % der Lebermasse einnehmen. Das Organ steuert multiple Stoffwechselvorgänge und ist

unter anderem am Glukosestoffwechsel, am Harnstoffwechsel, am Cholesterinstoffwechsel sowie an der Blutentgiftung beteiligt. Zudem hat die Leber einen wichtigen Einfluss auf das hämatopoetische und das gastrointestinale System [50]. Durch die hohe Durchblutung der Leber mit Blut aus dem Magen-Darm-Trakt ist sie hohen $H_2S$-Konzentrationen ausgesetzt. Aufgrund der Fähigkeit zur $H_2S$-Oxidation kann sie im Kreislauf vorhandenes $H_2S$ unter Sauerstoffverbrauch entfernen [97]. Dieser Aspekt macht das Organ zu dem zentralen Organ des $H_2S$-Metabolismus. Alle drei $H_2S$-bildenden Enzyme CBS, CSE sowie 3-MST kommen in der Leber vor und nehmen durch die Produktion von $H_2S$ Einfluss auf die Leberfunktion [86]. Das Enzym CBS ist unter physiologischen Bedingungen kaum in hepatischen Mitochondrien vorhanden. Im Falle einer Stresssituation, wie beispielsweise bei einer Ischämie oder Hypoxie, akkumuliert die CBS intramitochondrial, um größere Mengen $H_2S$ zu produzieren. Die gesteigerten $H_2S$-Spiegel führen zu einer Erhöhung der mitochondrialen Integrität der Hepatozyten. Folglich kommt es zu einer Blockade der Cytochrom c-Freisetzung und der mitochondrialen Schwellung [131]. Die Autoren Norris et al. konnten in primären Hepatozyten der Ratte feststellen, dass die Applikation von $H_2S$ bei vorliegender Hypoxie zu einer signifikanten Reduktion des Zelltods führte. Dabei kam es durch die $H_2S$-Behandlung zu einer abnehmenden mitochondrialen ROS-Produktion [98]. Darüber hinaus konnten in einem *in vitro* Modell antifibrotische Wirkungen durch die Behandlung mit 500 µM Natriumhydrogensulfid (NaHS) nachgewiesen werden. Diese wurden größtenteils durch eine Unterdrückung der Proliferation von hepatischen Sternzellen sowie durch eine verringerte intrazelluläre ROS-Produktion erreicht [28]. Die Erhöhung der mitochondrialen Integrität, eine Reduktion der ROS-Produktion, ein verbessertes Zellüberleben sowie die antifibrotischen Effekte verdeutlichen die protektiven Effekte von $H_2S$ auf Hepatozyten [28,98,131]. Nichtsdestotrotz zeigte sich, dass eine Inkubation von kultivierten Hepatozyten mit 0,5 mM NaHS für zwei Stunden zu einer Nekrose der Hepatozyten führen konnte. Die Autoren Truong et al. machten reaktive Schwefelspezies als Ursache der Nekrosen aus. Die reaktiven Schwefelmoleküle führten zu einer Glutathiondepletion und folglich zu gesteigerten ROS-Konzentrationen, welche die Toxizität des NaHS verursachten [133].

#### 1.2.6.1 $H_2S$ und der Lipidmetabolismus

Die Leber ist ein essentielles Organ für den Lipidstoffwechsel. Die Expression vieler Gene, welche am Fettstoffwechsel beteiligt sind, zeigen in Hepatozyten einen zirkadianen Rhythmus. Dysbalancen dieser zirkadianen Gene können Erkrankungen verursachen, die im Zusammenhang mit dem Fettstoffwechsel stehen. In isolierten Hepatozyten hatte die Applikation von $H_2S$ eine schützende Wirkung auf die Aufrechterhaltung zirkadianer Gene [113]. *In vivo* neigten Mäuse mit CBS-Mangel dazu eine Hyperhomocysteinämie zu entwickeln. Dies war mit einem erhöhten oxidativen Stress in der Leber assoziiert.

#### 1.2.6.2 $H_2S$ und der Glukosemetabolismus

Die beiden Hormone Insulin und Glukagon sind hauptsächlich für die intrahepatische homöostatische Kontrolle des Glukosestoffwechsels verantwortlich. In einer Studie von Zhang et al. konnte in einem *in vitro* Leberinsulinresistenz-Modell gezeigt werden, dass die Applikation von NaHS die basale und Insulin-stimulierte Glukoseaufnahme und Glykogenspeicherung signifikant beeinträchtigte und die Glukoneogenese sowie die Glykogenolyse verbesserte. Der verminderte Glykogengehalt der Hepatozyten war auf eine CSE-Überexpression zurückzuführen [146]. Durch Yang et al. wurde beschrieben, dass bei niedrigen extrazellulären Glukosekonzentrationen ein hoher $H_2S$-Spiegel vorliegt. Bei einer Erhöhung der extrazellulären Glukosekonzentration sinkt der endogene $H_2S$-Spiegel hingegen ab. Daraus resultiert eine erhöhte Insulinsekretion [144].

### 1.3 Applikationsformen von $H_2S$

Für die Verabreichung von $H_2S$ existieren unterschiedliche Applikationsformen. Zum einen besteht die Möglichkeit der inhalativen Verabreichung, zum anderen die Möglichkeit der direkten Injektion. Die inhalative Verabreichung von $H_2S$ ist eine leicht durchführbare und häufige Applikationsform, da die natürliche Form von $H_2S$ bei Raumtemperatur und physiologischem Druck gasförmig ist [128].

Trotz dieses Vorteils der inhalativen Applikationsform gibt es einige Gründe, welche diese Applikationsmethode erschweren. Für die Lagerung und den Transport von $H_2S$ wird eine spezielle Ausrüstung, zum Beispiel Gastanks und Masken, benötigt. Darüber hinaus hat $H_2S$ einen stechenden Geruch, welcher irritative Symptome, wie die Reizung der Atemwege, hervorrufen kann. Insbesondere die Lungenalveolarepithelzellen, welche direkt und in hohen Konzentrationen dem inhalativen $H_2S$ ausgesetzt werden, können geschädigt werden [18,128]. Weitere

Limitationen der inhalativen Verabreichung sind die Abhängigkeit der Bioverfügbarkeit von intrapulmonalen Transportsystemen sowie die leichte Entzündbarkeit des gasförmigen $H_2S$ [18].

Abseits der inhalativen Verabreichung besteht die Möglichkeit der direkten Injektion. Dazu werden $H_2S$-Donoren eingesetzt, welche $H_2S$ über verschiedene Mechanismen freisetzen. Die Applikation per Injektion hat im Vergleich zu der inhalativen Verabreichung die technisch einfache Durchführung als Vorteil. Dies führt zu einem geringen Expositionsrisiko der Umgebung und des eingesetzten Personals. $H_2S$-Donoren können in schnell und langsam freisetzende Donoren unterteilt werden. Zu den schnell freisetzenden $H_2S$-Donoren zählen die festen Sulfidsalze, wie beispielsweise $Na_2S$ und NaHS. Trotz ihres festen Zustands setzen sie, sobald sie sich in einer wässrigen Umgebung befinden, unmittelbar $H_2S$ frei. Der Nachteil der Sulfidsalze ist, dass sie im Vergleich zur endogenen Produktion $H_2S$ schneller und in supraphysiologischen Konzentrationen freisetzen. Dies kann in toxischen Konzentrationen enden [128]. In *in vitro* Experimenten zeigte sich nach dem schnellen Anstieg der Konzentration eine rasche Metabolisierung des $H_2S$, welche zu einer maximalen Halbwertszeit der Sulfidsalze von 30 Minuten führte [128]. Somit können die Salze die Wirkungen von endogenem $H_2S$ nicht korrekt nachahmen [81]. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren zunehmend synthetische $H_2S$-Donoren entwickelt, welche die Anforderungen einer kontrollierten $H_2S$-Freisetzung erfüllen sollten. Dabei sollte verhindert werden, dass zum einen toxische Konzentrationen erreicht werden, zum anderen durch hohe Metabolisierungsraten eine dauerhafte Applikation erforderlich war [128]. Die beiden synthetischen Moleküle AP39 und Morpholin-4-ium-4-methoxyphenyl(morpholino) phosphinodithioate (GYY4137) setzen $H_2S$ durch spontane Hydrolyse in wässrigen Lösungen frei. Im Vergleich zu den Sulfidsalzen erfolgt dies langsamer und in niedrigeren Höchstkonzentrationen [81,130]. In *in vitro* Experimenten mit LPS-behandelten Makrophagen der Maus wirkte GYY4137 entzündungshemmend und konnte die durch LPS-vermittelte Zytotoxizität hemmen [141]. Dazu waren aufgrund der eingeschränkten Zellpermeabilität von GYY4137 Konzentrationen von bis zu 100 mM notwendig. Der Bedarf solch hoher Konzentrationen schränkt das therapeutische Potenzial des $H_2S$-Donors GYY4137 jedoch ein [76].

## 1.4 Der $H_2S$-Donor AP39

Das synthetische Molekül AP39 ist ein mitochondrial gerichteter $H_2S$-Donor. Durch eine gezielte $H_2S$-Freisetzung und der Akkumulation von $H_2S$ innerhalb der Mitochondrienmatrix, ist die effektive Dosis deutlich niedriger als die Dosis der herkömmlichen $H_2S$-Donoren [3,76]. AP39 besteht aus einem mitochondriengerichteten Triphenylphosphonium-Kation ($TPP^+$). $TPP^+$-Verbindungen werden schon seit langer Zeit eingesetzt, um Moleküle gezielt in Mitochondrien zu schleusen. Über kettenförmig angeordnete Kohlenwasserstoffreste ist die $TPP^+$-Einheit mit der $H_2S$-freisetzenden Einheit Dithiolethion verbunden (**Abbildung 3**). Durch die ungeladene lipophile Ladung kann das Molekül durch Mitochondrienmembranen diffundieren, um dort $H_2S$ intrazellulär freizusetzen [3].

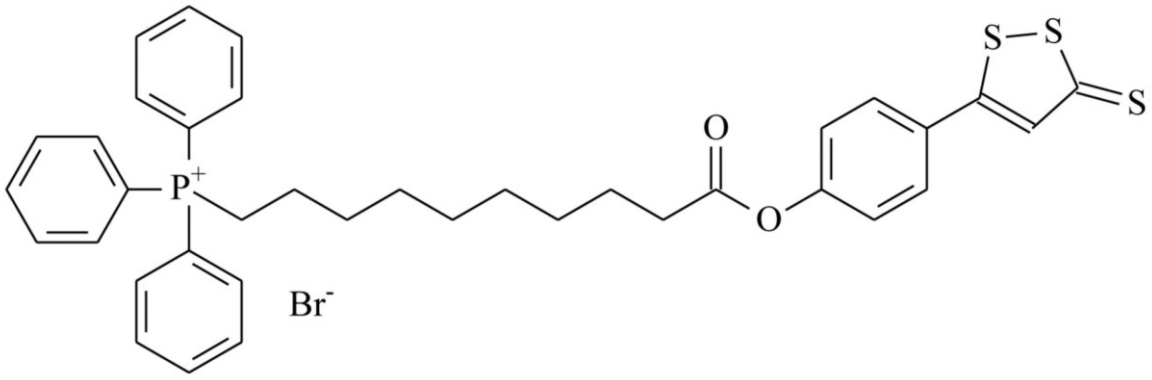



**Abbildung 3. Strukturformel von AP39.** Links zu sehen ist die $TPP^+$-Domäne, welche für die positive Ladung des Moleküls verantwortlich ist. Durch eine aliphatische Verbindung ist die $TPP^+$-Domäne mit dem Dithiolethion verbunden. Der lipophile Anteil ermöglicht die Aufnahme von AP39 in das Mitochondrium [130].
Abkürzungen: AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], $Br^-$: Brom-Anion, O: Sauerstoff, $P^+$: Phosphor-Kation, S: Schwefel, $TPP^+$: Triphenylphosphonium

*In vitro* Experimente mit humanen zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen sowie mikrovaskulären Endothelzellen der Maus konnten zeigen, dass die Applikation von AP39 die durch oxidativen Stress induzierte Zelltoxizität reduzierte. Dabei waren die Konzentrationen mehr als 1000-fach niedriger als die von GYY4137. Eine alleinige Inkubation mit der mitochondriengerichteten $TPP^+$-Domäne oder der $H_2S$-Donoreinheit Dithiolethion zeigten keinerlei zytoprotektive Wirkungen [76]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die gezielte Freisetzung von $H_2S$ innerhalb des Mitochondriums für die protektiven Effekte von AP39 verantwortlich ist. AP39 gehört zu der Gruppe der langsam freisetzenden $H_2S$-

Donoren. Durch seine drei Schwefelatome kann es die $H_2S$-Freisetzung bis zu mehrere Tage nach der Behandlung aufrecht erhalten [19]. In einem *in vitro* Modell mit mikrovaskulären Endothelzellen konnte die Freisetzung von $H_2S$ durch seine Reaktion mit Tetrazoliumfarbstoff 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid zu dem farbigen Formazan bis zu zehn Tagen nachgewiesen werden [32]. Im Vergleich zu der Applikation von Sulfidsalzen kann dadurch ein längerer und konstanterer $H_2S$-Spiegel erreicht werden. In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass AP39 *in vitro* zytoprotektive Effekte ausüben konnte [3,19,76,130]. Bei *in vitro* Modellen mit Endothelzellen, welche zuvor oxidativem Stress ausgesetzt waren, milderte AP39 den Verlust der zellulären Bioenergetik. Darüber hinaus konnten durch partielle Wiederherstellung der Integrität mitochondriale DNS-Schäden reduziert werden [130]. Auch in *in vitro* Modellen mit NRKs konnten protektive Wirkungen von AP39 gegenüber oxidativem Stress beobachtet werden. Dabei waren die eingesetzten Dosen von 30 bis 100 nM wesentlich niedriger als die Dosen nicht zielgerichteter $H_2S$-Donoren [3]. In AP39-behandelten Throphoblasten konnte der mitochondriale Stress reduziert und antioxidative Wirkungen nachgewiesen werden. Unter anderem vermuteten die Autoren Covarrubias et al., dass eine Erhöhung der Aktivität von Komplex IV für die Effekte verantwortlich war [19]. In *in vivo* Modellen zeigten sich für AP39 ebenfalls multiple protektive Effekte [3,58,139]. In Nierenischämie-Perfusionsverletzungen von Ratten übte AP39 dosisabhängige Schutzwirkungen aus [3]. Des Weiteren wurden entzündungshemmende Wirkungen bei Mäusen mit einem kombinierten stumpfen Brusttrauma und hämorrhagischen Schock beschrieben. AP39 konnte ebenfalls kardioprotektiv nach Herzstillstand und nach Myokardischämie wirken sowie die mitochondriale Integrität des Gehirns erhalten [3,58,130,139].

## 1.5 Zielsetzung

In den vergangenen Jahren wurden zunehmend wissenschaftliche Daten zu $H_2S$ publiziert. Dabei zeigte sich unter anderem, dass endogen synthetisiertes $H_2S$ ein Botenmolekül ist, welches multiple physiologische Einflüsse auf diverse Organe vermittelt [1,66]. Darüber hinaus konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Experimente zytoprotektive Wirkungen einer $H_2S$-Applikation nachgewiesen werden [23,127]. Bemerkenswert war der Nachweis eines durch $H_2S$-Exposition verursachten Abfalls der Körperfunktionen sowie einer Reduktion des Sauerstoffverbrauchs bis hin zu einem winterschlafähnlichen Ruhezustand [8,9].

Vorhergehende Untersuchungen lassen vermuten, dass die Effekte von $H_2S$ in Abhängigkeit von dem eingesetzten $H_2S$-Donor variieren. Als Folge wurden verschiedene $H_2S$-Donoren synthetisiert und entsprechend untersucht. Der mitochondrial gerichtete $H_2S$-Donor AP39 stellt einer der erfolgversprechendsten Donoren dar.

AP39 wurde in der vorliegenden Dissertation getestet, weil

- AP39 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zytoprotektive und antiinflammatorische Effekte ausüben konnte. Durch die Gabe eines inflammatorischen Stimulus sollten in den durchgeführten Experimenten diese Effekte überprüft werden.
- durch die gezielte $H_2S$-Freisetzung von AP39 innerhalb der Mitochondrienmatrix die effektive Dosis deutlich niedriger ist als die Dosis der herkömmlichen $H_2S$-Donoren. Da hohe Konzentrationen von $H_2S$ toxisch wirken, wurden durch den Einsatz geringer Dosen weniger schädliche Nebeneffekte erwartet.
- AP39 ein langsam freisetzender $H_2S$-Donor ist. Dadurch ergibt sich im Vergleich zu der Applikation schnell freisetzender $H_2S$-Donoren ein längerer und konstanterer $H_2S$-Spiegel.
- versucht werden sollte, ob AP39 einen künstlichen Ruhezustand *in vitro* simulieren kann.

Da die mitochondrialen Effekte von AP39 auf isolierte Hepatozyten *in vitro* zum jetzigen Zeitpunkt noch kaum untersucht wurden, sollte im Rahmen dieser Promotionsarbeit folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Welche Effekte hat der $H_2S$-Donor AP39 auf die Atmungskette von Hepatozyten und zeigen diese Effekte eine zeitliche Dynamik?
2. Sind vorliegende Effekte nach einem inflammatorischen Stimulus mit LPS weiterhin vorhanden?
3. Welche Auswirkungen hat die Applikation von AP39 auf die ROS-Produktion von Hepatozyten bei Fehlen oder Vorhandensein einer Inflammation?
4. Welche Auswirkungen hat AP39 auf die Proteinexpression der Hepatozyten? Sind diese Effekte nach dem LPS-Stimulus weiterhin nachweisbar?

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Zelllinie

**Tabelle 1. Überblick über die verwendete Zelllinie.**
Abkürzung: AML12: alpha mouse liver 12

| Name | Hersteller |
|---|---|
| AML12-Zelllinie | American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA #CRL-2254 (Spezies: Maus) |

### 2.1.2 Zellkultur

**Tabelle 2. Zusammensetzung des Zellkulturmediums.**
Abkürzung: DMEM-F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, FCS: fötales Kälberserum, µg: Mikrogramm, ml: Milliliter, ng: Nanogramm

| Wirkstoff | Menge/Konzentration | Hersteller |
|---|---|---|
| Dexamethason | 40 ng/ml | Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA |
| DMEM-F12 | 500 ml | Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA |
| FCS | 50 ml | Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA |
| Insulin | 10 µg/ml | Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA |
| Penicillin/Streptomycin | 10 ml | Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA |
| Transferrin | 5,5 µg/ml | Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA |
| Selenium | 5 ng/ml | Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA |

| | |
|---|---|
| Destilliertes Wasser ($dH_2O$) (Ampuwa) | Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland |
| Desinfektionsmittel | Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland |
| Phosphat-gepufferte Salzlösung nach Dulbecco (DPBS) | Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad Kalifornien, USA |
| Stickstoff (flüssig) | MTI Industriegase, Ulm, Deutschland |
| Trypsin Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA |

### 2.1.3 Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch und Wasserstoffperoxid-Produktion

**Tabelle 3. Überblick der Stimulantien.**
Abkürzungen: ADP: Adenosindiphosphat, AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], °C: Grad Celsius, DMSO: Dimethylsulfoxid, DPBS: Phosphat-gepufferte Salzlösung nach Dulbecco, EtOH: Ethanol, FCCP: Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone, $H_2O$: Wasser, HRP: Meerrettichperoxidase, LPS: Lipopolysaccharid, M: Mol, mg: Milligramm, MiR05: Mitochondriales Atmungsmedium 05, ml: Milliliter, mM: Millimol, $Na_2S$: Natriumsulfid, $(NH_4)_2SO_4$: Ammoniumsulfat, RT: Raumtemperatur, SOD: Superoxid-Dismutase, TMPD: Tetramethylphenylendiamin, U: Atomare Masseneinheit

| Name | Hersteller | Konzentration der Applikationslösung | Lösungsmittel | Lagerung [°C] |
|---|---|---|---|---|
| ADP | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | 0,5 M | $H_2O$ | -80 |
| AmplexRed | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA | 10 mM | DMSO | -20 |
| Antimycin A | Abcam, Cambridge, Großbritannien | 5 mM | EtOH | -20 |
| AP39 | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | 2 mM | DMSO | -20 |
| Ascorbat | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | 0,8 M | $H_2O$ | -20 |
| Cytochrom c | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA | 4 mM | $H_2O$ | -20 |
| Digitonin | Fluka, München, Deutschland | 8,1 mM | DMSO | -20 |
| DMSO | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA | | | RT |
| FCCP | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA | 0,5 mM | EtOH | -20 |
| Glutamat | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | 2 M | $H_2O$ | -20 |
| HRP | Santa Cruz, Dallas, Texas, USA | 500 U/ml | MiR05 | -20 |
| LPS aus Escherichia coli O111:B4 | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | 1mg/ml | DPBS | -80 |
| Malat | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | 0,8 M | $H_2O$ | -20 |
| $Na_2S$ | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA | 2 mM | $H_2O$ | -80 |
| Oligomycin | Biomol, Hamburg, Deutschland | 5 mM | EtOH | -20 |
| Pyruvat | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | 2 M | $H_2O$ | Frisch |
| Rotenon | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | 0,1 mM | EtOH | -20 |
| SOD | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | 10 U/ml | $(NH_4)_2SO_4$ | 4-8 |
| Succinat | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA | 1 M | $H_2O$ | -20 |
| TMPD | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | 0,2 M | $H_2O$ | -20 |

### 2.1.3.1 Mitochondriales Atmungsmedium 05

Als Trägermedium für die Messungen des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs ($JO_2$) und die Messungen der $H_2O_2$-Produktion wurde das mitochondriale Atmungsmedium 05 (MiR05 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich)) verwendet.

**Tabelle 4. MiR05-Zusammensetzung pro 250 ml**.
Abkürzungen: BSA: Bovines Serumalbumin, EGTA: Ethylenglykol Tetraessigsäure, g: Gramm, HEPES: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure, $KH_2PO_4$: Kaliumdihydrogenphosphat, l: Liter, mg: Milligramm, $MgCl_2$: Magnesiumchlorid, MiR05: Mitochondriales Atmungsmedium 05, ml: Milliliter, mM: Millimol

| Wirkstoff | Menge für 250 ml [mg] | Finale Konzentration [mM] |
|---|---|---|
| EGTA | 47 | 0,5 |
| $MgCl_2$ | 71 | 3 |
| Lactobionsäure | 5375 | 60 |
| Taurin | 625 | 20 |
| $KH_2PO_4$ | 340 | 10 |
| HEPES | 1191 | 20 |
| D-Sucrose | 9413 | 110 |
| BSA | 25 | 1 [g/l] |

### 2.1.3.2 Wasserstoffperoxid

Das $H_2O_2$ diente zur Kalibrierung der ROS-Experimente (s.2.2.3.3). Es wurde vor den jeweiligen Experimenten frisch hergestellt. Die finale Konzentration betrug 40 µM. Die Zusammensetzung ergab sich aus den folgenden Stoffen (**Tabelle 5**).

**Tabelle 5. Zusammensetzung von $H_2O_2$.**
Abkürzungen: $dH_2O$: destilliertes Wasser, $H_2O_2$: Wasserstoffperoxid, HCl: Salzsäure, mM: Millimol

| Wirkstoff | Hersteller | Konzentration [mM] |
|---|---|---|
| $dH_2O$ (Ampuwa) | Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland | |
| $H_2O_2$ | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | 880 |
| HCl | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | 1 |

## 2.1.4 Western Blot

### 2.1.4.1 Antikörper

**Tabelle 6. Primärantikörper für Western Blots.**
Abkürzungen: Bax: Bcl-2-associated X Protein, Bcl-2: B-cell lymphoma 2, °C: Grad Celsius, CBS: Cystathionin-ß-Synthase, COX4: Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 4, COX5A: Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 5A, COX5B: Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 5B, CSE: Cystathionin-γ-Lyase, IgG: Immunglobulin G, 3-MST: 3-Mercaptopyruvat-Schwefeltransferase, MT-CO1: Mitochondrially encoded Cytochrome-c-Oxidase I, PGC-1α: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, ü.N.: über Nacht

| Antikörper | Isotyp | Verdünnung/ Applikation | Aufbewahrung [°C] | Hersteller |
|---|---|---|---|---|
| Actin | polyklonal, Ziege IgG | 1:50000 ü.N. 4°C | +4 | Santa Cruz #1615 |
| Bax | polyklonal, Hase IgG | 1:1000 ü.N. 4°C | -20 | Cell signal #2772 |
| Bcl-2 | polyklonal, Hase IgG | 1:1000 ü.N. 4°C | -20 | Cell signal #2876 |
| CBS | monoklonal, Hase IgG | 1:1000 ü.N. 4°C | -20 | Cell signal #14782 |
| COX4 | polyklonal, Hase IgG | 1:1000 ü.N. 4°C | -20 | Cell signal #4844 |
| COX5A | monoklonal, Hase IgG | 1:2000 ü.N. 4°C | -20 | Abcam #180129 |
| COX5B | monoklonal, Maus IgG | 1:1000 ü.N. 4°C | +4 | Abcam #110263 |
| CSE | polyklonal, Hase IgG | 1:1000 ü.N. 4°C | -20 | St. Johns #27874 |
| 3-MST | polyklonal, Hase IgG | 1:2000 ü.N. 4°C | -20 | Sigma #001240 |
| MT-CO1 | monoklonal, Maus IgG | 1:2000 ü.N. 4°C | +4 | Abcam #14705 |
| PGC-1α | polyklonal, Hase IgG | 1:40000 ü.N. 4°C | -20 | Novus #04676 |
| Vinculin | polyklonal, Hase IgG | 1:5000 ü.N. 4°C | -20 | Sigma #V4139 |

**Tabelle 7. Sekundärantikörper für Western Blots**
Abkürzungen: °C: Grad Celsius, h: Stunde, HRP: Meerrettichperoxidase, IgG: Immunglobulin G, RT: Raumtemperatur

| Antikörper | Isotyp | Verdünnung/ Applikation | Aufbewahrung [°C] | Hersteller |
|---|---|---|---|---|
| Anti-rabbit IgG (HRP-linked antibody) | Ziege IgG | 1:2000 1 h RT | -20 | Cell signal #7074 |
| Anti-rabbit IgG, (HRP-linked antibody) | Pferd IgG | 1:10000 1 h RT | -20 | Cell signal #7076 |

### 2.1.4.2 Standardlösungen und Puffer

**Tabelle 8. Zusammensetzung Lysepuffer**
Abkürzungen: DTT: Dithiothreitol, EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure, EGTA: Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N′,N′-tetraessigsäure, g: Gramm, HCl: Salzsäure, µl: Mikroliter, ml: Milliliter, mM: Millimol, NaCl: Natriumchlorid, NP40: Nonyl-Phenoxypolyethoxylethanol, PNPP: Para-Nitrophenylphosphat

| Reagenz | Menge | Konzentration |
|---|---|---|
| Tris HCl pH 7,5 | 20 ml | 100 mM |
| NaCl | 5,844 g | 500 mM |
| 500 mM EDTA pH 8,0 | 2,4 ml | 6 mM |
| 600 mM EGTA pH 8,0 | 2 ml | 6 mM |
| Triton X100 | 4 ml | 2 % |
| NP40 | 2 ml | 1 % |
| Vor Nutzung Zugabe von: | | |
| DTT | 100 µl/50 ml | 2 mM |
| B-Glycerol | 50 µl/50 ml | 1 mM |
| Natriumvanadat | 50 µl/50 ml | 1 mM |
| PNPP | 100 µl/50 ml | 2 mM |
| Leupeptin | 50 µl/50 ml | 1 mM |

Zusammensetzung von:

- Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) 10x
  24,2 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan
  80 g Natriumchlorid (NaCl)
  Lösung auf pH-Wert von 7,6 einstellen und auf 1 l auffüllen

- Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) 10x
  95,5 g PBS
  Lösung auf 1 l auffüllen

- Laufpuffer 10x
  284,8 g Glycin
  60,56 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan
  20 g Natriumdodecylsulfat (SDS)
  Lösung auf 2 l auffüllen

- Blott-Puffer
  148 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan
  14 g Glycin
  200 ml Methanol
  Lösung auf 1 l auffüllen

- Blotto B

  TBS 1x
  1 % Milch
  1 % Bovines Serumalbumin (BSA)
  0,1 % Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20)

- Verdünnungspuffer für Erstantikörper

  PBS 1x
  0,1 % Tween 20
  5 % BSA

### 2.1.4.3 Gele und Reagenzien

**Tabelle 9. Konzentrationsangaben der Reagenzien zur Herstellung der Western Blot Gele.** Abkürzungen: APS: Ammoniumpersulfat, $dH_2O$: destilliertes Wasser, ml: Milliliter, SDS: Natriumdodecylsulfat, TEMED: Tetramethylethylendiamin

| Reagenz | Sammelgel (30 ml) pH = 6,8 | Trenngel (60 ml) pH = 8,8 | Lösungsmittel |
|---|---|---|---|
| Acrylamid | 4,5 % | 5-15 % | $dH_2O$ |
| APS | 0,25 % | 0,5 % | $dH_2O$ |
| TEMED | 0,025 % | 0,05 % | $dH_2O$ |
| Tris | 2 % | 5 % | $dH_2O$ |
| SDS (0,5 %) | 0,125 % | 0,125 % | $dH_2O$ |

| | |
|---|---|
| 2-Mercaptoethanol | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| Acrylamid Bis Solution | Servva, Heidelberg, Deutschland |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| Bromphenolblau | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| BSA, Fraction V, pH=7,0 | GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA |
| Colormarker Kaleidoscope Standards Precision Plus Protein | Bio Rad, Hercules, Kalifornien, USA |
| Comassie Blue Färbelösung | Bio Rad, Hercules, Kalifornien, USA |
| $dH_2O$ (Ampuwa) | Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland |
| PBS | Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA |
| EDTA | Applichem, Darmstadt, Deutschland |
| Entwicklerkit: | Cell Signaling, Cambridge, Großbritannien |
| Lumi GLO Reagent A | |
| Peroxide Reagent B | |

| | |
|---|---|
| Ethanol 99 % | Apotheke der Universität Ulm, Ulm, Deutschland |
| Glycerol | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| Glycin | Applichem, Darmstadt, Deutschland |
| HCl 32 % | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Milchpulver | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| NaCl | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| Nitrocellulose Blotting Membran | GE Healthcare, Buckingshamshire, Großbritannien |
| Ponceau S | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| Pufferlösungen (pH=4 und pH=7) | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| SDS-Pellets | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| TBS | Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA |
| Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan | USB Corporation, Cleveland, USA |
| Tween-20 | Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |

### 2.1.5 Laborgeräte

| | |
|---|---|
| Absaugpumpe Wisa | W. Sauer, Wuppertal, Deutschland |
| Autoklav Systec 2540 EL | Systec, Linden, Deutschland |
| Brutschrank C 42 | Labotec, Göttingen, Deutschland |
| $CO_2$-Inkubator Heracell 150i | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Deckgläser 22 mm | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Eberstadt Vortexer Genie, K550-GE | Bender & Hoe, Zürich, Schweiz |
| Einmaltücher | Kimtech Science, USA |
| Eismaschine B-190 | Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien |
| Eismaschine Scotsman AF80 | Frimont, Mailand, Italien |
| Elektrophorese Kammern Mini-Protean | Bio Rad, Hercules, USA |
| Entwicklerkassetten Hypercassette | GE Healthcare, Buckingshamshire, Großbritannien |
| Entwicklermaschine CP 1000 | AGFA Healthcare, Bonn, Deutschland |
| Eppendorf-Pipetten | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |

| | |
|---|---|
| Eppendorf Pipettenspitzen | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Eppendorf Tubes | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Falcon Tubes | BD Biosciences, Bedford, USA |
| Falcon™ Zentrifugenröhrchen | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Filme zur HRP Detektion | Thermo Fisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Gefrierschrank -80 °C | Liebherr, Bulle, Schweiz |
| Hamiltonpipette 1701 | Hamilton Company |
| Hamilton-Spritze | Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz |
| Handschuhe | Franz Mensch GmbH, Buchloe, Deutschland |
| Oxygraph-2k | Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich |
| Kühlschrank | Bosch, Gerlingen, Deutschland |
| Kühlschrank | Liebherr, Bulle, Schweiz |
| Küvetten PMMA 1,5ml halbmikro | Brand, Wertheim (Main), Deutschland |
| Medical X-Ray film CX-BL | AGFA Healthcare AG, Bonn, Deutschland |
| Mikroskop Olympus BH-2 | Firma Olympus, Tokio, Japan |
| Multipipette plus | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Neubauer-Zählkammer Bright-line | Brand, Wertheim (Main), Deutschland |
| O2k-Fluo Smart-Module | Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich |
| Peltier Thermal Cycler PTC-200 | MJ Research, Quebec, Canada |
| Photometer Spectra Max190 | Molecular Devices, San Jose, Kalifornien, USA |
| Pipettierhilfe PIPETBOY acu 2 | INTEGRA Biosciences, Zizers, Schweiz |
| Pipetten Eppendorf Multipipette | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Pipetten Eppendorf Reference | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Pipettenspitzen 25-1000 µl | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Power Pac 200 | Bio Rad, Hercules, USA |
| Power Pac 3000 | Bio Rad, Hercules, USA |
| PTC-200 Peltier Thermal Cycler | Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| Reaktionsgefäßständer Micro Test Tube Rack | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |

| | |
|---|---|
| Serologische Pipetten 2-50 ml | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Shaker S4, DRS-12 | Elmi, Riga, Lettland |
| Spektralphotometer Gene Quant Pro | GE Healthcare, Buckinshamshire, Großbritannien |
| Sterilbank, CLASS 2 Type A/B3 | The baker Company, USA |
| Sterile Einmalpipetten 10 ml/25 ml | Costar, New York, USA |
| Stoppers | Oroboros Instruments, Österreich |
| Stopper-Spacer | Oroboros Instruments, Österreich |
| T75-Flasc (75 $cm^2$) Nunc™ EasYFlask™ Zellkulturflaschen | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| Trans-Blot SP Semi Dry Transfer Cell | Bio Rad, Hercules, USA |
| Tubes | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Ultraschall-Homogenisator Sonopuls | Brandelin, Berlin, Deutschland |
| Ultra Turrax T25 Homogenisator | IKA Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland |
| Vortex-2 Genie | Sientific Industires, USA |
| Vortex Type 16700 Mixer Maxi Mix 1 | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| Waage BP 310 S | Sartorius, Göttingen, Deutschland |
| Wasserbad GFL-1003 | Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel |
| Whatman Chromatographiepapier | GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA |
| Zell- und Gewebskulturflaschen 500 ml mit filter cap | NUNC, Roskilde, Dänemark |
| Zentrifuge/Biofuge13 | Heraeus Sepatech, Deutschland |
| Zentrifuge Modell 5415 C | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Zentrifuge 5424 R | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |

### 2.1.6 Software

| | |
|---|---|
| DatLab 6 | Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich |
| Graphpad Prism 6.01 | GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA |
| ImageJ/Fiji 1.8.0 | National Institutes of Health, Maryland, USA |
| Microscoft Office365 (Powerpoint, Excel, Word) | Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Um die mitochondrialen Effekte des $H_2S$-Donors AP39 auf Hepatozyten im Rahmen einer LPS-Stimulation *in vitro* zu untersuchen wurden die Zellen vor den jeweiligen Experimenten mit AP39 stimuliert. Als Kontrolle diente die Stimulation mit dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO), da das zu untersuchende AP39 in DMSO gelöst war. Im Hinblick auf die erste Fragestellung wurden die AP39-stimulierten Zellen mit der DMSO-stimulierten Kontrollgruppe verglichen. Dem gegenüber stand die zweite Fragestellung, bei der ein LPS-induziertes Inflammationsgeschehen mit dem „Normalzustand“ ohne die Gabe von LPS im Vergleich untersucht wurde. Dazu wurden die Hepatozyten zu Beginn des Experiments mit LPS stimuliert. Daraufhin folgte entweder die AP39- oder DMSO-Stimulation. Es wurden mit Hilfe des Oxygraph-2k von Oroboros (Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich) Messungen des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs und der mitochondrialen Radikalproduktion durchgeführt. Als dritte Methode wurde die Durchführung von Western Blots praktiziert, welche einen Nachweis der Änderung von Proteinmengen ermöglichten (**Abbildung 4**).

