Institut für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung

der Universität Ulm

Direktion: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Peter Radermacher

Mitochondriale Effekte des Schwefelwasserstoffdonors AP39 im Rahmen einer Lipopolysaccharid-Stimulation einer embryonalen Neuronenzellkultur der Ratte

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Universität Ulm

vorgelegt von

Tim Niklas Bewersdorf

aus Aalen

2021

Amtierender Dekan: Professor Doktor Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Professor Doktor Enrico Calzia

2. Berichterstatter: Professor Doktor Markus Huber-Lang

Tag der Promotion: 22.04.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis **I**

Abkürzungsverzeichnis **III**

1. Einleitung **1**

1.1 Schwefelwasserstoff 1

1.2 Physikalische und chemische Eigenschaften von Schwefelwasserstoff 1

1.3 Enzymatische Produktion und endogene Freisetzung 2

1.4 Wirkung von Schwefelwasserstoff auf die Atmungskette 4

1.5 Weitere Funktionen von Schwefelwasserstoff 8

1.6 Schwefelwasserstoff und reaktive Sauerstoffspezies 11

1.7 Schwefelwasserstoff im Gehirn 12

1.8 Schwefelwasserstoff in der Sepsis 14

1.9 Applikation von Schwefelwasserstoff 15

1.10 AP39 – Ein langsamer Schwefelwasserstoffdonor 16

1.11. Fragestellung 18

2. Material und Methoden **20**

2.1 Übersicht über die verwendeten Materialien 20

2.2 Zellkultur und Stimulation 34

2.3 High Resolution Respirometry (HRR) 40

2.4 Citrat-Synthase Aktivität 53

2.5 Western Blot 55

2.6 Statistik 58

3. Ergebnisse **60**

3.1 Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch 60

3.2 Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs mit simultaner Messung der H_2O_2-Produktion 68

3.3 Citrat-Synthase Aktivität 72

3.4 Western Blot 75

4. Diskussion **82**

4.1 Wahl des Messzeitpunkts 82

4.2 Zeitabhängige Effekte von AP39 auf neuronale Mitochondrien 83

4.3 Effekte von LPS auf neuronale Mitochondrien 90

4.4 Effekte von AP39 auf die Atmungskette unter LPS-Stimulation 95

4.5 Effekte von AP39 und LPS auf die H_2O_2-Produktion 98

4.6 Effekte von AP39 und LPS auf die Proteinexpression 102

4.7 Mögliche therapeutische Ansätze 107

4.8 Limitationen 109

4.9 Schlussfolgerung 111

5. Zusammenfassung **114**

6. Literaturverzeichnis **116**

7. Danksagung **127**

8. Lebenslauf **128**

Abkürzungsverzeichnis

3-MP	3-Mercaptopyruvat
3-MST	3-Mercaptopyruvat Schwefeltransferase
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
AP39	(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphoniumbromid
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-2-Agonist-of-Cell-Death
Bcl-2	B-Cell-Lymphoma 2 Protein
Bcl-xL	B-Cell-Lymphoma extra large Protein
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CI	Komplex 1 der Atmungskette
CII	Komplex 2 der Atmungskette
CIII	Komplex 3 der Atmungskette
CIV	Komplex 4 der Atmungskette
CV	Komplex 5 der Atmungskette
ca.	circa
Ca^{2+}	Calcium
CAT	Cystein-Aminotransferase
CBS	Cystathionin-β-Synthase
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
COX4	Cytochrom-C-Oxidase-4
COX5A	Cytochrom-C-Oxidase-5A
COX5B	Cytochrom-C-Oxidase-5B
CS	Citrat-Synthase
CSE	Cystathionin-γ-Lyase
dH_2O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DTNB	Dithionitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N′,N′-tetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonooxid-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETS	Electron transfer system (Elektronen-Transport-System)
evtl.	eventuell
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
$FADH_2$	reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBS	fetales Rinderserum
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GFAP	Saures Gliafaserprotein
h	Stunden
H^+	Wasserstoffproton
HBSS	Hank’s Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HRR	High-resolution Respirometry
H_2S	Schwefelwasserstoff
HS^-	Hydrogensulfid
IgG	Immunglobulin-G
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
K^+	Kalium
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
LED	Light-emiting Diode
LPS	Lipopolysaccharid

M	Molar
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minuten
MirO5	Mitochondrial Respiration Medium
mol	Mol
mPTP	mitochondria Permeability Transistion Pores
MRC	mitochondriale respiratorische Reservekapazität (Mitochondrial Reserve Capacity)
n	Anzahl biologischer und technischer Replikate
NaCl	Natriumchlorid
NAD^+	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaHS	Natriumhydrogensulfid
Na_2S	Natriumsulfid
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nM	nanomolar
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NOS	Stickstoffmonooxid-Synthase
NP40	Phenoxypolyethoxylethanol
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NRK	Normal Rat Kidney Epithelial Cells (Immortalisierte Nierenepithelzellen der Ratte)
$OH^{\cdot}$	Hydroxyl-Radikal
OxPhos	Maximale oxidative Phosphorylierungskapazität
$^1O_2$	Singulett-Sauerstoff
O_2	Sauerstoff
$O_2^{\cdot -}$	Superoxid-Radikal
PAMP	Pathogen associated Molecular Pattern
PBS	phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCN	Primäre corticale Neurone
PGC1α	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ Coactivator 1 α

pmol	Picomol
PNPP	Para-Nitrophenylphosphat
ppm	Parts per million (Anteile pro 1 Million)
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
$RO^{\cdot}$	Alkoxyl-Rest
$ROO^{\cdot}$	Peroxyl-Rest
ROOH	Hydroperoxid-Rest
RNS	reactive nitrogen species (reaktive Stickstoffspezies)
S^{2-}	Sulfid-Anion
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIRT3	Nicotinamidadenindinukleotid-abhängige Deacetylase Sirtuin 3
SOD	Superoxiddismutase
TBS	tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMPD	Tetramethylphenylendiamin
TNB	Thionitrobenzoat
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-α
Tris	Tris(hydroxmethyl)aminomethane
Tween-20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat
U	Unit
UCP	Uncoupling Protein
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol

1. Einleitung

1.1 Schwefelwasserstoff

Schwefelwasserstoff (H_2S) ist ein hochgiftiges, farbloses, leicht entflammbares und wasserlösliches Gas mit einem charakteristischen Geruch nach verfaulten Eiern [65, 67, 68, 90, 128, 129]. Wie zahlreiche Unfälle und Zwischenfälle bei Vulkanausbrüchen oder mit Güllesilos zeigen, ist H_2S bereits in niedrigsten Dosen hochgiftig [6, 45, 128, 96]. Die Toxizität richtet sich zum einen nach der Dosis und zum anderen nach der Expositionszeit und beginnt bei inhalativen Konzentrationen von 50ppm mit Augenreizungen [114, 128]. Steigende Konzentrationen führen zu Irritationen der oberen Atemwege (100-200ppm), Lungenödem (250-500ppm) und bei Konzentrationen von 500-1000ppm schließlich zu Atemlähmung, Beeinträchtigungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) und des Herz-Kreislaufsystems und dadurch letztendlich zum Tod [45, 114, 128].

Andererseits wird angenommen, dass H_2S bereits vor mehreren Milliarden Jahren als biologischer Energieträger der ersten Lebewesen des Planeten genutzt wurde [128, 139]. Da das erste Leben auf der Erde höchstwahrscheinlich zu Zeiten von globalem Sauerstoffmangel in den Ozeanen entstand, mussten die ersten Lebewesen auf eine andere Weise Energie gewinnen [21, 128, 139]. Die Ressourcen hierfür fanden sich in den Vulkanen und Hydrothermalfeldern der Tiefsee, welche unter anderem Schwefelverbindungen wie H_2S auswerfen [21, 128, 139]. Noch heute wird H_2S von Bakterien und Röhrenwürmern in der Nähe von hydrothermalen Quellen der Tiefsee als Energieträger genutzt [128]. Doch nicht nur Bakterien und andere einfache Lebensformen nutzen H_2S als Energieträger. Seitdem Goodwin et al. im Jahr 1989 endogen produzierten H_2S in Gehirnen von Ratten und Menschen detektieren konnten, sind zahlreiche physiologische Funktionen und die für die endogene Synthese verantwortlichen Enzyme entdeckt und näher erforscht worden [45, 128].

1.2 Physikalische und Chemische Eigenschaften von Schwefelwasserstoff

Wird H_2S in Wasser gelöst, stellt sich innerhalb kürzester Zeit ein Ionengleichgewicht zwischen den Zuständen H_2S, HS^- und S^{2-} ein (Abbildung (Abb.) 1) [66, 128].

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

Abbildung 1: Dissoziationsgleichung von Schwefelwasserstoff (H_2S) in Wasser. H_2S dissoziiert in Wasser zu Wasserstoffprotonen (H^+) und Hydrogensulfid (HS^-). In einem weiteren Schritt kann HS^- weiter zu Sulfid (S^{2-}) dissoziieren.

Bei physiologischem pH-Wert von 7,4 liegen 20-30% als H_2S, 70-80% als HS^- und ein vernachlässigbar kleiner Anteil als zweifach deprotoniertes S^{2-} vor [66, 128]. H_2S befindet sich in gelöster Form permanent in diesem Säure-Basen-Gleichgewicht, sodass Konzentrationsänderungen eines der Zustände sofort durch Umverteilung wieder ausgeglichen werden [66, 128]. Dies ist einer der Gründe für die biochemische Instabilität von gelöstem H_2S, da es leicht in den gasförmigen Zustand übergeht und somit in Lösungen sehr flüchtig ist bzw. von Organismen abgeatmet werden kann [128]. Welcher der oben genannten Zustände der biochemisch aktive ist, ist noch nicht vollständig geklärt [66]. Neben einer guten Wasserlöslichkeit ist H_2S auch lipophil, weshalb es gut durch Zellmembranen hindurch diffundieren kann [66]. Dies ist eine der Eigenschaften, die H_2S als Gasotransmitter definieren [100, 141]. Neben der freien Permeabilität durch Zellmembranen, sind die von Wang im Jahr 2002 definierten Kriterien der Gasotransmitter folgende, welche allesamt von H_2S erfüllt werden: Gasotransmitter müssen kleine gasförmige Moleküle sein, die endogen enzymatisch und kontrollierbar gebildet werden, und klar definierte Funktionen in physiologischen Konzentrationen an spezifischen Orten erfüllen [100, 141]. Diese Eigenschaften werden neben H_2S nur von den beiden Gasotransmittern Kohlenstoffmonooxid (CO) und Stickstoffmonooxid (NO) erfüllt [100, 141]. Neben der Eigenschaft als Gasotransmitter besitzt H_2S in Säugetieren zahlreiche weitere physiologische Funktionen, weshalb H_2S von Säugetieren endogen produziert werden wird [90, 128].

1.3 Enzymatische Produktion und endogene Freisetzung

Mittlerweile ist bekannt, dass Säugetiere permanent geringe Mengen an H_2S produzieren [65, 66, 128, 45]. Neben einem nicht-enzymatischen Abbau wird überwiegend durch enzymatische Reaktionen H_2S freigesetzt [65, 66, 128]. Die enzymatische Synthese wird durch die vier Enzyme Cystathion-β-Synthase (CBS), Cystathion-γ-Lyase (CSE), 3-Mercaptopyruvat Schwefeltransferase (3-MST) und die Cystein-Aminotransferase (CAT) katalysiert [65, 66, 88, 128]. In der nachfolgenden Abbildung 2 sind die verschiedenen H_2S-Freisetzungswege dargestellt.

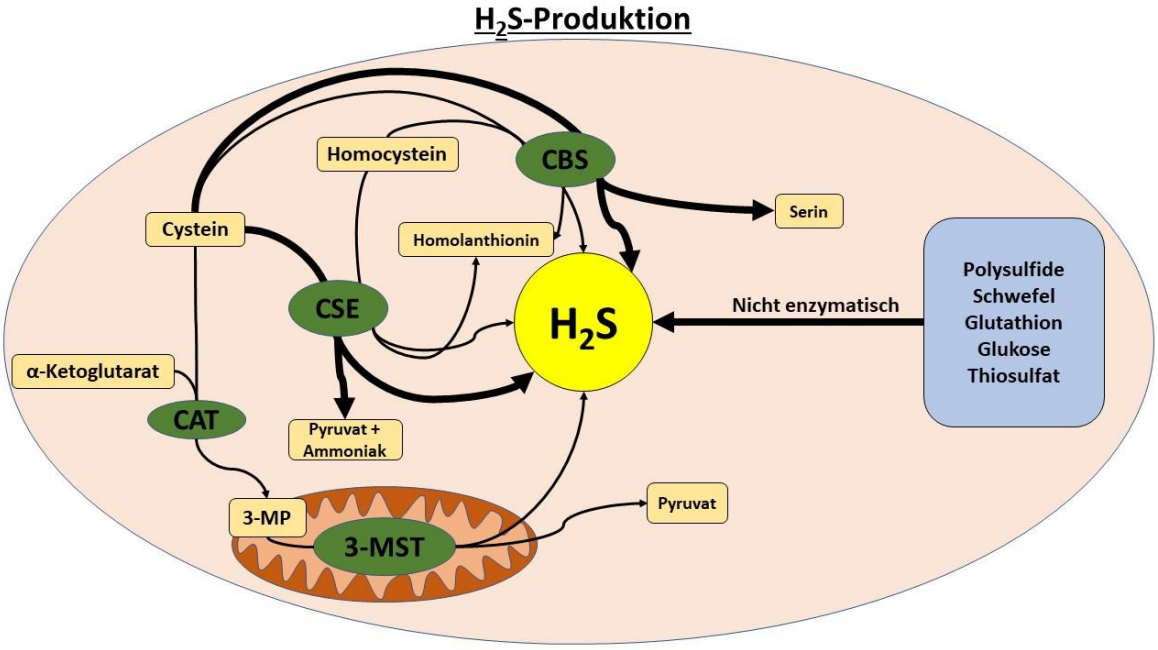

Abbildung 2: Darstellung der verschiedenen intrazellulären Schwefelwasserstoff- (H_2S-) Reaktionswege. Auf der linken Hälfte sind die enzymatischen Produktionswege dargestellt, während im blauen Kasten die nicht-enzymatische H_2S-Quellen abgebildet sind. Die Cystathion-β-Synthase (CBS), Cystathion-γ-Lyase (CSE), Cystein-Aminotransferase (CAT), 3-Mercaptopyruvat Schwefeltransferase (3-MST), welche sich im Zytosol und Mitochondrium befindet, stellen die wichtigsten enzymatischen H_2S-Quellen dar.

Die CBS wird überwiegend im Zytosol von Zellen des Nervensystems, der Niere, der Leber, des Darms, des Uterus und der Plazenta exprimiert und produziert H_2S indem es einen Austausch an der β-Bindungsstelle durchführt [65, 66]. Bei genauerer Betrachtung der Expression im Gehirn findet sich CBS vor allem in der zerebellären Bergmann Glia und in Astrozyten [65]. Bei der durch die CBS katalysierten Reaktion reagiert Cystein mit Wasser (H_2O) zur Aminosäure Serin und H_2S [66]. Außerdem kann die CBS durch diesen β-Austausch noch eine andere H_2S-freisetzende Reaktion durchführen [66]. In dieser Situation reagieren die Aminosäuren Cystein und Homocystein zu Homolanthionin und H_2S [66]. Während CBS das wichtigste H_2S produzierende Enzym im Gehirn ist, synthetisiert die ebenfalls zytosolische CSE die größte H_2S-Menge in Niere und Leber [66]. Des Weiteren wird die CSE im Gehirn, der thorakalen Aorta und der Portalvene exprimiert [65]. Die Bildung von H_2S durch die CSE erfolgt unter physiologischen Bedingungen zu 70% aus Cystein und zu 30% aus Homocystein [65]. Bei der häufiger stattfindenden Reaktion entstehen aus Cystein und H_2O Pyruvat, H_2S und Ammoniak [66]. Im Rahmen der seltener stattfindenden Reaktion reagieren zwei Moleküle Homocystein zu Homolanthionin und H_2S [66]. Während CBS und CSE rein zytosolische Enzyme sind, ist die 3-MST sowohl im Zytosol als auch in Mitochondrien nachweisbar [66]. Obwohl die Gesamtaktivität der zytosolischen 3-MST höher ist, ist der Effekt der mitochondrialen 3-MST ein Vielfaches

größer, da Mitochondrien den Hauptwirkungsort von H_2S darstellen [66]. Zur Produktion von H_2S benötigt die 3-MST 3-Mercaptopyruvat (3-MP), welches zuvor von der CAT aus Cystein und α-Ketoglutarat synthetisiert wurde [66]. Die CAT, auch Aspartat-Aminotransferase genannt, ist ebenfalls sowohl im Zytosol als auch mitochondrial vorzufinden [65, 66]. Bei der Reaktion der 3-MST wird aus 3-Mercaptopyruvat in Anwesenheit von Thioredoxin H_2S und Pyruvat freigesetzt [66].

Weitere Freisetzungsmechanismen von H_2S beruhen hauptsächlich auf der Synthese aus Polysulfiden, elementarem Schwefel, Glutathion und Glukose. Insbesondere das Polysulfid Thiosulfat spielt neben den bereits genannten Mechanismen eine entscheidende Rolle [66]. Thiosulfat, welches unter anderem als Produkt der oxidativen Energiegewinnung aus H_2S entsteht, wird durch das Enzym Schwefeltransferase in Anwesenheit von Thioredoxin zu H_2S und Sulfit metabolisiert [66, 128]. Neben der Bildung in der Atmungskette entsteht Thiosulfat auch beim Abbau von L-Cystein [137]. Des Weiteren wird H_2S auch bei der Reduktion von elementarem Schwefel durch reduziertem Nicotinamidadenindinukleotid (NADH), reduziertem Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) oder Glutathion gebildet [116].

1.4 Wirkung von Schwefelwasserstoff auf die Atmungskette

Einige der wichtigsten Effekte von H_2S werden über Interaktionen mit Komplexen der Atmungskette vermittelt [46, 90, 128, 129]. Als besonderes Charakteristikum besitzt H_2S bei unterschiedlichen Konzentrationen unterschiedliche Eigenschaften auf Mitochondrien [46, 128, 129]. Durch diese verschiedenen Eigenschaften bei unterschiedlichen Konzentrationen kommt es zu einer Veränderung des Gesamteffekts auf die mitochondriale Atmungskette, welche sich im Sauerstoffverbrauch der Zellen widerspiegelt [128, 129]. Während bei niedrigen H_2S-Konzentrationen die stimulatorischen Effekte von H_2S auf die Atmungskette überwiegen, kommt es bei zunehmender Steigerung der H_2S-Konzentration zu einer immer stärkeren Hemmung der Atmungskette [46, 128, 129]. Wann der stimulatorische Effekt und wann der inhibitorische Effekt überwiegt, ist stark gewebe- und pH-abhängig und die Wirkungen gleichen sich bei intermediären Konzentrationen teilweise aus [46, 128]. Unter physiologischen Bedingungen ist in aller Regel bis zu einer Konzentration von 10 µM mit einem stimulatorischen Effekt zu rechnen, da bis zu dieser Konzentration H_2S als eine Art Reservesubstrat neben den regulären Substraten reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid ($FADH_2$) und NADH als Elektronendonor in der Atmungskette fungiert [128]. Höhere

Konzentrationen resultieren in einer zunehmenden Hemmung des Komplex IV der Atmungskette, der Cytochrom-C-Oxidase, und damit in einem zunehmendem Erliegen der Atmungskette [45, 53, 90, 108, 128].

1.4.1 Stimulatorische Effekte von H_2S auf die Atmungskette

Wie bereits erwähnt wirkt H_2S in niedrigen Konzentrationen stimulatorisch auf die Atmungskette und den Sauerstoffverbrauch der Zellen. Diese evolutionär sehr alte Form der Energiegewinnung ist wahrscheinlich ein Relikt aus der Entstehung des Lebens auf der Erde und dient in Säugetieren unter anderem zur Entgiftung des Körpers von H_2S [46, 128, 139]. Die metabolische Verwertung von H_2S findet in dem Enzymkomplex Sulfide-Oxidation-Unit (SOU), welcher aus drei Enzymen besteht, statt (Abbildung 3) [46, 128]. Das Kernenzym der SOU ist die Sulfid-Ubichinon-Reduktase (SQR), welche zwei Elektronen von H_2S auf Ubichinon überträgt [46, 128]. Neben der SQR besteht die SOU außerdem aus den Enzymen Dioxygenase und Schwefeltransferase [46, 128]. Bei der durch die SOU katalysierten Reaktion reagieren zwei Moleküle H_2S mit Sauerstoff zu Thiosulfat ($H_2S_2O_3$) [46, 128]. Dabei werden zwei Elektronen von H_2S auf oxidiertes Ubichinon übertragen, wodurch dieses reduziert wird [46, 128]. Das reduzierte Ubichinon, das auch bei den Reaktionen der Komplexe I und II entsteht, wird in der Atmungskette zu Komplex III transportiert, an welchem es wieder oxidiert wird und die Elektronen auf Cytochrom C überträgt [46, 128]. An Komplex IV der Atmungskette werden die Elektronen wiederum auf Sauerstoff übertragen und es entsteht H_2O [46, 128]. Der Aufbau des Protonengradienten, welcher von der ATP-Synthase zur Bildung von ATP genutzt wird, wird bei der Metabolisierung von H_2S nicht durch die SOU, sondern durch die Elektronenübertragung an den Komplexen III und IV vermittelt [46, 128]. Im Vergleich zu den anderen Substraten der Atmungskette, NADH und $FADH_2$, ist allerdings die stöchiometrische Bilanz mit 0,75 (1,5 O_2/2H_2S) relativ schlecht, da bei der Verstoffwechslung von H_2S die dreifache Menge Sauerstoff benötigt wird [46, 128]. Betrachtet man allerdings den gesamten Metabolismus, ist die Energiebilanz von H_2S nicht ganz so niedrig. Da H_2S frei durch Membranen permeabel ist, entfällt ein energieverbrauchender Transport [128]. Außerdem entfällt eine ebenfalls energieverbrauchende Aktivierung, wie sie bei NADH und $FADH_2$ nötig ist [128]. Ein weiterer Punkt ist die hohe Affinität der SOU für H_2S und die damit verbundene 100%ige Metabolisierung von H_2S [128]. Darüber hinaus fällt im Verdauungstrakt H_2S als Abfallprodukt prokaryotischer Zellen an, sodass eine Metabolisierung von H_2S zum einen

Entgiftung und zum anderen Nutzung eines ohnehin zur Verfügung stehenden Substrates darstellt [46, 128].

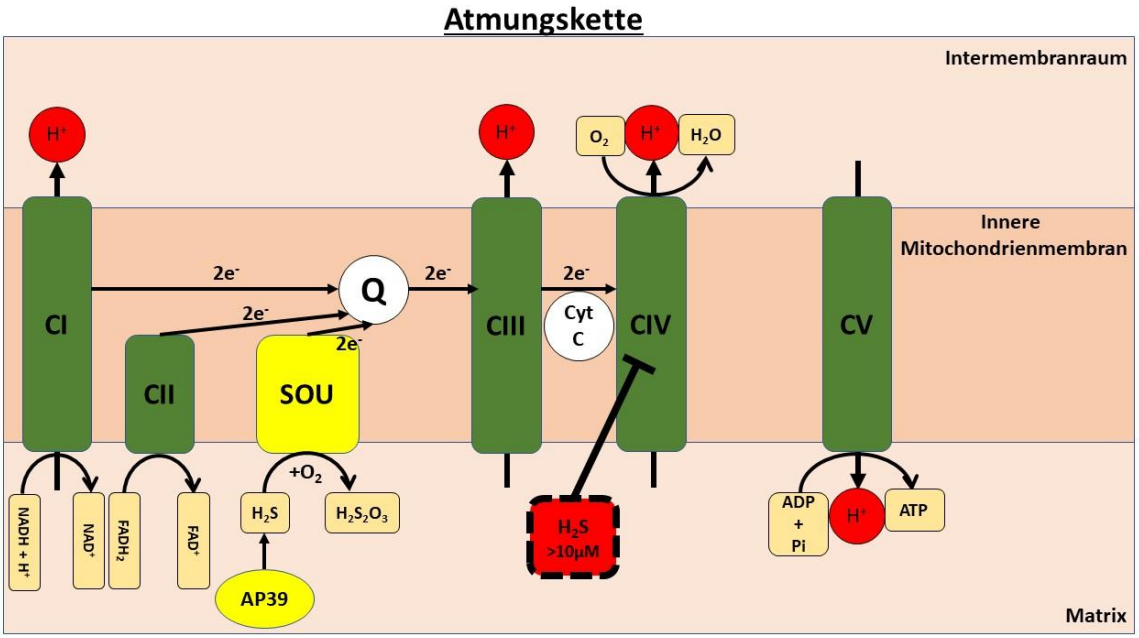

Abbildung 3: Darstellung der Atmungskette. Die Komplexe I (CI) und II (CII) und die Sulfide Oxidation Unit (SOU) übertragen Elektronen (e^-) auf Ubichinon (Q). Diese Elektronen werden an Komplex III (CIII) auf Cytochrom C (Cyt C) übertragen, welches die Elektronen auf Komplex IV (CIV) überträgt. CIV überträgt die e^- auf Sauerstoff (O_2) und bildet hierdurch Wasser (H_2O). Der Protonengradient zwischen Intermembranraum und Mitochondrienmatrix, welcher von CI, CIII und CIV aufgebaut wird, wird von der ATP-Synthase (CV) genutzt, um aus Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat (Pi) Adenosintriphosphat (ATP) zu bilden. Schwefelwasserstoff (H_2S) in Konzentrationen >10µM hemmt reversibel CIV. H_2S wird durch die SOU mit Sauerstoff zu Thiosulfat ($H_2S_2O_3$) metabolisiert. Wasserstoffproton (H^+), reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid (NADH), Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+), reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid ($FADH_2$), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD^+).

1.4.2 Inhibitorische Effekte von H_2S auf die Atmungskette

Steigt die H_2S-Konzentration allerdings in den mittleren bis hohen millimolaren Bereich an, überwiegen die hemmenden Effekte auf die Atmungskette, da H_2S eine reversible Hemmung der Cytochrom-C-Oxidase (CIV) bewirkt (Abb. 3) [45, 53, 90, 108, 109, 128]. Die Cytochrom-C-Oxidase ist das letzte Enzym des Elektronen-Transfer-Systems (ETS) und katalysiert die Oxidation von reduziertem Cytochrom C durch Sauerstoff und transportiert gleichzeitig Protonen vom inneren Mitochondrienraum, der Mitochondrien Matrix, in den Intermembranraum [108, 128]. Ähnlich wie Cyanid hemmt H_2S die Funktion der Cytochrom-C-Oxidase, wodurch es zu einem Rückstau von Elektronen im ETS kommt, da reduziertes Cytochrom C nicht oxidiert wird [128]. Dies führt zu einer Hemmung der vorangeschalteten Enzyme der Atmungskette bis hin zum völligen Erliegen, da der durch

das ETS aufgebaute Protonengradient nicht aufrecht erhalten werden kann und folglich auch Komplex V gehemmt wird [128, 140]. Im Unterschied zu Cyanid inhibiert H_2S Komplex IV reversibel [22, 128]. Auf molekularbiologischer Ebene betrachtet, bindet H_2S kompetitiv an Fe^{II} im reduzierten aktiven Zentrum der Cytochrom-C-Oxidase Untereinheit 1 (COX1) von Komplex IV und ist dort in Kompetition mit dem an $Fe^{II}Cu^{I}$ im aktiven Zentrum bindenden Sauerstoff [18, 128, 109]. Bei H_2S-Konzentrationen geringer als 10µM ist die Affinität von H_2S zu niedrig, um sich gegen Sauerstoff durchzusetzen, und folglich führt H_2S in diesen Konzentrationen nicht zu einer Inhibition von Komplex IV [22, 128]. Bei fehlender Zufuhr von neuem H_2S kommt es durch Metabolisierung zu einem raschen Abfall der H_2S-Konzentration, sodass die kompetitive Hemmung von Komplex IV durch H_2S schnell wieder durch Sauerstoff aufgehoben wird [22, 128]. Innerhalb von 10 bis 30 Minuten nach einmaliger H_2S-Applikation ist die Funktion der Cytochrom-C-Oxidase und damit auch der gesamten Atmungskette wieder nahezu normal [22, 128].

1.4.3 Künstlicher Winterschlaf - Suspended Animation

Durch die gezielte Hemmung von Komplex IV mit H_2S kann neben einer toxischen Wirkung auf die Zelle unter kontrollierten Bedingungen die Mitochondrienfunktion reduziert und damit der gesamte Metabolismus heruntergefahren werden [5, 9, 51, 90, 128, 140]. Ein solcher medikamentös induzierter hypometabolischer Zustand wird „suspended animation“ oder „künstlicher Winterschlaf“ genannt [5, 9, 51, 90]. Dieser Begriff ist angelehnt an die Fähigkeit einiger Säugetiere im Rahmen des Winterschlafs, Extremsituationen zu überleben, indem sie den Energieumsatz und die Körpertemperatur reduzieren [5, 9, 51, 90]. Sowohl der physiologische als auch der künstliche Winterschlaf gehen mit einer Reduktion der Mitochondrienaktivität und einer hieraus resultierenden verringerten Produktion von Sauerstoffradikalen und ATP einher [5, 9, 51, 90]. Therapeutisch kann dieser Effekt genutzt werden, um in ansonsten lebensbedrohlichen Zuständen den Metabolismus zu verlangsamen, sodass Organschädigungen zum Beispiel im Rahmen einer Minderperfusion verhindert und somit das Überleben verbessert werden können, da durch die Induktion eines künstlichen Winterschlafs ein Sauerstoff- bzw. Substratmangel besser von den Zellen toleriert werden kann [5, 9, 51, 90].

Neben H_2S besitzen auch die anderen Gasotransmitter CO und NO in höheren Konzentrationen die Fähigkeit zur reversiblen Hemmung von Komplex IV und können somit

ebenfalls einen künstlichen Winterschlaf induzieren [19, 51, 99, 134]. Während CO und NO bisher lediglich in der Taufliege Drosophila und dem Fadenwurm Caenorhabditis elegans einen künstlichen Winterschlaf induzieren konnten, wurde bereits mehrfach ein solcher hypometabolischer Status durch Applikation von H_2S erreicht [5, 9, 51, 99, 134]. So konnten Blackstone et. al nach Inhalation von 80ppm H_2S einen künstlichen Winterschlaf in Mäusen mit Reduktion des Metabolismus um 90% und deutlicher Senkung der Körpertemperatur induzieren [9]. Diese Effekte konnten im Rahmen einer intravenösen Applikation des H_2S-freisetzenden Salzes Natriumsulfid (Na_2S) auch im Großtiermodell reproduziert werden [119]. Sowohl Sauerstoffverbrauch und Kohlenstoffdioxid- (CO_2-) Produktion, als auch Herzfrequenz und Körpertemperatur waren in Schweinen, welche mit Na_2S therapiert wurden, nach einer 30-minütigen Abklemmung der thorakalen Aorta und einer hieraus folgenden Ischämie gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt [119]. Zusammenfassend kann H_2S sowohl im Kleintier- als auch im Großtiermodell einen künstlichen Winterschlaf induzieren und könnte somit in Zukunft eine mögliche neue Therapieoption darstellen [5, 9, 49, 84].