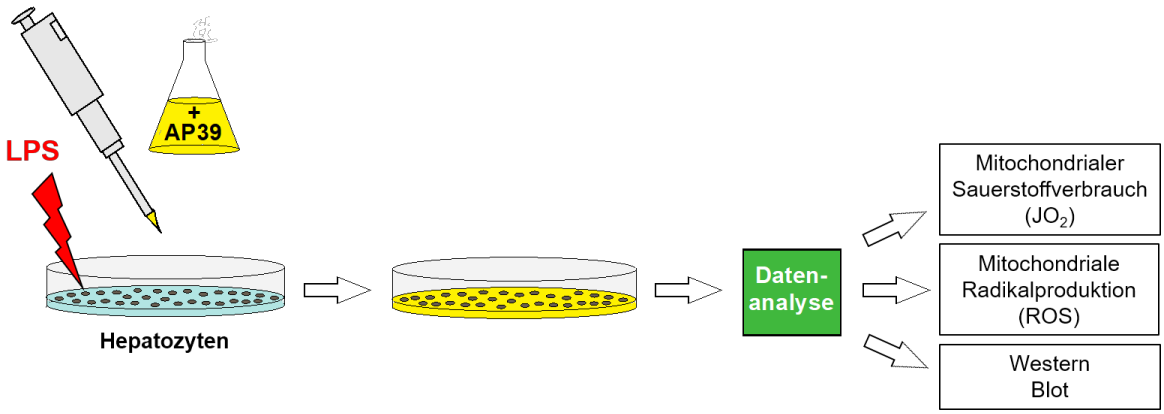



**Abbildung 4. *In vitro* Stimulation der Hepatozyten**. Die *in vitro* Stimulation der Hepatozyten wurde mit AP39 bzw. DMSO in An- oder Abwesenheit von LPS durchgeführt. Daran schloss sich die Datenanalyse an. Gemessen wurde der mitochondriale Sauerstoffverbrauch, die mitochondriale Radikalproduktion sowie die Änderung der Proteinmengen durch den Einsatz von Western Blots. Abkürzungen: AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], DMSO: Dimethylsulfoxid, LPS: Lipopolysaccharid, $JO_2$: Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch, ROS: Radikale Sauerstoffspezies

### 2.2.2 Zellkultur

Alle Experimente wurden an Hepatozyten durchgeführt, welche sich in einer Zellkultur befanden. Dabei handelte es sich um immortalisierte Hepatozyten von der

Maus (CRL-2254, American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA). Die Hepatozyten wurden aufgetaut und mit Dulbecco‘s Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA) im Inkubator bei 37 °C und einem Kohlenstoffdioxidanteil ($CO_2$) von 5 % kultiviert. Das eingesetzte Nährmedium sorgte für ein optimales Wachstum der Hepatozyten. Das Nährmedium wurde durch die zusätzliche Gabe von fötalem Kälberserum (FCS), Insulin-Transferrin-Selenium (ITS), Dexamethason sowie Penicillin / Streptomycin erweitert. FCS ist ein Hauptbestandteil vieler Nährmedien und enthält viele Proteine, unter anderem Wachstumsfaktoren, welche für das Kultivieren von Hepatozyten notwendig sind. Das ITS wird verwendet, um die Menge an FCS zu reduzieren, welches zur Kultivierung benötigt wird. In Hepatozyten-Kulturen begünstigt der Einsatz von Dexamethason das Zellüberleben, verbessert die zelluläre Signaltransduktion und wirkt antibakteriell [95]. Darüber hinaus wurde, um ein unerwünschtes Wachstum von Bakterienkolonien zu verhindern, dem Nährmedium Penicillin / Streptomycin hinzugefügt.

Für das Passagieren der Hepatozyten wurde eine Trypsin-EDTA Lösung in die Zellkulturflaschen gegeben. Im nächsten Schritt wurde frisches Zellmedium hinzugefügt, welches das Trypsin wiederum inaktivierte. Um die genaue Zellzahl zu bestimmen, wurden 20 µl der gewonnen Zelllösung in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Die Zellzahl pro Milliliter wurde anhand der **Formel 1** berechnet.

$$\frac{\text{Anzahl Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche } (\text{mm}^2) \text{x Kammertiefe } (\text{mm}) \text{x Verdünnung}} = \text{Zellen pro 1 µl}$$

**Formel 1. Formel für die Berechnung der Zellzahl in einem Mikroliter Zelllösung.** Von der Gesamtlösung wurde eine Probe von wenigen Mikrolitern entnommen. Mit Hilfe der Zählkammer wurde die absolute Zellzahl berechnet, indem die ausgezählte Fläche der Kammer ($mm^2$) mit der Kammertiefe (mm) sowie der Verdünnung der Probe multipliziert und das Produkt durch die Anzahl gezählter Zellen dividiert wurde.
Abkürzungen: µl: Mikroliter, mm: Millimeter, $mm^2$: Quadratmillimeter

Daraufhin wurden die Hepatozyten in neue Zellkulturflaschen mit vorgelegten 10 ml Nährmedium überführt und in diesem für weitere drei bis fünf Tage kultiviert. Die angestrebte Zieldichte betrug zwischen 9-12 x $10^6$ Zellen pro Zellkulturflasche. Das Wachstumsverhalten und das optimale Splitverhältnis wurde für die Zelllinie am Anfang der wissenschaftlichen Arbeit durch Experimente ermittelt. Diese Vorversuche zeigten, dass die Zellen bei einer Zelldichte von ca. 80-90 % der T75-Zellkulturflasche gesplittet werden mussten. Alle zwei Tage erfolgte ein Wechsel des Nährmediums, um die abgestorbenen Zellen und den vorhandenen Zellschrott

zu entfernen und den Zellen neue Stoffwechselsubstrate zur Verfügung zu stellen. Dazu wurde den Hepatozyten das alte Medium entzogen, die Zellen mit DPBS gespült und anschließend ein neues Medium hinzugegeben.

### 2.2.3 Stimulationen

Die optimalen Messzeitpunkte wurden in vorherigen Versuchen an immortalisierten NRKs der Ratte untersucht. Die NRKs wurden jeweils für 15 Minuten, zwei Stunden, vier Stunden, acht Stunden, 24 Stunden sowie 48 Stunden mit AP39 oder alleinig mit DMSO stimuliert. Anschließend erfolgte die Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs sowie der $H_2O_2$-Produktion. Eine 15-minütige Stimulation zeigte keinerlei messbaren Veränderungen. Alle anderen Stimulationszeitpunkte (≥ zwei Stunden) zeigten deutliche Veränderungen, wobei die zweistündigen und 24-stündigen Stimulationen mit AP39 den größten Effekt auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und die $H_2O_2$-Produktion der NRKs hatten. Aus diesen ersten Experimenten wurde geschlussfolgert, dass mögliche Effekte von AP39 und DMSO entweder durch kurzfristige (zwei Stunden) oder langfristige (24 Stunden) Stimulationen zur Geltung kamen und die mittellangen (vier bzw. acht Stunden) und 48-stündigen Stimulationen keine zusätzliche Änderung des Sauerstoffverbrauchs und der $H_2O_2$-Produktion verursachten. Aufgrund dieser Überlegungen wurden für die Experimente mit den Hepatozyten die zwei Stimulationszeitpunkte zwei und 24 Stunden gewählt.

Durch die zweistündige beziehungsweise 24-stündige Stimulation der Hepatozyten mit der Kontrollgruppe DMSO (0,1 µl/ml) oder AP39 (10 nM in 0,1 µl/ml DMSO) bei gleichzeitigem Vorhandensein oder Fehlen einer vorherigen LPS-Stimulation (1 µg/ml) ergaben sich insgesamt acht Messbedingungen (**Tabelle 10**).

**Tabelle 10. Verschiedene Stimulationsbedingungen der Hepatozyten.** Die Kontrollgruppe DMSO (0,1 µl/ml) mit den Stimulationszeiträumen zwei bzw. 24 Stunden bildeten Bedingungen I und V. AP39 (10 nM in 0,1 µl/ml DMSO) in zwei- bzw. 24-stündiger Stimulation stellten die Bedingungen II und VI dar. Bei den LPS (1 µg/ml) induzierten Inflammationsbedingungen wurden die Hepatozyten nachträglich mit DMSO oder AP39 für jeweils zwei bzw. 24 Stunden stimuliert. Die DMSO + LPS-Stimulationen sind hier als Bedingungen III und VII, die AP39 + LPS-Stimulationen als Bedingungen IV und VIII dargestellt.
Abkürzungen: AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], DMSO: Dimethylsulfoxid, h: Stunde, LPS: Lipopolysaccharide, µg: Mikrogramm, µl: Mikroliter, ml: Milliliter, nM: Nanomolar,

| Bedingung | Zeitraum [h] | Inkubation |
|---|---|---|
| **I** | 2 | **DMSO** |
| **II** | 2 | **AP39** |
| **III** | 2 | **DMSO + LPS** |
| **IV** | 2 | **AP39 + LPS** |
| **V** | 24 | **DMSO** |
| **VI** | 24 | **AP39** |
| **VII** | 24 | **DMSO + LPS** |
| **VIII** | 24 | **AP39 + LPS** |

#### 2.2.3.1 AP39-Stimulation

In allen durchgeführten Experimenten betrug die finale AP39-Konzentration 10 nM. Da das AP39 in dem Träger DMSO gelöst war, wurde das AP39 stets in einer Konzentration von 0,1 µl/ml DMSO in die jeweiligen Zellkulturflaschen gegeben. Für die Stimulation der Zellen wurde vorab eine hochkonzentrierte 1000 nM AP39-Lösung in 0,1 µl/ml DMSO angesetzt. Diese 1000 nM AP39-Lösung wurde anschließend auf die Konzentration von 10 nM verdünnt. Um eine gute Löslichkeit des $H_2S$-Donors zu gewährleisten wurden noch 9,9 µl DMSO der 10 nM Lösung hinzugefügt. Das in der Zellkulturflasche vorliegende Nährmedium der Hepatozyten wurde entfernt und die 10 nM AP39-Lösung auf die Zellen gegeben (**Tabelle 10**, Bedingung II und VI). Daraufhin wurden die stimulierten Zellen für zwei beziehungsweise 24 Stunden inkubiert. Für die Stimulation der Hepatozyten mit der Kontrollsubstanz DMSO wurden lediglich 10 µl DMSO appliziert und die Zellen mit 0,1 µl/ml DMSO für je zwei oder 24 Stunden inkubiert (**Tabelle 10**, Bedingung I und V).

#### 2.2.3.2 LPS-Stimulation

Um eine akute Inflammationsreaktion *in vitro* zu simulieren wurde LPS aus Escherichia coli O111:B4 vor der jeweiligen AP39- oder DMSO-Stimulation zu dem Zellkulturmedium hinzugegeben. Um eine Zielkonzentration des Nährmediums von 1 µg/ml LPS zu erreichen wurden 100 µl LPS (100 µg/ml) zu 10 ml Nährmedium gegeben. Das vorliegende Medium der Zellen wurde abgegossen, die LPS-Lösung anschließend in die jeweiligen Zellkulturflaschen gegeben und für 30 Minuten mit den Hepatozyten bei 37 °C und 5 % $CO_2$ inkubiert. Nach der 30-minütigen Inkubationszeit erfolgte die bereits oben beschriebene AP39- oder DMSO-Stimulation (**Tabelle 10**, Bedingung IV und VIII oder Bedingung III und VII). Teilweise wurden die Hepatozyten nach der Inkubation mit LPS ohne weitere AP39- oder DMSO-Stimulation für die Verwendung in Western Blots weiterverarbeitet.

### 2.2.4 Hochauflösende Respirometrie – Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch

Der Oxygraph-2k von Oroboros ist ein Gerät zur hochauflösenden Messung von Zellatmung und mitochondrialer Aktivität. Er ist insbesondere zur Messung von Proben mit niedrigen Atmungsaktivitäten und Sauerstoffspiegeln, wie sie bei Apoptose, oxidativem Stress oder Zellkulturen mit limitierten Zellzahlen vorkommen, geeignet [47]. Der Oxygraph-2k kann Sauerstoffkonzentrations-änderungen in Echtzeit im Bereich von wenigen Picomol messen [35]. Aus diesem Grund stellt er die optimale Messmethode für die erhobenen Daten dieser Dissertation dar. Durch den Einsatz von Substraten und Inhibitoren der Komplexe der mitochondrialen Atmungskette konnte der genaue Effekt jedes Stoffes auf die einzelnen Komplexe gemessen werden.

Der Oxygraph-2k bestand aus zwei Glaskammern, welche mit Stöpseln und einem Viton-O-Ring luftdicht verschlossen werden konnten und voneinander isoliert waren. Die Genauigkeit der Messung ging mit Abnahme des Kammervolumens durch eine gesteigerte $O_2$-Diffusion und Adhäsion der Substrate an den Oberflächen des Geräts verloren. Das optimale Kammervolumen betrug aus diesem Grund 1,5-2 ml [44,47]. Durch einen verstellbaren Volumen-Kalibrierungs-Ring konnte das Kammervolumen für die Experimente exakt auf 2 ml pro Kammer eingestellt werden. Der Innendurchmesser von 16 mm pro Kammer ermöglichte es zusätzliche Sensoren in die Kammern einzubringen [47]. Dies geschah mit Hilfe einer dünnen Titanium-Kanüle im Inneren der Stopper über die mit einer Injektionsspritze (Hamilton Microliter Syringes, Hamilton Company, Reno, USA) Substanzen in die

Kammer gespritzt werden konnten [48]. Somit war es möglich in jeder dieser Kammern eine voneinander isolierte Bedingung zu schaffen und zu untersuchen. Das Glas reduzierte die $O_2$-Diffusion, während der Viton-O-Ring keinerlei Diffusion zugelassen hat [47]. In den Kammern befand sich am Boden ein kleiner Rührer aus Polyetheretherketon, welcher durch ein elektromagnetisches Feld angetrieben wurde [48]. Mit 750 Umdrehungen/Minute führte der Rührer zu einer homogenen Verteilung der Stoffe. Zur Messung der Sauerstoffkonzentration diente ein polarographischer Sauerstoffsensor mit Elektrode, auch Clark Elektrode genannt. Diese wurde durch eine sauerstoffdurchlässige Membran von der Probenflüssigkeit getrennt (**Abbildung 5**) [112]. Der Aufbau dieses Sauerstoffsensors setzte sich nach der Membran in einer Gold-Kathode fort. Diese Kathode stand durch eine Kaliumchloridlösung mit einer Silber-Anode in Verbindung. Innerhalb der Kammer führte der Sauerstoffpartialdruckunterschied zwischen der Membranaußen- und -innenseite zu einer $O_2$-Diffusion hin zur Kathode. Dort wurde Sauerstoff reduziert und das Silber zu Silberchlorid oxidiert. Bei diesen Schritten entstand ein Stromfluss, welcher proportional zu dem Sauerstoffpartialdruck *p* der Messprobe war [47]. Somit konnte durch die Messung des Stroms sowohl auf die aktuelle Sauerstoffkonzentration als auch auf die Änderung der Sauerstoffkonzentration innerhalb der Kammern geschlossen werden.



**Abbildung 5. Oxygraph-2k von Oroboros Instruments.** Zur Messung der Sauerstoffkonzentration sind zu beiden Seiten polarographische Sauerstoffsensoren, die Clark-Elektroden, befestigt [112]. Zur Bestimmung der Radikalproduktion wird an die Vorderseite der jeweiligen Kammer eine Fluo LED2-Modul angeschlossen [72]. Um die Kammern zu isolieren wird ein Stöpsel mit Viton-O-Ring in die jeweilige Kammer eingeführt [47]. In Gnaiger 2014 [42], "The Oroboros O2k (© Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich)"

Anhand von **Formel 2** wird über eine Änderung der Sauerstoffkonzentration ($dcO_2$) der Sauerstoffverbrauch der Zellen berechnet [46]. Nach Matallo et al. berechnet sich der $JO_2$ als negative Ableitung der Sauerstoffkonzentration im Medium [87]. Da die Sauerstoffkonzentration über die Zeit abnimmt und einen negativen Wert annimmt, wird der $JO_2$ als negativer Quotient der Sauerstoffkonzentration pro Zeiteinheit dargestellt.

$$JO_2 = \frac{-dcO_2}{dt}$$

**Formel 2. Formel zur Berechnung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs ($JO_2$).** Der mitochondriale Sauerstoffverbrauch der Hepatozyten errechnet sich aus dem Quotienten der abnehmenden Sauerstoffkonzentration im Medium pro Zeiteinheit.
Abkürzungen: $dcO_2$: Änderung der Sauerstoffkonzentration, dt: Änderung über die Zeit, $JO_2$: Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch

### 2.2.4.1 Vorbereiten des Oxygraphen – Kalibrierung

Im Vorlauf der Experimente musste der Oxygraph-2k zunächst kalibriert werden. Dafür wurde eine Zweipunktkalibrierung durchgeführt. Diese Eichung erfolgte bei Raumluft und bei einer Sauerstoffkonzentration, welche in etwa dem Nullwert

entsprach. Dazu wurden die Probekammern des Oxygraph-2k vor dem Start des Experiments mit MiR05 gefüllt und die Stopper eingesetzt. Mit den O2k-Abstandshaltern konnten die Stopper in einer Position fixiert werden, in der sich über der flüssigen Phase eine gasförmige Phase innerhalb der Kammer befand. So konnten sich die Sauerstoffkonzentrationen in den Kammern und in der Raumluft angleichen [49]. Da sich in den Kammern lediglich MiR05 und keine Zellen befanden haben, stellte sich ein Sauerstoffffluss von 0 pmol/(s x Millionen Zellen) ein. Da die Sauerstofflöslichkeit und daraus folgend der Sauerstoffpartialdruck temperaturabhängig sind, wurde die Temperatur bei den Experimenten konstant in der Nähe von physiologischen Bedingungen (37 °C) gehalten. Dafür wurde das Gerät mit einer Temperatur von 37 °C und einem Druck von 94,4 kPa kalibriert. Mit einem Sauerstofflöslichkeitsfaktor des vorliegenden MiR05-Mediums von 0,92 konnte eine Sauerstoffkonzentration zu Beginn des Experiments von ca. 180 µM oder 180 nmol/ml erzielt werden. Bei den Clark-Elektroden wurde eine Polarisationsspannung von 800 mV und eine vierfache Verstärkung gewählt. Unter Kenntnis des Sauerstofflöslichkeitsfaktors von MiR05 konnte der Sauerstoffpartialdruck in die Sauerstoffkonzentration umgerechnet werden [36,49,108].

#### 2.2.4.2 Datenaufzeichung – DatLab

Die Auswertung erfolgte mit der Datlab-Software, welche im Verlauf näher beschrieben wird. Die Software DatLab 6 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich) ermöglichte durch eine kontinuierliche Aufzeichnung der Sauerstoffkonzentration und des Sauerstoffflusses sowie durch die Möglichkeit der digitalen Datenanalyse die hochauflösende Respirometriemessung [47]. Der Sauerstoffffluss entsprach der Atmungsaktivität der sich jeweils in den Kammern befindlichen Zellen und berechnete sich aus der Änderung der Sauerstoffkonzentration nach der Zeit (**Formel 2**). Der Sauerstoffffluss bezog sich dabei auf die Gesamtzellzahl der Hepatozyten (pmol $O_2$ / (s x Zellzahl in Millionen)). Während und nach dem Experiment stellte DatLab 6 eine Übersicht des jeweiligen Versuchs unabhängig für die beiden Oxygraph-Kammern auf einem Bildschirm dar [44,47]. Die Einheit der Software DatLab wurde auf Zellen in Millionen, die absolute Anzahl auf 1,0 x $10^6$ Zellen pro Kammer sowie ein definiertes Kammervolumen von 2,0 ml eingestellt. Dies führte zu einer Konzentration von 0,5 x $10^6$ Zellen pro ml bei einem Datenaufnahmeintervall von zwei Sekunden.

#### 2.2.4.3 Zellvorbereitung für die Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs

Zu Beginn der Experimente wurden die kultivierten Hepatozyten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 3 ml Trypsin-EDTA in die Zellkulturflasche hinzugegeben und diese für sieben Minuten bei 37 °C und 5 % $CO_2$-Konzentration inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen durch manuelles Klopfen vom Flaschenboden gelöst und mit 7 ml Nährmedium vermengt. Aus dieser Suspension wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer die absolute Zellzahl bestimmt und jeweils 1,0 x $10^6$ Zellen in zwei 15 ml Falcons verteilt. Die absolute Zellzahl sollte zwischen 9-12 x $10^6$ Zellen betragen. War dies nicht der Fall wurden die Zellen verworfen, da in vorangegangenen Experimenten festgestellt wurde, dass ein verändertes Zellwachstum zumeist mit einer Änderung des Sauerstoffverbrauchs der Zellen einherging. Die zwei Falcons wurden in die Zentrifuge gestellt und für drei Minuten bei 4 °C und 1500 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde abgekippt und verworfen, während das Zellpellet am Boden für die weiteren Experimente diente. Bei der $JO_2$-Messung wurden 2,2 ml MiR05 zu den Zellen gegeben und die entstandene Lösung mehrmals resuspendiert. Nachdem der Oxygraph-2k anhand des oben genannten Prozederes (s. 2.2.4.1) vorbereitet war, konnte mit den Experimenten nach den jeweiligen Protokollen begonnen werden.

#### 2.2.4.4 Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs

Das für die Sauerstoffkalibrierung eingesetzte MiR05 wurde durch die in 2,2 ml MiR05 gelösten Zellen ersetzt. Die Stöpsel wurden vollständig eingesetzt, sodass von der äußeren Umgebung kein Sauerstoff in die Kammer gelangen und damit ausschließlich der Sauerstoffverbrauch der Zellen gemessen werden konnte. Zu Beginn jedes Versuchs wurde die Basalatmung der Zellen für etwa zehn Minuten abgewartet. Daraufhin konnte das Experiment nach den Versuchsprotokollen für die Messung der mitochondrialen Atmung durchgeführt werden (**Tabelle 11, Tabelle 12**). Nach der Verabreichung der einzelnen Substanzen wurde abgewartet bis sich die Unregelmäßigkeiten des Sauerstoffflusses wieder abgeflacht hatten und sich ein konstantes Plateau eingestellt hatte. Jedes Experiment wurde in zwei unterschiedlichen Zuständen durchgeführt. In der einen Kammer wurden die Zellen im gekoppelten Zustand der Atmungskette untersucht,

wohingegen in der anderen Kammer die Hepatozyten in den entkoppelten Zustand versetzt wurden.

Zur Untersuchung der Atmungskette wurden gezielt Substrate und Inhibitoren verabreicht, welche zu einer veränderten Atmungsaktivität der Zellen führten. Voraussetzung war, dass die Mitochondrien von den exogen zugeführten Substraten abhängig waren. Dies wurde durch die Permeabilisierung mit Digitonin erreicht, was zum Freilegen der endogenen Substanzen führte [63]. Bei den verabreichten Konzentrationen wurde darauf geachtet, dass die gegebenen Mengen an Substraten und Inhibitoren in ausreichenden Mengen vorlagen und ein Substanzmangel per se zu keiner Limitierung der Effekte führte.

#### 2.2.4.4.1 Gekoppelter Zustand der Atmungskette

Die Autoren Chance und Williams unterteilten die Aktivität der Atmungskette von isolierten Mitochondrien in fünf verschiedene Stadien. Das „Respiratory Steady States“-Modell schafft einen Kausalitätszusammenhang zwischen verabreichten Substanzen und den darauffolgenden Atmungsaktivitäten [12]. Die Versuchsprotokolle der vorliegenden Studie orientierten sich an diesem Modell, obgleich sie an permeabilisierten Zellen und nicht an isolierten Mitochondrien durchgeführt wurden. Das Stadium I des „Respiratory Steady States“-Modells bezeichnet das Vorhandsein isolierter Mitochondrien ohne die externe Zugabe von Substraten. Die Zugabe von ADP induziert das Stadium II. Dabei kommt es zu einer vorübergehenden Aktivierung der Atmungsaktivität durch ADP, wobei die endogen vorhandenen Substrate ausgeschöpft werden. Die Mitochondrien sind nun für die weitere Energiegewinnung auf exogen zugeführte Substrate angewiesen. Es folgt das Stadium III, welches durch eine Aktivierung durch die Gabe von ADP und Substraten, wie Malat und Glutamat, charakterisiert ist. Dabei ist die Atmungskapazität hoch und ADP wird durch die Phosphorylierung zu ATP erschöpft. Das führt zu einem ADP-begrenzten Ruhezustand (Stadium IV). Im Anschluss wird die Atmung in der geschlossenen Oxygraphkammer anoxisch und es tritt das Stadium V ein. Unter diesen anoxischen Zuständen kann trotz der Gabe von ADP keine weitere Energiegewinnung stattfinden [12,43]. Im Laufe der Jahre entwickelte sich ein abgewandeltes Protokoll durch Estabrook et al., welches sich von dem ursprünglichen „Respiratory Steady States“-Modell von Chance und Williams im zeitlichen Ablauf unterscheidet [25]. Hier werden nach dem Stadium I Substrate wie Malat und Glutamat gegeben. Die Gabe von ADP jedoch wird nicht

praktiziert, sodass sich hier ein Minderangebot von ADP einstellt. ADP wird anschließend im Stadium III gegeben, um eine Steigerung der Atmungsaktivität und Energiegewinnung durch die ATP-Produktion zu ermöglichen. Die Versuchsprotokolle der vorliegenden Dissertation zur Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs und der $H_2O_2$-Produktion orientierten sich an dem modifizierten Modell von Estabrook.

Zunächst muss angemerkt werden, dass zwischen den Gaben der einzelnen Substrate bzw. Inhibitoren ein konstanter Sauerstoffverbrauch abgewartet wurde, welcher im DatLab an einem Plateau der Sauerstoffflusskurve erkennbar war.

**Tabelle 11. Protokoll zur Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs im gekoppelten Zustand der Atmungskette**. Die Tabelle für das Versuchsprotokoll zur Messung der Sauerstoffverbrauchsrate im gekoppelten Zustand wird dargestellt. Die Substrate und Inhibitoren wurden in den jeweiligen Konzentrationen nacheinander in die Kammer des Oxygraph-2k von Oroboros Instruments dazugegeben und lagen in einer finalen Konzentration innerhalb der Versuchskammer vor.
Abkürzungen: ADP: Adenosindiphosphat, µl: Mikroliter, µM: Mikromol, M: Mol, mM: Millimol, $Na_2S$: Natriumsulfid, TMPD: Tetramethylphenylendiamin

| Substrat | Konzentration (Subtrat) | Einheit | Volumen [µl] | Konzentration (final) | Einheit |
|---|---|---|---|---|---|
| Digitonin | 8,1 | mM | 3 | 12,15 | µM |
| Malat | 0,8 | M | 12,5 | 5 | mM |
| Glutamat | 2 | M | 10 | 10 | mM |
| Pyruvat | 2 | M | 10 | 10 | mM |
| ADP | 0,5 | M | 20 | 5 | mM |
| Cytochrom C | 4 | mM | 5 | 10 | µM |
| Succinat | 1 | M | 20 | 10 | mM |
| Rotenon | 0,1 | mM | 1 | 0,05 | µM |
| Antimycin A | 5 | mM | 1 | 2,5 | µM |
| Reoxygenieren | | | | | |
| Ascorbat | 0,8 | M | 5 | 2 | mM |
| TMPD | 0,2 | M | 5 | 0,5 | mM |
| $Na_2S$ | 2 | mM | 40 | 40 | µM |
| Reoxygenieren | | | | | |

Es wurde zu Beginn des Experiments abgewartet bis sich die Basalatmung der Zellen stabilisiert hatte. Die Basalatmung entsprach dem Stadium I nach Chance

und Williams. Anschließend wurde Digitonin in einer Konzentration von 12,15 µM hinzugegeben. Dazu wurde von 8,1 mM Digitonin 3 µl entnommen und der Kammer hinzugefügt, welches zusammen mit den 2 ml MiR05 eine Endkonzentration von 12,15 µM ergab. Durch diesen Schritt konnten die Zellmembranen der Hepatozyten permeabilisiert werden und es kam zu einem Efflux der endogenen Substrate [63]. Die Permeabilisierung der Zellmembranen und ein damit verbundenes stabiles Plateau wurde etwa für zehn Minuten abgewartet. Die weiteren Substanzen, welche in schneller Reihenfolge nacheinander in die Kammern gegeben wurden, waren die Substrate Malat, Glutamat sowie Pyruvat. Malat lag in einer finalen Konzentration von 5 mM vor, während sie bei Glutamat und Pyruvat jeweils 10 mM betrug. Die Gabe der Substrate Malat, Glutamat und Pyruvat entsprach dem Übergang von Stadium I in das Stadium II nach dem modifizierten Modell von Estabrook. Die Substrate bildeten in verschiedenen Reaktionen NADH und führten durch eine Elektronenübertragung auf Komplex I zu einer Stimulation der mitochondrialen Atmungsaktivität. Malat konnte auf drei verschiedene Arten in das Mitochondrium gelangen. Der mitochondriale Dicarboxylat-Carrier katalysierte den Austausch von $Malat^{2-}$ oder $Succinat^{2-}$ mit Hydrogenphosphat ($HPO_4^{2-}$). Weitere Möglichkeiten waren sowohl der Tricarboxylat-Carrier, welcher $Malat^{2-}$ gegen $Citrat^{3-}$ oder $Isocitrat^{3-}$ austauschte, als auch der α-Ketoglutarat-Malat-Carrier, der $Malat^{2-}$ gegen α-Ketoglutarat austauschte. Das Glutamat gelangte zusammen mit einem Wasserstoff-Kation/Proton ($H^+$) über den Aspartat-Glutamat-Antiport-Carrier im Austausch für $Aspartat^-$ ins Innere des Mitochondriums. Das Pyruvat konnte ab einer Konzentration von 5 mM unabhängig von Transportern in das Mitochondrium gelangen. Eine weitere Möglichkeit war der Pyruvat-Carrier, welcher $Pyruvat^-$ als $Pyruvat^-/H^+$-Symport oder $Pyruvat^-/OH^-$Antiport ins Mitochondrium schleuste [38]. Unter der Gabe von Malat, Glutamat und Pyruvat kam es zu einem leichten Anstieg der Atmungsaktivität, jedoch fehlte noch die Gabe von ADP, um eine Phosphorylierung zu ATP zu erzielen. Bei einem niedrigem ADP-Level und hohen Substratkonzentrationen stellte sich eine geringe Atmungsrate ein, welche die ADP-Level als begrenzenden Faktor hatten. Dies kam der State-II Atmung, dem ADP-begrenzten Ruhezustand, gleich. Um die oxidative Phosphorylierungskapazität (OxPHOS-Kapazität) des Komplexes I zu erreichen wurde noch 5 mM ADP hinzugefügt (**Abbildung 6**). Dies entsprach dem modifizierten Stadium III [12,39]. Die OxPHOS-Kapazität lag vor, wenn sich Mitochondrien im ADP-stimulierten

Zustand der oxidativen Phosphorylierung bei ausreichender Konzentration von ADP, Phosphat, Sauerstoff sowie Substraten befanden [39,43]. Im nächsten Schritt wurden 10 µM des Elektronenüberträgers Cytochrom c dem Experiment hinzugefügt. Das Molekül Cytochrom c wurde an Komplex III reduziert, nahm von Ubichinol Elektronen auf und übertrug diese auf Komplex IV. An Komplex IV, der COX, erfolgte die Abgabe der Elektronen vom reduzierten Cytochrom c auf molekularen Sauerstoff [109]. Ein Mangel des Elektronenüberträgers Cytochrom c, beispielsweise durch Pathologien der Zelle oder durch einen Integritätsverlust aufgrund der Permeabilisierung, hätte das Stadium III trotz des Vorhandenseins ausreichender Substrate limitiert und die Atmungsaktivität beeinträchtigt. Durch die exogene Zugabe konnte zwischen Defekten aufgrund von Cytochrom c-Mangel und anderen OxPHOS-Defekten unterschieden werden. Dies diente zur Qualitätskontrolle [42]. Daraufhin folgte die Gabe von 20 µl 1,0 M Succinat, welches anschließend in einer finalen Konzentration von 10 mM vorlag. Succinat gelangte über den Dicarboxylat-Carrier im Austausch mit $HPO_4^{2-}$ in das Innere des Mitochondriums. Die Oxidation von Succinat schleuste mit Hilfe von $FADH_2$ Elektronen über den Komplex II in die Atmungskette ein. Bei dieser Reaktion entstand das Produkt $Fumarat^{2-}$. Die SDH (Komplex II) ist ein membrangebundenes Enzym und das einzige Enzym des Citratzyklus, das zugleich Teil des ETS ist. Das $Fumarat^{2-}$ konnte im Citratzyklus mit Hilfe der Fumarase wieder zu Malat reagieren. Somit lag durch die Gabe der Substrate Malat, Glutamat, Pyruvat sowie Succinat ein Stadium der maximalen Atmung bei aerober ATP-Produktion der Komplexe I + II vor (**Abbildung 6**). Im nächsten Schritt des Versuchsprotokolls wurde der Komplex I-Inhibitor Rotenon gegeben. Dies führte dazu, dass der Komplex I nicht mehr am Elektronentransport beteiligt war. Der Elektronenfluss konnte nur noch über das Einschleusen von Elektronen über Succinat und die SDH stattfinden. Es lag die OxPHOS-Kapazität des Komplexes II vor (**Abbildung 6**). Kurze Zeit danach wurden den Hepatozyten 2,5 µM des Komplex III-Inhibitors Antimycin A vorgelegt. Antimycin A blockierte den Elektronenfluss an Komplex III und damit auch indirekt die Aktivität von Komplex II [45]. Folglich kam der komplette Elektronentransport über die Atmungskette zum Erliegen. Nachdem sich ein niedriges Plateau des Sauerstoffflusses eingestellt hatte, konnten Ascorbat und Tetramethyl-phenylendiamin (TMPD) eingespritzt werden. Dabei wurden Elektronen aus Ascorbat vom Redoxträger TMPD zu Cytochrom c transportiert [62]. Da das ETS

zuvor auf Ebene der Komplexe I-III inhibiert wurde und das durch TMPD reduzierte Cytochrom c Elektronen auf Höhe des Komplexes IV in die Atmungskette einspeiste, stellte sich die OxPHOS-Kapazität des Komplexes IV ein. Nach der Gabe von Ascorbat und TMPD kam es zu einer zügigen sauerstoff- und cytochrom c-abhängigen Autooxidation, die zu einem Absinken des Sauerstoffflusses führte. Um die Kapazität der Autooxidation von TMPD von der Aktivität der COX zu unterscheiden, wurde die COX mit 40 µM $Na_2S$ gehemmt. Nachdem sich ein Plateau eingestellt hat, wurden die Kammern reoxygeniert und ein zweites Plateau bei hoher Sauerstoffkonzentration registriert. Dies wurde durch die alleinige Autooxidation von TMPD verursacht [17,74,127].

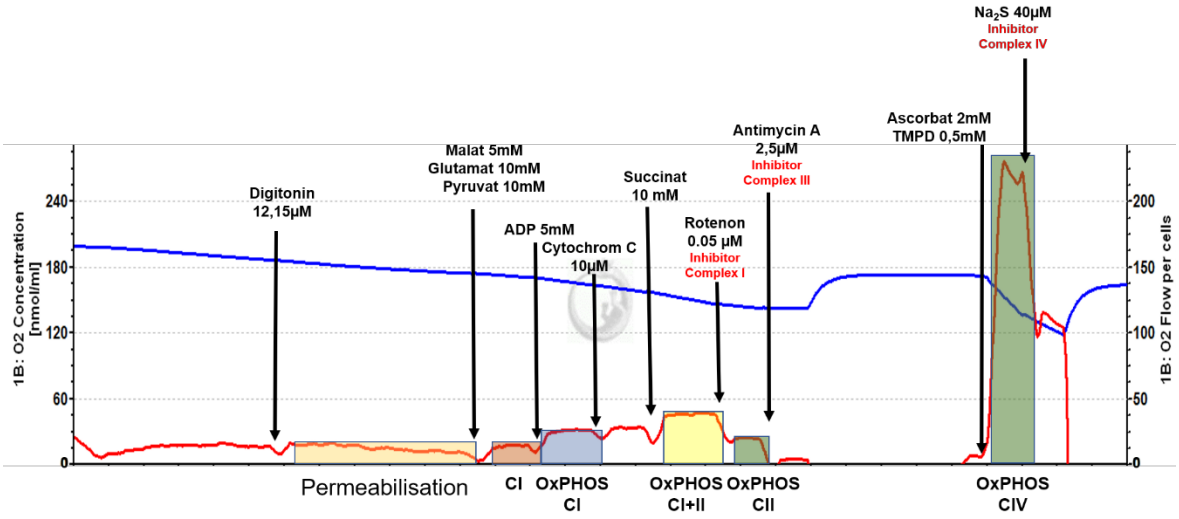



**Abbildung 6. Hochauflösende Respirometrie: Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs im gekoppelten Zustand der Atmungskette**. Dargestellt ist auf der linken y-Achse die $O_2$-Konzentration in nmol/ml, auf der rechten y-Achse der $O_2$-Fluss pro Millionen Zellen in pmol/(s*Mill). Die x-Achse stellt den zeitlichen Verlauf des Experiments dar. Zu sehen ist die aktuelle $O_2$-Konzentration sowie die Veränderung des $O_2$-Flusses mit anschließender Plateau-Phase nach Gabe der jeweiligen Substrate beziehungsweise Inhibitoren. Nach Stabilisierung der Basalatmung der Hepatozyten, erfolgte die Gabe von 12,15 µM Digitonin zur Permeabilisierung der Zellmembranen. Anschließend wurden die Substrate von Komplex I (CI) Malat (5 mM), Glutamat sowie Pyruvat (je 10 mM) dazugegeben. Zusammen mit ADP (5 mM) stellte sich die OxPHOS von CI ein. Cytochrom c (10 µM) und Succinat (10 mM) führten zur OxPHOS von CI+II. Die Gabe des CI-Inhibitors Rotenon (0,05 µM) induzierte die OxPHOS von CII. Anschließend erfolgte die Gabe des CIII-Inhibitors Antimycin A (2,5 µM). Zum Erreichen der OxPHOS von CIV wurden 2 mM Ascorbat und 0,5 mM TMPD eingesetzt. Die Zugabe von $Na_2S$ (40 µM) inhibierte CIV.
Blauer Graph: $O_2$-Konzentration in nmol/ml. Roter Graph: $O_2$-Fluss pro Millionen Zellen in pmol/(s*Mill). Schwarzer Pfeil: Zeitpunkt der Zugabe eines Stoffes.
Abkürzungen: ADP: Adenosindiphosphat, CI-IV: Komplex I-IV, $Na_2S$: Natriumsulfid, nmol/ml: Nanomol pro Milliliter, $O_2$: Sauerstoff, OxPHOS: oxidative Phosphorylierung, pmol/(s*Mill): Picomol pro Sekunde und Millionen, TMPD: Tetramethylphenylendiamin

### 2.2.4.4.2 Entkoppelter Zustand der Atmungskette

Dem gekoppelten Zustand stand der entkoppelte Zustand in der zweiten Kammer gegenüber (**Tabelle 12**). Dieser unterschied sich durch die zusätzliche Gabe von

Oligomycin und Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP). Dabei wurde jedoch auf die Gabe von ADP verzichtet.