1.5. Weitere Funktionen von Schwefelwasserstoff

1.5.1 Signalmolekül

Während die Wirkungen auf die Atmungskette durch direkte Stimulation oder Inhibition erreicht werden, werden die anderen Funktionen spezifisch über S-Sulfhydrierung vermittelt [20, 34, 80]. Durch die S-Sulfhydrierung kann H_2S mit Disulfiden (R-S-S-R´) oder mit Sulfensäuren (R-SOH) Verbindungen zu Persulfiden ($R\text{-}SS^-$) reagieren, wodurch zahlreiche Effekte wie Vasodilatation und Inhibition von Apoptose vermittelt werden [20, 34].

1.5.2 Vasodilatation

H_2S kann durch Bildung von Persulfiden vasoaktiv wirken [20, 100, 151]. Durch Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen führt H_2S zu einer Relaxation von glatten Muskelzellen in der Gefäßwand und einer hieraus resultierenden Vasodilatation [20, 65, 70, 151]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Vasodilatation abhängig von extrazellulären Calciumspiegeln ist [152]. Auch die NO-vermittelte Vasodilatation ist

teilweise H_2S vermittelt, da NO direkt und indirekt die CSE-Aktivität in glatten Muskelzellen der Gefäße erhöht und damit die H_2S-Produktion gesteigert wird [151]. In in vitro Experimenten mit thorakalen Rattenaorten konnten Kiss et al. im Jahr 2014 zeigen, dass die H_2S induzierte Vasodilatation nicht ausschließlich auf der Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen beruht, sondern zu einem relevanten Anteil durch Öffnung des Chlorid/Bikarbonat-Antiporters in der Zellmembran von glatten Muskelzellen hervorgerufen wird [69]. Kiss et al. postulierten, dass die durch H_2S induzierte vermehrte Aktivität des Chlorid/Bikarbonat-Antiporters auf einer Reduzierung des pH-Wertes in Folge niedrigerer ATP-Level, welche aus der H_2S-bedingten Inhibition von Komplex IV resultieren, beruht [69].

1.5.3 H_2S als Regulator der Sauerstoffversorgung

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die vasodilatierende Potenz von H_2S von der Sauerstoffkonzentration abhängig ist und eine niedrigere Sauerstoffkonzentration zu einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve von H_2S auf die Vasodilatation führt [69, 70, 100, 102]. Über diese vasodilatierende Wirkung spielt H_2S eine wichtige Rolle bei der Regulation der Sauerstoffversorgung des Gewebes [70, 100, 102]. Unter physiologischen Bedingungen resultiert bei Säugetieren eine Hypoxie in einer Relaxation glatter Muskelzellen in der Gefäßwand und somit in einer Vasodilatation [100, 101]. In Abwesenheit von H_2S führt eine Hypoxie allerdings zu einer geringeren Vasodilatation [69, 70, 100, 101]. Dieser Effekt ließ sich in in vitro Versuchen mit Pulmonalarterien von Seelöwen und Kühen durch erneute Hinzugabe von H_2S wieder ausgleichen, sodass davon auszugehen ist, dass H_2S bei der hypoxischen Vasodilatation eine entscheidende Rolle spielt [100, 102].

Neben diesen Wirkungen auf lokaler Ebene spielt H_2S ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Sauerstoffdetektion auf systemischer Ebene zum Beispiel in Zellen des Glomus caroticums [101, 102]. Die H_2S-Konzentration in den Zellen, welche die Freisetzung von Neurotransmittern beeinflusst, wird im Glomus caroticums unter anderem durch die vorherrschende Sauerstoffkonzentration reguliert [101]. Während die H_2S-Produktion selbst sauerstoffunabhängig ist, sind zahlreiche Abbauvorgänge sauerstoffabhängig, sodass bei geringeren Sauerstoffkonzentrationen die H_2S-Konzentration ansteigt [101]. So führt eine Hypoxie im Glomus caroticum zu einer Hemmung der CO-bildenden Hämoxygenase 2

[101]. Da CO ein Inhibitor der CSE ist, resultiert hieraus eine Erhöhung der H_2S-Konzentration in den Glomuszellen und eine hierdurch getriggerte Hemmung Calcium-(Ca^{2+}-) abhängiger Kalium- (K^+-) Kanäle mit folgender Freisetzung von Neurotransmittern [101, 132, 133].

1.5.4 Inflammation

H_2S zeigt als wichtiger Mediator der Inflammation zahlreiche pro- und antiinflammatorische Effekte. Einige der proinflammatorischen Wirkungen von H_2S zeigten sich in vivo und in vitro in Nagern bei der Regulation der Schwere der akuten Pankreatitis und der hierzu assoziierten respiratorischen Insuffizienz oder bei Lipopolysaccharid (LPS) induzierter Inflammation [17, 130]. So konnte durch Inhibition der H_2S-produzierenden CSE durch DL-Propargylglycin in vivo eine Reduktion des hepatischen, pankreatischen und neurologischen Schadens im septischen Schock erzielt werden [17]. Kongruent hierzu war auch eine vermehrte Expression der Enzyme CBS und CSE in der Leber während einer Endotoxämie zu beobachten [17]. Darüber hinaus führte H_2S zu einer verminderten Rekrutierung von Leukozyten ins Gewebe [17].

Andererseits vermittelt H_2S aber auch zahlreiche antiinflammatorische Effekte. In einer Studie aus meinem Labor zeigte H_2S in Mäusen mit Thoraxtrauma und hämorrhagischem Schock signifikant niedrigere Plasmaspiegel an proinflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin (IL) 1, 6 und 18, sowie Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1 und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNFα) [144]. In einer anderen Studie wirkte H_2S bei Nierenepithelzellen sowohl in vitro als auch in vivo zytoprotektiv [2]. Weitere zytoprotektive Effekte werden durch verminderte Aktivität der proapoptotischen Faktoren Caspase-3 und Bcl-2-Agonist-of-Cell-Death (Bad) bei gleichzeitig vermehrter Expression der antiapoptotischen Faktoren B-Cell-Lymphoma 2 (Bcl-2) und B-Cell-Lymphoma extra large (Bcl-xL) vermittelt [66]. Neben diesen Wirkungen in eukaryotischen Zellen bewirkt endogen produzierter H_2S in prokaryotischen Zellen protektive Effekte durch Schutz der DNA vor Antibiotika [66]. Darüber hinaus spielt H_2S auch noch eine Rolle bei vielen weiteren physiologischen und pathologischen Vorgängen, wie Thrombozytenaggregation, Angiogenese und der Entstehung von Atherosklerose, dem Calcium-Haushalt der Zellen oder der erektilen Dysfunktion, auf welche an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll [20, 64, 66, 127]. Außerdem werden weitere antiinflammatorische und zytoprotektive Wirkungen über

eine antioxidative Wirkung von H_2S vermittelt, welche im folgenden Kapitel näher beschrieben werden.

1.6 Schwefelwasserstoff und reaktive Sauerstoffspezies

Unter dem Begriff der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) werden alle Radikale und andere hochreaktive Moleküle zusammengefasst, welche Sauerstoff enthalten [48, 82]. Zu ihnen gehören das Superoxid-Radikal (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Hydroxyl-Radikal ($OH^\cdot$), Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$), sowie die Reste Peroxyl- ($R\text{-}OO^\cdot$), Alkoxyl- ($R\text{-}O^\cdot$), Hydroperoxid-Radikal (R-OOH) und weitere [48, 82]. Unter physiologischen Bedingungen entstehen ROS in erster Linie im Mitochondrium durch Übertragung eines Elektrons auf ein Sauerstoffmolekül [48, 82]. Das entstandene O_2^- wird durch die Superoxiddismutase (SOD) rasch zum weniger reaktionsfreudigem und damit stabilerem H_2O_2, welches per definitionem kein Radikal darstellt, abgebaut [48, 82, 126]. Durch die rasche Metabolisierung ist H_2O_2 in Mitochondrien in ca. 100-fach höherer Konzentration als O_2^- messbar [83]. Allerdings ist H_2O_2 in der Lage, $OH^\cdot$ zu bilden, sodass für eine vollständige Radikaleliminierung H_2O_2 durch die Katalase zu Wasser und Sauerstoff abgebaut werden muss [48].

Allen ROS-Molekülen gemeinsam ist eine hohe Reaktionsbereitschaft mit anderen Molekülen, wodurch diese biochemisch verändert werden [48, 82]. Reagiert ein Radikal mit einem Nicht-Radikal entsteht ein neues Radikal und eine Kettenreaktion wird in Gang gesetzt, sodass hieraus großer Schaden an DNA, Lipiden, Proteinen und anderen Molekülen resultieren kann [48, 82]. Um sich vor solchen Schäden zu schützen, haben Säugetiere verschiedenste antioxidative Mechanismen entwickelt [48, 82]. Li et al. definierten 2016 Antioxidantien und unterteilten sie in verschiedene Gruppen: 1. Antioxidantien, die direkt ROS abfangen; 2. Antioxidantien, die die Freisetzung von ROS in der Zelle verhindern; 3. Antioxidantien, die den durch ROS-verursachten Schaden reparieren [48, 82].

ROS sind außerdem wichtige Mediatoren der Inflammation und regulieren die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, sodass sie für die Aufrechterhaltung einer Inflammation von großer Bedeutung sind [16, 48, 82]. Im Rahmen des oxydative burst von Neutrophilen Granulozyten, bei welchem große Mengen ROS aus den Zellen als unspezifische Immunantwort freigesetzt werden, spielt ROS eine wichtige Rolle bei der

Immunantwort [16, 48, 82]. Andererseits ist eine überschießende Freisetzung von ROS mit zahlreichen Pathologien, wie rheumatischen Erkrankungen assoziiert [16, 48, 82].

Übersteigt die ROS-Bildung die Abbaukapazitäten spricht man von oxidativem Stress [82, 118]. Oxidativer Stress entsteht unter anderem bei überschießender Inflammation, Hypoxie oder Ischämie/Reperfusionsschäden und der Organismus muss mit antioxidativen Mechanismen einer Zellschädigung entgegenwirken [82, 118]. H_2S konnte in mehreren Studien über eine solche antioxidative Wirkung antiinflammatorische und zytoprotektive Effekte zeigen. Durch eine Reduktion der ROS-Produktion und einem verstärkten Abbau von ROS und reaktiven Stickstoffspezies (RNS) konnte H_2S in in vivo Versuchen mit Ratten Ischämie/Reperfusionsschäden insbesondere am Herzen signifikant vermindern und Apoptosen verhindern [63]. Diese Verringerung der ROS-Konzentrationen durch H_2S konnte auch in vitro in Mitochondrien der Ratte beobachtet werden [63, 126]. Das Sulfidanion HS^- ist ein sehr effektives Antioxidationsmittel, da es leicht ein Elektron an Sauerstoffradikale abgeben kann und direkt am Ort des Entstehens der Sauerstoffradikale, dem Mitochondrium, durch die 3-MST gebildet wird [66]. Darüber hinaus besitzt H_2S zytoprotektive Effekte durch vermehrte Bildung des Antioxidationsmittels Glutathion, wodurch ROS schneller und im vermehrten Umfang eliminiert werden können [66]. Außerdem bewirkt H_2S eine vermehrte Aufnahme des für die Glutathion-Synthese benötigten Glutamats in die Zelle [62, 85]. Zusätzlich wird die Reduktion zur Wiederverwertung von oxidiertem Glutathion durch H_2S stimuliert [66, 68]. Entsprechend der Definition von Li et al. ist H_2S folglich ein direktes und indirektes Antioxidans [82].

1.7 Schwefelwasserstoff im Gehirn

Neben den allgemeinen Funktionen nimmt H_2S im Gehirn weitere sehr komplexe Funktionen ein [45, 58, 62, 65, 66, 68, 146]. Dies ist unter anderem aufgrund der relativ hohen physiologischen Konzentration von 50-160µM anzunehmen [1, 45]. Darüber hinaus ist das Nervengewebe das erste Gewebe in Säugetieren, in welchem eine endogene Produktion von H_2S nachgewiesen wurde [45]. Insbesondere im Gehirn zeigt H_2S durch eine Verbesserung des Glutathionstoffwechsels ausgeprägte zytoprotektive Effekte gegenüber oxidativem Stress [62, 64, 68]. So konnten Kimura et al. zeigen, dass H_2S in einer Zellkultur mit primären embryonalen Rattenneuronen des Cortex sowohl die absolute Menge an Glutathion erhöht als die Reduktion von oxidiertem Glutathion verbessert und somit durch oxidativem Stress ausgelöste Apoptosen dosisabhängig minimiert [68]. Außerdem konnte

H_2S ebenfalls in einer Zellkultur mit primären embryonalen, corticalen Rattenneuronen die Glutathionlevel bei Ischämie/Reperfusionsschäden auf 90% des physiologischen Levels halten und hierdurch neuroprotektiv wirken [64, 67]. Des Weiteren wirkt H_2S über bereits erwähnte antiinflammatorische, antiapoptotische und antioxidative Effekte protektiv in verschiedenen in vivo Modellen eines ischämischen Schlaganfalls [27, 58, 146]. Diese protektiven Effekte konnten allesamt nur in niedrigen H_2S-Konzentrationen gezeigt werden, während H_2S in höheren Konzentrationen den Ischämie-Schaden verstärkte [27]. Außerdem wurde gezeigt, dass H_2S in vitro in einem Alzheimer-Demenzmodell der Maus zahlreiche neuroprotektive Effekte, wie erhöhte ATP-Level, Schutz mitochondrialer DNA und verringerte ROS-Produktion, aufweist [62, 149]. Diese neuroprotektiven Effekte, welche in der Zellkultur festgestellt werden konnten, zeigten auch in vivo entsprechende Resultate [62, 149]. Im Langzeitversuch hatten mit H_2S behandelte Mäuse bessere kognitive Funktionen als ihre nicht mit H_2S behandelten Artgenossen [149].

Darüber hinaus ist H_2S ein wichtiger Neuromodulator und spielt eine entscheidende Rolle bei Lernvorgängen [1, 62, 65, 66]. Dies zeigt sich unter anderem dadurch, dass H_2S in Kombination mit einer schwachen tetanischen Stimulation im Hippocampus zu einer Langzeitpotenzierung führt, während dieselbe alleinige tetanische Stimulation keine Effekte im Hippocampus hervorruft [1, 65]. Dieser Effekt wird durch eine verstärkte Glutamat-vermittelte Aktivierung von N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA-) Rezeptoren durch Reduktion von Disulfidbrücken hervorgerufen [1, 62, 65, 66].

Außerdem wirkt H_2S nicht nur durch direkte Wirkung an Neuronen als Neuromodulator, sondern auch indirekt über Wirkungen auf die Glia, insbesondere auf Astrozyten [62, 65, 66]. H_2S beeinflusst wesentlich die Inflammationsreaktionen von Astrozyten und Mikroglia [27, 54]. In einem in vitro Inflammationsmodell mit LPS reduzierte H_2S die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IL-1β aus Astrozyten und Mikroglia, während vermehrt die antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 sezerniert wurden [27, 54]. Des Weiteren reduzierte H_2S die LPS-induzierte Freisetzung von NO, welches einer der wichtigsten proinflammatorischen Faktoren der neuronalen Glia ist [54]. Außerdem reagieren Astrozyten auf elektrische Stimulation und Aktivierung von NMDA-Rezeptoren benachbarter Neurone mit einem Ca^{2+}-Einstrom [62, 65, 66]. Dieser Ca^{2+}-Einstrom führt zur Freisetzung intrazellulärer Ca^{2+}-Speicher, sodass die Bildung einer Ca^{2+}-Welle resultiert, welche einen Ca^{2+}-Einstrom in benachbarten Astrozyten induziert, diese ebenfalls aktiviert werden und somit angrenzende neuronale Synapsen moduliert werden können [65, 66]. H_2S

beeinflusst diese Ca^{2+}-Welle durch Aktivierung von transient-receptor potential (TRP-) Kanälen, welche entscheidend für die Ca^{2+}-Freisetzung aus intrazellulären Speichern sind [65, 66]. Zu hohe H_2S-Konzentrationen resultieren in einer überschießenden Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und TRP-Kanälen mit einem konsekutiv stark erhöhtem Ca^{2+}-Einstrom bis in toxische Bereiche und einer hieraus folgenden Apoptose der Zelle [62].

Neben diesen Effekten von H_2S zeigt der H_2S-Metabolismus auch bei einigen neuronalen Pathologien Besonderheiten [1, 105]. Im Rahmen des Down Syndroms ist eine Überexpression von CBS, dessen Gen auf Chromosom 21 gelegen ist, zu beobachten [1, 105]. Durch diese Überexpression kommt es in Patienten mit Down Syndrom zu erhöhten H_2S-Spiegeln und einer konsekutiven partiellen Hemmung der oxidativen Energiegewinnung, die zu den funktionellen und neurokognitiven Einschränkungen beitragen könnte [1, 105].

1.8 Schwefelwasserstoff in der Sepsis

Sepsis ist definiert als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion, welche durch eine dysregulierte, überschießende Inflammations- und Immunreaktion auf eine Infektion ausgelöst wird [104, 120]. Mit einer Sterblichkeit von über 10% bzw. über 40% im septischen Schock und einer Inzidenz von 106/100.000 Menschen pro Jahr in Deutschland ist die Sepsis eines der größten Gesundheitsprobleme der Welt [12, 104, 120]. Ein wichtiger Pathomechanismus der Sepsis wird über das in der Zellmembran gram-negativer Bakterien vorkommende LPS vermittelt [13, 23, 49, 59, 104]. LPS ist einer der potentesten Aktivatoren des menschlichen Immunsystems und somit eines der wichtigsten pathogen associated molecular patterns (PAMP) [23]. Neben einer Freisetzung zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren, wie TNFα oder IL-1β, deren Freisetzung überwiegend über eine Interaktion mit Toll-like Rezeptoren vermittelt wird, bewirkt LPS auch eine mitochondriale Dysfunktion mit verändertem Sauerstoffverbrauch [4, 13, 23, 49, 59, 104]. Die LPS-induzierte Endotoxämie führt unter anderem zu vermehrtem oxidativem Stress, einer zunehmenden Entkoppelung der Atmungskette, sowie einem Ca^{2+}-Konzentrationsanstieg in Mitochondrien [4, 13, 104, 147]. Dies mündet in einer zunehmenden mitochondrialen Dysfunktion und Apoptose der Zelle [4, 13, 49, 59, 104].

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass H_2S diesen Effekten von LPS entgegenwirkt [7, 33, 55, 90, 127]. Ähnlich wie in anderen Modellen bewirkt H_2S eine verstärkte Resistenz gegenüber oxidativem Stress, sowie weitere zytoprotektive Effekte [7,

33, 127]. Außerdem reduziert H_2S auch in der Sepsis und in Sepsismodellen die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie TNFα oder IL-1β, IL-6 und IL-8, woraus eine geringere Aktivierung von Immunzellen resultiert [7, 33, 55, 127]. Benedetti et al. zeigten darüber hinaus, dass H_2S in mit Mykoplasmen infizierten Zellen die Translokation von nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF-κB) verhindert und dadurch die Transkription proinflammatorischer Gene minimiert [7]. Auch sekundäre Folgen der Endotoxämie, wie das akute Lungenversagen, traten bei mit H_2S-behandelten Tieren seltener als in der Vergleichsgruppe auf [32].

1.9 Applikation von Schwefelwasserstoff

Oberstes Ziel einer therapeutischen Applikation ist es, die H_2S-Konzentration stets auf niedrigen, nicht-toxischen Spiegeln zu halten, welche gleichzeitig hoch genug sind, um den gewünschten Effekt zu erreichen. Die besonderen chemischen Eigenschaften von H_2S machen eine therapeutische Applikation äußerst schwierig [90, 127, 129]. Hierfür ist zu beachten, dass wenn der gewünschte Effekt eine partielle Hemmung der Atmungskette ist, die H_2S-Konzentration schnell ansteigen sollte, um die Phase der Stimulation der Atmungskette möglichst kurz zu halten. Auch eine zu hohe H_2S-Konzentration und eine hieraus resultierende zellschädigende vollständige Hemmung der Atmungskette ist unbedingt zu verhindern. Hierbei ist die schnelle Metabolisierung von H_2S, sowie eine Abatmung über die Lunge zu beachten [90, 127, 129]. Zum Monitoring der Gewebe-H_2S-Konzentration hat sich die Messung des abgeatmeten H_2S als praktikabelste Lösung erwiesen, da hierdurch Rückschlüsse auf die Gesamtmenge an H_2S im Körper gezogen werden können [127].

Da H_2S bei Raumtemperatur gasförmig vorliegt und sich gut im Blut löst, liegt eine inhalative Applikation nahe [127]. Dies ist allerdings mit verschiedenen Risiken verbunden, wie zum Beispiel einer toxischen H_2S-Konzentration in den Atemwegen und der Lunge, Atemwegsreizungen oder der potenziellen Entflammbarkeit des Gases [127]. Darüberhinaus wäre der äußerst unangenehme und Übelkeit auslösende Geruch eine große Belastung für Patienten und Personal [127]. Nichtsdestotrotz zeigte eine inhalative Applikation in verschiedenen Modellen von Lungenerkrankungen protektive Effekte [32, 33, 127]. So konnte H_2S den durch künstliche Beatmung hervorgerufenen Schaden in Mäusen reduzieren und auch Lungenschäden bei Endotoxämie reduzieren [32, 33, 127].

Neben der inhalativen Applikation gibt es auch die Möglichkeit, H_2S direkt in den Körper zu injizieren [100, 127]. Hierbei kann zwischen schnell und langsam freisetzenden H_2S-Donoren unterschieden werden [100, 127]. Schnell H_2S freisetzende Donoren, wie Na_2S und Natriumhydrogensulfid (NaHS), sind anorganische Schwefelsalze, welche in wässriger Lösung sofort dissoziieren und H_2S freisetzen [100, 127]. Dies führt zu einem schnellen Anstieg der H_2S-Konzentration, welche schnell toxische Bereiche erreichen kann [100, 127]. Neben der raschen Anflutung zeichnen sich Schwefelsalze auch durch einen zügigen Abfall der H_2S-Konzentration aus [127]. In in vitro Experimenten zeigte sich eine Halbwertszeit von 5 bis 30min, welche abhängig vom Zellkulturmedium, Zelllinie, Zelldichte, Temperatur und weiterer Faktoren war [100, 127]. Aus diesen Gründen müssen ähnlich wie bei der inhalativen Applikation Schwefelsalze kontinuierlich infundiert werden [100, 127]. Da sich sowohl eine inhalative als auch eine Applikation als Schwefelsalz als unpraktikabel erwiesen, wurden in der Folge diverse synthetische H_2S-Donoren entwickelt [127].

Diese synthetischen Donoren sollten vier verschiedene Eigenschaften erfüllen: 1. Es muss eine gute Biokompatibilität vorhanden sein, sodass Abbauprodukte nicht toxisch auf Zellen und Gewebe wirken können [127]. 2. Es muss eine langsame, kontrollierte H_2S-Freisetzung erfolgen, damit weder toxische Überdosierungen auftreten, noch kontinuierliche Applikationen notwendig sind [127]. 3. Der Donor muss gut wasserlöslich und gleichzeitig biochemisch stabil genug sein [127]. 4. Für eine potenzielle orale Applikation sollte der H_2S-Donor eine gute orale Bioverfügbarkeit aufweisen [127].

In den letzten Jahren sind zahlreiche H_2S-Donoren, welche mehrere der genannten Eigenschaften erfüllen, entwickelt und untersucht worden [127]. Besonders hervorzuheben ist der erstmals 2008 synthetisierte wasserlösliche, langsam H_2S-freisetzende Donor Morpholin-4-ium-4-Methoxyphenyl(Morpholino) Phosphinodithioat (GYY4137) [81, 127]. GYY4137 setzt bei physiologischer Temperatur und pH-Wert in 25min ca. 4-5% seiner H_2S-Kapazität frei, wodurch relativ hohe Dosen von 50-100mg/kg Körpergewicht in Tierversuchen appliziert werden mussten [127, 81].

1.10 AP39 – Ein langsamer Schwefelwasserstoffdonor

Da der Hauptwirkungsort von H_2S das Mitochondrium ist, wurde im Jahr 2014 der erste mitochondrienspezifische Schwefelwasserstoffdonor (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphoniumbromid (AP39) synthetisiert [79, 127, 129]. AP39 ist ein künstliches Molekül, welches aus der Zieldomäne

Triphenylphosphonium-Bromid (TPP^+) und dem H_2S-freisetzenden Dithiolethion besteht [56, 77, 122]. Triphenylphosphonium-Bromid (TPP^+), welches AP39 im Mitochondrium anreichert, diffundiert als lipophiles Kation frei durch Zellmembranen und reichert sich aufgrund der positiven Ladung in der stark negativ geladenen Mitochondrienmatrix an [58, 79, 129]. Diese chemische Eigenschaft von TPP^+ erzeugt eine 5-10-fache Konzentrationssteigerung von AP39 im Zytoplasma im Vergleich zum Extrazellulärraum und eine weitere 100-500-fache Konzentrierung im Mitochondrium [121, 129]. Zusätzlich ist AP39 aufgrund der freien Membrangängigkeit in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden [58]. Über eine aliphatische Verbindung ist TPP^+ mit dem H_2S-freisetzendem Dithiolethion verbunden [79, 129]. Diese Kombination führt zu einer hochselektiven Anreicherung von AP39 im Mitochondrium, sodass im Vergleich zu Schwefelsalzen bis zu 1000-fach niedrigere Dosen denselben Effekt erzielen [58, 127, 129]. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass AP39 schneller toxische Konzentrationen im Mitochondrium erreichen kann, weshalb die Dosis sehr Bedacht gewählt werden muss [79, 127]. In höheren Konzentrationen wirkt TPP^+ zytotoxisch und verliert die Affinität für Mitochondrien [79, 127]. In Konzentrationen bis 100nM stimuliert AP39 die Atmungskette, während bei höheren Konzentrationen von 300nM die Atmungskette inhibiert wird [58, 127, 129]. Neben den Effekten auf die Atmungskette zeigt AP39 auch weitere Effekte, welche von anderen H_2S-Donoren bekannt sind. AP39 erhält die DNA-Integrität und wirkt zytoprotektiv bei Ischämie/Reperfusionsschäden, bei oxidativem Stress oder im hämorrhagischem Schock [2, 58, 63, 79, 127, 129, 144, 149]. Explizit konnten in vitro zytoprotektive und antioxidative Effekte in Nierenepithelzellen, Endothelzellen verschiedener Gewebe, sowie in Neuronen gezeigt werden [2, 129, 149]. Des Weiteren wurden in einem Ischämie/Reperfusionsmodell an Kardiomyozyten in vitro zytoprotektive Effekte von AP39 gezeigt [63]. Bei Betrachtung verschiedener in vivo Studien bewirkte AP39 eine Verbesserung des neurologischen Outcomes von Mäusen in Ischämie/Reperfusionsmodellen oder bei einer Alzheimer-Demenz [58, 149]. AP39 verbesserte außerdem die Funktion von Nierenepithelzellen von Ratten und verringerte die Apoptoseraten von Kardiomyozyten in Ischämie/Reperfusionsmodellen [2, 63]. Des Weiteren zeigte AP39 antiinflammatorische Effekte in vivo in Mäusen nach Thoraxtrauma und bei hämorrhagischem Schock [144]. Außerdem führt eine Applikation von AP39 zu keiner Ausgasung von H_2S [127]. Zusammenfassend hat AP39 deshalb das Potential als neuer wichtiger H_2S-Donor, andere Applikationsweisen zu ersetzen.

1.11 Fragestellung

In den letzten Jahren ist H_2S zunehmend in den Fokus der Wissenschaft geraten. Mittlerweile ist bekannt, dass H_2S zahlreiche physiologische Funktionen in Säugetieren übernimmt, zytoprotektive Effekte hat und endogen produziert wird [7, 33, 55, 90, 127, 128, 141]. Darüber hinaus stellt die Induktion eines künstlichen Winterschlafs ein mögliches zukünftiges Einsatzgebiet dar [5, 9, 51, 90]. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren eine große Anzahl verschiedener H_2S-Donoren entwickelt und getestet. Einer der vielversprechendsten Donoren ist der sich im Mitochondrium anreichernde, langsam H_2S-freisetzende Donor AP39 [58, 79, 127, 129].

Aufgrund der zahlreichen zytoprotektiven und antiinflammatorischen Effekte, welche in vivo und in vitro gezeigt wurden, dem Fakt, dass H_2S vor allem im Mitochondrium seine Wirkung entfaltet, sowie der Eigenschaft der Induktion eines künstlichen Winterschlafs, liegt es nahe, die Auswirkungen von H_2S in einem Inflammationsmodell tiefergehend zu untersuchen. Allerdings existieren aktuell nur wenige Studien über die Auswirkungen von H_2S in einer LPS-induzierten Inflammation [7]. Die meisten Studien, welche dieses Thema behandeln, untersuchten die Auswirkungen von H_2S auf die Expression und Freisetzung von Mediatoren, die Bildung von ROS und die Resistenz gegenüber oxidativem Stress, sowie das Überleben der Zellen [7]. Dem gegenüber sind die Wirkungen von H_2S auf Mitochondrien und explizit die Atmungskette während einer Inflammation weitgehend unerforscht. Bei Betrachtung der Auswirkungen von H_2S auf Neurone nach LPS-Gabe ist die Datenlage noch weitaus dünner. Insbesondere die Verwendung von AP39 als H_2S-Donor kann aufgrund der hohen Affinität für Mitochondrien und der hieraus resultierenden geringeren Applikationsmenge und potenziell geringeren Nebenwirkungen neue Optionen in der Behandlung von Inflammationsreaktionen eröffnen. Deshalb habe ich mich in der vorliegenden Dissertation mit den Auswirkungen von H_2S auf die Atmungskette von Neuronen in einem Inflammationsmodell mit LPS beschäftigt.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollen folgende Fragen geklärt werden:

1. Welche Auswirkungen hat der H_2S-Donor AP39 auf die Atmungskette von Neuronen und zeigen diese Effekte eine zeitliche Dynamik?
2. Sind die Effekte von AP39 in einem Inflammationsmodell mit LPS ebenfalls vorhanden?
3. Welche Auswirkungen hat AP39 auf die H_2O_2-Produktion von Neuronen während und ohne Inflammation?