**Tabelle 12. Protokoll zur Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs im entkoppelten Zustand**. Die Tabelle für das Versuchsprotokoll zur Messung der Sauerstoffverbrauchsrate im entkoppelten Zustand wird dargestellt. Die Substrate und Inhibitoren wurden in den jeweiligen Konzentrationen nacheinander in die Kammer des Oxygraph-2k von Oroboros Instruments dazugegeben und lagen daraufhin in einer finalen Konzentration innerhalb der Versuchskammer vor.
Abkürzungen: FCCP: Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone, µl: Mikroliter, µM: Mikromol, M: Mol, mM: Millimol, $Na_2S$: Natriumsulfid, TMPD: Tetramethylphenylendiamin

| Substrat | Konzentration (Subtrat) | Einheit | Volumen [µl] | Konzentration (final) | Einheit |
|---|---|---|---|---|---|
| Oligomycin | 5 | mM | 1 | 2,5 | µM |
| FCCP | 0,5 | mM | 1 | 0,25 | µM |
| FCCP | 0,5 | mM | 1 | 0,25 | µM |
| FCCP | 0,5 | mM | 1 | 0,25 | µM |
| Ggf. weitere Applikationen von FCCP bis Plateau erreicht | | | | | |
| Digitonin | 8,1 | mM | 3 | 12,15 | µM |
| Malat | 0,8 | M | 12,5 | 5 | mM |
| Glutamat | 2 | M | 10 | 10 | mM |
| Pyruvat | 2 | M | 10 | 10 | mM |
| Cytochrom C | 4 | mM | 5 | 10 | µM |
| Succinat | 1 | M | 20 | 10 | mM |
| Rotenon | 0,1 | mM | 1 | 0,05 | µM |
| Antimycin A | 5 | mM | 1 | 2,5 | µM |
| Reoxygenieren | | | | | |
| Ascorbat | 0,8 | M | 5 | 2 | mM |
| TMPD | 0,2 | M | 5 | 0,5 | mM |
| $Na_2S$ | 2 | mM | 40 | 40 | µM |
| Reoxygenieren | | | | | |

Es wurde zunächst die Basalatmung der Hepatozyten abgewartet. Anschließend wurde den Zellen 1 µl von 5 mM Oligomycin verabreicht. Oligomycin fungierte in diesem Setting als Inhibitor der ATP-Synthase und induzierte die LEAK-Atmung. Die LEAK-Atmung trat bei inaktiver ATP-Synthase auf. Es kam zu einem nicht phosphorylierenden Elektronentransfer über die Atmungskette. Durch den abnehmenden Protonenfluss vom Intermembranraum in die Matrix durch die ATP-Synthase entstand zunehmend ein Protonenleck. Die LEAK-Atmung stellte den Versuch der Kompensation dar [43,46]. Nach der Gabe von Oligomycin wurde der Inhibitor FCCP in mehreren 0,25 µM Schritten auftitriert. FCCP induzierte einen

Zustand maximaler entkoppelter Atmung, indem es das Membranpotential reduzierte und somit das ETS maximal aktivierte. Durch die Eigenschaft von FCCP, die Integrität der inneren Mitochondrienmembran zu zerstören, kam es zu einem Rückstrom von Protonen vom Intermembranraum in die Mitochondrienmatrix. Dieser Zustand entkoppelte dementsprechend das ETS, da es nun nicht mehr durch die ATP-Synthase limitiert wurde [35,45,121]. Infolgedessen wurde Digitonin, gefolgt von Malat, Glutamat sowie Pyruvat verabreicht. Im Unterschied zu dem gekoppelten Zustand wurde auf die Gabe von ADP verzichtet, da die ATP-Synthase durch die Gabe von Oligomycin bis auf weiteres reversibel heruntergefahren wurde [43]. Mit der Gabe von Cytochrom c, Succinat, Rotenon, Antimycin A, Ascorbat/TMPD sowie $Na_2S$ war das weitere Protokoll des entkoppelten Zustands mit dem des gekoppelten Experiments vergleichbar (s. 2.2.3.2.1) (**Abbildung 7**).

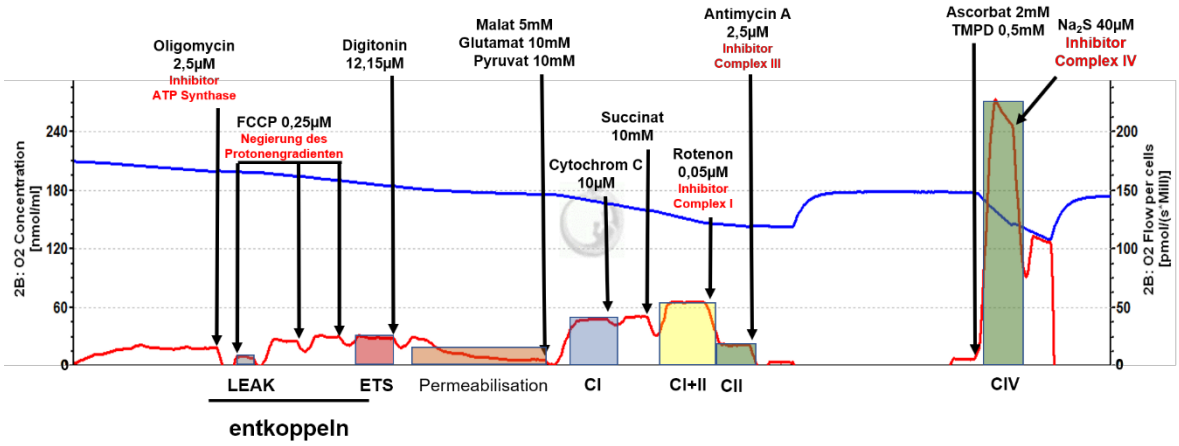



**Abbildung 7. Hochauflösende Respirometrie: Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs im entkoppelten Zustand der Atmungskette.** Dargestellt ist auf der linken y-Achse die $O_2$-Konzentration in nmol/ml, auf der rechten y-Achse der $O_2$-Fluss pro Millionen Zellen in pmol/(s*Mill). Die x-Achse stellt den zeitlichen Verlauf des Experiments dar. Zu sehen ist die aktuelle $O_2$-Konzentration sowie die Veränderung des $O_2$-Flusses mit anschließender Plateau-Phase nach Gabe der jeweiligen Substrate beziehungsweise Inhibitoren. Nach Stabilisierung der Basalatmung der Hepatozyten, wurde 2,5 µM vom ATP-Synthase Inhibitor Oligomycin hinzugegeben. Als Folge stellte sich die LEAK-Atmung ein. Daraufhin erfolgte die Entkopplung des ETS mittels wiederholter Gaben von FCCP (0,25 µM) bis zur daraus resultierenden ETS-Atmung. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wurden 12,15 µM Digitonin hinzugegeben. Anschließende Gabe der Substrate von Komplex I (CI) Malat (5 mM), Glutamat sowie Pyruvat (je 10 mM) zum Erreichen der Aktivität CI. Cytochrom c (10 µM) und Succinat (10 mM) führten zur Aktivität von CI+II. Die Gabe des CI-Inhibitors Rotenon (0,05 µM) induzierte die alleinige Aktivität von CII. Anschließend erfolgte die Gabe des CIII-Inhibitors Antimycin A (2,5 µM). Für die maximale Aktivität von CIV wurden 2 mM Ascorbat und 0,5 mM TMPD eingesetzt. Schlussendlich führte die Gabe von $Na_2S$ (40 µM) zu einer Inhibition von CIV.
Blauer Graph: $O_2$-Konzentration in nmol/ml. Roter Graph: $O_2$-Fluss pro Millionen Zellen in pmol/(s*Mill). Schwarzer Pfeil: Zeitpunkt der Zugabe eines Stoffes.
Abkürzungen: ATP: Adenosintriphosphat, CI-IV: Komplex I-IV, ETS: Elektronentransportsystem, FCCP: Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone, $Na_2S$: Natriumsulfid, nmol/ml: Nanomol pro Milliliter, $O_2$: Sauerstoff, pmol/(s*Mill): Picomol pro Sekunde und Millionen, TMPD: Tetramethylphenylendiamin

### 2.2.5 Messung der mitochondrialen respiratorischen Reservekapazität

Unter stressfreien Bedingungen benötigen Zellen nur einen Bruchteil der maximalen Atmungskapazität. Die Differenz zwischen dieser maximalen Kapazität und der zugehörigen basalen Atmung wird als mitochondriale respiratorische Reservekapazität bezeichnet [105]. Im Falle eines erhöhten Energiebedarfs kann diese Reservekapazität der Zelle ausgeschöpft und eine sogenannte ATP-Krise vermieden werden. Je höher die mitochondriale Reservekapazität ausgeprägt ist, desto anpassungsfähiger ist eine Zelle gegenüber metabolischen Veränderungen ihrer Umgebung. Aus diesem Grund führt eine Ausschöpfung dieser Reserven beispielweise bei Zellstress oder Hypoxie durch Aktivierung der Atmungskette und Bereitstellung von zusätzlicher Energie zu einem verbesserten Überleben [105]. Die mitochondriale Reservekapazität berechnete sich aus der Differenz nach Applikation von ETS-Inhibitoren und der Basalatmung der Zelle [43,105].

### 2.2.6 Cytochrom c-Test

Das Protein Cytochrom c ist ein Schlüsselprotein der Atmungskette und ist im Intermembranraum des Mitochondriums lokalisiert. Es fungiert als mobiler Cofaktor und überträgt die Elektronen zwischen Komplex III und Komplex IV [109]. Darüber hinaus vermittelt es durch seine Freisetzung die Aktivierung von Caspasen, welche schlussendlich zu einer Apoptose der betroffenen Zellen führen. Ein Mangel an Cytochrom c kann sowohl durch Pathophysiologien der Zelle als auch durch einen Integritätsverlust der äußeren Mitochondrienmembran als Ergebnis der Probenvorbereitung entstehen [42]. Daher diente der Cytochrom c-Test zur Kontrolle, um einen Integritätsverlust der äußeren Membran in permeabilisierten Zellen festzustellen [41,42]. Denn kam es im Verlauf des Experiments durch die Zugabe von Cytochrom c zu einem übermäßigen Anstieg der Atmungsaktivität, konnte dies ein Hinweis auf einen vorherigen Verlust des Cytochrom c sein. Dies kann durch eine vorliegende Barrierestörung der äußeren Membran verursacht worden sein. Wurde aus den gemessenen Atmungsaktivitäten nach Cytochrom c-Gabe und nach jeweiliger Aktivierung mit ADP ein Quotient gebildet, so entstand die Cytochrom c-Control-Ratio.

### 2.2.7 Hochauflösende Respirometrie – Wasserstoffperoxid-Produktion

Zusätzlich zu der Messung der *in vitro* Sauerstoffkonzentrationsänderungen war es möglich mit dem Oxygraph-2k in Echtzeit weitere Parameter zu bestimmen. Für diese Dissertation war die Möglichkeit der fluorometrischen Messung der $H_2O_2$-

Konzentrationen innerhalb der Probekammern von Bedeutung. Da diese Methode simultan zur oben beschriebenen Messung der mitochondrialen Atmung erfolgen konnte, ließ sich die $H_2O_2$-Produktion ins Verhältnis zum Sauerstoffverbrauch setzen und ermöglichte Rückschlüsse über die aktuelle Sauerstoffradikalproduktion zu jedem Zeitpunkt des Experiments [73]. Reaktive Sauerstoffspezies entstehen bei der mitochondrialen Atmung als Nebenprodukt und werden überwiegend durch die SOD zu $H_2O_2$ umgewandelt. Das $H_2O_2$ kann biologische Membranen durchdringen. Deswegen war die extrazelluläre $H_2O_2$-Messung die Methode der Wahl, um Rückschlüsse auf die ROS-Produktion im Mitochondrium zu gewinnen [73]. Diese Messmethode war demnach entscheidend, um die Auswirkungen von $H_2S$ auf die mitochondriale Produktion von Sauerstoffradikalen zu untersuchen.
Die Radikale wurden unter Verwendung des Fluoreszenzsensors Grün (525 nm) bestimmt. Dazu wurden von Oroboros Instruments zwei zusätzliche O2k- Fluo LED2-Module genutzt, welche an der Vorderseite des Geräts befestigt wurden (**Abbildung 5**).

#### 2.2.7.1 Vorbereiten des Oxygraphen – Kalibrierung

Vor den Messungen der $H_2O_2$-Produktion wurde der Oxygraph-2k mit denselben Parametern wie bei der Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs kalibriert. Zusätzlich wurden die Fluorometer noch mit einer Polarisationsspannung von 800 mV und einer Verstärkung von 1000 kalibriert.

#### 2.2.7.2 Datenaufzeichnung – DatLab

Bei der Messung von $H_2O_2$ wurden volumenbezogene $H_2O_2$-Flüsse von der DatLab-Software in Echtzeit aus der positiven zeitlichen Ableitung des Resorufinsignals über die Zeit berechnet. In DatLab wurde danach unter dem Menüpunkt „Layout“ das Anzeigefenster „Amperometric“ eingestellt. In dieser speziellen Ansicht wurden zusätzlich zu den Messfenstern für die Sauerstoffkonzentration auch die Kurven der amperometrischen Messung sichtbar.

#### 2.2.7.3 Zellvorbereitung für die Messung der Wasserstoffperoxid-Produktion

Die Zellvorbereitung für die folgenden Experimente erforderte zunächst dieselben Schritte wie die Vorbereitung der $JO_2$-Experimente (s. 2.2.4.3). Die Hepatozyten wurden dem Inkubator entnommen, mit PBS gewaschen, sieben Minuten mit Trypsin inkubiert und anschließend mit frischem Zellmedium innerhalb der Zellkulturflasche vermengt. Nach dem Auszählen der absoluten Zellzahl und dem

Verteilen von jeweils 1,0 x $10^6$ Zellen je Falcon wurden die Zellen zentrifugiert und der dadurch entstandene Überstand abgekippt. Der restliche Überstand, welcher sich durch das Abkippen nicht entfernen ließ, wurde abpipettiert. Im letzten Schritt wurden 25 µl MiR05 auf die Hepatozyten gegeben. Die vorbereiteten Zellen wurden auf Eis gelagert bis sie in die Kammern des Oxygraph-2k appliziert werden konnten.

#### 2.2.7.4 Messung der Wasserstoffperoxid-Produktion

Die Protokolle zur Messung der $H_2O_2$-Produktion wurden zuvor in Pilotversuchen an NRKs etabliert. Nachdem die Datenerhebung abgeschlossen war, wurden die Versuchsprotokolle auf die Zelllinie der Hepatozyten übertragen. Nach Vorexperimenten mit den Hepatozyten und kleineren Veränderungen, wie beispielsweise der Anpassung der absoluten Zellzahl pro Kammer sowie der Abänderungen der finalen Konzentrationen der Substrate und Inhibitoren, konnte mit den finalen Experimenten begonnen werden.

Voraussetzung für die Messung der Radikalkonzentrationen war die Abwesenheit von Licht innerhalb der untersuchten Proben, da die Messmethode auf einer fluorometrischen Basis beruhte. Dazu wurde vor dem Experiment die Kammerbeleuchtung ausgeschaltet und die Stöpsel mit Deckkappen bedeckt. Die Deckkappen minimierten das Eindringen von Licht durch die Kanülen der Stöpsel und ermöglichten somit eine weitestgehend störungsfreie Fluoreszenzmessung. Für eine hochauflösende Messung der fluorometrischen Signaländerungen wurde ein O2k-Fluo LED2-Modul, eine Fotodiode, eingesetzt, welche nur die Emissionswerte (positive lineare Beziehung zum Analysat), nicht aber die Absorptionswerte (negativ logarithmische Beziehung zum Analysat), registrierte [73]. Zu der Kammer wurde anschließend das farblose Substrat AmplexRed hinzugefügt. Des Weiteren legte man die Enzyme Meerrettichperoxidase (HRP) und SOD vor. Die entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies, insbesondere $O_2^-$, konnten mit dem SOD-Enzym zu $H_2O_2$ reagieren. Im nächsten Schritt reagierten AmplexRed und $H_2O_2$ durch die HRP miteinander zu $H_2O$ und dem hoch fluoreszierenden Resorufin mit einem Anregungs- und Emissionsmaximum von 563 bzw. 587 nm (**Abbildung 8**) [72,148]**.**

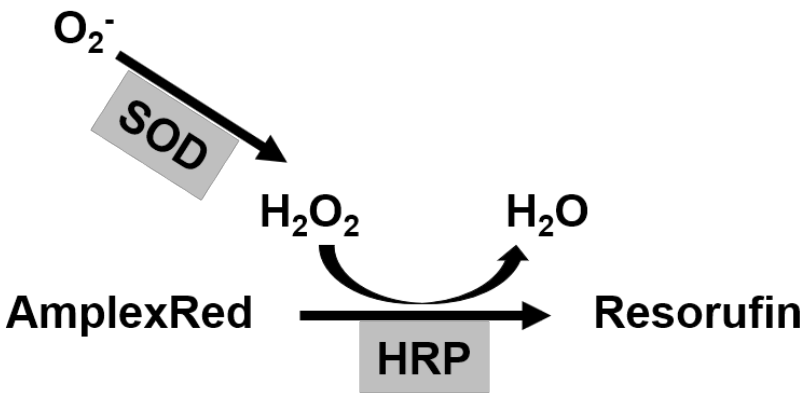



**Abbildung 8. Entstehung von Resorufin aus dem Ausgangssubstrat AmplexRed.** Reaktive Sauerstoffspezies reagieren mit dem Enzym SOD zu $H_2O_2$, HRP katalysiert die Reaktion von AmplexRed zu dem fluoreszierenden Resorufin. Dabei reagiert $H_2O_2$ zu $H_2O$.
Abkürzungen: AmplexRed: 10-acetyl-3,7-dihydrophenoxazine, $H_2O$: Wasser, $H_2O_2$: Wasserstoffperoxid, HRP: Meerrettichperoxidase, $O_2^-$: Hyperoxid-Anion, SOD: Superoxiddismutase

#### 2.2.7.4.1 Gekoppelter Zustand der Atmungskette

Allen Experimenten zur Messung der $H_2O_2$-Produktion wurde zunächst die Gabe der Substanzen AmplexRed, HRP, SOD sowie $H_2O_2$ vorangeschaltet (**Tabelle 13**). Dies ermöglichte die simultane fluorometrische Messung der Radikalproduktion und des Sauerstoffverbrauchs im Laufe des Versuchs [73]. Aus dem 10 mM vorliegenden AmplexRed wurde 1 µl pro Kammer injiziert, wodurch eine finale Konzentration von 5 µM erzielt wurde. Das AmplexRed selbst ist ein farbloser und nicht fluorometrischer Stoff, welcher für die Messung von extrazellulärem $H_2O_2$ eingesetzt wurde. Zusammen mit $H_2O_2$ reagiert das AmplexRed unter dem Enzym HRP zu dem hoch fluorometrischen Stoff Resorufin, welches letztendlich detektiert wurde (**Abbildung 8**) [73]. Die Kalibrierungen des ROS-Experiments wurden mit $H_2O_2$ durchgeführt, welches wiederholt den Kammern zugegeben wurde. Dazu wurde je ein Plateau der amperometrischen Kurve vor und nach der ersten $H_2O_2$-Gabe markiert. Im Kalibrierungsfenster wurde die $H_2O_2$-Konzentration des ersten Plateaus als 0,0 µM definiert und in das zweite Plateau eine Konzentration von 0,1 µM eingetragen. Aufgrund der Gabe von 5 µl $H_2O_2$ konnte eine Zielkonzentration von 0,1 µM innerhalb der Kammer erreicht werden. Im Anschluss daran wurden die in 25 µl MiR05 gelösten Zellen in die Kammer hineinappliziert. Daraufhin wurde im gekoppelten Zustand mit der Permeabilisierung der Zellmembranen durch Digitonin begonnen, welches nach Verabreichung in einer Konzentration von 12,15 µM vorlag [63]. Nach einer Dauer von etwa zehn Minuten wurden Malat, Glutamat sowie Pyruvat in die Kammer dazugegeben. Es folgte die

zweite von insgesamt vier $H_2O_2$-Gaben. In die Kammer des Oxygraph-2k wurde als nächstes ADP (5 mM) verabreicht. Im Vergleich zu den $JO_2$-Protokollen wurde bei den amperometrischen ROS-Messungen auf die Gabe von Cytochrom c verzichtet. Cytochrom c ist ein starkes Reduktionsmittel und war mit der AmplexRed-Methode inkompatibel. Stattdessen wurde das Protokoll mit dem Substrat Succinat, einem Stimulator von Komplex II, fortgeführt [73]. Zu diesem Zeitpunkt des ROS-Experiments wurde die maximale Atmung des Experiments erreicht. Es folgte die dritte $H_2O_2$-Gabe, bevor man die Inhibitoren Rotenon sowie Antimycin A hinzugab [43,45]. Zuletzt wurde die vierte und letzte $H_2O_2$-Gabe in die Kammer verabreicht und nach dem Erreichen des letzten stabilen Plateaus das Experiment beendet.

**Tabelle 13. Protokoll zur Messung der $H_2O_2$-Produktion im gekoppelten Zustand.** Die Tabelle für das Versuchsprotokoll zur Messung der $H_2O_2$-Produktion im gekoppelten Zustand wird dargestellt. Die Substrate und Inhibitoren wurden in den jeweiligen Konzentrationen nacheinander in die jeweilige Kammer des Oxygraph-2k von Oroboros Instruments dazugegeben und lagen daraufhin in einer finalen Konzentration innerhalb der Versuchskammer vor.
Abkürzungen: ADP: Adenosindiphosphat, $H_2O_2$: Wasserstoffperoxid, HRP: Meerrettichperoxidase, µl: Mikroliter, µM: Mikromol, M: Mol, mM: Millimol, SOD: Superoxiddismutase, U: Atomare Masseneinheit

| Substrat | Konzentration (Subtrat) | Einheit | Volumen [µl] | Konzentration (final) | Einheit |
|---|---|---|---|---|---|
| Amplex Red | 10 | mM | 1 | 5 | µM |
| HRP | 500 | U/ml | 4 | 1000 | U/ml |
| SOD | | | 1 | 5 | U/ml |
| $H_2O_2$ | 40 | µM | 5 | 0,1 | µM |
| Hepatozyten hinzufügen (4 Millionen/Kammer) | | | | | |
| Digitonin | 1,62 | mM | 4 | 3,24 | µM |
| Malat | 0,8 | M | 12,5 | 5 | mM |
| Glutamat | 2 | M | 10 | 10 | mM |
| Pyruvat | 2 | M | 10 | 10 | mM |
| $H_2O_2$ | 40 | µM | 5 | 0,1 | µM |
| ADP | 0,5 | M | 20 | 5 | mM |
| Succinat | 1 | M | 20 | 10 | mM |
| $H_2O_2$ | 40 | µM | 5 | 0,1 | µM |
| Rotenon | 0,1 | mM | 1 | 0,05 | µM |
| Antimycin A | 5 | mM | 1 | 2,5 | µM |
| $H_2O_2$ | 40 | µM | 5 | 0,1 | µM |

### 2.2.7.4.2 Entkoppelter Zustand der Atmungskette

Der entkoppelte Zustand des Experiments zur Messung der $H_2O_2$-Produktion unterschied sich im Wesentlichen vom gekoppelten Experiment durch die zusätzliche Gabe der Inhibitoren Oligomycin sowie FCCP zu Beginn der Messungen (**Tabelle 14**) [42,121]. Nach der Gabe der beiden Inhibitoren erfolgte eine zusätzliche $H_2O_2$-Gabe, welche im entkoppelten Zustand insgesamt fünf Applikationen zur Folge hatte. Als weiterer Unterschied wurde auf die Gabe von ADP verzichtet, welches durch die vorherige Inhibition der ATP-Synthase durch Oligomycin funktionslos gewesen wäre.

**Tabelle 14. Protokoll zur Messung der $H_2O_2$-Produktion im entkoppelten Zustand.** Die Tabelle für das Versuchsprotokoll zur Messung der $H_2O_2$-Produktion im entkoppelten Zustand wird dargestellt. Die Substrate und Inhibitoren wurden in den jeweiligen Konzentrationen nacheinander in die jeweilige Kammer des Oxygraph-2k von Oroboros Instruments dazugegeben und lagen daraufhin in einer finalen Konzentration innerhalb der Versuchskammer vor.
Abkürzungen: FCCP: Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone, $H_2O_2$: Wasserstoffperoxid, HRP: Meerrettichperoxidase, µl: Mikroliter, µM: Mikromol, M: Mol, mM: Millimol, SOD: Superoxiddismutase, U: Atomare Masseneinheit

| Substrat | Konzentration (Subtrat) | Einheit | Volumen [µl] | Konzentration (final) | Einheit |
|---|---|---|---|---|---|
| Amplex Red | 10 | mM | 1 | 5 | µM |
| HRP | 500 | U/ml | 4 | 1000 | U/ml |
| SOD | | | 1 | 5 | U/ml |
| $H_2O_2$ | 40 | µM | 5 | 0,1 | µM |
| Hepatozyten hinzufügen (4 Millionen/Kammer) | | | | | |
| Oligomycin | 5 | mM | 1 | 2,5 | µM |
| FCCP | 0,5 | mM | 0,5 | 0,125 | µM |
| FCCP | 0,5 | mM | 0,5 | 0,125 | µM |
| FCCP | 0,5 | mM | 0,5 | 0,125 | µM |
| Ggf. weitere Applikationen von FCCP bis Plateau erreicht | | | | | |
| $H_2O_2$ | 40 | µM | 5 | 0,1 | µM |
| Digitonin | 1,62 | mM | 4 | 3,24 | µM |
| Malat | 0,8 | M | 12,5 | 5 | mM |
| Glutamat | 2 | M | 10 | 10 | mM |
| Pyruvat | 2 | M | 10 | 10 | mM |
| $H_2O_2$ | 40 | µM | 5 | 0,1 | µM |
| Succinat | 1 | M | 20 | 10 | mM |
| $H_2O_2$ | 40 | µM | 5 | 0,1 | µM |
| Rotenon | 0,1 | mM | 1 | 0,05 | µM |
| Antimycin A | 5 | mM | 1 | 2,5 | µM |
| $H_2O_2$ | 40 | µM | 5 | 0,1 | µM |

### 2.2.8 Western Blots

Das Western-Blot-Verfahren ist ein etabliertes Laborverfahren zur gezielten Identifikation und Charakterisierung von Proteinen. Die Proteine werden mit Hilfe einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) anhand ihrer Strukturgröße aufgetrennt und auf eine Polyvinylidenfluorid-Trägermembran übertragen. Diese wird mit spezifischen Antikörpern inkubiert, um das gewünschte Protein darzustellen.

#### 2.2.8.1 Vorbereitung des Lysats

Um die Proteine in der Gelelektrophorese ihrer Größe nach auftrennen zu können, mussten die Zellen zunächst vorbereitet werden. Die Hepatozyten befanden sich in Zellkulturflaschen. Analog zu den Methoden zur Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs und der $H_2O_2$-Produktion erfolgte die Stimulation der Hepatozyten. Anschließend wurde das vorhandene Zellmedium entfernt und die Hepatozyten mit 0 °C kaltem PBS gewaschen. Das PBS wurde entfernt und daraufhin ein zweites Mal PBS zu den Zellen dazugegeben. Unter dem Einsatz eines Zellschabers wurden die Hepatozyten vom Boden der Zellkulturschale gelöst und in ein frisches Gefäß überführt. Dieses Gefäß wurde anschließend bei 1500 Umdrehungen/Minute für fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellett wurde mit Lysepuffer sowie einem Proteaseinhibitor vermengt und mit Hilfe eines Homogenisators (Ultra-turrax) zerkleinert. Unter Kühlung bei 4 °C und konstanter Bewegung wurden die Zellen mit dem Lysepuffer und dem Proteaseinhibitor für 30 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden die Proben für 30 Minuten bei 12.000 Umdrehungen/Minute sowie bei 4 °C erneut zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Aspiration und Übertragung des Überstands in frische, sich auf Eis befindlichen, Zellröhrchen. Mit einem Ultraschall-Sonicator wurde die Probe nochmals homogenisiert und verbleibende Zellfragmente aufgetrennt. Anschließend wurde das Zelllysat im Verhältnis 1:50 mit PBS verdünnt und die Proben auf Eis gelagert. Eine ständige Kühlung und die Zugabe von Proteaseinhibitoren sollte die Proteolyse während der Probenverarbeitung sowie Denaturierung der Proteine verhindern [85].

#### 2.2.8.2 Gelelektrophorese

Zur Proteinbestimmung wurde eine Standardreihe, welche ausgehend von 2 mg BSA/ml auf 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml sowie

1500 µg/ml verdünnt wurde, erstellt. Diese Verdünnungen dienten zur Kalibrierung des Spektrometers. Alle Lösungen wurden mit Blaupuffer als Färbereagenz angefärbt und bei 595 nm gegen einen Leerwert im Spektrometer gemessen [85]. Die Hepatozytenproben wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt, ebenfalls mit Blaupuffer angefärbt und im Spektrometer zur Bestimmung der Proteinmenge gemessen. Die gemessene Absorption wurde der entsprechenden Proteinmenge zugeordnet. Um die Proben auf eine gewünschte Proteinkonzentration von 4 mg/ml (Abweichung bis 5 %) zu titrieren, wurde ein Ladepuffer zu den vorbereiteten Hepatozyten hinzugegeben. Dieser bestand unter anderem aus Bromphenolblau, Dithiothreitol (DTT), Glycerol sowie Natriumdodecylsulfat (SDS). Die Applikation von Bromphenolblau diente der Visualisierung der Probenverläufe. Das DTT reduziert Disulfidbrücken und wandelt Proteine mit Tertiär- und Quartärstrukturen in lineare Formen um. Der Einsatz des im Ladepuffer enthaltenen Glycerols diente zur Erhöhung der Probendichte. Dadurch wurde ein gleichmäßigeres Absinken der Proben innerhalb der Geltaschen ermöglicht. Das anionische SDS denaturierte die Proteine und führte zu einer gleichmäßigen negativen Ladung. Dies ermöglichte eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe, unabhängig von ihrer jeweiligen Ladung. Eine einheitliche Konzentration aller Messproben war entscheidend, um eine spätere Vergleichbarkeit der Gruppen zu ermöglichen [85]. Anschließend erfolgte die Denaturierung der Hepatozytenproben für fünf Minuten bei 95 °C.

Für die Western Blots wurden Trenn- und Sammelgele aus eigener Herstellung benutzt. Alle Materialien wurden vor Benutzung mit Ethanol gereinigt. Zur Herstellung des Trenngels wurden Tris, SDS (0,5 %), Acrylamid (5-15 %) sowie $H_2O$ in einem Erlenmeyerkolben vermengt. Die Acrylamid-Konzentration bestimmte dabei wesentlich die Größe der Poren des Gels und ermöglichte die Auftrennung der Proteine anhand ihrer Molekülgröße. Je höher die Konzentration war, desto kleiner waren die Poren [85]. Durch die Zugabe von TEMED sowie APS wurde die Polymerisationsreaktion gestartet. Anschließend wurden die Glasplatten, mit Ausnahme des oberen Bereichs, mit dem Trenngel befüllt. Dieser obere freie Bereich wurde mit Sammelgel aufgefüllt. Die Herstellung des Sammelgels erfolgte ebenfalls mit Tris, SDS (0,5 %), Acrylamid (4,5 %), $H_2O$, TEMED sowie APS. Das Sammelgel mit seinen großen Poren war für die spätere scharfe Bandenbegrenzung verantwortlich [85]. Sowohl der Einsatz von Trenngel mit kleinen Poren als auch von Sammelgel mit großen Poren ermöglichte eine adäquate

Trennung der zu untersuchenden Proteine und folglich eine scharf begrenzte Bandenbildung. Bei der Befüllung der Glasplatten mit den beiden Gelen musste darauf geachtet werden, dass sich zum einen die beiden Gele nicht vermischten und zum anderen entstandene Luftbläschen mit einer Pipette wieder entfernt wurden. Nach dem Gießen der Gele wurden die Kämme für die Probentaschen eingefügt und die Gele für mindestens eine Stunde ausgehärtet. Jedes Gel hatte ein Ladeschema, welches Informationen über die benutzte Proteinmenge, Primär- und Sekundärantikörper, Acrylamid-Konzentration sowie Membran- und Blockpuffer enthielt. Nachdem die Gele mit destilliertem Wasser und mit Laufpuffer gewaschen wurden, konnten sie mit den gewünschten Proben beladen werden. Dazu wurde jede Ladetasche des Sammelgels mit Hilfe einer Hamiltonspritze mit 40 mg der Hepatozytenproben beladen und mit Laufpuffer bedeckt. Des Weiteren wurde das Gel zusätzlich mit einer Positiv- und Negativkontrolle beladen. Die Positivkontrolle, bestehend aus dem zu detektierenden Protein, diente zur späteren Identifikation des Zielproteins und wies die Aktivität des Antikörpers nach. Die Negativkontrolle bestand aus Actin oder Vinculin und diente zum Ausschluss einer unspezifischen Färbung [85]. Actin wurde als Negativkontrolle für die Proteine Bax, Bcl-2, CBS, CSE, 3- MST, Mitochondrially encoded Cytochrome-c-Oxidase I (MT-CO1), Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 4 (COX4), Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 5A (COX5A) sowie Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 5B (COX5B) eingesetzt. Vinculin stellte die Negativkontrolle für Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1α) dar. Es folgte die Elektrophorese bei 90 V für 15 Minuten sowie 180 V für 35 Minuten. Die angelegte Gleichspannung diente dazu, dass die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode wanderten und so das Proteingemisch anhand des Molekulargewichts aufgetrennt wurde [85].

#### 2.2.8.3 Blotten

Um die Western Blots weiter verarbeiten zu können, mussten die aufgetrennten Proteingemische von dem Laufgel auf einen festen Träger übertragen werden. Dazu diente eine Nitrocellulosemembran, welche nach der Gelelektrophorese zunächst in Wasser eingeweicht wurde. Nach dem Einweichen wurde sie in eine Schale mit Blotpuffer überführt und das aus der Gelelektrophorese gewonnene Gel direkt auf die Membran gegeben. Damit die negativ geladenen Proteine später vom Gel zur Membran wandern konnten, musste die Membran zwischen dem Gel und der positiven Elektrode positioniert werden [85]. Ein Filterpapier, Whatman-Papier,

wurde ebenfalls in dem Blotpuffer getränkt und bildete den Boden der Blotkammer. Das Gel und die Membran wurden vorsichtig aus dem Blotpuffer herausgelöst und auf das Whatman-Papier der Blotkammer gelegt. Eine zweite, obere Schicht Filterpapier wurde auf das Gel gelegt und mit leichtem Druck gewalzt, sodass von unten nach oben ein Filterpapier-Membran-Gel-Filterpapier-Komplex entstand (**Abbildung 9**). Für eine Stunde wurde bei 20 V geblottet und im Anschluss das Gel wieder vorsichtig von der Membran getrennt.

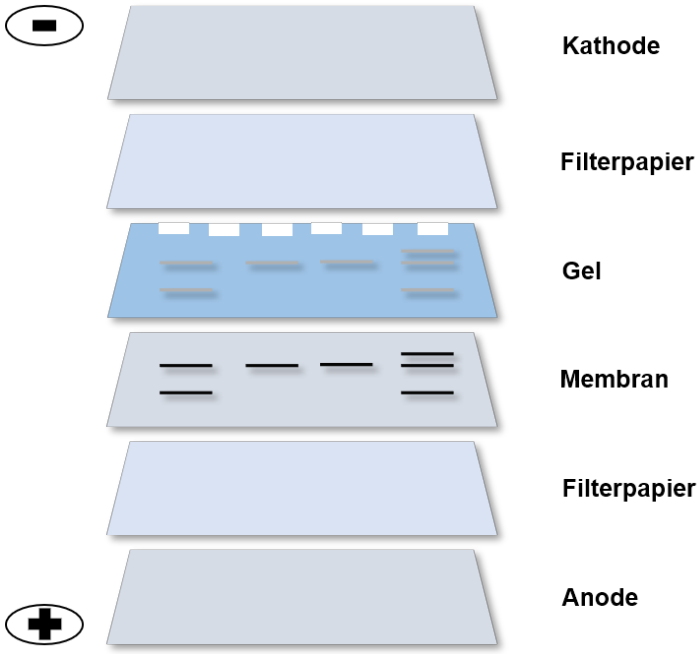



**Abbildung 9. Aufbau der Gelelektrophorese und Transfer der Proteinbanden vom Gel auf die Membran.** Dargestellt sind die Kathode und Anode und die dazwischen geschalteten Schichten aus Filterpapier, Membran, Gel und einer zweiten Lage an Filterpapier. Durch das Anlegen einer Gleichspannung wandern die negativ geladenen Proteine von dem Gel in Richtung Anode und können so in einem nächsten Schritt auf die Nitrocellulosemembran transferiert werden.

### 2.2.8.4 Antikörperfärbung und Entwicklung

Um die Banden sichtbar zu machen und die Weiterverarbeitung zu vereinfachen wurden die Banden mit dem Farbstoff Ponceaurot S gefärbt. Die Membran wurde zunächst mit Blotto B für je fünf Minuten gewaschen, um ein unspezifisches Binden der Antikörper an der Membran zu unterbinden. Im Nachhinein fand ein dreimaliges Waschen der Membran mit TBS statt, bevor sie über Nacht zusammen mit den Primärantikörpern bei 4 °C unter ständiger Bewegung inkubiert wurde. Als Primärantikörper wurden Antikörper gegen Bax (Anti-Bax), Bcl-2 (Anti-Bcl-2), CBS (Anti-CBS), COX4 (Anti-COX4), COX5A (Anti-COX5A), COX5B (Anti-COX5B), CSE (Anti-CSE), 3-MST (Anti-3-MST), MT-CO1 (Anti-MT-CO1) und PGC-1α (Anti-PGC-1α) verwendet. Daraufhin folgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit

TBS, gefolgt von der Inkubation des Sekundärantikörpers bei Raumtemperatur für jeweils eine Stunde. Der Sekundärantikörper bindet spezifisch an den Primärantikörper und katalysiert, durch den Einsatz von HRP, eine Detektionsreaktion. Im nächsten Schritt wurde ein Entwickler-Kit eingesetzt, welches die Chemilumineszenzreaktion initiierte. Die Membran wurde für eine Minute in der Entwickler-Lösung inkubiert und anschließend in Folie verpackt. Daraufhin wurden die fertigen Proben mit Hilfe einer Bleikassette in den Entwicklungsraum gebracht und in Dunkelheit einem Film aufgelegt, entwickelt und beschriftet.

#### 2.2.8.5 Western Blot – Auswertung

Abhängig von der Proteinmenge sowie der Proteinzusammensetzung eines Gewebes kam es zu einer unterschiedlich starken Anfärbung der Banden durch die eingesetzten Antikörper. Die Intensität und die Dicke der Banden ließ sich mit dem Programm Image J (Version 1.8.0, National Institutes of Health, Maryland, USA) bestimmen. Dieses Prinzip wird als densitometrische Quantifizierung bezeichnet. Die Ergebnisse wurden in Graph Pad (Version 6.01, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) statistisch analysiert und in Graphen dargestellt. Dabei wurde aus den gemessenen Intensitäten der Versuchsbedingungen und der jeweiligen unstimulierten Kontrollproben ein Quotient gebildet.

### 2.2.9 Software und Statistik

Um eine valide Aussagekraft der Ergebnisse zu generieren und Störfaktoren biologischer und technischer Art zu minimieren, wurden in den eingesetzten Methoden mehrfach biologische und technische Replikate durchgeführt.

Bei der Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs der Hepatozyten wurde dieselbe Bedingung zur gleichen Zeit an jeweils zwei unterschiedlichen Oxygraphen gemessen. Dadurch wurden technische Replikate generiert. Die Messungen der zweistündigen Stimulation wurden drei- bis sechsmal wiederholt, die der 24-stündigen Stimulation zwei- bis fünfmal. Daraus resultierten bei zweistündiger Stimulation zwischen sechs bis elf Experimente und pro 24-stündiger Stimulation vier bis neun Experimente. Die Mittelwerte der entsprechenden Plateaus der Sauerstoffänderung wurden als Messwerte definiert.

Bei der Messung der $H_2O_2$-Produktion musste auf die Generierung technischer Replikate verzichtet werden. Von den zwei sich im Einsatz befindenden Oxygraphen war nur ein Gerät zur fluorometrischen Messung in der Lage. Die Messungen der

zweistündigen Stimulation wurden zwei- bis dreimal wiederholt, die der 24-stündigen Stimulation zwei- bis viermal. Daraus resultierten bei zweistündiger Stimulation zwischen drei bis sechs Experimente und pro 24-stündiger Stimulation vier bis sieben Experimente. Die Mittelwerte der entsprechenden Plateaus der Sauerstoffänderung sowie der Resorufin-Konzentration wurden als Messwerte definiert.

Bei der Durchführung der Western Blots wurden für jede Bedingung jeweils zwei biologische Replikate erstellt. Jede Probe wurde je zwei Mal geblottet. Um möglichst valide Ergebnisse zu erzeugen, wurden die Hepatozytenproben mit unterschiedlich langen Belichtungszeiten gemessen und ein Quotient aus Intensität der gemessenen Bande im Verhältnis zur unstimulierten Hepatozytenkontrolle verwendet. Bei den Western Blot Daten konnte eine Fallzahl (n) von vier generiert werden.

Die Oxygraph-2k Experimente wurden mit der Software DatLab 6 simultan zu den Versuchen aufgezeichnet. Die Auswertung der Western Blot Filme erfolgte mit der Software Image J. Die Versuchssätze wurden mit der Software Microsoft Excel (Excel 2019, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) tabellarisch dargestellt. Die statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgten mit der Software Graph Pad. Bei den Box-Plots wurden die Mediane, die Minimal- und Maximalwerte sowie das erste und dritte Quartil der vier Versuchsgruppen dargestellt. Der Querbalken in der Mitte einer Box stellt den Median dar, während die untere und obere Begrenzung der Box jeweils dem ersten und dritten Quartil entsprechen. Die beiden Enden des Whiskers entsprechen den Minimal- und Maximalwerten. Für den Vergleich der verschiedenen Messbedingungen wurde eine Kruskal-Wallis ANOVA (Analysis of variance) mit Dunn’s Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau α (Alpha) wurde auf $\alpha = 0{,}05$ festgelegt. Signifikanz wurde ab einem p–Wert $< 0{,}05$ angenommen. In allen gezeigten Graphen werden p-Werte von <0.05, <0.01, <0.001 und <0.0001 mit *, **, *** sowie **** dargestellt.

# 3 Ergebnisse

In dieser Studie wurden die mitochondrialen Auswirkungen des $H_2S$-Donors AP39 auf Hepatozyten im Rahmen einer Lipopolysaccharid-Stimulation *in vitro* untersucht. Durch den Einsatz des Oxygraph-2k von Oroboros war es möglich die Sauerstoffkonzentration in Echtzeit zu messen und somit auf den aktuellen Sauerstoffverbrauch der Zellen zu schließen. Dabei wurde gemessen wie sich der Sauerstoffverbrauch der Hepatozyten durch eine Inkubation mit 10 nM AP39 veränderte. Darüber hinaus wurde bestimmt ob die AP39 induzierten Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs auch nach einer vorherigen LPS-Stimulation (1 µg/ml) nachweisbar waren. Die simultane Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs und der $H_2O_2$-Produktion wurde ebenfalls durch den Einsatz des Oxygraph-2k ermöglicht. Dabei erfolgte eine fluorometrische Messung der Resorufinbildung, welche direkt von der $H_2O_2$-Produktion innerhalb der untersuchten Probe abhängig war. Durch die letztendliche Bildung des Quotienten aus mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und der simultanen $H_2O_2$-Produktion konnte der Anteil des Sauerstoffverbrauchs bestimmt werden, welcher in die $H_2O_2$-Produktion mündete. Durch den Einsatz von Western Blots wurde die Expression der Protein Bax, Bcl-2, CBS, COX4, COX5A, COX5B, CSE, 3-MST, MT-CO1 sowie PGC-1α bestimmt. Bei allen durchgeführten Methoden wurde die AP39-Gruppe mit der Kontrollgruppe DMSO verglichen. Die gemessenen Werte der einzelnen Experimente wurden innerhalb der dazugehörigen Versuchsgruppe zusammengefasst und mit den jeweils anderen Versuchsgruppen verglichen.

## 3.1 Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch

Anhand der Versuchsprotokolle zur Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs wurden die Hepatozyten sowohl im gekoppelten Zustand als auch im entkoppelten Zustand untersucht. Es wurden die Änderungen des Sauerstoffverbrauchs nach jeder Gabe von Substraten und Inhibitoren registriert. In den nachfolgenden Abbildungen (**Abbildung 10, Abbildung 11**) sind die Ergebnisse der Experimente nach zwei- und 24-stündiger Stimulation abgebildet.

### 3.1.1 Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch nach zwei Stunden

In **Abbildung 10** wird der mitochondriale Sauerstoffverbrauch sowohl im gekoppelten Zustand (**Graph A**) als auch im entkoppelten Zustand (**Graph B**) in pmol pro Sekunde und Millionen Hepatozyten nach einer zweistündigen

Inkubationszeit dargestellt. Im gekoppelten Zustand zeigen sich sowohl in der OxPHOS-Kapazität als auch in der Aktivität von Komplex IV keine signifikanten Unterschiede des Sauerstoffverbrauchs zwischen den Stimulationen mit 10 nM AP39 und den DMSO-Kontrollgruppen. In der Aktivität von Komplex I wird eine signifikante Reduktion in der DMSO + LPS-Gruppe im Vergleich zur DMSO-Gruppe ersichtlich.

Im entkoppelten Zustand zeigen sich sowohl in der LEAK-Atmung, der ETS-Kapazität, der Aktivität der Komplexe I + II als auch in der Aktivität von Komplex IV keine signifikanten Unterschiede des Sauerstoffverbrauchs zwischen den Versuchsgruppen. In der Aktivität von Komplex I kann eine signifikante Reduktion in der DMSO + LPS-Gruppe im Vergleich zur DMSO-Gruppe festgestellt werden. In der AP39-Gruppe kommt es im Vergleich zur DMSO-Gruppe ebenfalls zu einer Reduktion.

Bei den jeweiligen Bedingungen im gekoppelten Zustand beträgt n für: DMSO = 11, AP39 = 8, DMSO + LPS = 6, AP39 + LPS = 8.

Bei den jeweiligen Bedingungen im entkoppelten Zustand beträgt n für: DMSO = 11, AP39 = 8, DMSO + LPS = 7, AP39 + LPS = 7.

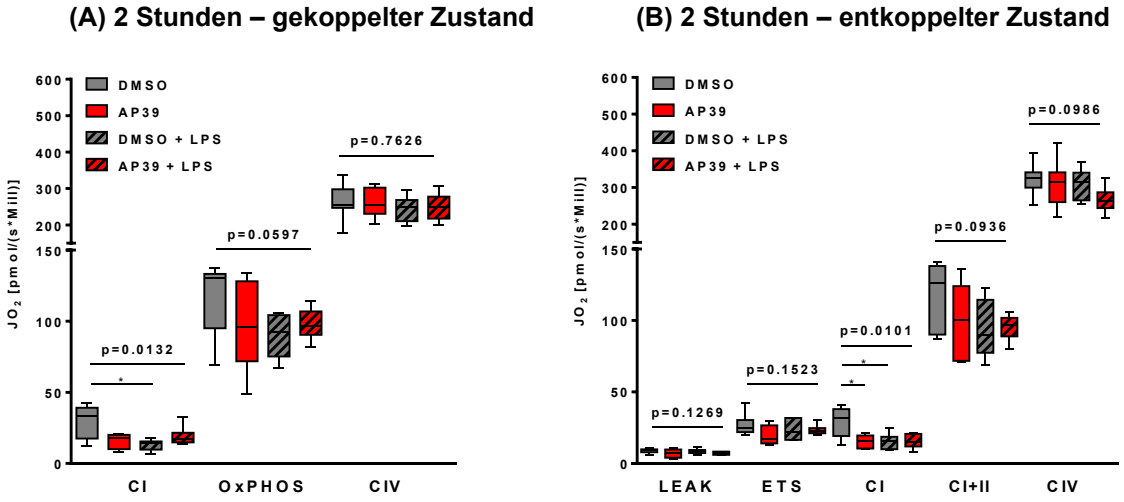



**Abbildung 10. Der mitochondriale $O_2$-Verbrauch der Hepatozyten nach zweistündiger Inkubationszeit im gekoppelten (A) und entkoppelten (B) Zustand**. Die Graphen zeigen jeweils auf der y-Achse den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch ($JO_2$) in pmol/(s*Mill) von Hepatozyten nach zweistündiger Stimulation der Zellen mit der Kontrollgruppe DMSO (0,1 µl/ml, grau) oder AP39 (10 nM in 0,1 µl/ml DMSO, rot) bei fehlender LPS-Stimulation und jeweils bei Vorhandensein einer vorherigen LPS-Stimulation (1 µg/ml, grau-schraffiert und rot-schraffiert). Auf der x-Achse sind die einzelnen Komplexaktivitäten nach der jeweiligen Stimulation abgebildet. Der gekoppelte Zustand wird in Graph A und der entkoppelte Zustand in Graph B dargestellt. In Graph A werden die Zustände nach maximaler Stimulation von Komplex I (CI), der Komplexe I + II (OxPHOS) sowie von CIV veranschaulicht. In Graph B sind die Zustände nach Hemmung der ATP-Synthase (LEAK), der vollständigen Entkopplung der Atmungskette (ETS), der maximalen Aktivität von CI, CI+II und CIV dargestellt. Die Messungen wurden mit 0,5 x $10^6$ Hepatozyten/ml mit dem Oxygraph-2k von Oroboros Instruments durchgeführt.
Die Daten sind als Box-Plots, der Median als Querbalken, die erste Quartile als untere Begrenzung der Box, die dritte Quartile als obere Begrenzung der Box, der Minimalwert als unterer Whisker sowie der Maximalwert als oberer Whisker dargestellt. *p < 0,05.
Abkürzungen: AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], CI,II,IV: Komplex I,II,IV, DMSO: Dimethylsulfoxid, ETS: Elektronentransport-system, $JO_2$: Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch, LPS: Lipopolysaccharide, $O_2$: Sauerstoff, OxPHOS: oxidative Phosphorylierung, pmol/(s*Mill): Picomol pro Sekunde und Millionen

### 3.1.2 Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch nach 24 Stunden

In **Abbildung 11** wird der mitochondriale Sauerstoffverbrauch sowohl im gekoppelten Zustand (**Graph A**) als auch im entkoppelten Zustand (**Graph B**) in pmol pro Sekunde und Millionen Hepatozyten nach einer 24-stündigen Inkubationszeit dargestellt. Im gekoppelten Zustand zeigen sich in der Aktivität von Komplex IV keine signifikanten Unterschiede des Sauerstoffverbrauchs zwischen den Versuchsgruppen. Sowohl in der Aktivität von Komplex I als auch in der OxPHOS-Kapazität ist eine signifikante Reduktion in der DMSO + LPS-Gruppe im Vergleich zur DMSO-Gruppe ersichtlich. Zusätzlich ist die Aktivität der AP39 + LPS-Gruppe im Vergleich zur AP39-Gruppe reduziert.

Im entkoppelten Zustand zeigt sich in der Aktivität von Komplex IV kein signifikanter Unterschied des Sauerstoffverbrauchs zwischen den Versuchsgruppen. In der

LEAK-Atmung kommt es zu einer signifikanten Reduktion in der AP39 + LPS-Gruppe im Vergleich zur AP39-Gruppe. Sowohl bei der ETS-Kapazität, der Aktivität von Komplex I als auch bei der Aktivität der Komplexe I + II kann eine signifikante Reduktion des Sauerstoffverbrauchs in den LPS-Gruppen im Vergleich zu den jeweils LPS freien Gruppen beobachtet werden. (DMSO + LPS vs. DMSO und AP39 + LPS vs. AP39).

Bei den jeweiligen Bedingungen im gekoppelten Zustand beträgt n für: DMSO = 8, AP39 = 9, DMSO + LPS = 9, AP39 + LPS = 5.

Bei den jeweiligen Bedingungen im entkoppelten Zustand beträgt n für: DMSO = 8, AP39 = 9, DMSO + LPS = 9, AP39 + LPS = 4.

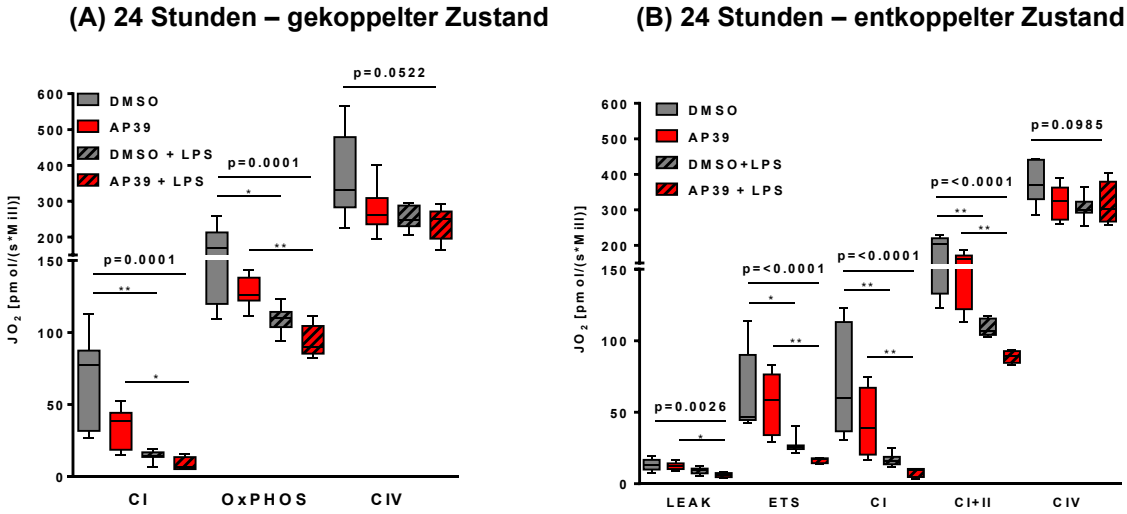



**Abbildung 11. Der mitochondriale $O_2$-Verbrauch der Hepatozyten nach 24-stündiger Inkubationszeit im gekoppelten (A) und entkoppelten (B) Zustand**. Die Graphen zeigen jeweils auf der y-Achse den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch ($JO_2$) in pmol/(s*Mill) von Hepatozyten nach 24-stündiger Stimulation der Zellen mit der Kontrollgruppe DMSO (0,1 µl/ml, grau) oder AP39 (10 nM in 0,1 µl/ml DMSO, rot) bei fehlender LPS-Stimulation und jeweils bei Vorhandensein einer vorherigen LPS-Stimulation (1 µg/ml, grau-schraffiert und rot-schraffiert). Auf der x-Achse sind die einzelnen Komplexaktivitäten nach der jeweiligen Stimulation abgebildet. Der gekoppelte Zustand wird in Graph A und der entkoppelte Zustand in Graph B dargestellt. In Graph A sind die Zustände nach maximaler Stimulation von Komplex I (CI), der Komplexe I + II (OxPHOS) sowie von CIV dargestellt. In Graph B werden die Zustände nach Hemmung der ATP-Synthase (LEAK), der vollständigen Entkopplung der Atmungskette (ETS), der maximalen Aktivität von CI, CI+II und CIV veranschaulicht. Die Messungen wurden mit 0,5 x $10^6$ Hepatozyten/ml mit dem Oxygraph-2k von Oroboros Instruments durchgeführt.
Die Daten sind als Box-Plots, der Median als Querbalken, die erste Quartile als untere Begrenzung der Box, die dritte Quartile als obere Begrenzung der Box, der Minimalwert als unterer Whisker sowie der Maximalwert als oberer Whisker dargestellt. *p < 0,05, **p < 0,01.
Abkürzungen: AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], CI,II,IV: Komplex I,II,IV, DMSO: Dimethylsulfoxid, ETS: Elektronentransport-system, $JO_2$: Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch, LPS: Lipopolysaccharide, $O_2$: Sauerstoff, OxPHOS: oxidative Phosphorylierung, pmol/(s*Mill): Picomol pro Sekunde und Millionen

## 3.2 Wasserstoffperoxid-Produktion

Anhand der Versuchsprotokolle zur Messung der $H_2O_2$-Produktion wurden die Hepatozyten sowohl im gekoppelten Zustand als auch im entkoppelten Zustand untersucht. Es wurden die $H_2O_2$- Konzentrationen sowie der Zuwachs von Resorufin nach jeder Gabe von Substraten und Inhibitoren registriert. In den nachfolgenden Abbildungen (**Abbildung 12**, **Abbildung 13**, **Abbildung 14**, **Abbildung 15**) werden sowohl die absoluten Werte der $H_2O_2$-Produktion als auch das Verhältnis der $H_2O_2$-Produktion zu dem jeweiligen Sauerstoffverbrauch nach zweistündiger und 24-stündiger Stimulation abgebildet.

### 3.2.1 Die mitochondriale $H_2O_2$-Produktion nach zwei Stunden

In **Abbildung 12** wird die absolute mitochondriale $H_2O_2$-Produktion sowohl im gekoppelten Zustand (**Graph A**) als auch im entkoppelten Zustand (**Graph B**) in pmol pro Sekunde und Millionen Hepatozyten nach einer zweistündigen Inkubationszeit dargestellt. In den zweistündigen Stimulationen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen. Tendenziell führt jedoch eine zweistündige Stimulation der Hepatozyten mit AP39 (10 nM) im entkoppelten Zustand zu einem leichten Abfall der $H_2O_2$-Produktion gegenüber der DMSO-Kontrolle. Dieser Abfall ist insbesondere in der Aktivität der Komplexe I + II im Vergleich zur zugehörigen DMSO-Kontrolle sichtbar.
Bei den jeweiligen Bedingungen im gekoppelten Zustand beträgt n für: DMSO = 6, AP39 = 4, DMSO + LPS = 4, AP39+ LPS = 3.
Bei den jeweiligen Bedingungen im entkoppelten Zustand beträgt n für: DMSO = 6, AP39 = 4, DMSO + LPS = 4, AP39 + LPS = 3.

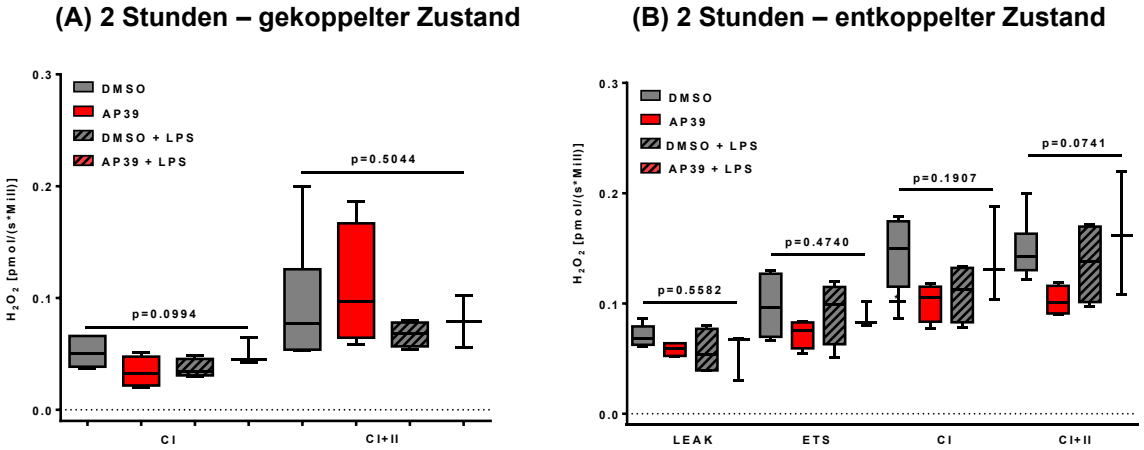



**Abbildung 12. Die mitochondriale $H_2O_2$-Produktion der Hepatozyten nach zweistündiger Inkubationszeit im gekoppelten (A) und entkoppelten (B) Zustand**. Die Graphen zeigen jeweils auf der y-Achse die mitochondriale $H_2O_2$-Produktion in pmol/(s*Mill) von Hepatozyten nach zweistündiger Stimulation der Zellen mit der Kontrollgruppe DMSO (0,1 µl/ml, grau) oder AP39 (10 nM in 0,1 µl/ml DMSO, rot) bei fehlender LPS-Stimulation und jeweils bei Vorhandensein einer vorherigen LPS-Stimulation (1 µg/ml, grau-schraffiert und rot-schraffiert). Auf der x-Achse sind die einzelnen Komplexaktivitäten nach der jeweiligen Stimulation abgebildet. Der gekoppelte Zustand wird in Graph A und der entkoppelte Zustand in Graph B dargestellt. In Graph A sind die Zustände nach maximaler Stimulation von Komplex I (CI) sowie CI+II dargestellt. In Graph B werden die Zustände nach Hemmung der ATP-Synthase (LEAK), der vollständigen Entkopplung der Atmungskette (ETS), der maximalen Aktivität von CI sowie CI+II veranschaulicht. Die Messungen wurden mit 0,5 x $10^6$ Hepatozyten/ml mit dem Oxygraph-2k von Oroboros Instruments durchgeführt. Die Daten sind als Box-Plots, der Median als Querbalken, die erste Quartile als untere Begrenzung der Box, die dritte Quartile als obere Begrenzung der Box, der Minimalwert als unterer Whisker sowie der Maximalwert als oberer Whisker dargestellt.
Abkürzungen: AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], CI,II: Komplex I,II, DMSO: Dimethylsulfoxid, ETS: Elektronentransport-system, $H_2O_2$: Wasserstoffperoxid, LPS: Lipopolysaccharide, pmol/(s*Mill): Picomol pro Sekunde und Millionen

### 3.2.2 $H_2O_2$-Produktion im Verhältnis zu dem mitochondrialen Sauerstoffverbrauch nach zwei Stunden

In **Abbildung 13** wird das Verhältnis der mitochondrialen $H_2O_2$-Produktion zu dem mitochondrialen Sauerstoffverbrauch sowohl im gekoppelten Zustand (**Graph A**) als auch im entkoppelten Zustand (**Graph B**) nach einer zweistündigen Inkubationszeit der Hepatozyten dargestellt. In den zweistündigen Stimulationen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.

Bei den jeweiligen Bedingungen im gekoppelten Zustand beträgt n für: DMSO = 6, AP39 = 4, DMSO + LPS = 4, AP39 + LPS = 3.

Bei den jeweiligen Bedingungen im entkoppelten Zustand beträgt n für: DMSO = 6, AP39 = 4, DMSO + LPS = 4, AP39 + LPS = 3.

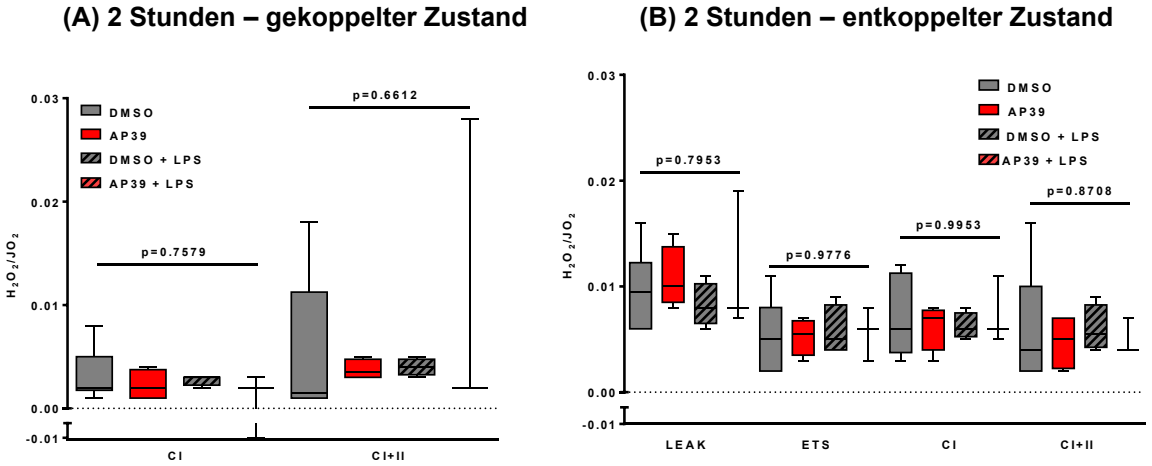



**Abbildung 13. Die mitochondriale $H_2O_2$-Produktion der Hepatozyten im Verhältnis zum mitochondrialen $O_2$-Verbrauch nach zweistündiger Inkubationszeit im gekoppelten (A) und entkoppelten (B) Zustand.** Die Graphen zeigen jeweils auf der y-Achse die mitochondriale $H_2O_2$-Produktion von Hepatozyten im Verhältnis zum mitochondrialen Sauerstoffverbrauch ($JO_2$) nach zweistündiger Stimulation der Zellen mit der Kontrollgruppe DMSO (0,1 µl/ml, grau) oder AP39 (10 nM in 0,1 µl/ml DMSO, rot) bei fehlender LPS-Stimulation und jeweils bei Vorhandensein einer vorherigen LPS-Stimulation (1 µg/ml, grau-schraffiert und rot-schraffiert). Auf der x-Achse sind die einzelnen Komplexaktivitäten nach der jeweiligen Stimulation abgebildet. Der gekoppelte Zustand wird in Graph A und der entkoppelte Zustand in Graph B dargestellt. In Graph A sind die Zustände nach maximaler Stimulation von Komplex I (CI) sowie CI+II dargestellt. In Graph B werden die Zustände nach Hemmung der ATP-Synthase (LEAK), der vollständigen Entkopplung der Atmungskette (ETS), der maximalen Aktivität von CI und CI+II veranschaulicht. Die Messungen wurden mit 0,5 x $10^6$ Hepatozyten/ml mit dem Oxygraph-2k von Oroboros Instruments durchgeführt. Die Daten sind als Box-Plots, der Median als Querbalken, die erste Quartile als untere Begrenzung der Box, die dritte Quartile als obere Begrenzung der Box, der Minimalwert als unterer Whisker sowie der Maximalwert als oberer Whisker dargestellt.
Abkürzungen: AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], CI,II: Komplex I,II, DMSO: Dimethylsulfoxid, ETS: Elektronentransport-system, $H_2O_2$: Wasserstoffperoxid, $JO_2$: Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch, LPS: Lipopolysaccharide, $O_2$: Sauerstoff

### 3.2.3 Die mitochondriale $H_2O_2$-Produktion nach 24 Stunden

In **Abbildung 14** wird die absolute mitochondriale $H_2O_2$-Produktion sowohl im gekoppelten Zustand (**Graph A**) als auch im entkoppelten Zustand (**Graph B**) in pmol pro Sekunde und Millionen Hepatozyten nach einer 24-stündigen Inkubationszeit dargestellt. Im gekoppelten Zustand der Atmungskette zeigen sich nach einer Stimulation mit 10 nM AP39 keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen. Im entkoppelten Zustand führt eine 24-stündige Stimulation mit 10 nM AP39 bei gehemmter ATP-Synthase (LEAK) zu einem signifikanten Abfall der $H_2O_2$-Produktion in der AP39-Gruppe im Vergleich zu der DMSO-Gruppe.

Bei den jeweiligen Bedingungen im gekoppelten Zustand beträgt n für: DMSO = 7, AP39 = 6, DMSO + LPS = 4, AP39 + LPS = 4.

Bei den jeweiligen Bedingungen im entkoppelten Zustand beträgt n für: DMSO = 7, AP39 = 6, DMSO + LPS = 4, AP39 + LPS = 4.

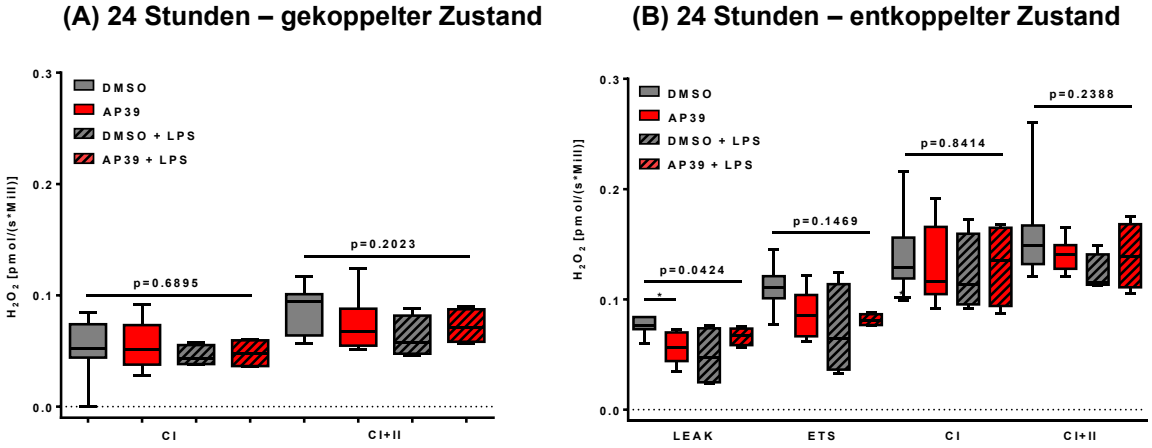



**Abbildung 14. Die mitochondriale $H_2O_2$-Produktion der Hepatozyten nach 24-stündiger Inkubationszeit im gekoppelten (A) und entkoppelten (B) Zustand.** Die Graphen zeigen jeweils auf der y-Achse die mitochondriale $H_2O_2$-Produktion in pmol/(s*Mill) von Hepatozyten nach 24- stündiger Stimulation der Zellen mit der Kontrollgruppe DMSO (0,1 µl/ml, grau) oder AP39 (10 nM in 0,1 µl/ml DMSO, rot) bei fehlender LPS-Stimulation und jeweils bei Vorhandensein einer vorherigen LPS-Stimulation (1 µg/ml, grau-schraffiert und rot-schraffiert). Auf der x-Achse sind die einzelnen Komplexaktivitäten nach der jeweiligen Stimulation abgebildet. Der gekoppelte Zustand wird in Graph A und der entkoppelte Zustand in Graph B dargestellt. In Graph A sind die Zustände nach maximaler Stimulation von Komplex I (CI) sowie CI+II dargestellt. In Graph B werden die Zustände nach Hemmung der ATP-Synthase (LEAK), der vollständigen Entkopplung der Atmungskette (ETS), der maximalen Aktivität von CI und CI+II dargestellt. Die Messungen wurden mit 0,5 x $10^6$ Hepatozyten/ml mit dem Oxygraph-2k von Oroboros Instruments durchgeführt.
Die Daten sind als Box-Plots, der Median als Querbalken, die erste Quartile als untere Begrenzung der Box, die dritte Quartile als obere Begrenzung der Box, der Minimalwert als unterer Whisker sowie der Maximalwert als oberer Whisker dargestellt. *p < 0,05.
Abkürzungen: AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], CI,II: Komplex I,II, DMSO: Dimethylsulfoxid, ETS: Elektronentransports-ystem, $H_2O_2$: Wasserstoffperoxid, LPS: Lipopolysaccharide, pmol/(s*Mill): Picomol pro Sekunde und Millionen

### 3.2.4 $H_2O_2$-Produktion im Verhältnis zu dem mitochondrialen Sauerstoffverbrauch nach 24 Stunden

In **Abbildung 15** wird das Verhältnis der mitochondrialen $H_2O_2$-Produktion zu dem mitochondrialen Sauerstoffverbrauch sowohl im gekoppelten Zustand (**Graph A**) als auch im entkoppelten Zustand (**Graph B**) nach einer 24-stündigen Inkubationszeit der Hepatozyten dargestellt. Im gekoppelten Zustand der Atmungskette zeigt eine 24-stündige Stimulation mit 10 nM A39 und einer vorherigen Stimulation mit LPS (1µg/ml) eine signifikante Erhöhung der $H_2O_2$-Produktion im Verhältnis zum mitochondrialen Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu der AP39-Gruppe ohne LPS-Stimulation. Dieser Anstieg ist sowohl in Komplex I als auch in der Aktivität der Komplexe I + II sichtbar. Der gleiche Effekt kann ebenso im entkoppelten Zustand gezeigt werden. Zu jedem Messzeitpunkt ist die $H_2O_2$-Produktion in der

AP39 + LPS-Gruppe höher als in der Vergleichsgruppe ohne LPS. Insbesondere in den Komplexen I + II ist eine signifikante Erhöhung der $H_2O_2$-Produktion im Verhältnis zum mitochondrialen Sauerstoffverbrauch erkennbar.