4. Zeigt eine AP39-Stimulation Effekte auf die Produktion von NO, sowie die mitochondriale Masse und Funktion?

2. Material und Methoden

2.1 Übersicht über die verwendeten Materialien

2.1.1 Reagenzien

Tabelle 1: Reagenzien, welche für die Zellkultur verwendet wurden. Dimethylsulfoxid (DMSO), Natriumchlorid (NaCl).

Zellkultur	
AP39 ([(10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphoniumbromide) (2mM in DMSO) Anwendung: 10nM in Neurobasal-Medium Lagerung: -20°C	Zur Verfügung gestellt von Matthew Whiteman, University of Exeter Medical School, St. Luke's Campus, Großbritannien
B27 Supplement (50x) Anwendung: 2% in Neurobasal-Medium Lagerung: -20°C	Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA
Deoxyribonuclease I (50-375U/µl) Anwendung: 100µl/ml Dulbecco's Modified Eagle Medium Lagerung: -20°C	Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA
Destilliertes Wasser (dH_2O) (Ampuwa) Lagerung: Raumtemperatur	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1x) Lagerung: 4°C	Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA
Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS) Lagerung: Raumtemperatur	Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA
Fetales Rinderserum (FBS) Superior (inaktiviert) Anwendung: 10% in Neurobasal-Medium oder DMEM Lagerung: -20°C	Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA

GlutaMAX Supplement (100x) (200mM L-Alanyl-L-Glutamin-Dipeptid in 0,85% NaCl-Lösung) Anwendung: 1% in Neurobasal-Medium oder DMEM Lagerung: -20°C	Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (1x) (klar) Lagerung: Raumtemperatur	Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (1x) (+Phenolrot) Lagerung: Raumtemperatur	Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA
Lipopolysaccharid (LPS) (von E. coli O111:B4) Anwendung: 1µg/ml Neurobasal-Medium Lagerung: -80°C	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Neurobasal-Medium Lagerung: 4°C	Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA
Penicillin/Streptomycin (5000U/ml) Anwendung: 1% in Neurobasal-Medium oder DMEM Lagerung: -20°C	Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA
Poly-L-Lysin Hydrobromid Anwendung: 0,05mg/ml HBSS Lagerung: -20°C	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (0,25%); (+Phenolrot) Lagerung: -20°C	Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA

Tabelle 2: Mitochondrial Respiration Medium (MiR05) Zusammensetzung. Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung des mitochondrialen Atmungsmediums MiR05 pro 250 ml.

Substrat	Menge für 250 ml [mg]	Finale Konzentration [mM]
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N′,N′-tetraessigsäure (EGTA)	47	0,5
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	71	3
Lactobionsäure	5375	60
Taurin	625	20
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	340	10
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES)	1191	20
D-Sucrose	9413	110
Bovines Serum Albumin (BSA)	25	1 [g/l]

Tabelle 3: Reagenzien, welche zur Durchführung der Experimente am Oroboros O2k verwendet wurden. Dimethylsulfoxid (DMSO), Wasser (H_2O), Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).

High-Resolution Respirometry und ROS-Messung	
Amplex UltraRed (10mM in DMSO) Anwendung: 10µM Lagerung: -20°C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Antimycin A (5mM in Ethanol) Anwendung: 2,5µM Lagerung: -20°C	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Ascorbat (0,8mM in H_2O) Anwendung: 2mM Lagerung: -20°C	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Carbonilcyanid-p-Triflouromethoxyphenylhydrazon (FCCP) (0,5mM in Ethanol) Anwendung: 0,375-0,625µM Lagerung: -20°C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Cytochrom C (4mM in H_2O) Anwendung: 10µM Lagerung: -20°C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Glutamat (2M in H_2O) Anwendung: 10mM Lagerung: -20°C	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Horse Radish Peroxide (HRP) (500U/ml in Mitochondrial Respiration Medium) Anwendung: 1U/ml Lagerung: -20°C	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Malat (0,8M in H_2O) Anwendung: 5mM Lagerung: -20°C	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Mitochondrial Respiration Medium (MirO5) Lagerung: -20°C	Aus eigener Herstellung entsprechend dem Protokoll von: OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Österreich [44]
Natriumsulfid (Na_2S) (2mM in H_2O) Anwendung: 40µM Lagerung: -80°C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Oligomycin (5mM in Ethanol) Anwendung: 2,5µM Lagerung: -20°C	Biomol, Hamburg, Deutschland

Pyruvat (2M in H_2O) Anwendung: 10mM Lagerung: -20°C	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Rotenon (0,1mM in Ethanol) Anwendung: 0,1µM Lagerung: -20°C	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Salzsäure (HCl) (1mM in H_2O) Lagerung: Raumtemperatur	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Succinat (1M in H_2O) Anwendung: 10mM Lagerung: -20°C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Superoxiddismutase (SOD) (10U/µl in 3.8M Ammoniumsulfat, pH 7.0) Anwendung: 5U/ml Lagerung: -20°C	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tetramethylphenylendiamin (TMPD) (0,2M in H_2O) Anwendung: 0,5mM Lagerung: -20°C	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (880mM in H_2O) Anwendung: 0,1µM Lagerung: 4°C	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 4: Reagenzien, die zur Bestimmung der Citrat-Synthase Aktivität verwendet wurden.

Citrat-Synthase Aktivitätsbestimmung	
Acetyl-Coenzym A (12,2mM) Anwendung: 0,31mM Lagerung: -20°C	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Citrat-Synthase (200U/mg) Anwendung: 3,44U/ml Lagerung: 4°C	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Destilliertes Wasser (dH_2O) (Ampuwa) Lagerung: Raumtemperatur	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Dithionitrobenzoesäure (DTNB) (1,01mM in Tris(hydroxmethyl)aminomethan) Anwendung: 0,1mM Lagerung: Raumtemperatur	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Oxalacetat (10mM in Tris(hydroxmethyl)aminomethan) Anwendung: 0,5mM Lagerung: -20°C	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Triton X-100 (Octoxinol 9) (10% in H_2O) Anwendung: 0,25% Lagerung: 4°C	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 5: Reagenzien, die für den Citrat-Synthase Aktivitätsassay benötigt werden. In der zweiten Spalte ist das Volumen und in der dritten Spalte die finale Konzentration in einer Küvette angegeben. Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA), Dithionitrobenzoesäure (DTNB).

Substrat	Volumen	finale Konzentration
Destilliertes Wasser (dH_2O)	533,4µl	-
Triton X-100 (10%) (Octoxinol 9)	25µl	0,25%
Acetyl-CoA	25µl	0,31mM
DTNB (1,01mM)	100µl	0,101mM
Zellsuspension (750.000 Zellen/ml)	266,6µl	200.000 Zellen/ml
Oxalacetat (10mM)	50µl	0,5mM

Tabelle 6: Reagenzien, welche zur Durchführung der Western Blots verwendet wurden. Wasser (H_2O), Meerrettichperoxidase (HRP), Immunglobulin-G (IgG).

Western Blot	
Acrylamid/Bis-Lösung (37,5:1 in H_2O) Lagerung: 4°C	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumpersulfat Lagerung: Raumtemperatur	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Anti-β-Actin Antikörper Anwendung: 1:25.000 Lagerung: 4°C	Santa Cruz, Dallas, Texas, USA
Anti-Cytochrom-C-Oxidase-4 Antikörper Anwendung: 1:1.000 Lagerung: -20°C	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
Anti-Cytochrom-C-Oxidase-5A Antikörper Anwendung: 1:2.000 Lagerung: 4°C	Abcam, Cambridge, Großbritannien

Anti-Cytochrom-C-Oxidase-5B Antikörper Anwendung: 1:1.000 Lagerung: 4°C	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-glial fibrillary acidic protein Antikörper Anwendung: 1:1.000 Lagerung: -20°C	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-inducible nitric oxide synthase Antikörper Anwendung: 1:1.000 Lagerung: -20°C	Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA
Anti-mouse, HRP-linked Antikörper, IgG Anwendung: 1:10.000 Lagerung: -20°C	Cell Signaling, Cambridge, Großbritannien
Anti-neuronal nitric oxide synthase Antikörper Anwendung: 1:10.000 Lagerung: -20°C	Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA
Anti-Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α Anwendung: 1:10.000 Lagerung: -20°C	Novus Biologicals, Centennial, Colorado, USA
Anti-rabbit, HRP-linked Antikörper, IgG Anwendung: 1:2.000 Lagerung: -20°C	Cell Signaling, Cambridge, Großbritannien
Anti-Vinculin Antikörper Anwendung: 1:5.000 Lagerung: 4°C	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Bromphenolblau Lagerung: Raumtemperatur	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

BSA (Bovines Serum Albumin), Fraction V, pH=7,0 Lagerung: 4°C	GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA
Colormarker Kaleidoscope Standards Precision Plus Protein Lagerung: -20°C	Bio Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Coomassie Blue Färbelösung Lagerung: Raumtemperatur	Bio Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Destilliertes Wasser (dH_2O) (Ampuwa) Lagerung: Raumtemperatur	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS) Lagerung: Raumtemperatur	Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Lagerung: Raumtemperatur	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Entwicklerkit: **Lumi GLO Reagent A** **Peroxide Reagent B** Lagerung: 4°C	Cell Signaling, Cambridge, Großbritannien
Ethanol (99,9%) Lagerung: Raumtemperatur	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Glycerol Lagerung: Raumtemperatur	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Glycin Lagerung: Raumtemperatur	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (HCl) (32%) Lagerung: Raumtemperatur	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver Lagerung: Raumtemperatur	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Natriumchlorid (NaCl) Lagerung: Raumtemperatur	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ponceau S Lagerung: Raumtemperatur	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Pufferlösungen (pH=4 und pH=7) Lagerung: Raumtemperatur	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumdodecylsulfat- (SDS-) Pellets Lagerung: Raumtemperatur	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED) Lagerung: Raumtemperatur	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tris(hydroxmethyl)aminomethan (Tris) Lagerung: Raumtemperatur	USB Corporation, Cleveland, Ohio USA
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat (Tween-20) Lagerung: Raumtemperatur	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
2-Mercaptoethanol Lagerung: 4°C	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 7: Reagenzien, die für die Herstellung des für die Western Blots benötigten Lysepuffer verwendet wurden. In Spalte 2 ist die finale Konzentration angegeben.

Substrat	Konzentration
Destilliertes Wasser (dH_2O)	-
Natriumchlorid (NaCl)	500mM
Tris(hydroxmethyl)aminomethan (Tris)	100mM
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	6mM
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N′,N′-tetraessigsäure (EGTA)	6mM
Dithiothreitol (DTT)	2mM
Leupeptin	1mM
Triton X100 (Octoxinol 9)	2%
Nonyl-Phenoxypolyethoxylethanol (NP40)	1%

Tabelle 8: Konzentrationsangaben der Reagenzien, welche für die Western Blot Gele benötigt wurden.

Reagenz	Trenngel (60ml)	Sammelgel (30ml)
Acrylamid	5-15%	4,5%
Tris(hydroxmethyl)aminomethan (Tris)	5%	2%
Natriumdodecylsulfat (SDS) (0,5%)	0,125%	0,125%
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	0,05%	0,025%
Ammoniumpersulfat (APS)	0,5%	0,25%

Tabelle 9: Reagenzien, die für die Herstellung des für die Western Blots benötigten Blotpuffers verwendet wurden. In Spalte 2 ist die finale Konzentration angegeben.

Substrat	Konzentration
Destilliertes Wasser (dH_2O)	-
Methanol	20%
Glycin	1,4%
Tris(hydroxmethyl)aminomethan (Tris)	0,3%

Tabelle 10: Reagenzien, die für die Herstellung des für die Western Blots benötigten Blotto B-Puffers verwendet wurden. In Spalte 2 ist die finale Konzentration angegeben.

Substrat	Konzentration
tris buffered saline (TBS) (2,5% Tris(hydroxmethyl)aminomethan, 8% Natriumchlorid in destilliertem Wasser)	97,9%
Bovines Serum Albumin (BSA)	1%
Milchpulver	1%
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat (Tween-20)	0,1%

2.1.2 Werkzeuge und Materialien

Tabelle 11: Materialien, die für die Zellkultur verwendet wurden.

Zellkultur	
Eppendorf Pipettenspitzen (2µl, 10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Serological Pipets (2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
CL-XPosure Film (für Meerrettichperoxidase)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Falcon Tubes (10ml, 50ml)	BD Biosciences, Bedford, USA
Hamilton-Spritzen (10µl, 25µl, 50µl)	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Küvetten 1,5ml halbmikro (Polymethylmethacrylat)	Brand, Wertheim (Main), Deutschland
Medical X-Ray film CX-BL	AGFA Healthcare AG, Bonn, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Nitrocellulose Blotting Membran	GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA
T75-Flasc (75 cm^2) Nunc™ EasYFlask™ Zellkulturflaschen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Whatman Chromatographiepapier	GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA
Filtropur S.02 (0,2µM Cellulose-Acetat Filter)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
EASYstrainer 100µm - sterile Filter	greiner bio one, Kremsmünster, Österreich

2.1.3 Technische Geräte und Datenauswertung

Tabelle 12: Technische Geräte, welche in dieser Dissertation verwendet wurden.

Technische Geräte	
Autoklav Systec 2540 EL	Systec, Linden, Deutschland
Centrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kohlenstoffdioxid-Inkubator Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Eismaschine B-190	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Elektrophorese Kammern Mini-Protean	Bio Rad, Hercules, USA
Entwicklerkassetten Hypercassette	GE Healthcare, Buckingshamshire, Großbritannien
Entwicklermaschine CP 1000	AGFA Healthcare AG, Bonn, Deutschland
Inversmikroskop Olympus CXK41	Olympus, Shinjuku, Japan
Oxygraph O2k	Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria
O2k-Fluorometer	Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria
Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research, Quebec, Canada
Photometer Spectra Max190	Molecular Devices, San Jose, Kalifornien, USA
Pipettierhilfe Pipetboy Acu	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Power Pac 200	Bio Rad, Hercules, USA
Power Pac 3000	Bio Rad, Hercules, USA
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Shaker S4, DRS-12	Elmi, Riga, Lettland

Spektralphotometer Gene Quant Pro	GE Healthcare, Buckinshamshire, Großbritannien
Trans-Blot SP Semi Dry Transfer Cell	Bio Rad, Hercules, USA
Ultraschall-Homogenisator Sonopuls	Brandelin, Berlin, Deutschland
Ultra Turrax T25 Homogenisator	IKA Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Vortex Type 16700 Mixer Maxi Mix 1	Thermo Scientific, Waltham, USA
Waage BP 310 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	ISMATEC SA, Labortechnik – Analytik, Glattbrugg, Schweiz

Tabelle 13: Software-Programme, welche für die Datenauswertung verwendet wurden.

Datenauswertung und Software	
Chemische Struktursuche	Fisher Scientific, Hampton, USA
DatLab 6	ssn.at und Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich
Graphpad Prism 8	GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA
ImageJ/Fiji	NIH, Bethesda, Maryland, USA
Microsoft Office365 (Powerpoint, Excel, Word)	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

2.2 Zellkultur und Stimulation

2.2.1 Embryonale Neuronenzellkultur

Alle Experimente, wurden an primären embryonalen corticalen Rattenneuronen (PCN), die in Zellkultur kultiviert wurden, durchgeführt. Hierfür wurden ausschließlich Embryonen der Rattenlinie Sprague-Dawley verwendet, welche vom Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Ulm unter der Leitung von Professor Tobias Böckers und der Mithilfe von Professor Nicola Gohlenhofen und Doktor Michael Schön zur Verfügung gestellt wurden [115]. Im Rahmen dieser Dissertation wurden ausschließlich Neurone aus dem frontalen und präfrontalen Cortex von Embryonen am 18. Tag nach Konzeption entnommen. Die Tötung des trächtigen

Weibchens und der Embryonen erfolgte durch Mitarbeiter des Instituts für Anatomie und Zellbiologie nach Genehmigung und den gültigen rechtlichen Standards. Ein vorheriges positives Votum der Ehtikkommission der Universität Ulm liegt unter dem Aktenzeichen O.103 vor. Die Entnahme und Präparierung der Gehirne erfolgte entsprechend bewährter Protokolle des Instituts für Anatomie und Zellbiologie [115]. Die Präparation der Zellen erfolgte durch mich oder Mitarbeiter des Instituts für Anatomie und Zellbiologie.