Bei den jeweiligen Bedingungen im gekoppelten Zustand beträgt n für: DMSO = 7, AP39 = 6, DMSO + LPS = 4, AP39 + LPS = 4.

Bei den jeweiligen Bedingungen im entkoppelten Zustand beträgt n für: DMSO = 7, AP39 = 6, DMSO + LPS = 4, AP39 + LPS = 4.

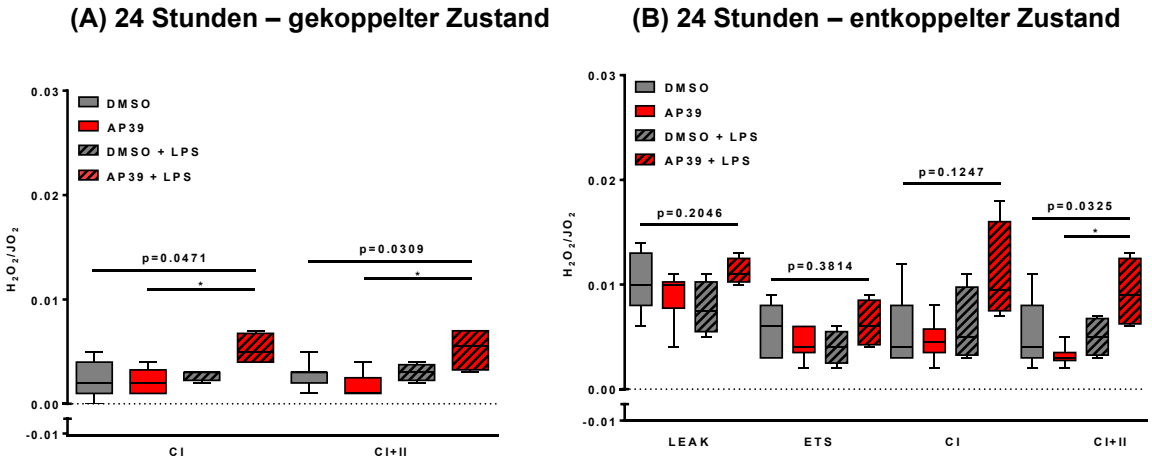



**Abbildung 15. Die mitochondriale $H_2O_2$-Produktion der Hepatozyten im Verhältnis zum mitochondrialen $O_2$-Verbrauch nach 24-stündiger Inkubationszeit im gekoppelten (A) und entkoppelten (B) Zustand.** Die Graphen zeigen jeweils auf der y-Achse die mitochondriale $H_2O_2$-Produktion von Hepatozyten im Verhältnis zum mitochondrialen Sauerstoffverbrauch ($JO_2$) nach 24- stündiger Stimulation der Zellen mit der Kontrollgruppe DMSO (0,1 µl/ml, grau) oder AP39 (10 nM in 0,1 µl/ml DMSO, rot) bei fehlender LPS-Stimulation und jeweils bei Vorhandensein einer vorherigen LPS-Stimulation (1 µg/ml, grau-schraffiert und rot-schraffiert) Auf der x-Achse sind die einzelnen Komplexaktivitäten nach der jeweiligen Stimulation abgebildet. Der gekoppelte Zustand wird in Graph A und der entkoppelte Zustand in Graph B dargestellt. In Graph A sind die Zustände nach maximaler Stimulation von Komplex I (CI) sowie CI+II dargestellt. In Graph B werden die Zustände nach Hemmung der ATP-Synthase (LEAK), der vollständigen Entkopplung der Atmungskette (ETS), der maximalen Aktivität von CI und CI+II veranschaulicht. Die Messungen wurden mit 0,5 x $10^6$ Hepatozyten/ml mit dem Oxygraph-2k von Oroboros Instruments durchgeführt. Die Daten sind als Box-Plots, der Median als Querbalken, die erste Quartile als untere Begrenzung der Box, die dritte Quartile als obere Begrenzung der Box, der Minimalwert als unterer Whisker sowie der Maximalwert als oberer Whisker dargestellt. *p < 0,05.
Abkürzungen: AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], CI,II: Komplex I,II, DMSO: Dimethylsulfoxid, ETS: Elektronentransport-system, $H_2O_2$: Wasserstoffperoxid, $JO_2$: Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch, LPS: Lipopolysaccharide, $O_2$: Sauerstoff

## 3.3 Western Blots

Nach den Arbeitsschritten Gelelektrophorese, Blotting, Antikörperfärbung sowie Entwicklung konnte die Intensität der Banden mit der Software Image J quantifiziert werden. Die gemessene absolute Intensität wurde in das Verhältnis zur Positivkontrolle gesetzt. Dabei entstand der Quotient aus Intensität der Bedingung und Intensität der Kontrolle. Die berechnete Intensität / Kontroll-Rate (I/K-R) der

jeweils untersuchten Proteine ist in den nachfolgenden Abbildungen graphisch dargestellt. Die in den Graphen angegebenen Signifikanzen ergaben sich aus dem Vergleich einer einzelnen Gruppe mit jeder anderen Gruppe der gleichen Stimulationsdauer.

### 3.3.1 Western Blot – COX4

In **Abbildung 16** werden die Western Blot Ergebnisse für COX4 dargestellt. Es ergeben sich sowohl in der zweistündigen als auch in der 24-stündigen Stimulation keine signifikanten Unterschiede der I/K-R zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen.

Für die COX4 beträgt n = 4.

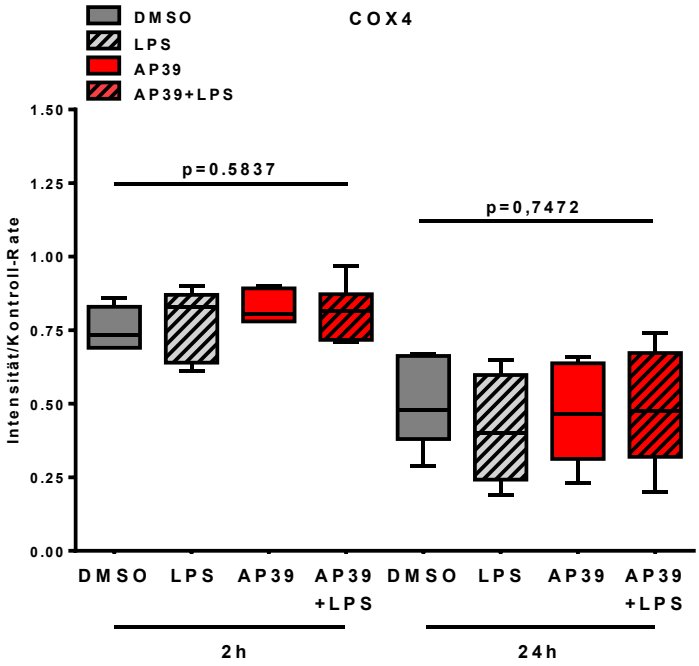



**Abbildung 16. Densitometrische Quantifizierung der Western Blot Ergebnisse von Hepatozyten nach zweistündiger und 24-stündiger Stimulation für COX4.** Der Graph zeigt auf der y-Achse die Intensität/Kontroll-Rate. Auf der x-Achse sind sowohl die zweistündigen (links) als auch die 24-stündigen (rechts) Bedingungen mit DMSO (0,1 µl/ml, grau), LPS (1 µg/ml, grau-schraffiert), AP39 (10 nM in 0,1 µl/ml DMSO, rot) sowie AP39 + LPS (10 nM AP39 in 0,1 µl/ml DMSO und 1 µg/ml LPS, rot-schraffiert) abgebildet. Die Messungen wurden mit 40 mg pro Probe durchgeführt. Belichtungszeiten: 8 s, 15 s und 30 s.
Die Daten sind als Box-Plots, der Median als Querbalken, die erste Quartile als untere Begrenzung der Box, die dritte Quartile als obere Begrenzung der Box, der Minimalwert als unterer Whisker sowie der Maximalwert als oberer Whisker dargestellt.
Abkürzungen: AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], COX4: Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 4, DMSO: Dimethylsulfoxid, h: Stunde, LPS: Lipopolysaccharide

### 3.3.2 Western Blot – COX5A

In **Abbildung 17** werden die Western Blot Ergebnisse für COX5A dargestellt. In der zweistündigen Stimulation zeigt sich eine signifikante Erhöhung der I/K-R zwischen

der DMSO- und der AP39 + LPS-Gruppe. In der 24-stündigen Stimulation werden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt.
Für die COX5A beträgt n = 4.

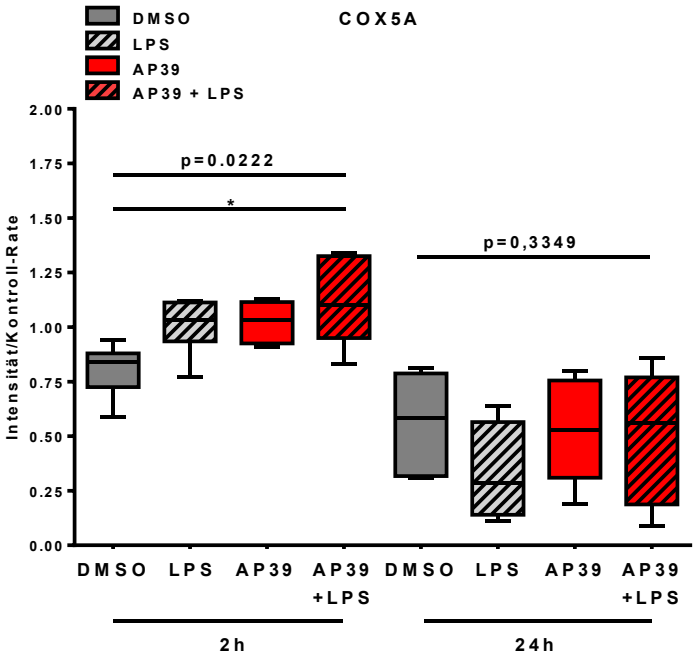



**Abbildung 17. Densitometrische Quantifizierung der Western Blot Ergebnisse von Hepatozyten nach zweistündiger und 24-stündiger Stimulation für COX5A.** Der Graph zeigt auf der y-Achse die Intensität/Kontroll-Rate. Auf der x-Achse sind sowohl die zweistündigen (links) als auch die 24-stündigen (rechts) Bedingungen mit DMSO (0,1 µl/ml, grau), LPS (1 µg/ml, grau-schraffiert), AP39 (10 nM in 0,1 µl/ml DMSO, rot) sowie AP39 + LPS (10 nM AP39 in 0,1 µl/ml DMSO und 1 µg/ml LPS, rot-schraffiert) abgebildet. Die Messungen wurden mit 40 mg pro Probe durchgeführt. Belichtungszeiten: 5 s, 10 s und 20 s.
Die Daten sind als Box-Plots, der Median als Querbalken, die erste Quartile als untere Begrenzung der Box, die dritte Quartile als obere Begrenzung der Box, der Minimalwert als unterer Whisker sowie der Maximalwert als oberer Whisker dargestellt. *p < 0,05
Abkürzungen: AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], COX5A: Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 5A, DMSO: Dimethylsulfoxid, h: Stunde, LPS: Lipopolysaccharide

### 3.3.3 Western Blot – COX5B

In **Abbildung 18** werden die Western Blot Ergebnisse für COX5B dargestellt. In der zweistündigen Stimulation zeigen sich mehrere Signifikanzen. Ausgehend von der DMSO-Gruppe kommt es sowohl in der LPS-, in der AP39- als auch in der AP39 + LPS-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der I/K-R. In der 24-stündigen Stimulation werden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt.
Für die COX5B beträgt n = 4.

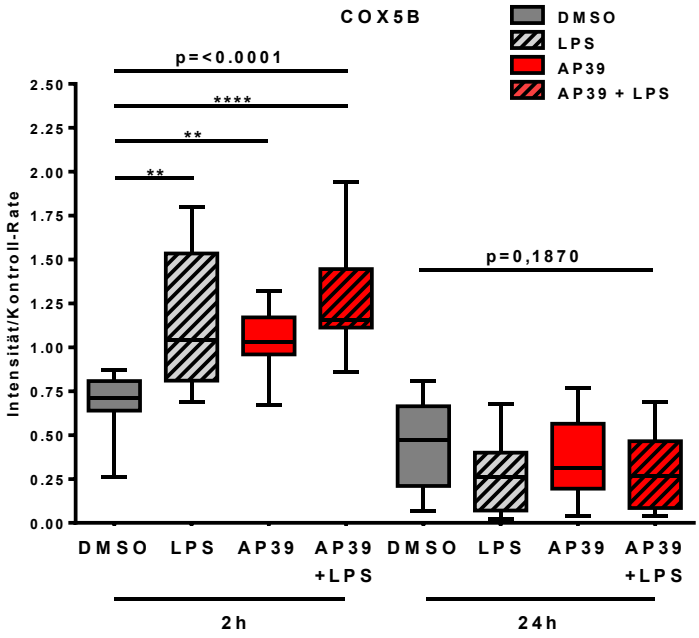



**Abbildung 18. Densitometrische Quantifizierung der Western Blot Ergebnisse von Hepatozyten nach zweistündiger und 24-stündiger Stimulation für COX5B.** Der Graph zeigt auf der y-Achse die Intensität/Kontroll-Rate. Auf der x-Achse sind sowohl die zweistündigen (links) als auch die 24-stündigen (rechts) Bedingungen mit DMSO (0,1 µl/ml, grau), LPS (1 µg/ml, grau-schraffiert), AP39 (10 nM in 0,1 µl/ml DMSO, rot) sowie AP39 + LPS (10 nM AP39 in 0,1 µl/ml DMSO und 1 µg/ml LPS, rot-schraffiert) abgebildet. Die Messungen wurden mit 40 mg pro Probe durchgeführt. Belichtungszeiten: 120 s, 240 s, 300 s, 900 s und 1800 s.
Die Daten sind als Box-Plots, der Median als Querbalken, die erste Quartile als untere Begrenzung der Box, die dritte Quartile als obere Begrenzung der Box, der Minimalwert als unterer Whisker sowie der Maximalwert als oberer Whisker dargestellt. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.
Abkürzungen: AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], COX5B: Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 5B, DMSO: Dimethylsulfoxid, h: Stunde, LPS: Lipopolysaccharide

### 3.3.4 Western Blot – MT-CO1

In **Abbildung 19** werden die Western Blot Ergebnisse für MT-CO1 dargestellt. Es können sowohl in der zweistündigen als auch in der 24-stündigen Stimulation keine signifikanten Unterschiede der I/K-R zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen aufgezeigt werden.

Für die MT-CO1 beträgt n = 4.

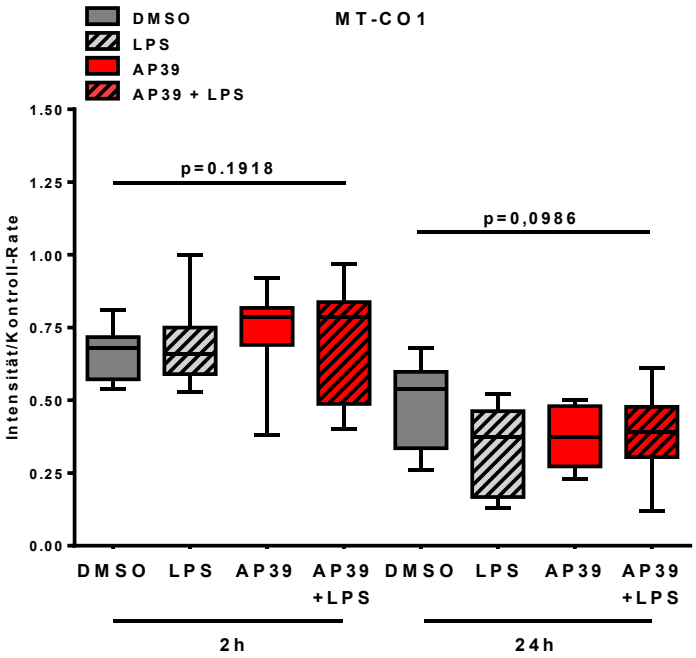



**Abbildung 19. Densitometrische Quantifizierung der Western Blot Ergebnisse von Hepatozyten nach zweistündiger und 24-stündiger Stimulation für MT-CO1.** Der Graph zeigt auf der y-Achse die Intensität/Kontroll-Rate. Auf der x-Achse sind sowohl die zweistündigen (links) als auch die 24-stündigen (rechts) Bedingungen mit DMSO (0,1 µl/ml, grau), LPS (1 µg/ml, grau-schraffiert), AP39 (10 nM in 0,1 µl/ml DMSO, rot) sowie AP39 + LPS (10 nM AP39 in 0,1 µl/ml DMSO und 1 µg/ml LPS, rot-schraffiert) abgebildet. Die Messungen wurden mit 40 mg pro Probe durchgeführt. Belichtungszeiten: 90 s, 180 s, 300 s und 360 s.
Die Daten sind als Box-Plots, der Median als Querbalken, die erste Quartile als untere Begrenzung der Box, die dritte Quartile als obere Begrenzung der Box, der Minimalwert als unterer Whisker sowie der Maximalwert als oberer Whisker dargestellt.
Abkürzungen: AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], MT-CO1: Mitochondrially encoded Cytochrome-c-Oxidase I, DMSO: Dimethylsulfoxid, h: Stunde, LPS: Lipopolysaccharide

### 3.3.5 Western Blot – CBS

In **Abbildung 20** werden die Western Blot Ergebnisse für CBS dargestellt. In der zweistündigen Stimulation ist ein signifikanter Anstieg der I/K-R zwischen der LPS- und der AP39-Gruppe nachweisbar. In der 24-stündigen Stimulation kommt es ausgehend von DMSO zu einer signifikanten Reduktion sowohl in der LPS- als auch in der AP39 + LPS-Gruppe.

Für die CBS beträgt n = 4.

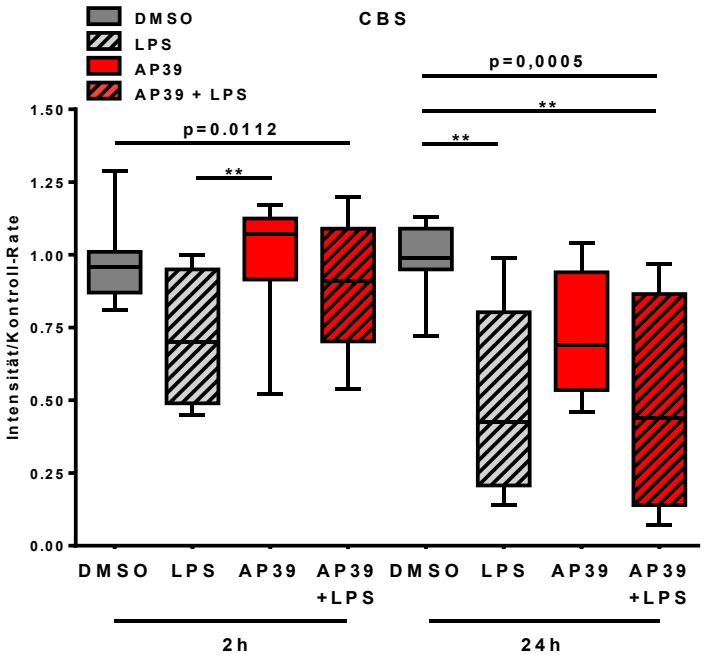



**Abbildung 20. Densitometrische Quantifizierung der Western Blot Ergebnisse von Hepatozyten nach zweistündiger und 24-stündiger Stimulation für CBS.** Der Graph zeigt auf der y-Achse die Intensität/Kontroll-Rate. Auf der x-Achse sind sowohl die zweistündigen (links) als auch die 24-stündigen (rechts) Bedingungen mit DMSO (0,1 µl/ml, grau), LPS (1 µg/ml, grau-schraffiert), AP39 (10 nM in 0,1 µl/ml DMSO, rot) sowie AP39 + LPS (10 nM AP39 in 0,1 µl/ml DMSO und 1 µg/ml LPS, rot-schraffiert) abgebildet. Die Messungen wurden mit 40 mg pro Probe durchgeführt. Belichtungszeiten: 20 s, 30 s, 60 s, 90 s und 120 s.
Die Daten sind als Box-Plots, der Median als Querbalken, die erste Quartile als untere Begrenzung der Box, die dritte Quartile als obere Begrenzung der Box, der Minimalwert als unterer Whisker sowie der Maximalwert als oberer Whisker dargestellt. *p < 0,05, **p < 0,01.
Abkürzungen: AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], CBS: Cystathionin-ß-Synthase, DMSO: Dimethylsulfoxid, h: Stunde, LPS: Lipopolysaccharide

### 3.3.6 Western Blot – CSE

In **Abbildung 21** werden die Western Blot Ergebnisse für CSE dargestellt. Es ergeben sich sowohl in der zweistündigen als auch in der 24-stündigen Stimulation keine signifikanten Unterschiede der I/K-R zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen.

Für die CSE beträgt n = 4.

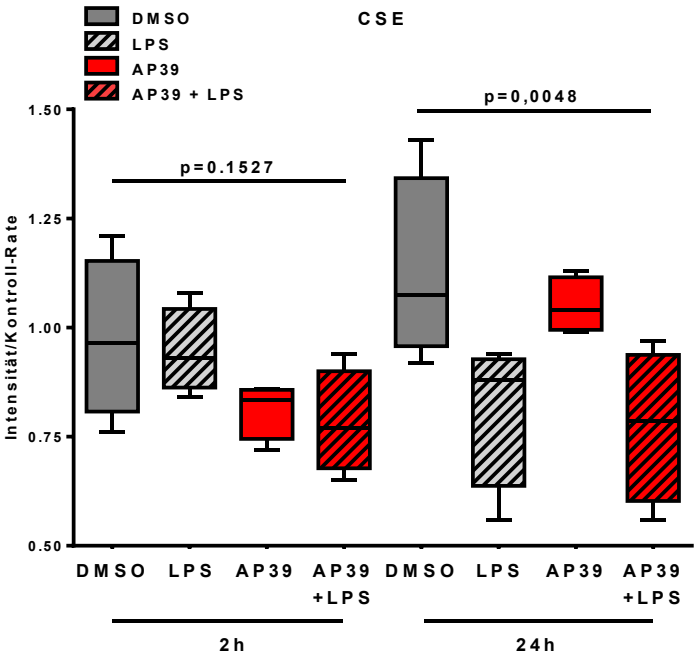



**Abbildung 21. Densitometrische Quantifizierung der Western Blot Ergebnisse von Hepatozyten nach zweistündiger und 24-stündiger Stimulation für CSE.** Der Graph zeigt auf der y-Achse die Intensität/Kontroll-Rate. Auf der x-Achse sind sowohl die zweistündigen (links) als auch die 24-stündigen (rechts) Bedingungen mit DMSO (0,1 µl/ml, grau), LPS (1 µg/ml, grau-schraffiert), AP39 (10 nM in 0,1 µl/ml DMSO, rot) sowie AP39 + LPS (10 nM AP39 in 0,1 µl/ml DMSO und 1 µg/ml LPS, rot-schraffiert) abgebildet. Die Messungen wurden mit 40 mg pro Probe durchgeführt. Belichtungszeiten: 10 s und 30 s.
Die Daten sind als Box-Plots, der Median als Querbalken, die erste Quartile als untere Begrenzung der Box, die dritte Quartile als obere Begrenzung der Box, der Minimalwert als unterer Whisker sowie der Maximalwert als oberer Whisker dargestellt.
Abkürzungen: AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], CSE: Cystathionin-γ-Lyase, DMSO: Dimethylsulfoxid, h: Stunde, LPS: Lipopolysaccharide

### 3.3.7 Western Blot – 3-MST

In **Abbildung 22** werden die Western Blot Ergebnisse für 3-MST dargestellt. Es sind sowohl in der zweistündigen als auch in der 24-stündigen Stimulation keine signifikanten Unterschiede der I/K-R zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen ersichtlich.

Für die 3-MST beträgt n = 4.

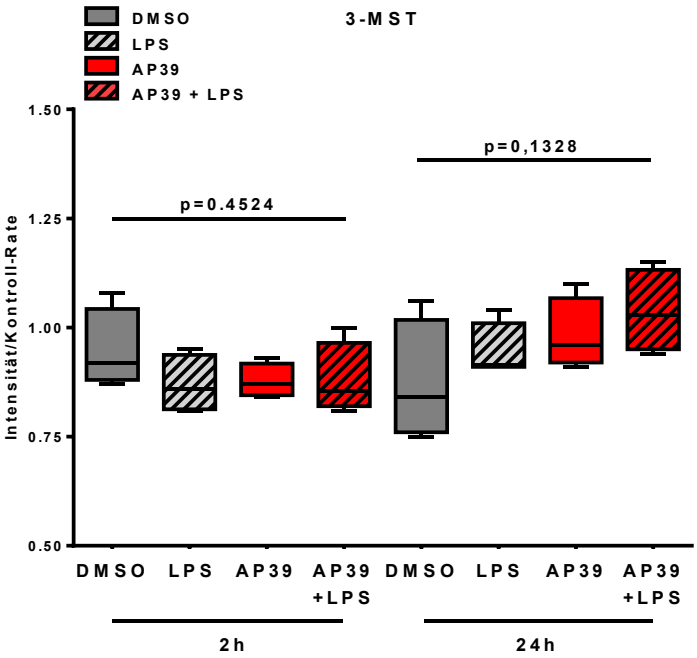



**Abbildung 22. Densitometrische Quantifizierung der Western Blot Ergebnisse von Hepatozyten nach zweistündiger und 24-stündiger Stimulation für 3-MST.** Der Graph zeigt auf der y-Achse die Intensität/Kontroll-Rate. Auf der x-Achse sind sowohl die zweistündigen (links) als auch die 24-stündigen (rechts) Bedingungen mit DMSO (0,1 µl/ml, grau), LPS (1 µg/ml, grau-schraffiert), AP39 (10 nM in 0,1 µl/ml DMSO, rot) sowie AP39 + LPS (10 nM AP39 in 0,1 µl/ml DMSO und 1 µg/ml LPS, rot-schraffiert) abgebildet. Die Messungen wurden mit 40 mg pro Probe durchgeführt. Belichtungszeiten: 10 s und 30 s.
Die Daten sind als Box-Plots, der Median als Querbalken, die erste Quartile als untere Begrenzung der Box, die dritte Quartile als obere Begrenzung der Box, der Minimalwert als unterer Whisker sowie der Maximalwert als oberer Whisker dargestellt.
Abkürzungen: AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], 3-MST: 3-Mercaptopyruvat-Schwefeltransferase, DMSO: Dimethylsulfoxid, h: Stunde, LPS: Lipopolysaccharide

### 3.3.8 Western Blot – Bax

In **Abbildung 23** werden die Western Blot Ergebnisse für Bax dargestellt. In der zweistündigen Stimulation zeigt sich eine signifikante Reduktion der I/K-R zwischen der DMSO- und der LPS-Gruppe, sowie zwischen der DMSO- und der AP39-Gruppe. Bei der 24-stündigen Messbedingung kommt es zu einer signifikanten Abnahme der I/K-R zwischen der DMSO- und der AP39 + LPS-Gruppe sowie zwischen der LPS- und der AP39 + LPS-Gruppe.

Für Bax beträgt n = 4.

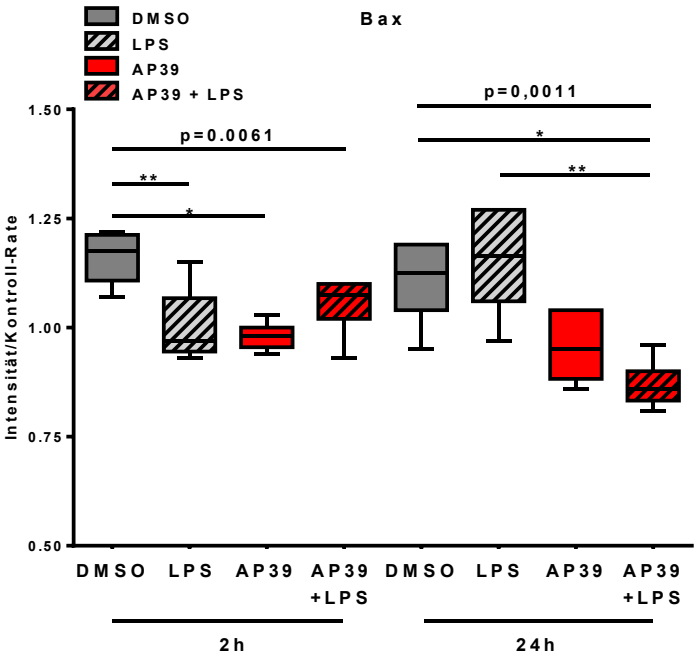



**Abbildung 23. Densitometrische Quantifizierung der Western Blot Ergebnisse von Hepatozyten nach zweistündiger und 24-stündiger Stimulation für Bax.** Der Graph zeigt auf der y-Achse die Intensität/Kontroll-Rate. Auf der x-Achse sind sowohl die zweistündigen (links) als auch die 24-stündigen (rechts) Bedingungen mit DMSO (0,1 µl/ml, grau), LPS (1 µg/ml, grau-schraffiert), AP39 (10 nM in 0,1 µl/ml DMSO, rot) sowie AP39 + LPS (10 nM AP39 in 0,1 µl/ml DMSO und 1 µg/ml LPS, rot-schraffiert) abgebildet. Die Messungen wurden mit 40 mg pro Probe durchgeführt. Belichtungszeiten: 8 s, 12 s und 30 s.
Die Daten sind als Box-Plots, der Median als Querbalken, die erste Quartile als untere Begrenzung der Box, die dritte Quartile als obere Begrenzung der Box, der Minimalwert als unterer Whisker sowie der Maximalwert als oberer Whisker dargestellt. *p < 0,05, **p < 0,01.
Abkürzungen: AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], Bax: Bcl-2-associated X Protein, DMSO: Dimethylsulfoxid, h: Stunde, LPS: Lipopolysaccharide

### 3.3.9 Western Blot – Bcl-2

In **Abbildung 24** werden die Western Blot Ergebnisse für Bcl-2 dargestellt. In den zweistündigen Stimulationen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Bei der 24-stündigen Stimulation kommt es zu einer signifikanten Reduktion der I/K-R zwischen der DMSO- und der AP39 + LPS-Gruppe. Darüber hinaus zeigt sich eine signifikante Reduktion zwischen der AP39- und der AP39 + LPS-Gruppe.

Für Bcl-2 beträgt: n = 4.

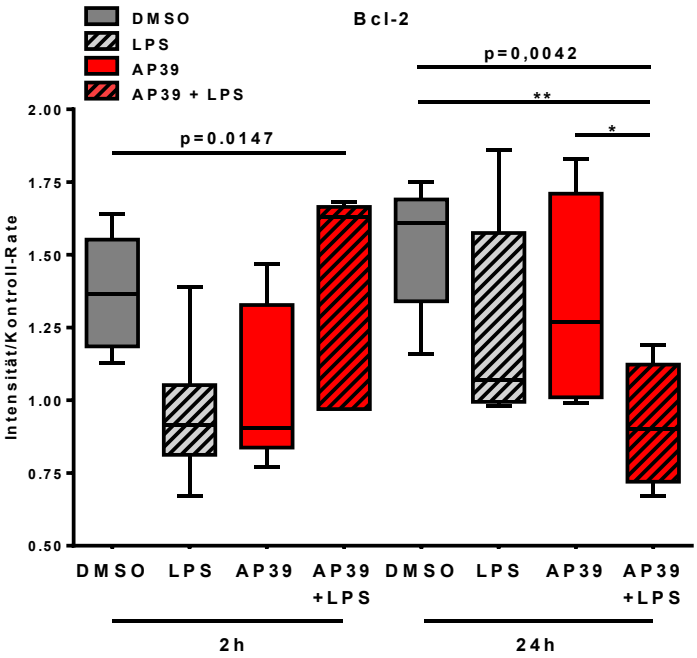



**Abbildung 24. Densitometrische Quantifizierung der Western Blot Ergebnisse von Hepatozyten nach zweistündiger und 24-stündiger Stimulation für Bcl-2.** Der Graph zeigt auf der y-Achse die Intensität/Kontroll-Rate. Auf der x-Achse sind sowohl die zweistündigen (links) als auch die 24-stündigen (rechts) Bedingungen mit DMSO (0,1 µl/ml, grau), LPS (1 µg/ml, grau-schraffiert), AP39 (10 nM in 0,1 µl/ml DMSO, rot) sowie AP39 + LPS (10 nM AP39 in 0,1 µl/ml DMSO und 1 µg/ml LPS, rot-schraffiert) abgebildet. Die Messungen wurden mit 40 mg pro Probe durchgeführt. Belichtungszeiten: 30 s und 120 s.
Die Daten sind als Box-Plots, der Median als Querbalken, die erste Quartile als untere Begrenzung der Box, die dritte Quartile als obere Begrenzung der Box, der Minimalwert als unterer Whisker sowie der Maximalwert als oberer Whisker dargestellt. *p < 0,05, **p < 0,01.
Abkürzungen: AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], Bcl-2: B-cell lymphoma 2, DMSO: Dimethylsulfoxid, h: Stunde, LPS: Lipopolysaccharide

### 3.3.10 Western Blot – PGC-1α

In **Abbildung 25** werden die Western Blot Ergebnisse für PGC-1α dargestellt. Es zeichnen sich in der zweistündigen Stimulation keine signifikanten Unterschiede der I/K-R zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen ab. Bei der 24-stündigen Stimulation kommt es zu einer signifikanten Reduktion der I/K-R von AP39 im Vergleich zu der LPS-Gruppe.

Für PGC-1α beträgt n = 4.

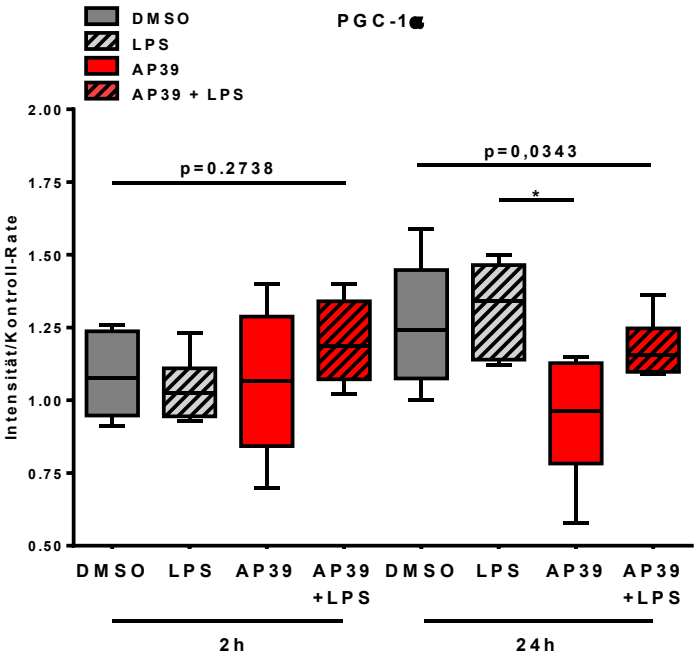



**Abbildung 25. Densitometrische Quantifizierung der Western Blot Ergebnisse von Hepatozyten nach zweistündiger und 24-stündiger Stimulation für PGC-1α.** Der Graph zeigt auf der y-Achse die Intensität/Kontroll-Rate. Auf der x-Achse sind sowohl die zweistündigen (links) als auch die 24-stündigen (rechts) Bedingungen mit DMSO (0,1 µl/ml, grau), LPS (1 µg/ml, grau-schraffiert), AP39 (10 nM in 0,1 µl/ml DMSO, rot) sowie AP39 + LPS (10 nM AP39 in 0,1 µl/ml DMSO und 1 µg/ml LPS, rot-schraffiert) abgebildet. Die Messungen wurden mit 40 mg pro Probe durchgeführt. Belichtungszeiten: 60 s, 120 s und 180 s.
Die Daten sind als Box-Plots, der Median als Querbalken, die erste Quartile als untere Begrenzung der Box, die dritte Quartile als obere Begrenzung der Box, der Minimalwert als unterer Whisker sowie der Maximalwert als oberer Whisker dargestellt. *p < 0,05.
Abkürzungen: AP39: [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid], PGC-1α: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- alpha, DMSO: Dimethylsulfoxid, h: Stunde, LPS: Lipopolysaccharide

## 3.4 Zusammenfassung

Anhand der Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs kann durch die Stimulation mit 10 nM AP39 eine zeitabhängige Inhibition beobachtet werden, insbesondere nach vorheriger LPS-Stimulation (1 µg/ml). Diese Inhibition betrifft nach 24-stündiger Stimulation die LEAK-Atmung, die ETS-Kapazität sowie die Komplexe I + II. In der zweistündigen Stimulation sind diese Effekte weniger deutlich nachweisbar. In der zweistündigen Stimulation mit AP39 ist insbesondere der Abfall des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs in Komplex I sowohl im gekoppelten als auch im entkoppelten Zustand im Vergleich zur Kontrollgruppe DMSO auffällig.