Um die embryonalen Gehirne entnehmen zu können, wurde das trächtige Muttertier an Tag 18 post conceptionem zunächst mit Kohlenstoffdioxid getötet. Nach Feststellung des Todes wurde das Weibchen mit Hilfe einer Guillotine dekapitiert und anschließend über eine mediane Laparotomie der Uterus entnommen. Anschließend wurden aus dem entnommenen Uterus schnellstmöglich die Embryonen geborgen und sofort ebenfalls dekapitiert. Daraufhin wurde unter mikroskopischer Vergrößerung der embryonale Schädel eröffnet, die Gehirne auf Höhe des Hirnstamms vom restlichen Nervengewebe getrennt und in eisgekühlter Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) Pufferlösung die Meningen mittels stumpfer Präparation entfernt. Anschließend wurden die Gehirnhälften in ein neues Gefäß mit eisgekühlter HBSS überführt, um Kontaminationen durch in der Lösung schwimmende nicht-neuronale Zellen so gering wie möglich zu halten. Daraufhin wurde unter dem Mikroskop der präfrontale und frontale Cortex abgetrennt und erneut in ein neues Gefäß mit eisgekühlter HBSS überführt. Diese Schritte wurden vor Ort im Institut für Anatomie und Zellbiologie durchgeführt.

Nach dem Transport wurden die Cortexstücke unter einer Sterilbank weiterbearbeitet. Zunächst wurde aus dem Transportgefäß, in welchem die Cortices transportiert wurden, die überschüssige kalte HBSS abpipettiert. Anschließend wurde das Gefäß wieder mit 10ml auf 37°C und 5% Kohlenstoffdioxidanteil äquilibrierter HBSS aufgefüllt. Um die Kohlenstoffdioxidkonzentration (CO_2) und damit den pH-Wert abschätzen zu können, wurde HBSS mit dem pH-Indikator Phenolrot verwendet. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt, bevor die HBSS erneut fast komplett abpipettiert wurde. Anschließend wurden 4ml ebenfalls auf 37°C und 5% CO_2-Konzentration äquilibrierte Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lösung mit einer Trypsin-Konzentration von 0,25% sowie Phenolrot auf die Cortexstücke gegeben. Nach kurzem Schwenken des Gefäßes wurden die Zellen im Inkubator (Heracell 150i) bei 37°C und 5% CO_2 für 18min lysiert. Währenddessen wurde das Gefäß alle 3-4min vorsichtig geschwenkt, um den Lyseprozess zu beschleunigen. Nach Verstreichen der Zeit wurde das Trypsin-EDTA wieder größtmöglich entfernt und es wurden 10ml speziell erweitertes Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) zum Inaktiveren des Trypsins

hinzugegeben. Das DMEM wurde mit 10% fetalem Rinderserum (FBS, bei 60°C für 30 inaktiviert), 1% GlutaMAX (reaktionsstabiles Glutamin) und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung erweitert. Es wurde stets das durch diese Zusätze erweiterte Medium verwendet. Nach kurzem Schwenken wurde das Medium erneut abpipettiert und der Vorgang ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde das DMEM mit den darin enthaltenen Gehirnstückchen bis auf 1,8ml entfernt und 200µl DNAse hinzugegeben. Hierdurch wird ein Verkleben der einzelnen Zellen durch während der Präparation und Lyse freigesetzte DNA verhindert. Um die durch das Trypsin gelösten Zellverbände voneinander zu trennen, wurden nun die Cortices in der 2ml DMEM/DNAse-Lösung mehrfach mit einer 1000µl Pipette langsam auf- und abpipettiert, bis die Lösung makroskopisch homogen war. Anschließend wurde das Zelllysat mit einem 100µm Filter filtriert, um gröbere Verunreinigungen und nicht lysierte Zellverbände zu entfernen. Das Filtrat wurde daraufhin wieder auf 20ml mit äquilibrierten DMEM aufgefüllt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in einer Neubauer Zählkammer gezählt und entsprechend der Zellkonzentration auf die Zellkulturflaschen verteilt. In den Zellkulturflaschen wurden vor Verteilung der Zellen bereits 9ml äquilibriertes Neurobasalmedium vorgehalten. Da Brewer et al. gezeigt hatten, dass eine Neuronenzellkultur in Neurobasalmedium mit dem Zusatz B27 bei einer Zelldichte ab 160 Zellen pro Quadratmillimeter ein optimales Wachstum unabhängig von der Zelldichte aufweist, ermittelten wir in mehreren Vorversuchen die für unsere Experimente optimale Zelldichte [10, 11] (62; 63). Hierbei ergaben sich die besten Resultate für eine Zelldichte von 400 Zellen pro Quadratmillimeter. Dies entspricht einer Zellkonzentration von 300.000 Zellen/ml Zellmedium und einer Anzahl von 3.000.000 Zellen pro T75-Flasche.

Damit die Neurone auf dem Grund der Flaschen optimal anhaften und sich entwickeln können, wurden die Behälter 1-2 Tage vor Befüllung mit Poly-L-Lysine beschichtet. Hierfür wurde das Poly-L-Lysine mit einer Konzentration von 0,05 mg/ml in HBSS gelöst und auf den Untergrund der Zellkulturbehälter aufgetragen. Die Lösung wurde für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 in den Behältnissen belassen. Anschließend wurde die Poly-L-Lysine/HBSS-Lösung abpipettiert und die Behälter drei Mal mit sterilem H_2O gewaschen und anschließend mit 8 ml DMEM bei 37°C und 5% CO_2 im Inkubator gelagert. Vor Befüllung der Flaschen mit den Neuronen wurde das DMEM durch 9ml Neurobasalmedium ersetzt.

Das für die Neuronenzellkultur verwendete Neurobasalmedium wurde ähnlich wie DMEM vor Verwendung in der Zellkultur durch mehrere Zusätze erweitert. Um ein optimales Wachstum der Neurone zu gewährleisten wurden dem Medium 2mM GlutaMAX hinzugefügt [150] (64).

GlutaMAX enthält L-Alanyl-L-Glutamin-Dipeptid, welches im Vergleich zu L-Glutamin eine deutlich höhere Stabilität besitzt [150]. Das Dipeptid zerfällt nur bei Bedarf zu Glutamin, sodass über einen längeren Zeitraum konstante L-Glutaminkonzentrationen aufrechterhalten werden können [150]. Darüber hinaus zerfällt L-Alanyl-L-Glutamin-Dipeptid in deutlich geringerem Umfang zu zytotoxischem Ammoniak [150]. Durch diese Eigenschaft kann der Zeitraum zwischen den Mediumwechseln deutlich verlängert werden, wodurch das Wachstum der Neurone verbessert wird. Außerdem wurden, um ein Bakterienwachstum zu verhindern, 48 U/ml Penicillin/Streptomycin hinzugefügt. Zusätzlich applizierten wir 2% B-27 Supplement. B27 hemmt das Wachstum der neuronalen Glia, sodass in der Zellkultur eine hohe Neuronenreinheit erreicht wird [10, 11].

Um Zelldetritus, welcher während der Präparation angefallen ist, zu entfernen, wurde 3 bis 4 Stunden nach Aussaat der Zellen ein vollständiger Mediumwechsel durchgeführt. Nach dieser Zeit haben sich die vitalen Zellen bereits vollständig auf dem beschichteten Boden der Flaschen festgesetzt, während tote Zellen und Zelldetritus im Medium schwimmen, sodass dieser Mediumwechsel bereits problemlos möglich ist und eine gute Reinigungsmöglichkeit darstellt [115]. Hierbei wurden zunächst die 10ml Medium in der Zellkulturflasche abpipettiert und durch 10ml Neurobasalmedium mit den bereits genannten Zusätzen ersetzt. Ein weiterer vollständiger Mediumwechsel fand 24 Stunden nach Aussaat statt. Da die Neurone und vor allem die neuronale Glia zahlreiche Wachstumsfaktoren und andere Mediatoren, welche für ein gutes Zellwachstum essenziell sind, bildet, ist es wichtig, dass diese bei weiteren Mediumwechseln erhalten bleiben [122]. Aus diesem Grund wurde bei den darauffolgenden Mediumwechseln nur die Hälfte des Mediums entfernt und durch dieselbe Menge an neuem Neurobasalmedium ersetzt. Diese Mediumwechsel wurden am 8., 15. und 22. Tag in Kultur durchgeführt.

Insgesamt wurden die Zellen 21 bis 24 Tage kultiviert, bevor sie für Experimente verwendet wurden. Um die embryonalen Zellen für Experimente nutzen zu können, musste zunächst die ca. siebentägige Zellreifung und die hieran anschließende Wachstumsphase abgewartet werden [26]. Während dieser Wachstumsperiode wurde außerdem die Glia in ihrer Funktion durch B27 gehemmt, sodass mit zunehmender Dauer der Zellkultur diese zunehmend apoptotisch wurde [10, 11]. Wie bereits in Vorstudien festgestellt werden konnte, ist ein adultes Entwicklungsstadium der Neurone bei gleichzeitig niedriger Gliakonzentration ab dem 14. Tag in Kultur zu erwarten [115]. Zur Ermittlung des optimalen Messzeitpunktes führte ich Messungen des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs ab Tag 14 in Kultur durch. Im Rahmen

dessen konnte gezeigt werden, dass zwischen Tag 21 und 24 in Kultur der Sauerstoffverbrauch der Zellen konstant ist, sodass in diesem Zeitraum sämtliche Experimente durchgeführt wurden.

2.2.3 Stimulation der Neuronenzellkultur

In Vorversuchen an immortalisierten Nierenepithelzellen der Ratte (NRK) untersuchten wir geeignete Messzeitpunkte nach Stimulation, an welchen AP39 sichtbare Effekte auf den Sauerstoffverbrauch der Zellen zeigt. Deshalb führten wir Experimente nach 15 min, sowie nach 2, 4, 8, 24 und 48 Stunden Inkubationszeit mit AP39 bzw. einer Dimethylsulfoxid (DMSO-) Kontrolle durch. Wir konnten anhand dieser Vorversuche ermitteln, dass AP39 nach 15 Minuten noch keinen messbaren Effekt auf den Sauerstoffverbrauch der NRK hatte. Nach 2 Stunden konnten wir dagegen bereits deutliche Effekte auf die Zellatmung nachweisen. Die Ergebnisse der Experimente, welche nach 4 Stunden Inkubationszeit durchgeführt wurden, ergaben keine signifikanten Unterschiede zu der Gruppe der Zellen mit 2 Stunden Inkubationszeit. Signifikante Ergebnisse konnten wir weiterhin für eine Stimulation von 24 Stunden nachweisen. Im Vergleich mit den Ergebnissen nach 2 und 24 Stunden Stimulationszeit, zeigten die Zellen nach 8 Stunden bereits dieselben Tendenzen wie nach 24 Stunden Stimulation. Allerdings waren diese Ergebnisse nach 24 Stunden deutlicher. Nach 48 Stunden Stimulation erhielten wir sehr ähnliche Ergebnisse wie nach einer 24-stündigen Stimulation. Sämtliche Experimente an den NRK wurden von Daniel Kupka und mir durchgeführt. Neben der Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs wurde auch die simultane ROS-Produktion der Zellen ermittelt. Auf die Ergebnisse der Experimente mit NRK wird an dieser Stelle nicht weiter eingegangen.

Zusammenfassend entschieden wir uns deshalb, diese sechs Versuchszeitpunkte auf ein aussagekräftiges Minimum zu reduzieren. Hierbei wählten wir die Untersuchungszeitpunkte 2 und 24 Stunden, da zu diesen Zeitpunkten in den Vorversuchen mit NRK signifikante Ergebnisse gezeigt werden konnten und die anderen Zeitpunkte gegenüber der Kontrolle (15 Minuten Stimulation) bzw. gegenüber den gewählten Untersuchungszeitpunkten (4, 8, und 48 Stunden) keine signifikanten Unterschiede ergaben.

2.2.3.1 AP39-Stimulation

Um in Kohärenz mit anderen Publikationen aus meinem Institut zu sein, wurden alle Experimente mit einer AP39 Konzentration von 10nM durchgeführt [144]. Da AP39 in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst ist, wurde deshalb AP39 stets mit einer Konzentration von

0,1µl/ml DMSO in Neurobasalmedium appliziert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit 0,1µl/ml DMSO inkubiert.

Da wie bereits erwähnt die Konzentration an Wachstumsfaktoren und anderen Mediatoren für eine physiologische Neuronenkultur von elementarer Bedeutung ist, wurde das Neurobasalmedium auf den Zellen belassen. Nachdem sichergestellt wurde, dass die exakte Menge an Neurobasalmedium in der Zellkulturflasche vorhanden ist, wurden die Neurone mit AP39 und DMSO oder nur mit DMSO stimuliert. Um eine möglichst exakte Menge zu applizieren, wurde direkt vor der Stimulation eine höher konzentrierte Lösung mit einer Konzentration von 1000nM AP39 in 0,1µl/ml DMSO mit Neurobasalmedium und den dazugehörigen Zusätzen hergestellt, welche anschließend auf die finale Konzentration von 10nM mit Neurobasalmedium verdünnt wurde. Für eine gute Löslichkeit des H_2S-Donors wurden außerdem noch 9,9µl DMSO hinzugefügt. Nach Vermischen der Stimulantien im Zellkulturmedium wurden die Zellkulturflaschen für die Zeit der Inkubation im Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 gelagert. Die Stimulation der DMSO-Kontrollgruppe wurde auf eine ähnliche Art realisiert. Hierbei wurden 10µl DMSO appliziert. Nachfolgend fand die Inkubation ebenfalls bei 37°C und 5% CO_2 statt.

2.2.3.2 LPS-Stimulation

In der Hälfte der Experimente wurden die Zellen vor einer Inkubation mit AP39 oder DMSO zunächst mit LPS stimuliert. Hierfür wurde eine Zielkonzentration von 1µg/ml LPS in Neurobasalmedium angestrebt. Um die Wirkung von AP39 während einer LPS-Stimulation zu untersuchen, mussten die Zellen vor Applikation des AP39 mit LPS stimuliert werden. Aus diesem Grund wurden 30 Minuten vor der AP39-Gabe die Neurone mit LPS des Bakteriums Escherichia coli inkubiert. Zur Stimulation wurden 100µl einer 100µg/ml LPS in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)-Lösung in jede Zellkulturflasche gegeben. Folglich ergab sich eine Konzentration von 1µg/ml LPS im Zellkulturmedium. Nach dieser Stimulation wurden die Zellen kongruent zur AP39/DMSO Stimulation bei 37°C und 5% CO_2 für 30min inkubiert. Nachfolgend wurden die AP39 oder DMSO Stimulationen durchgeführt bzw. die Zellen direkt für Experimente als 30min LPS Kontrollgruppe verwendet.

2.3 High-Resolution Respirometry (HRR)

Die High-Resolution Respirometry ist die wichtigste Methode im Rahmen dieser Dissertation. Mit Hilfe des Oxygraph O2k (Oroboros Instruments) ist es möglich, die Sauerstoffkonzentration bzw. Sauerstoffkonzentrationsveränderungen in einer Lösung in Echtzeit mit einer Genauigkeit von 1 $\frac{pmol}{s \cdot ml}$ darzustellen [38]. Die Messungen werden in zwei getrennten Versuchskammern durchgeführt, in welchen die Zellen in 2ml bei auf Raumluft und 37°C äquilibriertem Mitochondrial Respiration Medium (MirO5) suspendiert sind und stets mittels Rührfisch bei 750 Umdrehungen pro Minute homogen durchmischt werden. Simultan zu dieser live in vitro Sauerstoffmessung können verschiedene andere Messungen in Echtzeit durchgeführt werden. Im Rahmen meiner Forschung führte ich hierbei fluorometrische Messungen der H_2O_2-Konzentration durch. Mit dieser Methode konnte ich sowohl den Sauerstoffverbrauch der Neurone als auch die H_2O_2-Produktion und -konzentration quantifizieren. Durch die Zugabe verschiedener Substrate und Inhibitoren der einzelnen Komplexe der mitochondrialen Atmungskette ist es möglich, den Effekt jedes einzelnen Enzyms auf den Sauerstoffverbrauch der Zellen zu ermitteln. Durch die simultane Messung der H_2O_2-Konzentration wurden darüber hinaus auch die Veränderungen in der H_2O_2-Produktion gemessen, sodass wir Rückschlüsse darüber ziehen konnten, wie sich die H_2O_2-Produktion in Relation zum Sauerstoffverbrauch ändert.

2.3.1 Vorbereitung der Zellen

Für die Messungen mit dem Oxygraph O2k müssen die Zellen in einer MirO5-Suspension vorliegen. Die Herstellung von MirO5 wurde entsprechend der Publikation von Gnaiger et al. mit dem dazugehörigen Kit durchgeführt und ist in Tabelle 2 dargestellt [38, 43, 44]. Des Weiteren müssen die Zellenmembranen permeabilisiert sein, damit zum einen die zelleigenen Substrate der Atmungskette den Zellen verloren gehen und zum anderen die hinzugegebenen Substrate und Inhibitoren an der Atmungskette ihre Wirkung entfalten können. Um die Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen zu lösen, wurden sie mit einem Zellschaber abgekratzt und im Zellkulturmedium gelöst. Hierdurch wurde außerdem die Zellmembran der Neurone permeabilisiert, sodass eine biochemische Permeabilsiation zum Beispiel mit Trypsin nicht mehr nötig war. Für die Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs wurde eine Zellzahl von 750.000 Zellen/ml angestrebt. Entsprechend wurden die Zellen einer Zellkulturflasche auf zwei Gefäße und damit auf zwei Versuchskammern aufgeteilt. Um die Messung von H_2O_2 auf einem genauen Niveau durchzuführen, wurde für diese Experimente die

doppelte Zellzahl von 1.500.000 Zellen pro Milliliter gewählt, da H_2O_2 in nur in sehr geringen und damit schwer detektierbaren Mengen gebildet wird. Nach der Aufteilung der Zellen wurden diese in einer Zentrifuge bei einer Zentripetalkraft von 600g für 4min bei 4°C zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abpipettiert und durch auf 37°C und Raumluft äquilibriertes MirO5 ersetzt. Für die Experimente zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs wurden 2,2ml MirO5 hinzugegeben, während für die Experimente mit simultaner H_2O_2-Konzentrationsmessung 200µl MirO5 appliziert wurden. Anschließend wurden die Zellen im neuen Medium resuspendiert und in die Versuchskammern des Oxygraph O2k pipettiert.

2.3.2 Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs (JO_2)

Bevor die Experimente am Oxygraph O2k durchgeführt werden können, muss das Gerät zuerst kalibriert werden. Hierfür wird der Oxygraph bei einer Temperatur von 37°C und einem Druck von 94,8kPa auf eine Sauerstoffkonzentration von circa 180nmol/ml im Medium MirO5 kalibriert. Die sauerstoffmessenden Clarke-Elektroden wurden mit einer Polarisationsspannung von 800mV und einem Gain von 4 eingesetzt.

Nach erfolgreicher Kalibration wurden die Zellen, welche in MirO5 suspendiert waren, in die zwei Kammern des Oxygraph O2k gegeben und diese Kammern mit einem Stopfen verschlossen, sodass exakt 2 ml Zellsuspension und keine Luft in der Kammer waren. Die Daten, welche der Oxygraph O2k generierte, wurden mit der Software DatLab 6 (ssn.at und Oroboros Instruments), visualisiert und ausgewertet. Mit Hilfe dieser Software kann die Sauerstoffkonzentration in den Kammern im zeitlichen Verlauf angezeigt werden. Der Sauerstoffverbrauch in den Kammern kann als negative erste Ableitung der gemessenen Sauerstoffkonzentration berechnet werden [38]. In DatLab wurden entsprechend folgender Formel der Sauerstoffverbrauch anhand der Veränderungen der Sauerstoffkonzentration berechnet:

$$JO_2 = -\frac{\Delta cO_2}{\Delta t} * 10^3 - (cO_2 * (b - a))$$

Hierbei ergibt sich der Sauerstoffverbrauch (JO_2) aus dem negativen Ergebnis der Division der Sauerstoffkonzentrationsdifferenz (ΔcO_2) zwischen zwei bekannten Zeitpunkten a und b durch den zeitlichen Abstand dieser Punkte (Δt), multipliziert mit dem Faktor 1000, wovon die aktuelle Sauerstoffkonzentration (cO_2) multipliziert mit der Differenz der Zeitpunkte a und b

subtrahiert wird. Auf diese Weise kann man mit DatLab den Sauerstoffverbrauch in $\frac{\text{pmol}}{\text{s}*\text{ml}}$ indirekt aus der Messung der Sauerstoffkonzentration in $\frac{nmol}{ml}$ berechnen [38].

Nach jeder Hinzugabe von Zellen, Substraten, Inhibitoren oder anderer Stoffe wurde ein Artefakt freies Plateau abgewartet, welches für mindestens 2 Minuten konstant sein musste. Der Mittelwert dieses Plateaus wurde als entsprechender Wert für die Auswertung verwendet.

Nachdem die Zellen in die Kammern gegeben wurden, wurde zunächst für 15 bis 20 Minuten der basale Sauerstoffverbrauch (Basalatmung) der Zellen abgewartet. Sobald diese Basalatmung bestimmt worden war, wurde in einer der beiden Kammern immer der Sauerstoffverbrauch bei einer vollständig gekoppelten Atmungskette gemessen, während in der anderen Kammer der Sauerstoffverbrauch bei einer entkoppelten Atmungskette gemessen wurde. Hierbei bedeutet der Begriff gekoppelt, dass die Komplexe I bis IV der Atmungskette fest an die Funktion der ATP-Synthase gekoppelt sind. Diese Koppelung ist der physiologische Zustand, in welchem die Komplexe I, III und IV, einen Protonengradienten zwischen der Mitochondrien Matrix und dem Intermembranraum aufbauen [38, 41]. Dieser Protonengradient wird unter physiologischen Bedingungen von der ATP-Synthase zur Synthese von ATP genutzt [24]. Bei niedrigem ATP-Bedarf ist die Aktivität der ATP-Synthase ebenfalls vermindert. Als Folge wird der Protonengradient weniger stark abgebaut, sodass im Sinne einer negativen Rückkopplung auch die Komplexe I bis IV eine erniedrigte Aktivität aufweisen. Daraus resultiert auch ein geringerer Sauerstoffverbrauch [41]. Wird die Atmungskette entkoppelt, bedeutet dies eine Abkoppelung der Aktivität der Komplexe I bis IV von der Aktivität der ATP-Synthase und damit eine Unterbrechung dieser negativen Rückkoppelung [41]. Dies geschieht mit Hilfe von Oligomycin und Carbonilcyanid-p-Triflouromethoxyphenylhydrazon (FCCP) [39]. Das zuerst hinzugegebene Oligomycin ist ein Inhibitor der ATP-Synthase [24, 39, 50]. Anschließend wird durch FCCP der Protonengradient an der inneren Mitochondrienmembran ausgeglichen, indem FCCP diese Membran für Protonen permeabilisiert [41]. Durch diese Entkoppelung wird die Aktivität der Komplexe I bis IV auf ein Maximum gesteigert, da die negative Rückkoppelung durch den Protonengradienten vollkommen entfällt [41]. Hierdurch lässt sich die maximale Aktivität der Atmungskette besser betrachten, wodurch die Unterschiede in den einzelnen Versuchsgruppen deutlicher zu erkennen waren.

Im Folgenden wird der genaue Ablauf des Experiments bei gekoppelter und entkoppelter Atmungskette beschrieben: Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 4 visualisiert:

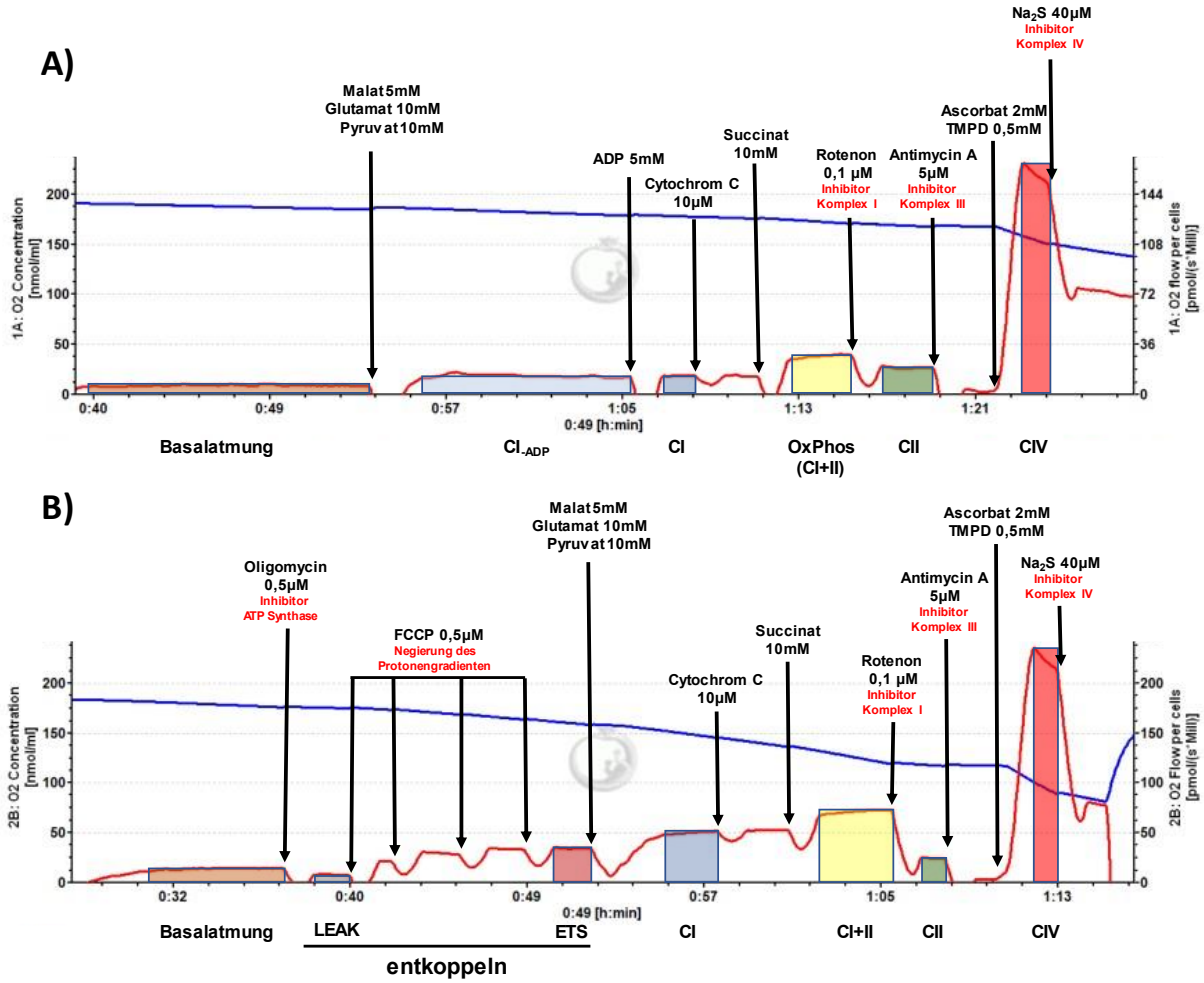

Abbildung 4: Darstellung des Ablaufs eines Experiments zur Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs. In A) ist der Ablauf im gekoppelten Zustand der Atmungskette dargestellt, während in B) der Ablauf im entkoppelten Zustand der Atmungskette abgebildet ist. Die Hinzugabe von Substraten oder Inhibitoren ist mit einem Pfeil markiert. Durch die farbigen Kästen und die darunterliegende Beschriftung ist der jeweilige Zustand der Atmungskette dargestellt. Mit der blauen Kurve wird die gemessene Sauerstoffkonzentration in den Versuchskammern in $\frac{\mathbf{nmol}}{\mathbf{ml}}$ dargestellt. Die rote Linie ist die erste negative Ableitung der blauen Linie und gibt den aktuellen Sauerstoffverbrauch der Zellen in den Kammern in $\frac{\mathbf{pmol}}{\mathbf{s{*}10^6{*}Zellen}}$ an. Angegeben sind der Sauerstoffverbrauch nach Aktivierung von Komplex I der Atmungskette vor Adenosindiphosphat- (ADP-) Gabe (CI_{-ADP}), nach ADP-Gabe (CI), nach Aktivierung von Komplex I und II (OxPhos (CI+II)), nach alleiniger Komplex II-Aktivierung (CII), die durch Hemmung von Komplex I erreicht wurde, und nach Aktivierung von Komplex IV (CIV). Der Sauerstoffverbrauch nach Hemmung der Adenosintriphosphat- (ATP-) Synthase wird LEAK und nach vollständiger Entkoppelung der Atmungskette wird ETS genannt. Ruheaktivität der Atmungskette/LEAK respiration (LEAK), maximale intrinsische Aktivität des Elektronen-Transfer-Systems (ETS). Carbonilcyanid-p-Triflouromethoxyphenylhydrazon (FCCP), Natriumsulfid (Na_2S), Sauerstoff (O2), maximale oxidative Phosphorylierungskapazität (OxPhos), Tetramethylphenylendiamin (TMPD).

In Abbildung 4 ist die Sauerstoffkonzentration und der daraus berechnete Sauerstoffverbrauch über die Zeit abgebildet, wie sie sich mit der Software DatLab darstellen lässt. Nach Hinzugabe der Zellen in die Kammer und Bestimmung der Basalatmung mittels des ersten Plateaus, wurde zunächst die Atmungskette der Zellen in einer der beiden Kammern entkoppelt. Hierfür wurde

zunächst 5µM Oligomycin in die Kammer gegeben und das Plateau abgewartet (LEAK in Abb. 4B)). Dieser Zustand wird auch LEAK respiration genannt. In Folge der Inhibition der ATP-Synthase kommt es zu einem Elektronenrückstau und einer negativen Rückkopplung auf die Komplexe I-IV [38, 41]. Hieraus resultiert ein maximaler Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran [38, 41]. Der in diesem Zustand gemessene Sauerstoffverbrauch entspricht der Ruheaktivität der Atmungskette, welche benötigt wird um den Protonengradienten gegen ein physiologisches Protonenleck in der inneren Mitochondrienmembran aufrecht zu erhalten [38, 41].