Bei der Messung der absoluten $H_2O_2$-Produktion sind durch die Stimulation mit 10 nM AP39 keine signifikanten Veränderungen nachweisbar. Dennoch kann nach einer zweistündigen Stimulation der Hepatozyten mit AP39 im entkoppelten

Zustand ein leichter Abfall der $H_2O_2$-Produktion gegenüber der DMSO-Kontrolle gezeigt werden. Dieser Effekt ist beim Verhältnis der $H_2O_2$-Produktion zum mitochondrialen Sauerstoffverbrauch nicht mehr nachweisbar. Nach 24-stündiger AP39-Behandlung ist die $H_2O_2$-Produktion im Verhältnis zu dem Sauerstoffverbrauch in LPS-behandelten Zellen erhöht. Diese Erhöhung ist insbesondere im gekoppelten Zustand der Atmungskette sowohl in Komplex I als auch in der Aktivität der Komplexe I + II auffällig. Im entkoppelten Zustand zeigt sich die Erhöhung vor allem in den Komplexen I + II.

Die Western Blot Ergebnisse zeigen keinen Effekt der Stimulation mit AP39 auf die Proteinexpression von COX4, COX5A, MT-CO1, CBS, CSE und 3-MST. Eine zweistündige Inkubation mit AP39 resultiert in einer Erhöhung der Expression von COX5B. In den Western Blot Ergebnissen kann die Stimulation mit AP39 nach zwei Stunden zu einer Reduktion von Bax führen. Nach 24 Stunden zeigt sich in der AP39 + LPS-Gruppe ebenfalls eine Reduktion. Die Expression von Bcl-2 wird nach 24-stündiger AP39-Stimulation in LPS-behandelten Zellen reduziert. Nach einer 24- stündigen AP39-Stimulation zeichnet sich eine Reduktion von PGC-1α ab.

# 4 Diskussion

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Dissertation diverse Effekte auf die Komplexe der Atmungskette und auf weitere zelluläre Vorgänge von Hepatozyten nachgewiesen werden. Ausgelöst wurden diese Effekte von AP39 sowie LPS. Die Auswirkungen von $H_2S$ auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch der Hepatozyten zeigten einen zeitabhängigen Verlauf. Nach der zweistündigen Stimulation der Hepatozyten mit AP39 wurde ein diskreter Abfall des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs ersichtlich. Dieser Abfall war im entkoppelten Zustand der Atmungskette sowie nach vorheriger Aktivierung des Komplexes I am auffälligsten (**Abbildung 10**). Nach einer 24-stündigen Stimulation war eine ausgeprägte Abnahme des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs messbar, welche sich durch eine vorherige Stimulation mit LPS noch weiter verstärken ließ (**Abbildung 11**).

Bei der Messung der $H_2O_2$-Produktion im Verhältnis zum mitochondrialen Sauerstoffverbrauch zeigten sich durch die Stimulation der Hepatozyten mit AP39 keine eindeutigen Veränderungen. In einem durch LPS-verursachten Inflammationsprozess führte die 24-stündige Stimulation mit AP39 zu einer Erhöhung der mitochondrialen $H_2O_2$-Produktion im Vergleich zu dem mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (**Abbildung 13, Abbildung 15**).

Da die gemessenen absoluten $H_2O_2$-Konzentrationen keine nennenswerten Veränderungen zeigten, ist davon auszugehen, dass die Veränderungen des Quotienten aus $H_2O_2$-Produktion und mitochondrialem Sauerstoffverbrauch allein durch die Änderungen des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs entstanden sind. Diese Erkenntnis könnte auf zwei Aspekte zurückzuführen sein. Zum einen lässt sich vermuten, dass die Effekte aufgrund einer direkten Interaktion an den Komplexen der Atmungskette entstanden sind. Zum anderen ist es möglich, dass die Effekte von AP39 zu schwach ausgeprägt waren, um messbare Veränderungen abseits der Atmungskette zu verursachen. Auf den folgenden Seiten soll auf die genauen Effekte sowie auf mögliche Erklärungen eingegangen werden.

## 4.1 Effekte von AP39 auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch

### 4.1.1 Zeitabhängige Dynamik der Effekte von AP39

Ein entscheidendes Charakteristikum von $H_2S$ stellt die biphasische Dosis-Wirkungs-Kurve auf die Atmungskette dar. Bei $H_2S$-Konzentrationen von bis zu 10 µM kann von einer stimulatorischen Wirkung auf die mitochondriale Atmungskette ausgegangen werden. Dies ist dadurch bedingt, dass Elektronen von $H_2S$ über die SOU an das Coenzym Q der Atmungskette übertragen werden [16,51]. Dabei kommt es entlang des ETS zu einem gesteigerten Elektronenfluss und folglich zu einer Erhöhung des Protonengradienten, welcher wiederum den Sauerstoffverbrauch der Zelle ansteigen lässt [51,127]. Höhere Konzentrationen von $H_2S$ können jedoch eine Inhibition der Atmungskette initiieren [16,57,96,107]. Dabei reichen bereits Konzentrationen im mittleren bis hohen millimolaren Bereich aus. Die hemmende Wirkung auf die mitochondriale Atmungskette kann auf die Interaktion mit der COX zurückgeführt werden [10,26,51,57,94,127]. Durch den Ausfall des Komplexes kommt es innerhalb des ETS zu einem Rückstau von Elektronen. Folglich stellt sich ein komplettes Erliegen der Atmungskette ein [127]. Das bereits mehrfach beschriebene Phänomen der konzentrationsabhängigen Effekte von $H_2S$ konnte in den vorliegenden Ergebnissen ebenfalls gezeigt werden. Durch den Einsatz von AP39 konnte den Hepatozyten $H_2S$ *in vitro* appliziert werden. Da AP39 zu der Gruppe der langsam freisetzenden $H_2S$-Donoren gehört, kann das Molekül bis zu mehrere Tage nach seiner Applikation $H_2S$ freisetzen [32]. Durch die $TPP^+$-Domäne, welche zu einer gezielten $H_2S$-Freisetzung innerhalb des Mitochondriums führt, resultieren hohe effektive intramitochondriale $H_2S$-Konzentrationen [3,76]. Der sinkende mitochondriale Sauerstoffverbrauch der Hepatozyten nach 24-stündiger Stimulation mit AP39 im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe legt die Vermutung nahe, dass es in den jeweiligen Zellen zu einer zeitabhängigen intramitochondrialen Akkumulation gekommen ist, welche für die gemessenen Reduktionen verantwortlich war (**Abbildung 11**). Eine Stimulation des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs konnte durch niedrige $H_2S$-Konzentrationen jedoch nicht gezeigt werden. Auf mögliche Gründe soll in dem jeweiligen Kapitel genauer eingegangen werden (s. 4.1.2).

### 4.1.2 Zweistündige Effekte von AP39 auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch von Hepatozyten

Die durchgeführten Experimente zeigten nach zweistündiger Stimulation mit AP39 eine nicht signifikante Reduktion des Sauerstoffverbrauchs im gekoppelten Zustand in Komplex I im Vergleich zur Kontrollgruppe DMSO. Darüber hinaus kam es zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität von Komplex I im entkoppelten Zustand der Atmungskette (**Abbildung 10**). Die AP39-Gabe senkte den Sauerstoffverbrauch der Hepatozyten auf 53,3 % (CI, gekoppelt) sowie auf 51,6 % (CI, entkoppelt) im Vergleich zu den jeweiligen DMSO-Kontrollgruppen. Die gemessene Aktivität der COX nach zweistündiger AP39-Stimulation betrug im gekoppelten Zustand 100 % sowie im entkoppelten Zustand 97 % im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe. Da $H_2S$ in hohen intramitochondrialen Konzentrationen insbesondere mit der COX interagiert und zu einer Hemmung des Komplexes führt, kann eine zu hohe $H_2S$-Konzentration als Ursache für die alleinige Reduktion der Aktivität von Komplex I ausgeschlossen werden [26,51].

Der Komplex I der Atmungskette ist die NADH-Dehydrogenase. Sie nimmt Elektronen von NADH auf und überträgt sie auf das mobile Coenzym Ubichinon. Das Ubichinon stellt demnach die Schnittstelle zwischen der Reduktionsäquivalente NADH und dem ETS dar. Dabei stammt das reduzierte NADH aus dem Citratzyklus, dem Aminosäurestoffwechsel oder der Glykolyse [43]. Die Bereitstellung reduzierter Cofaktoren, wie beispielsweise NADH, sowie die Generierung von $NAD^+$ als Elektronenakzeptoren sind kritische Funktionen der mitochondrialen Atmung in proliferierenden Zellen. In Zellen, welche $H_2S$ ausgesetzt waren, kam es durch eine Insuffizienz von $NAD^+$ zu einer Abnahme des $NAD^+$ / NADH-Verhältnisses [79]. In isolierten Mitochondrien führt ein hohes NADH / $NAD^+$-Verhältnis in der mitochondrialen Matrix zu einer signifikanten Sauerstoffproduktion. Anhand dieses Aspekts kann angenommen werden, dass eine Abnahme der $NAD^+$-Konzentrationen durch die $H_2S$-Applikation zu einer reduzierten Aktivität von Komplex I geführt hat. Die Ursache hierfür liegt in der Reduktion des Elektronenakzeptors $NAD^+$ zu NADH durch die Aufnahme von zwei Elektronen sowie einem Proton. Ein Mangel an $NAD^+$ führt wiederum zu einer mangelhaften Wiederaufbereitung von NADH, welches dem Komplex I als Substrat dient. Durch die Übergabe von Elektronen von NADH an Ubichinon, speist der Komplex I üblicherweise Elektronen in das ETS. Während die Elektronen von einem Komplex

auf den nächsten übertragen werden, werden Protonen aus dem Mitochondrium über die IMM in den Intermembranraum gepumpt. Dadurch wird ein zunehmender Protonengradient aufgebaut. Dieser wird schlussendlich am Komplex V unter der Entstehung von ATP über die oxidative Phosphorylierung wieder abgebaut [42]. Durch einen Mangel an NADH können weniger Elektronen über den Komplex I in das ETS fließen. Dadurch wird ein geringerer Protonengradient aufgebaut, welcher ebenfalls zu einer erniedrigten Atmungsaktivität der folgenden Komplexe führt. Dies zeigte sich zum einen an der reduzierten Aktivität von Komplex I, aber auch an der Aktivität der Komplexe I + II. Die Aktivität der Komplexe I + II betrug im gekoppelten Zustand 82,2 % sowie im entkoppelten Zustand 84 % der Atmungsaktivität der DMSO-Kontrollgruppe.

Die Tatsache, dass die COX scheinbar unbeeinträchtigt aktiviert werden konnte, ist möglicherweise durch die Biodynamik von $H_2S$ zu erklären. In niedrigen Konzentrationen ist $H_2S$ dazu in der Lage Elektronen über eine Sulfidoxidation an die Atmungskette abzugeben und dadurch die Atmungskette zu stimulieren [16,51]. Die Donation wird über die SOU vermittelt, welche sich auf Höhe von Komplex II befindet und die Elektronen anschließend an Komplex III weitergibt [127]. Durch die Stimulation der SOU bleibt die Aktivität der Komplexe I + II unbeeinträchtigt, da die Elektronen erst auf Höhe von Komplex III in das ETS fließen. Dies führt wiederum zu einer Stimulation der COX und zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch der Zelle, da am Ende der Atmungskette Sauerstoff, durch die Aufnahme von Elektronen, verbraucht wird [127]. Damit könnte die erhaltene Aktivität der COX ein kumulatives Ergebnis sein, welches sich aus einer partiellen Inhibition durch einen $NAD^+$-Mangel sowie einer partiellen Stimulation durch die Aktivierung der SOU zusammensetzt. Die Stimulation der Atmungskette durch $H_2S$ erfolgt der Literatur zufolge bis zu einer Konzentration von 10 µM [127]. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass nach der zweistündigen Stimulation mit AP39 die Konzentration im Mitochondrium unterhalb dieses Wertes lag.

Die Inhibition von Komplex I ist im entkoppelten Zustand im Vergleich zum gekoppelten Zustand der Atmungskette signifikant ausgefallen. Dies steht im Zusammenhang damit, dass das ETS im physiologischen Zustand der Zelle gehemmt wird, da es dauerhaft gegen einen bestehenden Protonengradienten Protonen in den Intermembranraum pumpt [37]. Dadurch schafft der Gradient eine Abhängigkeit des ETS, welches wiederum von der ATP-Synthase abhängig ist [43].

Durch die Gabe von Oligomycin wird ein nicht phosphorylierender Zustand der Atmungskette erreicht. Die daraus entstehende Inhibition der ATP-Synthase führt dazu, dass an Komplex V kein ATP mehr gebildet werden kann. Durch diese Inhibition stellt sich die Leckage-Atmung beziehungsweise Kompensations-Atmung ein, welche das ETS zunehmend von der ATP-Synthase entkoppelt [35,37,104]. Die Titration von FCCP führt zu einem Rückstrom von Protonen in die Matrix und damit zunächst zu einem Verlust des Protonengradienten. Zur Aufrechterhaltung des Gradienten ist der Elektronenfluss entlang der Komplexe kompensatorisch erhöht [35,45,121]. In diesem Zustand entfällt die natürliche Hemmung des ETS und die Aktivität nimmt zu. Durch die fehlende natürliche Hemmung des ETS wiegt der Mangel an Substraten an Komplex I schwerer und die messbaren Effekte verdeutlichen sich.

### 4.1.3 24-stündige Effekte von AP39 auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch von Hepatozyten

Die Inhibition der Komplexe durch die zweistündige AP39-Stimulation konnte in der 24-stündigen Stimulation ebenfalls nachgewiesen werden. Der mitochondriale Sauerstoffverbrauch der Hepatozyten wurde durch die 24-stündige Stimulation mit AP39 im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe deutlich gesenkt (**Abbildung 11**). Dabei zeigte sich nicht nur eine Reduktion der Aktivität von Komplex I, sondern in allen Komplexen konnte diese Tendenz beobachtet werden. Die gemessene Aktivität der COX betrug durch die AP39-Stimulation im gekoppelten Zustand 75 % sowie im entkoppelten Zustand 85,1 % der Aktivität der DMSO-Vergleichsgruppe. Dieses Ergebnis lässt sich am ehesten auf die $H_2S$-Konzentrationen nach 24-stündiger AP39 Stimulation zurückführen. Die langsame und zielgerichtete Freisetzung des $H_2S$ durch den Einsatz von AP39 resultiert in einer intramitochondrialen Akkumulation über die Zeit [3,76]. Daraus resultieren hohe Konzentrationen von $H_2S$, welche wiederum die Aktivität der COX hemmen [10,26,51,57,94,127]. Die Inhibition der Atmungskette erfolgt der Literatur zufolge ab einer Konzentration von 10 µM [127]. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass nach einer 24-stündigen Stimulation mit AP39 die Konzentration im Mitochondrium oberhalb dieses Wertes lag. Die Bindung des $H_2S$ an die COX hemmt die Fähigkeit zur Sauerstoffbindung. Durch den Ausfall des Komplexes kann das reduzierte Cytochrom c nicht mehr oxidiert werden. Es fallen zunehmende Konzentrationen von reduziertem Cytochrom c an. Dies hat zur Folge, dass die

unzureichende Verwertung zu einem Mangel an oxidiertem Cytochrom c führt. Am Komplex III werden Elektronen von Ubichinol auf oxidiertes Cytochrom c transferiert [127]. Durch den Mangel an oxidiertem Cytochrom c kommt es zu einer verminderten Aktivität von Komplex III und zu einer steigenden Konzentration an unverwertbarem Ubichinol. Dies wiederum führt zu einem Mangel an oxidiertem Ubichinon, welches für die Elektronenübertragung der Komplexe I + II benötigt wird [40]. Aufgrund von diesem Mechanismus führt die initiale Inhibition von Komplex IV zu einer Beeinträchtigung der Komplexe I – III. Der resultierende Rückstau von Elektronen innerhalb des ETS bewirkt eine schrittweise Auflösung des Protonengradienten, wodurch der Sauerstoffverbrauch der Zelle erniedrigt wird [127]. Wird die COX vollständig gehemmt, stellt sich ein komplettes Erliegen der Atmungskette mit Stopp der aeroben ATP-Erzeugung ein. Da in den vorliegenden Experimenten jedoch eine Restaktivität der COX von 75 % im gekoppelten Zustand beziehungsweise 85,1 % im entkoppelten Zustand gemessen wurde, kann hier von einer partiellen Hemmung ausgegangen werden. Ausgehend von der Inhibition der COX resultierte wiederum eine Restaktivität von Komplex I von 51,1 % im gekoppelten Zustand und 59,4 % im entkoppelten Zustand im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe. Die OxPHOS war im gekoppelten Zustand auf 75,2 % sowie im entkoppelten Zustand auf 81,6 % reduziert.

Wie bereits beschrieben, nimmt durch die zunehmende Entkopplung der Atmungskette die natürliche Hemmung des ETS ab. Dadurch werden höhere Komplexaktivitäten erreicht und die messbaren Effekte nehmen zu. Aus diesem Grund wäre eine stärkere Inhibition nach 24-stündiger Stimulation mit AP39 im entkoppelten Zustand der Atmungskette zu erwarten gewesen. Die mitochondriale respiratorische Reservekapazität der vorliegenden Experimente betrug nach einer zweistündigen Stimulation mit AP39 23,4 pmol/(s*Mill) und nach der 24-stündigen Stimulation 44,3 pmol/(s*Mill). In der Literatur sind für höhere Konzentrationen von $H_2S$ zytotoxische Wirkungen beschrieben [2,15,80,145]. Da davon ausgegangen werden muss, dass die 24-stündige Stimulation von AP39 zu höheren effektiven $H_2S$-Konzentrationen in den Mitochondrien geführt hat, sind die Hepatozyten im Vergleich zur zweistündigen Stimulation in einem höheren Maße von $H_2S$-verursachten Zellstress betroffen. Die gesteigerte mitochondriale Reservekapazität der Hepatozyten nach der 24-stündigen AP39-Stimulation im Vergleich zur zweistündigen Stimulation würde diese Annahme belegen. Es kann angenommen

werden, dass die gesteigerte Ausnutzung der mitochondrialen Reservekapazität die Unterschiede des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs zwischen dem gekoppelten Zustand und dem entkoppelten Zustand der Atmungskette erklärt. Durch die Entkopplung werden höhere Flussraten generiert, welche die Inhibition der Komplexe im entkoppelten Zustand stärker ausfallen lassen können. Durch das Ausschöpfen der mitochondrialen respiratorischen Reservekapazität können die Hepatozyten die Inhibition abschwächen und den Sauerstoffverbrauch steigern. Dies führt zu den vorliegenden Ergebnissen und erklärt die stärkere Inhibition der Komplexe im gekoppelten Zustand nach 24-stündiger AP39-Stimulation im Vergleich zu der jeweiligen DMSO-Kontrollbedingung.

Es kann festgehalten werden, dass der mitochondriale Sauerstoffverbrauch der Hepatozyten nach AP39-Stimulation eine zeitabhängige Inhibition aufzeigt. Eine zweistündige Stimulation bewirkte eine Reduktion der Aktivität von Komplex I, insbesondere im entkoppelten Zustand der Atmungskette. Mit einer Stimulationsdauer von 24 Stunden stellte sich zunehmend eine zusätzliche Inhibition der restlichen Komplexe der Atmungskette heraus.

## 4.2 Effekte von LPS auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch

Durch die Messungen am Oxygraph-2k konnte veranschaulicht werden, dass die Applikation von LPS, im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit DMSO, zu einer Reduktion der Atmungsaktivität der Hepatozyten führte (**Abbildung 10, Abbildung 11**). Dieser Effekt kam insbesondere nach längerer Stimulationsdauer zu Tragen. Nach zweistündiger Stimulation war sowohl im gekoppelten als auch im entkoppelten Zustand der Atmungskette ein signifikanter Abfall in Komplex I ersichtlich. Nach 24-stündiger Stimulation breitete sich dieser Trend ausgehend von Komplex I auf den Komplex II und weiter auf das ETS aus. Bei allen gemessenen Werten zeigte sich ein signifikanter Rückgang des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs. LPS gilt als einer der stärksten Stimuli für einen Organismus. Die Exposition von Zellen mit LPS führt zu einer Aktivierung von Entzündungszellen mit konsekutiver Entstehung eines akuten Inflammationsprozesses [54,116,141]. Im Zuge dessen werden unter anderem vermehrt Superoxide gebildet und es kommt zu einer mitochondrialen Schwellung [54,116]. Die unphysiologische Schwellung geht mit einer erhöhten Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran einher und führt zu einem Verlust des Membranpotentials [54]. Das mitochondriale Membranpotential entsteht durch Elektronentransfer über die IMM und setzt sich

aus einem pH-Gradienten sowie einer elektrostatischen Ladungsdifferenz zusammen. Voraussetzung für die letztliche ATP-Synthese ist die Integrität der IMM, welche die potentielle Energie des Gradienten aufrechterhält. Dieser Gradient kann anschließend verwendet werden, um am Ende der Atmungskette die ATP-Synthase anzutreiben [102,109]. Die LPS-induzierte Barrierestörung führt zu einem Abbau des Protonengradienten und des mitochondrialen Membranpotentials. Es kommt, durch die Unfähigkeit der Mitochondrien die Energie des Gradienten zu konservieren, zu einem verminderten Sauerstoffangebot der Zelle [102]. Diese Veränderungen zeigten sich ebenfalls in den vorliegenden Ergebnissen dieser Dissertation. Die LPS-Applikation führte zu einem abfallenden Sauerstoffverbrauch der Hepatozyten. Es kann angenommen werden, dass LPS nicht in direkter Interaktion mit den einzelnen Komplexen die hervorgerufenen Effekte bewirken konnte. Dies ist dadurch bedingt, dass der Trend zur Reduktion des Sauerstoffverbrauchs in allen Komplexen nachgewiesen werden konnte. Da sich sowohl im gekoppelten als auch im entkoppelten Zustand der Atmungskette signifikante Reduktionen der Atmungsaktivität der Komplexe zeigten, scheint das Entkoppeln keine nennenswerte Ursache der LPS-induzierten Effekte zu sein.

Auffällig war jedoch die geringe Inhibition des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs von Komplex IV, insbesondere nach 24-stündiger Stimulation. Manifestierte sich in der Aktivität der restlichen Komplexe ein signifikanter Abfall, konnte die Komplex IV-Aktivität weitestgehend durch die LPS-Stimulation erhalten werden. Dieses Ergebnis wäre durch eine Hochregulierung des Proteins Hepcidin erklärbar. Hepcidin, ein aus der Leber stammendes Peptidhormon, spielt eine zentrale Rolle im Eisenstoffwechsel und ist darüber hinaus bei akuten Entzündungsreaktionen als akutes-Phase-Protein vermehrt nachweisbar [60]. Eine Vielzahl an Mikroben nehmen während einer Infektion Eisen vom Wirt auf. Das Eisenregulationshormon Hepcidin ist ein wichtiger Modulator dieser Reaktion und kann durch die Kontrolle des Eisenspiegels bakterizide Wirkungen ausüben. Durch die Stimulation mit LPS kommt es in den Hepatozyten zu einer gesteigerten Expression von Hepcidin [77]. Durch hohe Konzentrationen an Hepcidin kann ein LPS-induzierter Verlust der COX-Aktivität verhindert werden [110]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die LPS-Stimulation zu einer intrazellulären Gegenregulation mit Erhöhung der Hepcidin-Spiegel geführt haben könnte, welche die Aktivität von Komplex IV konservierte.

Die Ausschöpfung bioenergetischer Reserven ist ein Anpassungsprozess von Zellen, welche dadurch einen erhöhten Energiebedarf decken können [105]. Die metabolische Anpassung ist ein Versuch der Zellen den LPS-induzierten Zellstress zu kompensieren. Deshalb wurde die mitochondriale respiratorische Reservekapazität der Hepatozyten nach LPS-Stimulation bestimmt und mit dem jeweiligen Wert der DMSO-Kontrollgruppe verglichen. Die mitochondriale respiratorische Reservekapazität nach zweistündiger DMSO-Stimulation betrug 12,0 pmol/(s*Mill). Die vorherige Applikation von LPS verringerte die Kapazität auf 11,2 pmol/(s*Mill). Da eine Erhöhung der Reservekapazität als Folge von Zellstress entsteht, der Zelle als eine Art Kompensation dient und sie gegen Noxen resistenter macht, kann zunächst vermutet werden, dass die Hepatozyten durch die zweistündige LPS-Stimulation keinem vermehrten Stress ausgesetzt waren. Diese Vermutung wird jedoch durch den nachgewiesenen Abfall des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs nach zwei Stunden entkräftet. Die LPS-Applikation hatte bereits nach dieser Inkubationszeit Einfluss auf die Atmungsaktivität und konnte sie zum Teil signifikant reduzieren. Daher kann angenommen werden, dass die LPS-Gabe zu einer intrazellulären Belastung geführt hat und maßgeblich eine Depression der Atmung verursacht hat.

Eine Erhöhung der mitochondrialen respiratorischen Reservekapazität wird überwiegend durch den Komplex II der Atmungskette vermittelt [43,105]. Da er eine gemeinsame Komponente des Citratzyklus und des ETS ist, führt eine Erhöhung von Komplex II-Substraten, beispielsweise durch Steigerung der Glukose- oder Fettsäureoxidation, zu einer Zunahme des Elektronenflusses. Die Steigerung wird unter anderem durch die Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase reguliert. Dieses Enzym ist ein Stoffwechselsensor, der die Oxidation und Bereitstellung von Fettsäuren für das ETS verstärken kann [105]. Die Erhöhung der Reservekapazität wird hauptsächlich durch den Komplex II vermittelt und die zweistündige LPS-Stimulation verursacht im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe eine erniedrigte Aktivität von Komplex II. Anhand dieser beiden Beobachtungen kann der fehlende Anstieg der mitochondrialen respiratorischen Reservekapazität durch LPS erklärt werden. Die Aktivität von Komplex II betrug nach zweistündiger Stimulation mit DMSO + LPS im gekoppelten Zustand 78,9 % und im entkoppelten Zustand 80,1 % der Aktivität der DMSO-Gruppe. Des Weiteren findet die Aktivierung der Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase nach einem Zeitraum von

48 Stunden statt [105]. Somit benötigen die entsprechenden Anpassungen einen längeren Zeitraum und können in den zweistündigen Experimenten nicht nachgewiesen werden.

Die mitochondriale respiratorische Reservekapazität der Hepatozyten nach 24-stündiger DMSO-Stimulation betrug 53,5 pmol/(s*Mill). Die vorherige Applikation von LPS verringerte die Kapazität auf 11,1 pmol/(s*Mill). Je ausgeprägter die mitochondriale Reservekapazität ist, desto anpassungsfähiger ist eine Zelle gegenüber metabolischen Veränderungen ihrer Umgebung [105]. Der starke Abfall nach 24-stündiger Stimulation verdeutlicht, dass die Hepatozyten die Fähigkeit des Metabolismus weitestgehend verloren haben. Die Applikation von LPS sowie die lange Stimulationsdauer von 24 Stunden führten zu einer unphysiologischen Atmosphäre, in welcher die Hepatozyten sich nicht mehr anpassen konnten und offensichtliche Schäden davontrugen. Die Fähigkeit die Reservekapazität über eine Steigerung der Aktivität von Komplex II zu erhöhen, war mit Atmungsaktivitäten von 70,4 % (gekoppelt) sowie 64,3 % (entkoppelt), verglichen zu der DMSO-Kontrollgruppe, durch die Gabe von LPS ebenfalls erloschen.

Der Cytochrom c-Test liefert Hinweise auf einen Integritätsverlust der äußeren Mitochondrienmembran in permeabilisierten Zellen [41,42]. Im Falle einer Barrierestörung zeigt sich ein Anstieg der Cytochrom c-Control-Ratio. Eine Verabreichung von LPS führt zu hohen TNF-α-Spiegeln. TNF- α ist ein Zytokin, das hauptsächlich durch aktivierte Makrophagen produziert wird und eine Schlüsselrolle bei der Apoptose von Hepatozyten spielt [71]. TNF-α vermittelt seine Wirkungen am TNF-Rezeptor und führt zu einer gesteigerten Permeabilität der Mitochondrien. Daraus resultiert ein Efflux von Cytochrom c in das Zytosol, wodurch es zu einer Kaskade mit der Aktivierung von Caspasen kommt [41,42,71]. Es folgt eine Fragmentierung der DNS sowie eine Akkumulation von Calcium-Kationen ($Ca^{2+}$), welche über die permeabilisierte Membran aus dem Zytosol in das Mitochondrium gelangen können [71]. Hohe $Ca^{2+}$-Spiegel hemmen wiederum den mitochondrialen Elektronentransport und induzieren Nekrosen. Die Cytochrom c-Control-Ratio der Hepatozyten nach zweistündiger DMSO-Stimulation betrug 1,5. Fand jedoch im Vorhinein eine Stimulation mit LPS statt erhöhte sich die Ratio auf 2,6. In den 24-stündigen Experimenten ergab sich bei Abwesenheit von LPS eine Cytochrom c-Control-Ratio von 1,3. Diese stieg durch die vorherige Gabe von LPS auf einen Wert von 4,3 an. Diese Ergebnisse zeigen, dass LPS zu einer zeitabhängigen

Barrierestörung der äußeren Mitochondrienmembran von Hepatozyten führt. Durch die Bestimmung der Cytochrom c-Control-Ratio kann ein Mangel an Cytochrom c und damit eine Störung der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran nachgewiesen werden. Dieser Nachweis war nach 24-stündiger LPS-Stimulation im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe am ausgeprägtesten. Eine hohe Ratio bedeutet wiederum hohe Cytochrom c-Konzentrationen im Zytosol, welche zu Apoptosen der betroffenen Zelle führen können. Es ist davon auszugehen, dass LPS über den oben genannten Mechanismus zu Apoptosen und Störungen des ETS geführt hat. Dadurch wäre auch die signifikante Hemmung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs der Hepatozyten am ehesten erklärbar (**Abbildung 10, Abbildung 11**). Eine steigende Cytochrom c-Control-Ratio führt durch einen zunehmenden Cytochrom c-Mangel zu einer stärkeren Reduktion des Sauerstoffverbrauchs, welche sich insbesondere in den Versuchen nach 24-stündiger Stimulation mit LPS zeigte.

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse, konnte die Applikation mit LPS eine mitochondriale Dysfunktion der Hepatozyten verursachen. Der mitochondriale Sauerstoffverbrauch zeigte eine signifikante Reduktion, welche durch eine zunehmende Stimulationsdauer stetig abfiel. Die Cytochrom c-Control-Ratio stieg insbesondere durch die 24-stündige LPS-Stimulation an. Da erhöhte Cytochrom c-Spiegel im Zytosol Apoptosen verursachen, wurde zusätzlich die mitochondriale respiratorische Reservekapazität ermittelt. Als Kompensationsmechanismus können Zellen bei einer Erhöhung der Reservekapazität resistenter auf Zellstress reagieren. Die Berechnung der zweistündigen Kapazität ergab keine klare Veränderung, wohingegen die Kapazität nach 24-stündiger Stimulation mit LPS deutlich reduziert war. Diese Tatsache begünstigte den Zelltod zusätzlich.

## 4.3 Effekte von AP39 auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch unter LPS-Stimulation

Zuvor wurden bereits die Veränderungen des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs einer alleinigen AP39-Stimulation im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe diskutiert. Anschließend wurden die Experimente mit LPS-Stimulation der DMSO-Gruppe gegenübergestellt, um die Effekte einer LPS-induzierten Inflammation auf Hepatozyten *in vitro* zu untersuchen.

Im Folgenden soll die Wirksamkeit von AP39 bei Vorliegen einer LPS-Stimulation untersucht und mit der Kontrollgruppe DMSO + LPS verglichen werden. Dies soll

eine Aussage über die zweistündigen und 24-stündigen Effekte von AP39 auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch im Rahmen einer LPS-Stimulation ermöglichen.

Nach zweistündiger AP39 + LPS-Stimulation zeigten sich keine signifikanten Veränderungen auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch der Hepatozyten im Vergleich mit der DMSO + LPS-Stimulation (**Abbildung 10**). Somit lässt sich der Rückschluss ziehen, dass die eingesetzte AP39-Konzentration unter LPS-Stimulation nach zweistündiger Inkubationszeit keine zusätzlichen Effekte auf den Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien ausüben konnte.

Nach 24-stündiger Stimulation bewirkte AP39 in Kombination mit LPS eine weitere Hemmung der Atmungskette im Vergleich zu der DMSO + LPS-Stimulation. Diese Reduktion war, mit Ausnahme von Komplex IV, in der Aktivität aller Komplexe nachweisbar (**Abbildung 11**). Die AP39-Gabe reduzierte die Aktivität von Komplex I auf 60,2 % (gekoppelt) und 50,0 % (entkoppelt), von Komplex I+ II auf 86,2 % (gekoppelt) und 81,7 % (entkoppelt), die LEAK-Atmung auf 67,0 % sowie die ETS-Aktivität auf 61,7 %. Die Aktivität von Komplex IV hingegen war im gekoppelten Zustand mit 93,6 % der Aktivität der DMSO + LPS-Kontrollgruppe weitestgehend erhalten geblieben. Im entkoppelten Zustand der Atmungskette konnte die Aktivität von Komplex IV sogar um 3,6 % gesteigert werden.

In bisherigen Studien konnten zytoprotektive sowie antiapoptotische Effekte für $H_2S$ gezeigt werden [3,15,58,76,139]. Dabei ist bekannt, dass die Auswirkungen von $H_2S$ gewebeabhängig sind und sowohl von der Dosis als auch von der Behandlungsdauer abhängen [53,145]. Abweichend von den zytoprotektiven Effekten konnte in Lebergewebe gezeigt werden, dass eine $H_2S$-Exposition den Energiestoffwechsel in der Leber störte und eine Apoptose der Hepatozyten induzierte. Es stellte sich sowohl eine Abnahme des Expressionsniveaus von Genen des Energiestoffwechsels als auch eine Zunahme Apoptose-verwandter Gene wie Caspase3, Bcl-2 sowie Bax heraus. Die Kombination von $H_2S$ und LPS steigerte das Ausmaß der Störung noch weiter [55]. Diese Ergebnisse könnten die vorliegenden Messungen des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs erklären. Bereits die alleinige Applikation von LPS führte zu einer Reduktion des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs. Es ist wahrscheinlich, dass diese Effekte durch die Induktion einer Apoptose entstanden sind (s. 4.2). Zudem könnte die Gabe von AP39 die Apoptose noch aggraviert haben. Dadurch standen weniger

Mitochondrien für die Energiegewinnung zur Verfügung und der Sauerstoffverbrauch sank ab. In Anwesenheit von LPS werden apoptotische Frühereignisse hauptsächlich über TNF-α vermittelt, wohingegen $H_2S$ eine Rolle bei der Vermittlung der Spätereignisse spielt [31]. Durch die Verwendung von AP39, ein langsam und gezielt im Mitochondrium freisetzender $H_2S$-Donor, wurde $H_2S$ von exogen den Hepatozyten zugeführt [127]. Da physiologische $H_2S$-Konzentrationen an der Vermittlung apoptotischer Prozesse beteiligt sind, kann angenommen werden, dass die exogen zugeführte $H_2S$-Menge nicht nur an der Vermittlung der Apoptose beteiligt war, sondern diese zusätzlich verstärkte. Wie bereits erwähnt vermittelt $H_2S$ in LPS-Stimulationen die spätapoptotischen Ereignisse [31]. Dadurch könnten die fehlenden Effekte von AP39 unter LPS-Stimulation nach kurzer Stimulationsdauer von zwei Stunden und ebenfalls der deutliche Abfall des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs nach 24 Stunden erklärt werden. Darüber hinaus wurde in den Hepatozyten durch die externe Applikation von LPS eine *in vitro* Endotoxämie hervorgerufen. In den vorliegenden Ergebnissen zeigte sich eine Abnahme der Funktion der mitochondrialen Atmungskette, welche mit zunehmender Dauer der Endotoxämie zunahm. Eine LPS-induzierte Endotoxämie führt unter anderem zu einer hepatozellulären Dysfunktion [70]. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die Kapazität der Hepatozyten $H_2S$ zu metabolisieren durch die Endotoxämie stark beeinträchtigt wurde. Die Studie von Norris et al. zeigte, dass der $H_2S$-Metabolismus in Hepatozyten in der Frühphase erhalten blieb. Mit zunehmender hepatozellulärer Dysfunktion nahm die Fähigkeit des $H_2S$-Metabolismus jedoch ab, da die Oxidation von $H_2S$ selbst den noch verfügbaren Sauerstoff verbrauchte [97]. Dadurch steigen die effektiven $H_2S$-Konzentrationen über die Zeit an und die Aktivität der Atmungskette fällt weiter ab.

Die 24-stündige Applikation von AP39 reduzierte unter gleichzeitiger LPS-Stimulation den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch aller Komplexe im Vergleich zu der zugehörigen DMSO-Kontrollgruppe. Von diesem ausgeprägten Abfall war die Aktivität von Komplex IV jedoch ausgenommen. Im gekoppelten Zustand manifestierte sich eine leichte Reduktion, während im entkoppelten Zustand keine Veränderung gemessen werden konnte. Vermutlich spielt die Erhöhung des Proteins Hepcidin eine wichtige Rolle und kann die gezeigten Effekte erklären. Durch die Hepcidin-vermittelte Konservierung der Aktivität von Komplex IV hatte AP39 keinen weiteren Effekt auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch.

Die mitochondriale respiratorische Reservekapazität zeigte durch AP39 nach zweistündiger und 24-stündiger Stimulation mit LPS keine Veränderungen. Um einen LPS-induzierten Inflammationsprozess kompensieren zu können, können Zellen ihre metabolische Reservekapazität ausnutzen [105]. Durch die Biogenese neuer Mitochondrien können Zellen gegen Zellstress resistenter gemacht werden [11]. Durch die alleinige Applikation von LPS kam es bereits zu einer ausgeprägten Reduktion der Reservekapazität, die wie bereits vermutet auf einen Untergang von Mitochondrien zurückzuführen ist. Die zusätzliche Applikation von AP39 konnte diesen irreversiblen Effekt von LPS weder positiv noch negativ beeinflussen.

Die Cytochrom c-Control-Ratio konnte unter LPS-Stimulation durch den Einsatz von AP39 reduziert werden. Nach zweistündiger Stimulation sank die Ratio der AP39 + LPS-Gruppe (2,0) im Vergleich zu der DMSO + LPS-Gruppe (2,6). Ein ähnliches Bild zeigte sich nach den 24-stündigen Experimenten. Dort kam es zu einem Abfall der Ratio von ursprünglich 4,3 in der DMSO + LPS-Gruppe auf 3,6 in der AP39 + LPS-Gruppe. Eine hohe Cytochrom c-Control-Ratio gibt Hinweise auf eine Barrierestörung der äußeren Mitochondrienmembran [42]. Dies lässt vermuten, dass AP39 unter LPS-Stimulation die mitochondriale Integrität der äußeren Membran erhöhen konnte. Eine niedrige Integrität wiederum resultiert in hohen Cytochrom c-Konzentrationen im Zytosol und führt letztendlich zu Apoptosen [71]. Obwohl die Ergebnisse des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs proapoptotische Effekte von AP39 unter LPS-Stimulation nahelegen, zeigte sich eine Reduktion der Cytochrom c-Control-Ratio. Es ist festzuhalten, dass neben der Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium noch weitere Faktoren die Apoptose der Hepatozyten begünstigten.

Abschließend kann dargelegt werden, dass AP39 nach zwei Stunden unter LPS-Stimulation keine Auswirkungen auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch im Vergleich zur zugehörigen DMSO-Kontrollgruppe hatte. Verlängerte sich die Inkubationszeit von AP39 auf 24 Stunden resultierte eine Reduktion der Aktivität der Komplexe I + II, der LEAK-Atmung sowie der ETS-Aktivität. Bei der Bestimmung der mitochondrialen respiratorischen Reservekapazität hatte die Applikation von AP39, bei gleichzeitigem Vorhandsein eines LPS-induzierten Zellstresses, keinen eindeutigen Effekt im Vergleich zur DMSO-Bedingung. Darüber hinaus konnte im LPS-Setting eine Applikation von AP39 unabhängig von der Inkubationsdauer die Cytochrom c-Control-Ratio erniedrigen.

### 4.4 Effekte von AP39 und LPS auf die mitochondriale $H_2O_2$-Produktion

Aerobe Organismen nutzen molekularen Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor, um die Energieversorgung zu ermöglichen. Ungefähr 95 % des Sauerstoffs werden auf diesem Weg zu ATP, $H_2O$ und $CO_2$ reduziert. Das Risiko der Produktion toxischer Zwischenprodukte ist bei dieser Energiegewinnung jedoch groß, denn die verbleibenden 5 % Sauerstoff werden einwertig reduziert und bilden freie Sauerstoffradikale [6]. Diese reaktiven Sauerstoffspezies entstehen durch die sequentielle Reduktion von molekularem Sauerstoff durch jeweils ein Elektron [101]. Zu Beginn reduziert die NADPH-Oxidase das $O_2$, durch die Aufnahme von einem Elektron von NADPH, zu $O_2^-$. Die SOD katalysiert anschließend die Reaktion von $O_2^-$ zu $O_2$ und $H_2O_2$. Die Katalase oder das Glutathionsystem vermitteln schlussendlich die Reaktion von $H_2O_2$ zu $O_2$ und $H_2O$ [6,101]. Insbesondere an Leckagen der Atmungskette können aus $O_2$ ROS entstehen. Das betrifft vor allem den Komplex I sowie den Komplex III. An Komplex I werden die gebildeten Radikale in die mitochondriale Matrix freigesetzt, während sie am Komplex III sowohl in die Matrix als auch in den Intermembranraum gelangen [83]. Da ROS unter anderem als Second-Messenger und als Teil der angeborenen Immunabwehr agieren können, besteht unter physiologischen Bedingungen eine Homöostase zwischen zellulärem ROS und Antioxidantien. Übersteigt die mitochondriale ROS-Produktion die antioxidativen Kapazitäten, entsteht oxidativer Stress [83]. Beginnender oxidativer Stress führt zu Zellfunktionsstörungen, da die Radikale hochreaktiv und für Membranen permeabel sind. Steigt der oxidative Stress weiter an, resultiert der Zelltod [82]. Darüber hinaus ist die ROS-Produktion von weiteren Faktoren wie dem mitochondrialen Membranpotential, dem Stoffwechselzustand der Mitochondrien sowie dem Sauerstoffspiegel abhängig. Eine Abweichung des optimalen mitochondrialen Membranpotentials ist mit einer erhöhten ROS-Produktion verbunden. Zum einen führt eine Erhöhung des Membranpotentials zu einer Verlangsamung des Elektronenflusses, wodurch die Elektronen eher auf Sauerstoff übertragen werden können. Zum anderen führt eine Entkopplung des ETS, welche das Membranpotential auflöst, durch einen Mangel des antioxidativen NADPH zu erhöhten ROS-Spiegeln Ein leichter Anstieg der intramitochondrialen $Ca^{2+}$-Konzentration verringert die Geschwindigkeit des ETS und schränkt auf diesem Weg die ROS-Produktion ein. Demgegenüber steht jedoch die Wirkung einer hohen $Ca^{2+}$-Konzentration, welche wiederum die ROS-Produktion erhöhen.

Zudem hängt die ROS-Bildung von der Sauerstoffkonzentration der Zelle ab. Während mit zunehmenden Sauerstoffkonzentrationen die Geschwindigkeit der ROS-Produktion linear ansteigt, haben hypoxische Stoffwechselzustände über einen erniedrigten Elektronenfluss ebenfalls hohe ROS-Konzentrationen zur Folge [83].

Die Applikation des $H_2S$-Donors AP39 und LPS nehmen, wie bereits beschrieben, Einfluss auf den Metabolismus der Hepatozyten. Dabei kommt es unter anderem zu Änderungen des mitochondrialen Membranpotentials, des Stoffwechselzustands und der Sauerstoffspiegel. Im Folgenden sollen die erwarteten Ergebnisse mit den gemessenen Werten verglichen und diskutiert werden.

### 4.4.1 Effekte von AP39 auf die mitochondriale $H_2O_2$-Produktion von Hepatozyten

Im niedrigen Konzentrationsbereich können durch $H_2S$ Elektronen über die SOU-Einheit an das Coenzym Q der Atmungskette übertragen werden [16,51]. Aufgrund des gesteigerten Elektronenflusses entlang des ETS kommt es zu einer Erhöhung des Membranpotentials. Es ist bekannt, dass eine Aktivierung der Atmungskette in einer erhöhten ROS-Produktion mündet, da stets ein kleiner Anteil des Sauerstoffverbrauchs zu Radikalen reduziert wird [6]. Darüber hinaus können die Elektronen, welche aufgrund des hohen Membranpotentials nur noch verlangsamt fließen können, vermehrt mit Sauerstoff reagieren und ebenfalls zu höheren ROS-Konzentrationen führen [83]. In den vorliegenden Ergebnissen zeigte sich jedoch überwiegend eine Reduktion der $H_2O_2$-Konzentrationen im Vergleich zu der DMSO-Kontrollgruppe durch die zweistündige AP39-Stimulation (**Abbildung 12**). Dieser Effekt war insbesondere im entkoppelten Zustand der Atmungskette in Komplex I und in den Komplexen I + II zu sehen. Der Anteil an Sauerstoff, welcher in die ROS-Produktion fließt, blieb dabei unverändert (**Abbildung 13**). Für die Erklärung dieser gemessenen Ergebnisse kann zum einen die Lokalisation der SOU verantwortlich sein. Sie befindet sich auf Höhe des Komplexes II und speist Elektronen in das ETS auf Höhe des nachgeschalteten Komplexes III ein [16,51]. Dadurch fließen die zusätzlichen Elektronen nicht über die Komplexe I + II und stehen diesen dementsprechend nicht zur Verfügung, um Radikale bilden zu können. Zusätzlich kann eine Verschiebung der Homöostase zugunsten der Antioxidantien für die erniedrigten $H_2O_2$-Konzentrationen verantwortlich sein. Wie bereits beschrieben, kann $H_2S$ antioxidative Effekte in Mitochondrien ausüben und ROS-induzierten

Zellstress senken [5,92]. Insbesondere die Bildung und Reduktion des antioxidativen Glutathions fördert den Abbau von $H_2O_2$ und schützt die Mitochondrien vor freien Radikalen [5,6,92,101]. Darüber hinaus kann $H_2S$ die Aufnahme von Glutamat erhöhen, welches essentiell für die weitere Glutathionsynthese ist [84]. Außerdem konnte in einer *in vitro* Studie gezeigt werden, dass die Applikation von $H_2S$ bei oxidativem Stress zu einer Erhöhung der Aktivität der SOD führte [125]. Die SOD katalysiert die Reaktion von Superoxid-Anionen zu $H_2O_2$ und stellt damit den Beginn des ROS-Abbaus dar.

Ein effektiver Anstieg der intrazellulären Konzentration von $H_2S$ verändert die Wirkung auf die mitochondriale Atmungskette. Ursächlich dafür ist der hemmende Effekt von $H_2S$ auf die COX [10,26,51]. Durch den Ausfall des Komplexes kommt es zu einem Rückstau der Elektronen mit nachfolgender Steigerung des Membranpotentials. Die resultierenden freien Elektronen können zunehmend einwertig zu freien Radikalen reduziert werden [6,83]. Dennoch zeigte sich in der 24-stündigen Stimulation mit AP39 eine signifikante Reduktion der $H_2O_2$-Produktion in der LEAK-Atmung im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe. Eine nicht signifikante Reduktion konnte bei der ETS-Aktivität und in der Aktivität der Komplexe I + II nachgewiesen werden (**Abbildung 14**). Der Quotient aus $H_2O_2$-Produktion und mitochondrialem Sauerstoffverbrauch war im entkoppelten Zustand in den Komplexen I + II reduziert, ansonsten überwiegend unverändert (**Abbildung 15**). Die Inhibition der ATP-Synthase durch Oligomycin induzierte einen nicht-phosphorylierenden Zustand der Atmungskette, die LEAK-Atmung. Diese Atmung entsteht durch den Versuch Protonenverluste über die IMM bei hohem Membranpotential zu kompensieren [35,43,104]. Dabei wäre zu erwarten gewesen, dass durch die Steigerung des Membranpotentials die ROS-Produktion ebenfalls mitsteigt. Zum einen können nach 24 Stunden die Erhöhung antioxidativer Effekte, wie bereits bei der zweistündigen Stimulation beschrieben, eine entscheidende Rolle bei der Senkung der ROS-Konzentrationen spielen. Dazu passend kam es im entkoppelten Zustand zu einer stärkeren Abnahme der $H_2O_2$-Produktion im Vergleich zum mitochondrialen Sauerstoffverbrauch, was zu einer Reduktion des Quotienten geführt hat. Zum anderen führt die LEAK-Atmung zu Veränderungen der Aufnahme und Abgabe von Kationen wie $Ca^{2+}$ [35,43,104]. Eine vermehrte Aufnahme von $Ca^{2+}$-Kationen verringert wiederum die ROS-Produktion [83]. Daher kann angenommen werden, dass erhöhte intramitochondriale

$Ca^{2+}$-Konzentrationen und die induzierten antioxidativen Effekte von $H_2S$ zu diesem Ergebnis geführt haben.

### 4.4.2 Effekte von LPS auf die mitochondriale $H_2O_2$-Produktion von Hepatozyten

LPS gilt als einer der stärksten Stimuli für den Organismus und verursacht bei seiner Freisetzung einen akuten Inflammationsprozess [116]. Dabei kommt es unter anderem zu einer Stimulation des Toll-like-Rezeptors 4, welcher auf der Zelloberfläche von Hepatozyten exprimiert wird. Diese Interaktion aktiviert nachgeschaltete Signalkaskaden, unter anderem die Erhöhung von TNF-α, und führt zu einer LPS-induzierten ROS-Produktion der Zelle [118]. In den zweistündigen beziehungsweise 24-stündigen Experimenten resultierten aus den LPS-Applikationen verglichen mit der dazugehörigen DMSO-Kontrollgruppe keine signifikanten Veränderungen der absoluten $H_2O_2$-Produktion sowie des Quotienten (**Abbildung 12**, **Abbildung 13**, **Abbildung 14**, **Abbildung 15**). Um diese Ergebnisse am ehesten erklären zu können, muss ein genauerer Blick auf die Aktivität der SOD geworfen werden. Durch die Verabreichung von LPS ist es möglich die Aktivität der SOD in der Leber um mehr als die Hälfe zu senken [64]. Da die SOD die Reaktion von $O_2^-$ zu $H_2O_2$ und $O_2$ katalysiert, könnte eine Reduktion der Enzymaktivität die gemessenen $H_2O_2$-Konzentrationen erklären. Folglich kommt es zu steigenden $O_2^-$Konzentrationen, welche deutlich reaktiver als $H_2O_2$ sind und dadurch höheren oxidativen Schaden verursachen können [6]. In den vorherigen Messungen konnte durch die alleinige Applikation von LPS eine Reduktion des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs nachgewiesen werden. Die Reduktion der $H_2O_2$-Konzentrationen und der reduzierte mitochondriale Sauerstoffverbrauch im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe führte zu einem gleichbleibenden Quotienten.

### 4.4.3 Effekte von AP39 auf die mitochondriale $H_2O_2$-Produktion von Hepatozyten unter LPS-Stimulation

Mehrere Effekte von AP39 und LPS, welche bereits erwähnt wurden, bewirken eine Erhöhung der ROS-Produktion. Auf der einen Seite kommt es durch die LPS-Applikation über die Stimulation des Toll-like-Rezeptors 4 zu erhöhten ROS-Spiegeln [118]. Niedrige Konzentrationen von $H_2S$ führen zu einer Aktvierung der SOU, während hohe Konzentrationen eine Hemmung von Komplex IV induzieren [10,16,26,51]. Beides hat wiederum eine steigende Konzentration an

Sauerstoffradikalen zur Folge. Eine LPS-induzierte Endotoxämie führt unter anderem zu einer hepatozellulären Dysfunktion und reduziert die Kapazität der Hepatozyten $H_2S$ zu metabolisieren [70,97]. Dadurch steigt die effektive $H_2S$-Konzentration an und führt zu einer stärkeren Inhibition von Komplex IV mit konsekutiver Radikalbildung. Auf der anderen Seite steht jedoch die Induktion antioxidativer Mechanismen, insbesondere der Glutathionkaskade, durch AP39 im Vordergrund [5,92]. In den durchgeführten Experimenten zeigte sich nach 24-stündiger Stimulation mit AP39 nach vorheriger LPS-Stimulation ein Anstieg des Quotienten aus $H_2O_2$-Produktion und mitochondrialem Sauerstoffverbrauch im Vergleich zur DMSO + LPS-Kontrollgruppe in allen gemessenen Aktivitäten (**Abbildung 15**). In den absoluten $H_2O_2$-Konzentrationen war keine klare Differenz ersichtlich (**Abbildung 14**). Der Anstieg des Anteils an Sauerstoff, welcher in die ROS-Produktion fließt, konnte durch eine Erhöhung der $H_2O_2$-Produktion oder einer Erniedrigung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs im Vergleich zur Kontrollgruppe entstanden sein. Am wahrscheinlichsten ist, dass die Erhöhung des Quotienten aufgrund einer Reduktion des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs bei gleichbleibender $H_2O_2$-Produktion entstanden ist. Dafür würden zum einen die absolut gemessenen $H_2O_2$-Konzentrationen sprechen, welche im Vergleich zur DMSO + LPS-Kontrollgruppe keinen Anstieg oder Abfall zeigten. Zum anderen war der mitochondriale Sauerstoffverbrauch nach 24-stündiger Stimulation im Vergleich zu der Kontrollgruppe noch weiter vermindert.

Zusammenfassend konnte durch die AP39-Stimulation eine Tendenz zur Reduktion der $H_2O_2$-Produktion im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe gezeigt werden. Lediglich in der gemessenen Aktivität der LEAK-Atmung nach 24 Stunden war dieser Abfall signifikant. Der Anteil des Sauerstoffs, der in die ROS-Produktion fließt, blieb dabei jedoch unverändert. Durch eine zusätzliche LPS-Applikation stellte sich weder eine Veränderung der $H_2O_2$-Produktion noch des dazugehörigen Quotienten heraus. Darüber hinaus konnte im LPS-Setting die 24-stündige Applikation mit AP39 den Quotienten aus $H_2O_2$-Produktion und mitochondrialem Sauerstoffverbrauch erhöhen. Ursächlich dafür war vermutlich die Erniedrigung des Sauerstoffverbrauchs.

## 4.5 Effekte von AP39 auf die Proteinexpression

Im Folgenden soll auf die Auswirkung von AP39 auf die Expression der Proteine COX4, COX5A, COX5B, MTCO-1, CBS, CSE, 3-MST, Bax, Bcl-2, PGC-1α eingegangen werden.

### 4.5.1 COX4, COX5A, COX5B und MTCO-1

Die COX, der vierte Hauptkomplex der Atmungskette, überspannt die IMM und katalysiert den Elektronentransfer von reduziertem Cytochrom c zu molekularem Sauerstoff. Das Enzym besteht aus den 13 Untereinheiten COX1 – COX13, wovon die ersten drei die Kernuntereinheiten bilden und in mitochondrialer DNS kodiert sind. Die COX1 und COX2 katalysieren die Elektronen- und Protonen-transferreaktionen, während die COX3 innerhalb der IMM einen Kanal bildet, um das aktive Zentrum mit Substraten zu versorgen. Die restlichen Untereinheiten sind in nukleärer DNS kodiert und spielen überwiegend eine Rolle bei dem Aufbau, der Stabilität sowie der Regulierung der COX [109]. Die COX4 ist die größte nukleär-kodierte Untereinheit und besteht aus den beiden Untereinheiten 1 und 2. Die Untereinheit 1 kann ATP oder ADP abhängig vom ATP / ADP-Verhältnis binden. Bei hohen ATP-Konzentrationen kann die Untereinheit die COX-Aktivität inhibieren. Eine Ausschaltung der COX4 führt wiederum zu einer verminderten Aktivität der COX und resultiert in einem niedrigen ATP-Gehalt der Zelle. Die Untereinheit 2 besitzt ein Hypoxie-sensitives Element, welches die Transkription des Proteins bei vorherrschender Hypoxie erhöht. Die COX5 besteht aus den beiden Untereinheiten 5A und 5B, welche sich beide an der Matrixseite der COX befinden [59]. Während die COX5A bevorzugt unter physiologischen Sauerstoff-konzentrationen exprimiert wird, erhöht sich die Expression der COX5B bei Hypoxie [119]. Dies ermöglicht eine weitestgehend sauerstoffabhängige Kontrolle der COX-Aktivität. Ein Ausschalten der Untereinheit 5B resultiert jedoch in einem Verlust der Gesamtaktivität der COX, einem Verlust des Membranpotentials sowie einer erhöhten ROS-Produktion [59]. Die COX besteht neben ihren Untereinheiten zusätzlich aus zwei Häm-Gruppen, den beiden Cytochromen a und a3 sowie aus zwei weiteren Kupfer-(Cu-)-Zentren [127]. Die COX1 beinhaltet dabei das Häm-a sowie das Häm-a3 / CuB-Zentrum, in dem die eigentliche Sauerstoffreduktion stattfindet [59]. Es ist beschrieben, dass Sulfid an die aktive Seite des zentralen Eisenatoms der Häme bindet und dadurch mit dem Sauerstoff um die Bindungsstelle konkurriert [127]. Das Eisenatom des Häm- a3 / CuB-Zentrums

befindet sich dabei eingebettet in der IMM. Der $H_2S$-Donor AP39 bewirkt über seine $TPP^+$-Domäne eine gezielte Freisetzung und Akkumulation von $H_2S$ innerhalb der Mitochondrienmatrix [3,130]. Aus diesem Grund wäre es denkbar, dass sich das aus AP39 freigesetzte $H_2S$ insbesondere an den Untereinheiten der COX auswirkt, welche in ihrem Aufbau eine Komponente innerhalb der Mitochondrienmatrix besitzen.

In den vorliegenden Western Blot Ergebnissen wurden durch den Einsatz spezifischer Antikörper die Isoformen 1 und 2 der COX4, COX5A, COX5B sowie MTCO-1, ein Gen das für die Untereinheit COX1 kodiert, detektiert. Es zeigten sich nach zweistündiger und 24-stündiger Stimulation in der Proteinexpression von COX4, COX5A und MTCO-1 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (**Abbildung 16, Abbildung 17, Abbildung 19**).

Nach zweistündiger Stimulation der Hepatozyten mit AP39 zeigte sich ein signifikanter Anstieg der matrixlokalisierten COX5B im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe (**Abbildung 18**). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Stimulation mit AP39 nach zwei Stunden zu hypoxischen Verhältnissen der Hepatozyten im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe geführt hat. Da die Expression von COX4, COX5A und MTCO-1 nicht verändert war, hat AP39 vermutlich keinen direkten strukturellen Einfluss auf die Proteine der COX. Demnach war die COX5B bei Hypoxie reaktiv erhöht. Es ist darüber hinaus ein zweiter Weg der inhibitorischen Wirkung von $H_2S$ beschrieben. Cystein, das Ausgangssubstrat der $H_2S$-Synthese, kann als Radikal oder als Cu-Cystein-Komplex direkt mit molekularem Sauerstoff reagieren und auf diesem Wege hypoxische Stoffwechselzustände induzieren [127]. Über diesen Mechanismus könnte das $H_2S$ zu einem hypoxischen Stoffwechselzustand der Zelle geführt haben, ohne in direkter Interaktion mit den jeweiligen Untereinheiten der COX gestanden zu haben.

### 4.5.2 CBS, CSE und 3-MST

$H_2S$ wird endogen durch die Enzyme CBS, CSE und 3-MST gebildet [127]. Während die 3-MST für den Großteil der mitochondrialen $H_2S$-Produktion verantwortlich ist, können die überwiegend im Zytosol lokalisierten CBS und CSE bei Zelldysfunktionen in das Mitochondrium translozieren und ebenfalls zur $H_2S$-Synthese beitragen [29,114]. Die beiden dominierenden Enzyme der hepatischen $H_2S$-Synthese bilden die Enzyme CBS und CSE [122]. Die 3-MST spielt in der Leber

lediglich eine untergeordnete Rolle und kommt überwiegend im Gehirn und im Gefäßsystem vor [114,115].

Eine Stimulation der Hepatozyten mit AP39 konnte im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe zu einer angedeuteten Reduktion der Proteinexpression von CBS und CSE führen (**Abbildung 20, Abbildung 21**). Zum einen wurde nach 24 Stunden eine verminderte Expression von CBS sichtbar, zum anderen zeigte sich nach zwei Stunden ein Rückgang der Expression von CSE. Diese Ergebnisse stützen den Mechanismus der negativen Rückkopplung. Durch die Applikation von AP39 wurde eine intrazelluläre $H_2S$-Freisetzung induziert, welche wiederum die endogene Synthese von weiterem $H_2S$ heruntergefahren hat. Wie bereits erwähnt sind die beiden Enzyme CBS und CSE insbesondere im Zytosol lokalisiert [29]. $H_2S$ ist stark lipophil und in der Lage Zellmembranen leicht zu durchdringen [127]. Daher lässt sich vermuten, dass das freigesetzte mitochondriale $H_2S$ auch im Zytosol erhöht war und dort die weitere Synthese reduzieren konnte.

In den Western Blot Ergebnissen der Expression von 3-MST zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen (**Abbildung 22**). Dies lässt sowohl auf die untergeordnete Rolle der 3-MST in der hepatischen $H_2S$-Synthese, als auch auf die spezifische Gewebeabhängigkeit der Enzyme CBS, CSE und 3-MST schließen.

### 4.5.3 Bax, Bcl-2 und PGC-1α

In multizellulären Organismen spielt die genetisch kontrollierte Apoptose eine unverzichtbare Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase [69]. Der extrinsische Weg der Apoptose wird über die Wechselwirkungen von Todesliganden, wie beispielsweise TNF-α, mit ihren Rezeptoren vermittelt. Diese Wechselwirkungen initiieren die Aktvierung der Caspase 8, welche weitere Caspasen aktiviert oder direkt zur Apoptose führt. Der intrinsische Apoptoseweg wird durch DNS-Schäden hervorgerufen, welche die Aktivierung des proapoptotischen Bax begünstigen. Als Reaktion kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Cytochrom c, welches wiederum über die Aktivierung von Caspasen die Apoptose verursacht [68]. Die beiden Proteine Bax und Bcl-2 gehören zur Familie der Bcl-2-Proteine [56]. Die Apoptose-regulierenden Gene der Bcl-2 Familie haben, trotz ihres ähnlichen strukturellen Aufbaus, grundsätzlich entweder Apoptose-induzierende oder Apoptose-inhibierende Eigenschaften [56]. Das Protein Bax vermittelt proapoptotische Effekte und führt bei übermäßiger Produktion

zu einem programmierten Zelltod [137]. Das Protein Bcl-2 hingegen ist ein antiapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie. Eine gesteigerte Expression von Bcl-2 hemmt die Apoptose und führt zu einer gesteigerten Resistenz der Zelle gegenüber schädlichen Einflüssen [56]. Dabei bestimmt unter anderem das Verhältnis von Agonisten beziehungsweise Antagonisten der Bcl-2 Familie die Anfälligkeit der Zelle für den Eintritt der Zelle in die Apoptose. Jedoch können sowohl das Protein Bax, als auch Bcl-2, ihre Funktion unabhängig von der Interaktion mit dem anderen Protein vermitteln [69].

PGC-1α ist ein Cofaktor von Transkriptionsfaktoren vieler verschiedener Gene, welche unter anderem an der Regulation der adaptiven Thermogenese, dem Glukose- und Fettsäurestoffwechsel sowie der mitochondrialen Biogenese beteiligt sind. Als Transkriptionskoaktivator erhöht PGC-1α die Wahrscheinlichkeit der Transkription eines interagierenden Gens, ohne dabei direkte Wechselwirkungen mit der entsprechenden DNS zu haben. Eine Erhöhung des PGC-1α führt über eine Aktivierung der Kaskade nuklearer Atmungsfaktoren zu einer erhöhten Expression von Untereinheiten der ATP-Synthase, von Cytochrom c sowie der COX [78]. Darüber hinaus ist PGC-1α ein Signalmolekül des ROS-Metabolismus, welches ein Gleichgewicht zwischen aktuellen Stoffwechselanforderungen und Zellschutz herstellt. Bei erhöhtem oxidativen Stress erfordert die Induktion ROS-abfangender Enzyme eine Hochregulierung von PGC-1α [123].

In den durchgeführten Western Blots zeigte sich durch die zweistündige Stimulation mit AP39 eine signifikant verminderte Expression des Proteins Bax im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe. Die 24-stündige Stimulation mit AP39 konnte die Expression von Bax leicht reduzieren, bei vorheriger LPS-Stimulation war dieser Effekt in Bezug auf die DMSO + LPS-Kontrollgruppe ebenfalls signifikant (**Abbildung 23**). Die erwartete Hochregulierung des antiapoptotischen Antagonisten Bcl-2 durch AP39 blieb jedoch in den durchgeführten Experimenten aus (**Abbildung 24**). Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Bcl-2- Expression zwischen den AP39- und den jeweils zugehörigen DMSO-Stimulationen. Die 24-stündigen Messungen des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs und der mitochondrialen respiratorischen Reservekapazität stehen jedoch nicht im Einklang mit der Erniedrigung des proapoptotischen Bax. Dies spricht dafür, dass die vermuteten proapoptotischen Effekte von AP39 unter vorheriger LPS-Stimulation unabhängig von Bax vermittelt wurden. Da eine erhöhte Expression von Bax durch DNS-

Schäden hervorgerufen wird, könnten die gemessenen niedrigen Expressionslevel bedeuten, dass die apoptotischen Effekte nicht durch Schäden der DNS verursacht wurden. Eher wäre zu vermuten, dass die synergistischen Effekte von AP39 und LPS über die Aktivierung des extrinsischen Wegs der Apoptose ausgelöst wurden. In den Western Blot Ergebnissen der PGC-1α-Expression stellte sich nach 24-stündiger Stimulation mit AP39 eine nicht signifikante Reduktion im Verhältnis zu der DMSO-Kontrollgruppe dar (**Abbildung 25**). PGC-1α ist an der Transkription von Untereinheiten der ATP-Synthase, des Cytochroms c und der COX beteiligt. Die verminderte Expression nach 24-stündiger AP39-Behandlung steht im Einklang mit dem gemessenen niedrigen mitochondrialen Sauerstoffverbrauch der Hepatozyten.

### 4.6 Limitationen

Die Gabe von Stoffen, wie beispielsweise Substrate und Inhibitoren, und die Messung der daraus resultierenden Aktivitätsveränderungen der mitochondrialen Atmungskette ist eine weit etablierte und präzise Untersuchungsmethode. Ein Vorteil der Respirometrie mittels Oxygraph-2k ist, dass sie Messungen der Atmung bei nur geringen volumenspezifischen Flüssen erlaubt. Dadurch ist es möglich mehrere Titrationen von Substraten bzw. Inhibitoren innerhalb eines Experiments zu untersuchen [75]. Durch eine winklige Anbringung des polarographischen Sauerstoffsensors wird eine Minimierung des Totraums der Probekammern erreicht. Die zusätzliche Verwendung geeigneter Materialien reduziert die durch Diffusion von Sauerstoff entstehenden Artefakte [47]. Diese Faktoren ermöglichten die genaue Messung und Beurteilung kleinster Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen. Ein weiterer Vorteil der Messung war die konstante Kammertemperatur von 37 °C während den Experimenten, welche im gewissen Maße den *in vivo* Zustand widerspiegelte. Dabei wurde versucht die negativen Einflüsse der Temperaturschwankungen zu minimieren. Die vorliegenden Ergebnisse wurden mit immortalisierten Leberzellen der Maus erzielt. Dafür war im Vorhinein die Anzucht der Zellen in einer Zellkultur notwendig. Zellkulturen haben im Vergleich zu *in vivo* Experimenten die Vorteile, dass sie weniger äußeren und inneren Einflüssen unterliegen. Bei den *in vivo* Experimenten können Perfusionsänderungen und Einflüsse durch Hormone zu Abweichungen zwischen den Experimenten führen. Die Verwendung von Zelllinien der Leber ermöglichte die Reproduzierbarkeit der Experimente. Primärkulturen hingegen werden direkt aus

dem Versuchstier gewonnen. Dabei fließen die individuellen Faktoren jedes Versuchstiers in die Experimente mit ein und können die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ebenfalls beeinträchtigen. Jede wissenschaftliche Untersuchungsmethode birgt neben ihren Vorteilen auch Nachteile, welche die Aussagekraft der gemessenen Parameter einschränken können. Bei den in der vorliegenden Studie verabreichten Konzentrationen wurden hohe Mengen an Substrate und Inhibitoren gegeben, sodass es durch einen Substanzmangel per se zu keiner Limitierung der Atmungsaktivität kam. Dies kann natürlich die physiologischen Zustände und Konzentrationen der Zelle nicht imitieren und damit zu einer Einschränkung der Aussagekraft der Ergebnisse führen. Eine weitere Limitation der Methodik war, dass die mitochondriale Atmungsaktivität nur indirekt über die aktuelle Sauerstoffkonzentration gemessen wurde und es keine Möglichkeit der direkten Messung gab. In den Experimenten wurde die Permeabilisierung der Zellen mithilfe von Digitonin vorgenommen. Die Autoren Merlavsky et al. konnten in einer Studie zeigen, dass die Permeabilisierung von Zellmembranen durch Digitonin, unter anderem von der vorliegenden Digitoninkonzentration, der Anzahl der suspendierten Zellen sowie der Art des Gewebes abhängt [89]. Somit ergeben sich einige Variablen, welche die externe Validität der erhobenen Ergebnisse weiter einschränken können. $H_2S$ ist durch seine Lipophilie ein sehr flüchtiges Gas, welches durch eine kurze Verweilzeit in biologischen Experimenten charakterisiert ist [21,138]. Daher konnte nicht sichergestellt werden, in welcher finalen Konzentration $H_2S$ während des Experiments in den Zellen vorhanden war. Jedoch muss bedacht werden, dass die prominentesten Effekte von AP39 in vorherigen Studien bei Konzentrationen zwischen 30 – 1000 nM festgestellt wurden [3,76,130]. Aufgrund dieser vorherigen Veröffentlichungen wäre es denkbar, dass die in dieser Dissertation eingesetzte AP39-Konzentration von 10 nM zu niedrig angesetzt wurde, um die protektiven Effekte des $H_2S$-Donors AP39 im Rahmen eines LPS-induzierten Inflammationsprozesses klar abzugrenzen. Nichtsdestotrotz zeigte eine vorherige Studie, dass die Applikation von 100 nM AP39 zu einer erhöhten Mortalität von Mäusen führte [139]. Dementsprechend wäre auch denkbar, dass eine Erhöhung der eingesetzten Konzentration von 10 nM die zytotoxischen Effekte noch weiter aggraviert hätte. Abschließend muss bei der Betrachtung der hier vorliegenden Ergebnisse berücksichtigt werden, dass sich lediglich Aussagen über die Mitochondrien auf zellulärer Ebene treffen lassen. Inwieweit diese Ergebnisse

auf einen gesamten Organismus angewandt werden können bleibt unklar und bedarf weiteren wissenschaftlichen Studien.

### 4.7 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollten die mitochondrialen Auswirkungen des $H_2S$-Donors AP39 auf primäre Hepatozyten untersucht werden. Des Weiteren stand die Fragestellung nach dem Vorhandensein einer zeitlichen Dynamik der Effekte im Mittelpunkt. Auffällig war insbesondere die zunehmende Inhibition des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs der Hepatozyten mit steigender Stimulationsdauer von AP39. Die langsame und mitochondrial ausgerichtete $H_2S$-Freisetzung durch AP39 resultierte über die Zeit in hohen effektiven $H_2S$-Konzentrationen, welche letztendlich die gemessenen Effekte vermittelten [3,76]. Auf Ebene der Atmungskette kam es zu einer Hemmung der COX und damit zu einer Inhibition der gesamten Atmungskette mit konsekutiver Reduktion des Sauerstoffverbrauchs der Zelle [51,127].

Die nächste Fragestellung dieser Dissertationen untersuchte, ob das eingesetzte AP39 einen potenziellen klinischen Nutzen im Rahmen eines akuten Inflammationsprozesses haben kann. Um einen akuten Inflammationsprozess *in vitro* zu simulieren, wurden LPS-Stimulationen durchgeführt. Die Applikation von LPS verursachte eine Reduktion des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs, welcher in den 24-stündigen Experimenten deutlicher zum Tragen kam als in den zweistündigen Versuchen. Eine LPS-induzierte Inflammation verursacht eine mitochondriale Schwellung, die mit einer erhöhten Permeabilität und einem Verlust des Membranpotentials einhergeht [54]. Eine erhöhte Permeabilität der Mitochondrienmembranen führt zu einer vermehrten Cytochrom c-Freisetzung, welche in den LPS-Bedingungen an der erhöhten Cytochrom c-Control-Ratio zu erkennen war. Die vorliegenden Effekte der LPS-Stimulation waren bei nachfolgender zweistündiger AP39-Stimulation weiterhin vorhanden, nach 24 Stunden sogar verstärkt. In Hepatozyten kann $H_2S$ die Expression von Genen, die mit dem Energiestoffwechsel zusammenhängen, reduzieren und von Genen, welche Apoptose vermitteln, erhöhen [55]. Dieser Aspekt deutet darauf hin, dass die $H_2S$-Exposition die Energiegewinnung beeinträchtigen sowie die LPS-induzierte Apoptose verstärken konnte [55].

Da bei der mitochondrialen Energiegewinnung ein geringer Anteil der freien Elektronen zu toxischen Zwischenprodukten reduziert wird, wurde untersucht ob die

Veränderung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs auch Auswirkungen auf die ROS-Produktion der Zelle hat. Die gemessenen $H_2O_2$-Konzentrationen waren durch die Gabe von AP39 niedriger, als ursprünglich zu erwarten gewesen wäre. Für diesen Effekt kann unter anderem die $H_2S$-induzierte Bildung und Reduktion des antioxidativen Glutathions verantwortlich sein, welches den Abbau von $H_2O_2$ fördert [5,92,101]. Bei dem gleichzeitigen Vorhandensein einer akuten Inflammation konnte die Stimulation mit AP39 weder eine Veränderung der absoluten $H_2O_2$-Produktion noch des dazugehörigen Quotienten aus $H_2O_2$-Produktion und mitochondrialem Sauerstoffverbrauch bewirken.

Zu guter Letzt wurde noch der Fragestellung nachgegangen, ob AP39 die Expression bestimmter Proteine beeinflussen kann. Die Untereinheiten der COX blieben weitestgehend von der AP39-Stimulation unbeeinflusst. Dies spricht dafür, dass die Reduktion des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs nicht durch direkte Interaktion von $H_2S$ mit den jeweiligen Untereinheiten vermittelt wird.

Die Bestimmung der Expression der drei $H_2S$-bildenden Enzyme (CBS, CSE und 3-MST) zeigte, dass AP39 unabhängig von der endogenen $H_2S$-Synthese zu einer Erhöhung der intrazellulären $H_2S$-Konzentrationen führte. Darüber hinaus konnten die Western-Blot-Daten zeigen, dass die durch AP39 und LPS vermittelte Apoptose weitestgehend Bax-unabhängig abläuft.

# 5 Zusammenfassung

Schwefelwasserstoff ($H_2S$) stellt neben Kohlenstoffmonoxid und Stickstoffmonoxid einen der drei wichtigsten Gasotransmitter des menschlichen Körpers dar. Trotz seiner Toxizität wird $H_2S$ endogen synthetisiert und vermittelt als Botenmolekül diverse physiologische Einflüsse. Das gasförmige $H_2S$ kann durch Diffusion und ohne den Einsatz von Transportern das Mitochondrium erreichen und benötigt als Energieträger keinerlei biochemischer Vorbereitung. Aus diesen Gründen ist der Gasotransmitter in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus wissenschaftlicher Arbeiten geraten. Neben den antioxidativen sowie zytoprotektiven Effekten sind insbesondere Interaktionen von $H_2S$ mit der mitochondrialen Atmungskette beschrieben. In einem niedrigen Konzentrationsbereich dient $H_2S$ als zusätzlicher Elektronendonor. Durch das Einspeisen von Elektronen wird der Protonengradient, der zur letztendlichen Adenosintriphosphat-Gewinnung dient, weiter aufgebaut. In höheren Konzentrationen interagiert $H_2S$ mit der Cytochrom-c-Oxidase (COX) der Atmungskette. Durch die reversible Bindung wird die Fähigkeit zur Sauerstoffbindung gehemmt und der Elektronenfluss über die Atmungskette kommt zum Erliegen.

In der vorliegenden Studie wurde zur exogenen $H_2S$-Applikation das synthetische Molekül [(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) Triphenyl Phosphonium Bromid] (AP39) verwendet. AP39 ist ein mitochondrial gerichteter $H_2S$-Donor, welcher durch eine gezielte Freisetzung zu einer Akkumulation von $H_2S$ innerhalb der Mitochondrienmatrix führt. Aus diesem Grund ist es möglich die $H_2S$-Konzentration zielgenauer zu titrieren und die effektive Dosis niedriger zu halten als diejenige von herkömmlichen Donoren. Um die Effekte der AP39-Stimulation (10 nM) zusätzlich im Rahmen eines akuten Inflammationsprozesses zu untersuchen, wurden die verwendeten Zellen mit Lipopolysacchariden (LPS, 1 µg/ml) behandelt. Ziel dieser Arbeit war die Veränderungen des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs, der Wasserstoffperoxid- ($H_2O_2$-) Produktion sowie der Proteinexpression zu untersuchen. Zur Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs wurde eine hochauflösende Respirometrie durchgeführt. Für die simultane Messung der $H_2O_2$-Produktion wurde die Methode mit einer fluorometrischen Messung ergänzt. Die Bestimmung der Änderungen der Proteinexpression erfolgte durch Western Blots. Um die Effekte von AP39 besser

nachvollziehen zu können, erfolgte in allen drei Methoden der Vergleich mit der jeweiligen Dimethylsulfoxid-Kontrollgruppe.

Aus den Ergebnissen können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden. Die Applikation von AP39 verursachte eine zeitabhängige Inhibition des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs. Diese Inhibition wurde im Rahmen eines akuten Inflammationsprozesses noch weiter verstärkt. Ursächlich dafür könnte die Akkumulation des $H_2S$ und die damit verbundene Inhibition der COX mit zunehmender Stimulationsdauer von AP39 sein. Die Durchführung des Cytochrom c-Tests legt die Vermutung nahe, dass die LPS-induzierte Inflammation zu einer mitochondrialen Dysfunktion führte, welche mit einer erhöhten Permeabilität sowie einem Verlust des Membranpotentials einherging. Die gleichzeitige Applikation von $H_2S$ konnte diese Tendenz nicht verhindern. Der erwartete zytoprotektive Effekt von AP39 im Rahmen einer Inflammation konnte nicht gezeigt werden.

Die verwendete AP39-Konzentration sowie das genutzte Zeitfenster von zwei bzw. 24 Stunden waren möglicherweise nicht optimal, um protektive Effekte von AP39 im Rahmen einer akuten Inflammation nachzuweisen. Nichtsdestotrotz ist das klinische Potenzial von $H_2S$ sehr vielversprechend. Der Einsatz wird aktuell aufgrund der unselektiven Applikationsmöglichkeiten und der daraus resultierenden geringen therapeutischen Breite nicht praktiziert. Eine Inhibition des Sauerstoffverbrauchs durch AP39 könnte sich insbesondere im Rahmen einer akuten Inflammation, welche in einer Dysbalance von Sauerstoffangebot und -bedarf mündet, günstig auswirken. Dieser Aspekt könnte den speziell mitochondriengerichteten $H_2S$-Donor AP39 in Zukunft zu einem wichtigen Teil des Therapiekonzepts bei der Behandlung inflammatorischer Krankheitsbilder machen.

# 6 Literaturverzeichnis


1. Abe K, Kimura H: The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. J Neurosci 16: 1066–71 (1996)
2. Adhikari S, Bhatia M: H2S-induced pancreatic acinar cell apoptosis is mediated via JNK and p38 MAP kinase. J Cell Mol Med 12: 1374–83 (2008)
3. Ahmad A, Olah G, Szczesny B, Wood M, Whiteman M, Szabo C: AP39, A Mitochondrially Targeted Hydrogen Sulfide Donor, Exerts Protective Effects in Renal Epithelial Cells Subjected to Oxidative Stress in Vitro and in Acute Renal Injury in Vivo. Shock 45: 88–97 (2016)
4. Ahmad A, Gerö D, Olah G, Szabo C: Effect of endotoxemia in mice genetically deficient in cystathionine-γ-lyase, cystathionine-β-synthase or 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. Int J Mol Med 38: 1683–92 (2016)
5. Ali R, Pal H, Hameed R, Nazir A, Verma S: Controlled release of hydrogen sulfide significantly reduces ROS stress and increases dopamine levels in transgenic C. elegans. Chem Commun (Camb) 55: 10142–45 (2019)
6. Becker L: New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. Cardiovasc Res 61: 461–70 (2004)
7. Behera J, Kelly K, Voor M, Metreveli N, Tyagi S, Tyagi N: Hydrogen Sulfide Promotes Bone Homeostasis by Balancing Inflammatory Cytokine Signaling in CBS-Deficient Mice through an Epigenetic Mechanism. Sci Rep 8: 15226 (2018)
8. Blackstone E, Morrison M, Roth M: H2S induces a suspended animation-like state in mice. Science 308: 518 (2005)
9. Blackstone E, Roth M: Suspended animation-like state protects mice from lethal hypoxia. Shock 27: 370–72 (2007)
10. Bouillaud F, Blachier F: Mitochondria and sulfide: a very old story of poisoning, feeding, and signaling? Antioxid Redox Signal 15: 379–91 (2011)
11. Carré J, Orban J-C, Re L, Felsmann K, Iffert W, Bauer M, Suliman H, Piantadosi C, Mayhew T, Breen P, Stotz M, Singer M: Survival in critical illness is associated with early activation of mitochondrial biogenesis. Am J Respir Crit Care Med 182: 745–51 (2010)
12. Chance B, Williams G: Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. J Biol Chem 217: 409–27 (1955)

13. Chen Y, Jin S, Teng X, Hu Z, Zhang Z, Qiu X, Tian D, Wu Y: Hydrogen Sulfide Attenuates LPS-Induced Acute Kidney Injury by Inhibiting Inflammation and Oxidative Stress. Oxid Med Cell Longev 2018: 6717212 (2018)
14. Cody G, Boctor N, Filley T, Hazen R, Scott J, Sharma A, Yoder H, JR: Primordial carbonylated iron-sulfur compounds and the synthesis of pyruvate. Science 289: 1337–40 (2000)
15. Collin M, Anuar F, Murch O, Bhatia M, Moore P, Thiemermann C: Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia. Br J Pharmacol 146: 498–505 (2005)
16. Collman J, Ghosh S, Dey A, Decréau R: Using a functional enzyme model to understand the chemistry behind hydrogen sulfide induced hibernation. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 22090–95 (2009)
17. Cooper C, Brown G: The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. J Bioenerg Biomembr 40: 533–39 (2008)
18. Couch L, Martin L, Rankin N: Near death episode after exposure to toxic gases from liquid manure. N Z Med J 118: U1414 (2005)
19. Covarrubias A, Lecarpentier E, Lo A, Salahuddin S, Gray K, Karumanchi S, Zsengellér Z: AP39, a Modulator of Mitochondrial Bioenergetics, Reduces Antiangiogenic Response and Oxidative Stress in Hypoxia-Exposed Trophoblasts: Relevance for Preeclampsia Pathogenesis. Am J Pathol 189: 104–14 (2019)
20. Dai J: Novel molecular fossils of bacteria: insights into hydrothermal origin of life. J Theor Biol 310: 249–56 (2012)
21. Deleon E, Stoy G, Olson K: Passive loss of hydrogen sulfide in biological experiments. Anal Biochem 421: 203–07 (2012)
22. Dombkowski R, Russell M, Olson K: Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 286: R678-85 (2004)
23. Elrod J, Calvert J, Morrison J, Doeller J, Kraus D, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C, Kimura H, Chow C-W, Lever D: Hydrogen sulfide

attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 15560–65 (2007)

24. Esechie A, Kiss L, Olah G, Horváth E, Hawkins H, Szabo C, Traber D: Protective effect of hydrogen sulfide in a murine model of acute lung injury induced by combined burn and smoke inhalation. Clin Sci (Lond) 115: 91–97 (2008)
25. Estabrook RW: Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. Methods Enzymol 10: 41–47 (1967)
26. Evans C: The toxicity of hydrogen sulphide and other sulphides. Q J Exp Physiol Cogn Med Sci 52: 231–48 (1967)
27. Faller S, Hausler F, Goeft A, Itter M-N von, Gyllenram V, Hoetzel A, Spassov S: Hydrogen sulfide limits neutrophil transmigration, inflammation, and oxidative burst in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. Sci Rep 8: 14676 (2018)
28. Fan H-N, Wang H-J, Ren L, Ren B, Dan C-R, Li Y-F, Hou L-Z, Deng Y: Decreased expression of p38 MAPK mediates protective effects of hydrogen sulfide on hepatic fibrosis. Eur Rev Med Pharmacol Sci 17: 644–52 (2013)
29. Fu M, Zhang W, Wu L, Yang G, Li H, Wang R: Hydrogen sulfide (H2S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 2943–48 (2012)
30. Gaill F: Aspects of life development at deep sea hydrothermal vents. FASEB J 7: 558–65 (1993)
31. George L, Ramasamy T, Sirajudeen K, Manickam V: LPS-induced Apoptosis is Partially Mediated by Hydrogen Sulphide in RAW 264.7 Murine Macrophages. Immunol Invest 48: 451–65 (2019)
32. Gerő D, Torregrossa R, Perry A, Waters A, Le-Trionnaire S, Whatmore J, Wood M, Whiteman M: The novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide (H(2)S) donors AP123 and AP39 protect against hyperglycemic injury in microvascular endothelial cells in vitro. Pharmacol Res 113: 186–98 (2016)
33. Gibson G, Cummings J, Macfarlane G: Competition for hydrogen between sulphate-reducing bacteria and methanogenic bacteria from the human large intestine. J Appl Bacteriol 65: 241–47 (1988)
34. Giles G, Tasker K, Jacob C: Hypothesis: the role of reactive sulfur species in oxidative stress. Free Radic Biol Med 31: 1279–83 (2001)

35. Gnaiger E: Polarographic Oxygen Sensors, the Oxygraph, and High-Resolution Respirometry to Assess. In: Dykens J, Will Y (Hrsgs) Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction, 1. Aufl, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, S. 325-352 (2008)
36. Gnaiger E: Oxygen Solubility in Experimental Media. Mitochondr Physiol Network: 1–13 (2011)
37. Gnaiger E: Mitochondrial Pathways and Respiratory Control. Mitochondr Physiol Network: 19–31 (2014)
38. Gnaiger E: Mitochondrial pathways to Complex I. In: Gnaiger E (Hrsg) Mitochondrial Pathways and Respiratory Control, 4. Aufl, OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck, Austria, S. 32-38 (2014)
39. Gnaiger E: Mitochondrial pathways to Complexes I & II. In: Gnaiger E (Hrsg) Mitochondrial Pathways and Respiratory Control, 4. Aufl, OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck, Austria, S. 43-57 (2014)
40. Gnaiger E: Mitochondrial pathways to Complexes II. In: Gnaiger E (Hrsg) Mitochondrial Pathways and Respiratory Control, 4. Aufl, OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck, Austria, S. 39-42 (2014)
41. Gnaiger E: Normalization of flux - past the RCR. In: Gnaiger E (Hrsg) Mitochondrial Pathways and Respiratory Control, 4. Aufl, OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck, Austria, S. 58-63 (2014)
42. Gnaiger E: Real-time OXPHOS analysis. In: Gnaiger E (Hrsg) Mitochondrial Pathways and Respiratory Control, 4. Aufl, OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck, Austria, S. 7-18 (2014)
43. Gnaiger E: Respiratory states. In: Gnaiger E (Hrsg) Mitochondrial Pathways and Respiratory Control, 4. Aufl, OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck, Austria, S. 19-31 (2014)
44. Gnaiger E, Kuznetsov A, Lassnig B, Fuchs A, Reck M, Renner K, Stadlmann S, Rieger G, Margreiter R: High-resolution respirometry. Optimum permeabilization of the cell membrane by digitonin. BioThermoKinetics in the Post Genomic Era 18: 43–512 (1998)
45. Gnaiger E, Lassnig B, Kuznetsov A, Rieger G, Margreiter R: Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. J Exp Biol 201: 1129–39 (1998)

46. Gnaiger E: Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. Respir Physiol 128: 277–97 (2001)
47. Gnaiger E: The Oxygraph for High-Resolution Respirometry. Oroboros Bioenergetics News 6.1: 1–20 (2001)
48. Gnaiger E, Gradl P: Oxygraph-2k: Paradigm Shift and Features of High-Resolution Respirometry. Mitochondr Physiol Network: 1–8 (2011)
49. Gnaiger E: O2k-calibration by DatLab. Mitochondr Physiol Network 19.18: 1–12 (2016)
50. Gordillo M, Evans T, Gouon-Evans V: Orchestrating liver development. Development 142: 2094–108 (2015)
51. Goubern M, Andriamihaja M, Nübel T, Blachier F, Bouillaud F: Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. FASEB J 21: 1699–706 (2007)
52. Grivennikova V, Kareyeva A, Vinogradov A: Oxygen-dependence of mitochondrial ROS production as detected by Amplex Red assay. Redox Biol 17: 192–99 (2018)
53. Groeger M, Matallo J, McCook O, Wagner F, Wachter U, Bastian O, Gierer S, Reich V, Stahl B, Huber-Lang M, Szabo C, Georgieff M, Radermacher P, Calzia E, Wagner K: Temperature and cell-type dependency of sulfide effects on mitochondrial respiration. Shock 38: 367–74 (2012)
54. Gu J, Luo L, Wang Q, Yan S, Lin J, Li D, Cao B, Mei H, Ying B, Bin L, Smith F, Jin S-W: Maresin 1 attenuates mitochondrial dysfunction through the ALX/cAMP/ROS pathway in the cecal ligation and puncture mouse model and sepsis patients. Lab Invest 98: 715–33 (2018)
55. Guo J, Xing H, Chen M, Wang W, Zhang H, Xu S: H(2)S inhalation-induced energy metabolism disturbance is involved in LPS mediated hepatocyte apoptosis through mitochondrial pathway. Sci Total Environ 663: 380–86 (2019)
56. Guo X-Z, Shao X-D, Liu M-P, Xu J-H, Ren L-N, Zhao J-J, Li H-Y, Di Wang: Effect of bax, bcl-2 and bcl-xL on regulating apoptosis in tissues of normal liver and hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol 8: 1059–62 (2002)
57. Hill B, Woon T, Nicholls P, Peterson J, Greenwood C, Thomson A: Interactions of sulphide and other ligands with cytochrome c oxidase. An electron-paramagnetic-resonance study. Biochem J 224: 591–600 (1984)

58. Ikeda K, Marutani E, Hirai S, Wood M, Whiteman M, Ichinose F: Mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor AP39 improves neurological outcomes after cardiac arrest in mice. Nitric Oxide 49: 90–96 (2015)
59. Kadenbach B, Hüttemann M: The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase. Mitochondrion 24: 64–76 (2015)
60. Kanamori Y, Sugiyama M, Hashimoto O, Murakami M, Matsui T, Funaba M: Regulation of hepcidin expression by inflammation-induced activin B. Sci Rep 6: 38702 (2016)
61. Kato S, Takano Y, Kakegawa T, Oba H, Inoue K, Kobayashi C, Utsumi M, Marumo K, Kobayashi K, Ito Y, Ishibashi J, Yamagishi A: Biogeography and biodiversity in sulfide structures of active and inactive vents at deep-sea hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough. Appl Environ Microbiol 76: 2968–79 (2010)
62. Kayser E-B, Sedensky M, Morgan P, Hoppel C: Mitochondrial oxidative phosphorylation is defective in the long-lived mutant clk-1. J Biol Chem 279: 54479–86 (2004)
63. Kelner K, Morita K, Rossen J, Pollard H: Restricted diffusion of tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine N-methyltransferase from digitonin-permeabilized adrenal chromaffin cells. Proc Natl Acad Sci U S A 83: 2998–3002 (1986)
64. Kiliç V: Piceatannol Mediated Modulation of Oxidative Stress and Regeneration in the Liver of Endotoxemic Mice. J Med Food 22: 594–601 (2019)
65. Kimura H: Production and physiological effects of hydrogen sulfide. Antioxid Redox Signal 20: 783–93 (2014)
66. Kimura H: The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. Nitric Oxide 41: 4–10 (2014)
67. Kimura Y, Toyofuku Y, Koike S, Shibuya N, Nagahara N, Lefer D, Ogasawara Y, Kimura H: Identification of H2S3 and H2S produced by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the brain. Sci Rep 5: 14774 (2015)
68. Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y: Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. Tumour Biol 37: 8471–86 (2016)
69. Knudson C, Korsmeyer S: Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. Nat Genet 16: 358–63 (1997)

70. Kobayashi M, Tsujitani S, Kurisu Y, Kaibara N: Bcl-2 and Bax expression for hepatocellular apoptosis in a murine endotoxin shock model. Hepatogastroenterology 49: 1602–06 (2002)
71. Kobayashi Y, Mori M, Naruto T, Kobayashi N, Sugai T, Imagawa T, Yokota S: Dynamic movement of cytochrome c from mitochondria into cytosol and peripheral circulation in massive hepatic cell injury. Pediatr Int 46: 685–92 (2004)
72. Krumschnabel G, Makrecka-Kuka M, Kumphune S, Fontana-Ayoub M, Fasching M, Gnaiger E: O2k-Fluorometry: HRR and simultaneous determination of H2O2 production with Amplex Red. Mitochondr Physiol Network 19: 1–5 (2014)
73. Krumschnabel G, Fontana-Ayoub M, Sumbalova Z, Heidler J, Gauper K, Fasching M, Gnaiger E: Simultaneous high-resolution measurement of mitochondrial respiration and hydrogen peroxide production. Methods Mol Biol 1264: 245–61 (2015)
74. Kuznetsov A. G: Oxygraph Assay of Cytochrome c Oxidase Activity: Chemical Background Correction. Mitochondr Physiol Network: 1–4 (2010)
75. Kuznetsov A, Strobl D, Ruttmann E, Königsrainer A, Margreiter R, Gnaiger E: Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. Anal Biochem 305: 186–94 (2002)
76. Le Trionnaire S, Perry A, Szczesny B, Szabo C, Winyard P, Whatmore J, Wood M, Whiteman M: The synthesis and functional evaluation of a mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5-yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphonium bromide (AP39). Med Chem Commun 5: 728–36 (2014)
77. Lee Y-S, Kim Y-H, Jung Y, Kim K-S, Kim D-K, Na S-Y, Lee J-M, Lee C-H, Choi H-S: Hepatocyte toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced hepcidin expression. Exp Mol Med 49: e408 (2017)
78. Liang H, Ward W: PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. Adv Physiol Educ 30: 145–51 (2006)
79. Libiad M, Vitvitsky V, Bostelaar T, Bak D, Lee H-J, Sakamoto N, Fearon E, Lyssiotis C, Weerapana E, Banerjee R: Hydrogen sulfide perturbs mitochondrial bioenergetics and triggers metabolic reprogramming in colon cells. J Biol Chem 294: 12077–90 (2019)

80. Li L, Bhatia M, Zhu Y, Zhu Y, Ramnath R, Wang Z, Anuar F, Whiteman M, Salto-Tellez M, Moore P: Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. FASEB J 19: 1196–98 (2005)
81. Li L, Whiteman M, Guan Y, Neo K, Cheng Y, Lee S, Zhao Y, Baskar R, Tan C-H, Moore P: Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. Circulation 117: 2351–60 (2008)
82. Li R, Jia Z, Trush M: Defining ROS in Biology and Medicine. React Oxyg Species (Apex) 1: 9–21 (2016)
83. Li X, Fang P, Mai J, Choi E, Wang H, Yang X: Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. J Hematol Oncol 6: 19 (2013)
84. Lu M, Hu L-F, Hu G, Bian J-S: Hydrogen sulfide protects astrocytes against H(2)O(2)-induced neural injury via enhancing glutamate uptake. Free Radic Biol Med 45: 1705–13 (2008)
85. Mahmood T, Yang P-C: Western blot: technique, theory, and trouble shooting. N Am J Med Sci 4: 429–34 (2012)
86. Mani S, Cao W, Wu L, Wang R: Hydrogen sulfide and the liver. Nitric Oxide 41: 62–71 (2014)
87. Matallo J, Vogt J, McCook O, Wachter U, Tillmans F, Groeger M, Szabo C, Georgieff M, Radermacher P, Calzia E: Sulfide-inhibition of mitochondrial respiration at very low oxygen concentrations. Nitric Oxide 41: 79–84 (2014)
88. Mathai J, Missner A, Kügler P, Saparov S, Zeidel M, Lee J, Pohl P: No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 16633–38 (2009)
89. Merlavsky V, Manko B, Ikkert O, Manko V: Experimental substantiation of permeabilized hepatocytes model for investigation of mitochondria in situ respiration. Ukr Biochem J 87: 113–21 (2015)
90. Mikami Y, Shibuya N, Kimura Y, Nagahara N, Ogasawara Y, Kimura H: Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide. Biochem J 439: 479–85 (2011)

91. Mikami Y, Shibuya N, Ogasawara Y, Kimura H: Hydrogen sulfide is produced by cystathionine γ-lyase at the steady-state low intracellular Ca(2+) concentrations. Biochem Biophys Res Commun 431: 131–35 (2013)
92. Mironov A, Seregina T, Nagornykh M, Luhachack L, Korolkova N, Lopes L, Kotova V, Zavilgelsky G, Shakulov R, Shatalin K, Nudler E: Mechanism of H(2)S-mediated protection against oxidative stress in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A 114: 6022–27 (2017)
93. Mitchell P: Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol Rev Camb Philos Soc 41: 445–502 (1966)
94. Modis K, Bos E, Calzia E, van Goor H, Coletta C, Papapetropoulos A, Hellmich M, Radermacher P, Bouillaud F, Szabo C: Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part II. Pathophysiological and therapeutic aspects. Br J Pharmacol 171: 2123–46 (2014)
95. Mogensen T, Berg R, Paludan S, Østergaard L: Mechanisms of dexamethasone-mediated inhibition of Toll-like receptor signaling induced by Neisseria meningitidis and Streptococcus pneumoniae. Infect Immun 76: 189–97 (2008)
96. Negelein E.: Über die Wirkung des Schwefelwasserstoffs auf chemische Vorgänge in Zellen. Biochem Zeitschrift 165: 203: 199-209 (1925)
97. Norris E, Culberson C, Narasimhan S, Clemens M: The liver as a central regulator of hydrogen sulfide. Shock 36: 242–50 (2011)
98. Norris E, Schleser F, Culberson C, Clemens M: Hydrogen sulfide protects against hepatocyte cell death and mitochondrial reactive oxygen during hypoxia. FASEB J 26: 1110.5-1110.5 (2012)
99. Olson K, Dombkowski R, Russell M, Doellman M, Head S, Whitfield N, Madden J: Hydrogen sulfide as an oxygen sensor/transducer in vertebrate hypoxic vasoconstriction and hypoxic vasodilation. J Exp Biol 209: 4011–23 (2006)
100. Olson K, Perry S: H2S and O2 sensing. Proc Natl Acad Sci U S A 107: E141 (2010)
101. Olson K, Gao Y, Arif F, Arora K, Patel S, Deleon E, Sutton T, Feelisch M, Cortese-Krott M, Straub K: Metabolism of hydrogen sulfide (H(2)S) and

Production of Reactive Sulfur Species (RSS) by superoxide dismutase. Redox Biol 15: 74–85 (2018)

102. Pan P, Wang X, Liu D: The potential mechanism of mitochondrial dysfunction in septic cardiomyopathy. J Int Med Res 46: 2157–69 (2018)
103. Peng Y-J, Nanduri J, Raghuraman G, Souvannakitti D, Gadalla M, Kumar G, Snyder S, Prabhakar N: H2S mediates O2 sensing in the carotid body. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 10719–24 (2010)
104. Pesta D, Gnaiger E: High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. Methods Mol Biol 810: 25–58 (2012)
105. Pfleger J, He M, Abdellatif M: Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival. Cell Death Dis 6: e1835 (2015)
106. Prior M, Sharma A, Yong S, Lopez A: Concentration-time interactions in hydrogen sulphide toxicity in rats. Can J Vet Res 52: 375–79 (1988)
107. Ramazzini B: De morbis artificum diatriba diseases of workers. 1713. Am J Public Health 91: 1380–82 (2001)
108. Rasmussen H, Rasmussen U: Oxygen solubilities of media used in electrochemical respiration measurements. Anal Biochem 319: 105–13 (2003)
109. Rich P, Maréchal A: The mitochondrial respiratory chain. Essays Biochem 47: 1–23 (2010)
110. Scindia Y, Wlazlo E, Leeds J, Loi V, Ledesma J, Cechova S, Ghias E, Swaminathan S: Protective Role of Hepcidin in Polymicrobial Sepsis and Acute Kidney Injury. Front Pharmacol 10: 615 (2019)
111. Searcy D, Lee S: Sulfur reduction by human erythrocytes. J Exp Zool 282: 310–22 (1998)
112. Severinghaus J, Astrup P: History of blood gas analysis. IV. Leland Clark's oxygen electrode. J Clin Monit 2: 125–39 (1986)
113. Shang Z, Lu C, Chen S, Hua L, Qian R: Effect of $H_2S$ on the circadian rhythm of mouse hepatocytes. Lipids Health Dis 11: 23 (2012)
114. Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H: Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. J Biochem 146: 623–26 (2009)

115. Shibuya N, Koike S, Tanaka M, Ishigami-Yuasa M, Kimura Y, Ogasawara Y, Fukui K, Nagahara N, Kimura H: A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. Nat Commun 4: 1366 (2013)
116. Shin K-M, Kim Y-H, Park W-S, Kang I, Ha J, Choi J-W, Park H-J, Lee K-T: Inhibition of methanol extract from the fruits of Kochia scoparia on lipopolysaccharide-induced nitric oxide, prostaglandin correction of prostagladin E2, and tumor necrosis factor-alpha production from murine macrophage RAW 264.7 cells. Biol Pharm Bull 27: 538–43 (2004)
117. Simon F, Giudici R, Duy C, Schelzig H, Oter S, Gröger M, Wachter U, Vogt J, Speit G, Szabó C, Radermacher P, Calzia E.: Hemodynamic and metabolic effects of hydrogen sulfide during porcine ischemia/reperfusion injury. Shock 30: 359–64 (2008)
118. Singh A, Koduru B, Carlisle C, Akhter H, Liu R-M, Schroder K, Brandes R, Ojcius D: NADPH oxidase 4 modulates hepatic responses to lipopolysaccharide mediated by Toll-like receptor-4. Sci Rep 7: 14346 (2017)
119. Sinkler C, Kalpage H, Shay J, Lee I, Malek M, Grossman L, Hüttemann M: Tissue- and Condition-Specific Isoforms of Mammalian Cytochrome c Oxidase Subunits: From Function to Human Disease. Oxid Med Cell Longev 2017: 1534056 (2017)
120. Sivarajah A, Collino M, Yasin M, Benetti E, Gallicchio M, Mazzon E, Cuzzocrea S, Fantozzi R, Thiemermann C: Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. Shock 31: 267–74 (2009)
121. Steinlechner-Maran R, Eberl T, Kunc M, Margreiter R, Gnaiger E: Oxygen dependence of respiration in coupled and uncoupled endothelial cells. Am J Physiol 271: C2053-61 (1996)
122. Stipanuk M, Beck P: Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. Biochem J 206: 267–77 (1982)
123. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi J, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon D, Bachoo R, Spiegelmann B: Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. Cell 127: 397–408 (2006)

124. Sun L, Chen L, Wang F, Zheng X, Yuan C, Niu Q, Li Z, Deng L, Zheng B, Li C, Deng L, Zheng B, Chunjin Z: Exogenous hydrogen sulfide prevents lipopolysaccharide-induced inflammation by blocking the TLR4/NF-κB pathway in MAC-T cells. Gene 710: 114–21 (2019)
125. Sun W-H, Liu F, Chen Y, Zhu Y-C: Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under ischemia/reperfusion. Biochem Biophys Res Commun 421: 164–69 (2012)
126. Szabo C, Coletta C, Chao C, Módis K, Szczesny B, Papapetropoulos A, Hellmich M: Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine-β-synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 110: 12474–79 (2013)
127. Szabo C, Ransy C, Modis K, Andriamihaja M, Murghes B, Coletta C, Olah G, Yanagi K, Bouillaud F: Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. Br J Pharmacol 171: 2099–122 (2014)
128. Szabo C, Papapetropoulos A: International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H(2)S Levels: H(2)S Donors and H(2)S Biosynthesis Inhibitors. Pharmacol Rev 69: 497–564 (2017)
129. Szabó C: Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. Nat Rev Drug Discov 6: 917 EP (2007)
130. Szczesny B, Modis K, Yanagi K, Coletta C, Le Trionnaire S, Perry A, Wood M, Whiteman M, Szabo C: AP39, a novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, stimulates cellular bioenergetics, exerts cytoprotective effects and protects against the loss of mitochondrial DNA integrity in oxidatively stressed endothelial cells in vitro. Nitric Oxide 41: 120–30 (2014)
131. Teng H, Wu B, Zhao K, Yang G, Wu L, Wang R: Oxygen-sensitive mitochondrial accumulation of cystathionine beta-synthase mediated by Lon protease. Proc Natl Acad Sci U S A 110: 12679–84 (2013)
132. Tropea T, Wareing M, Greenwood S, Feelisch M, Sibley C, Cottrell E: Nitrite mediated vasorelaxation in human chorionic plate vessels is enhanced by hypoxia and dependent on the NO-sGC-cGMP pathway. Nitric Oxide 80: 82–88 (2018)

133. Truong D, Eghbal M, Hindmarsh W, Roth S, O'Brien P: Molecular mechanisms of hydrogen sulfide toxicity. Drug Metab Revs 38: 733–44 (2006)
134. Ubuka T, Abe T, Kajikawa R, Morino K: Determination of hydrogen sulfide and acid-labile sulfur in animal tissues by gas chromatography and ion chromatography. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 757: 31–37 (2001)
135. Ubuka T: Assay methods and biological roles of labile sulfur in animal tissues. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 781: 227–49 (2002)
136. Villarejo M, Westley J: Mechanism of Rhodanese Catalysis of Thiosulfate-Lipoate Oxidation-Reduction. J Biol Chem 238: 4016–20 (1963)
137. Walton M, Whysong D, O'Connor P, Hockenbery D, Korsmeyer S, Kohn K: Constitutive expression of human Bcl-2 modulates nitrogen mustard and camptothecin induced apoptosis. Cancer Res 53: 1853–61 (1993)
138. Wang R: Two's company, three's a crowd: can H2S be the third endogenous gaseous transmitter? FASEB J 16: 1792–98 (2002)
139. Wepler M, Merz T, Wachter U, Vogt J, Calzia E, Scheuerle A, Moller P, Groger M, Kress S, Fink M, Lukaschewski B, Rumm G, Stahl B, Georgieff M, Huber-Lang M, Torregrossa R, Whiteman M, McCook O, Radermacher P, Hartmann C: The Mitochondria-Targeted H2S-donor AP39 in a Murine Model of Combined Hemorrhagic Shock and Blunt Chest Trauma. Shock (2018)
140. Westley A, Westley J: Biological sulfane sulfur. Anal Biochem 195: 63–67 (1991)
141. Whiteman M, Li L, Rose P, Tan C-H, Parkinson D, Moore P: The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. Antioxid Redox Signal 12: 1147–54 (2010)
142. Yadav P, Yamada K, Chiku T, Koutmos M, Banerjee R: Structure and kinetic analysis of H2S production by human mercaptopyruvate sulfurtransferase. J Biol Chem 288: 20002–13 (2013)
143. Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa A, Mu W, Zhang S, Snyder S, Wang R: H2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. Science 322: 587–90 (2008)

144. Yang W, Yang G, Jia X, Wu L, Wang R: Activation of KATP channels by H2S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. J Physiol 569: 519–31 (2005)
145. Zhang J-H, Dong Z, Chu L: Hydrogen sulfide induces apoptosis in human periodontium cells. J Periodontal Res 45: 71–78 (2010)
146. Zhang L, Yang G, Untereiner A, Ju Y, Wu L, Wang R: Hydrogen sulfide impairs glucose utilization and increases gluconeogenesis in hepatocytes. Endocrinology 154: 114–26 (2013)
147. Zhao W, Wang R: H(2)S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. Am J Physiol Heart Circ Physiol 283: H474-80 (2002)
148. Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland R: A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. Anal Biochem 253: 162–68 (1997)

# Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

## Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.