Anschließend wurde zum Ausgleich des Protonengradienten FCCP in mehreren Dosen appliziert. Mit jeder Dosis stieg die FCCP-Konzentration in der Kammer um 0,125µM und der Sauerstoffverbrauch erhöhte sich mit jeder erneuten Applikation. Dieser Vorgang wurde drei bis fünf Mal wiederholt, bis der Sauerstoffverbrauch bei erneuter Applikation nicht weiter anstieg (ETS in Abb. 4B)). Der fehlende weitere Anstieg des Sauerstoffverbrauchs ist durch eine für Protonen maximal durchlässige innere Mitochondrienmembran zu erklären, weshalb eine weitere Applikation von FCCP keine weiteren entkoppelnden Effekte auf die Atmungskette hat und somit die Atmungskette maximal entkoppelt war [38, 41]. Die vollständige Entkoppelung der Atmungskette wird als ETS capacity bezeichnet, da dieser Zustand der maximalen intrinsischen Aktivität des Elektronen-Transfer Systems der Atmungskette entspricht [41, 50]. Abgesehen von der Entkoppelung der Atmungskette in einer der beiden Kammern war der experimentelle Ablauf in beiden Kammern nahezu identisch, sodass im Folgenden der weitere Ablauf des Experiments unabhängig vom Koppelungszustand der Atmungskette beschrieben wird.

Zunächst wurde der Komplex I der Atmungskette maximal stimuliert. Hierfür wurden die Substrate Malat, Glutamat und Pyruvat hinzugegeben, sodass nach Applikation eine Konzentration von 5mM Malat sowie jeweils 10mM Glutamat und 10mM Pyruvat in der Kammer vorherrschten (CI_{-ADP} in Abb. 4A)) [24, 39]. Bei den Experimenten wurden stets deutlich höhere Konzentrationen als physiologisch gewählt, um die Komplexe maximal zu stimulieren, und dadurch eine mögliche geringere Aktivität durch Substratmangel zu vermeiden. Als Folge kam es zu einem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs.

Nach Abwarten des Plateaus wurde anschließend nur im gekoppelten Zustand 5mM Adenosindiphosphat (ADP) in die Kammer appliziert. Da eine verminderte Aktivität der ATP-Synthase aufgrund eines Mangels an ADP im gekoppelten Zustand zu einer negativen Rückkopplung der gesamten Atmungskette führen kann, muss ein durch ADP-Mangel falsch

niedriger Sauerstoffverbrauch verhindert werden [24, 38]. Das Plateau nach ADP-Applikation zeigt den Sauerstoffverbrauch an, welcher einer maximalen Stimulierung des Komplex I entspricht (CI in Abb. 4A)). Dieser Sauerstoffverbrauch zum Zeitpunkt CI ist einer der Zustände der Atmungskette, welcher für die Auswertung der Experimente verwendet wurde.

Anschließend wurde der Elektronentransporter Cytochrom C mit einer Konzentration von 10µM hinzugegeben, um einen normalen Ablauf der Atmungskette zu gewährleisten. Des Weiteren kann über den Anstieg des Sauerstoffverbrauchs auch die Qualität der Zellpräparation abgeschätzt werden [40, 42]. Ein nur geringer Anstieg der Zellatmung spricht für intakte Mitochondrien und eine schonende Präparation [42]. Sind dagegen viele Mitochondrien geschädigt, verteilt sich das Cytochrom C im gesamten Volumen der Versuchsprobe, wodurch die Konzentration im Mitochondrium stark abfällt und die Atmungskette in ihrer Funktion beeinträchtigt wird [42]. Erst durch die Hinzugabe von Cytochrom C würde dann die Konzentration im Mitochondrium wieder ansteigen. Als Resultat wäre ein deutlicher Anstieg des Sauerstoffverbrauchs zu detektieren. In allen für diese Dissertation durchgeführten Experimenten war der Anstieg des Sauerstoffverbrauchs nach Cytochrom C-Gabe nur marginal, sodass dies als Zeichen für eine qualitativ hochwertige und schonende Präparation gewertet werden konnte.

Anschließend wurde durch die Hinzugabe von 10mM Succinat der Komplex II der Atmungskette stimuliert (OxPhos (CI+II) in Abb. 4A) bzw. CI+II in Abb. 4B)) [24, 50]. Dieser nun gemessene Sauerstoffverbrauch entspricht einer maximalen Aktivität der Komplexe I und II und wird als maximale oxidative Phosphorylierungskapazität (OxPhos) bezeichnet [24, 50]. Kongruent zum Sauerstoffverbrauch zum Zeitpunkt CI ist auch die OxPhos einer der Zustände der Atmungskette, welcher für die Auswertung der Experimente verwendet wurde.

Nachfolgend wurde der Komplex I-Inhibitor Rotenon in einer Konzentration von 0,1µM in die Kammern appliziert (CII in Abb. 4) [24, 40]. Da der Sauerstoffverbrauch im Zustand der maximalen oxidativen Phosphorylierung eine Kombination aus maximaler Aktivität der Komplexe I und II ist, kann durch die Inhibierung des Komplex I der Sauerstoffverbrauch ermittelt werden, der ausschließlich auf die Aktivität von Komplex II zurückzuführen ist. Weil der Sauerstoffverbrauch durch CII höher als durch CI ist, pendelte sich das Plateau stets auf einem Niveau zwischen dem Verbrauch von CI und OxPhos ein.

Daraufhin wurde durch die Hinzugabe des Komplex III-Inhibitors Antimycin A in einer Konzentration von 5µM die Atmungskette weiter gehemmt [24, 47]. Wird die Cytochrom-C-

Reduktase gehemmt, führt dies zu einem Anstieg von mit Elektronen beladenem Ubichinon [57]. Als Folge sinkt der Anteil an freiem Ubichinon, welches die Komplexe I und II für den Elektronentransfer benötigen [57]. Folglich kommt es zu einer negativen Rückkoppelung und die Komplexe I und II werden ebenfalls gehemmt [142]. Da hieraus außerdem ein Mangel an reduziertem Cytochrom C, welches der Komplex IV als Substrat benötigt, resultiert, führt dies zum Erliegen der gesamten Atmungskette [24]. Als Resultat fiel der Sauerstoffverbrauch während des Experiments nach Antimycin A Gabe auf nahezu null ab.

Anschließend wurde die Aktivität der Cytochrom-C-Oxidase mittels des Elektronendonors Tetramethylphenylendiamin (TMPD) in einer Konzentration von 0,5mM bestimmt. Reduziertes TMPD überträgt Elektronen auf Cytochrom C, wodurch dieses wiederum reduziert wird und in der reduzierten Form als Substrat für CIV dient [47, 50, 76, 103]. Durch die kontinuierliche Reduktion von Cytochrom C ist stets ausreichend Substrat für CIV vorhanden, sodass das Enzym maximal aktiviert wird [76]. Da allerdings TMPD eine hohe Autooxidation aufweist, muss zusätzlich ein Reduktionsmittel für TMPD appliziert werden [76]. Hierfür verwendeten wir Ascorbat in einer Konzentration von 2mM, welches kurz vor der TMPD-Gabe appliziert wurde. Durch die Gabe der zwei Substanzen stieg der Sauerstoffverbrauch in den Kammern sprunghaft stark an. Dieser Anstieg ist einerseits auf den maximal stimulierten Komplex IV und andererseits auf die Autooxidation von TMPD und erneute Reduktion durch Ascorbat zurückzuführen (CIV in Abb. 4) [76]. Um zu bestimmen, welcher Anteil des Sauerstoffverbrauchs auf CIV und welcher auf die Reduktion von TMPD zurückzuführen ist, wurde anschließend CIV durch das H_2S-freisetzende Natriumsulfid (Na_2S) mit einer Konzentration von 40µM gehemmt. Hierdurch fiel der Sauerstoffverbrauch ab. Die Differenz zwischen dem Sauerstoffverbrauch nach TMPD/Ascorbat-Gabe und der Na_2S-Gabe entspricht dem Sauerstoffverbrauch, welcher alleinig auf die CIV-Aktivität zurückzuführen ist. Mit dem Abwarten des letzten Plateaus war das Experiment beendet und die Zellsuspensionen wurden für die Bestimmung der Citrat-Synthase Aktivität bei -80°C gelagert, sowie die Kammern für weitere Experimente aufbereitet.

2.3.3 Berechnung von der mitochondrialen respiratorischen Reservekapazität und OxPhos Control Ratio

Unter normalen Bedingungen nutzt die Zelle nur einen geringen Anteil der maximalen Kapazität der Atmungskette [110]. Die Differenz zwischen der Kapazität unter normalen Bedingungen und erhöhtem Zellstress wird mitochondriale respiratorische Reservekapazität

(Mitochondrial Reserve Capacity (MRC)) oder Spare Respiratory Capacity genannt und kann mit den in den Experimenten gewonnenen Werten berechnet werden [40, 97, 110]. Die MRC errechnet sich aus der Differenz zwischen ETS und der zugehörigen Basalatmung und gibt an, wie hoch die bioenergetische Reserve der Atmungskette ist [40, 110]. Umso höher die MRC und damit die bioenergetische Reserve ist, desto stärker kann die Zelle die Atmungskette aktivieren, Energiereserven bereitstellen und somit einem ATP-Mangel vorbeugen [97, 110, 145]. Dementsprechend korreliert eine hohe MRC mit einem verbesserten Überleben, während eine niedrige MRC zu einem vermehrten Untergang von Neuronen führt [97, 110, 145]. Unter physiologischen Bedingungen nutzt die Zelle die MRC indem sie mehr Substrate den Komplexen der Atmungskette zur Verfügung stellt und somit deren Aktivität steigert [110]. Auf die gleiche Art und Weise kann bei entkoppelten Zellen die MRC experimentell bestimmt werden [40, 110].

Ein weiterer berechneter Wert ist die OxPhos Control Ratio (OCR). Unter physiologischen Bedingungen wird die maximale Kapazität der Atmungskette durch die Kapazität des Elektronentransfersystems und die Kapazität des Phosphorylierungssystems bestimmt [40]. Das Elektronentransfersystem hat die Aufgabe, den Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran aufzubauen und dabei Elektronen letztendlich zu Komplex IV zu transportieren, während das Phosphorylierungssystem diesen Protonengradienten zur Phosphorylierung von ADP zu ATP nutzt [41]. Die OCR ist ein Maß, mit welchem der Einfluss der Kapazität des Phosphorylierungssystems auf die maximale oxidative Phosphorylierungskapazität der Atmungskette angegeben werden kann [40, 107]. Es kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen und erreicht umso höhere Werte, desto höher die Kapazität des Phosphorylierungssystems ist [40, 107]. Werte von 1 werden erreicht, wenn die Kapazität des Phosphorylierungssystems die Elektronentransferkapazität übersteigt oder äquivalent zu ihr ist [40]. Experimentell lässt sich die Phosphorylierungskapazität als OxPhos messen, während die Elektronentransferkapazität CI+II im entkoppelten Zustand entspricht [40]. Folglich lässt sich die OCR als Produkt $\frac{OxPhos}{CI+II_{entkoppelt}}$ errechnen [40]. Allerdings kann die OCR durch eine physiologische oder artifizielle Entkoppelung während der OxPhos-Messung ebenfalls höhere Werte erreichen, da bei einer Entkoppelung die Limitierung der Atmungskette nicht mehr durch das abgekoppelte Phosphorylierungssystem beeinflusst wird [40, 107].

2.3.4 Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs mit simultaner Messung der H_2O_2-Produktion

Neben der reinen Messung des Sauerstoffverbrauchs, wurde im Rahmen der Dissertation auch die simultane Messung von Sauerstoffverbrauch und Produktion von H_2O_2 gemessen. Unter physiologischen Bedingungen fließt permanent ein kleiner Teil des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs in die Produktion von ROS, sodass mitochondrialer Sauerstoffverbrauch und ROS-Produktion untrennbar miteinander verbunden sind [3, 48, 83, 93]. In der Atmungskette wird von den Komplexen I und III überwiegend O_2^- freigesetzt, welches durch die endogene und zusätzlich applizierte SOD größtenteils unmittelbar zu H_2O_2 reagiert [48, 73]. Membranen sind im Gegensatz zu O_2^- für H_2O_2 frei permeabel [48, 73]. Aufgrund dieser freien Permeabilität und der schnellen Metabolisierung ist es möglich, die mit dem Oxygraph O2k gemessene H_2O_2-Produktion als Surrogat-Parameter für die gesamte ROS-Produktion zu verwenden [73].

Mit Hilfe der simultanen Messung von Sauerstoffverbrauch und H_2O_2-Produktion konnte beurteilt werden, ob eine Veränderung des Sauerstoffverbrauchs auch mit einer Veränderung der H_2O_2-Produktion einhergeht, und somit mögliche Effekte des veränderten Sauerstoffverbrauchs evtl. auch auf eine Änderung der ROS-Produktion zurückzuführen sind. Diese Methode ist entscheidend um zu untersuchen, ob H_2S neben Auswirkungen auf die einzelnen Komplexe der Atmungskette auch Effekte auf die ROS-Produktion hat.

Die Messungen wurden ebenfalls mit dem Oxygraph O2k von Oroboros Instruments durchgeführt. Im Rahmen dieser Methode wurde die HRR mit einer fluorometrischen Messung der H_2O_2-Produktion kombiniert. Hierfür wurde neben den Clarke-Elektroden das O2k-Fluorometer von Oroboros Instruments verwendet. Das Fluorometer besteht neben einer LED, sowie einer Photodiode, aus den entsprechenden Farbfiltern der Wellenlänge 525nm für die LED bzw. einem roten Farbfilter für die Photodiode [73]. Bei dieser Methode wird die H_2O_2-Menge indirekt fluorometrisch mit Hilfe von Amplex UltraRed nachgewiesen. Das nicht fluorometrisch nachweisbare Amplex UltraRed reagiert mit H_2O_2 entsprechend der nachfolgenden Reaktionsgleichung zu fluorometrisch detektierbarem Resorufin (Abb. 5) [73, 92].

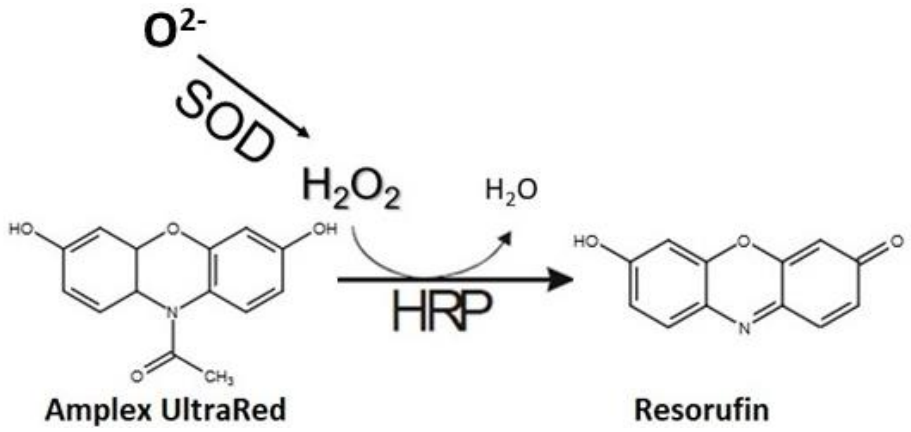

Abbildung 5: Reaktion von Amplex UltraRed mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Resorufin. Um die H_2O_2-Produktion messen zu können, reagieren zunächst die in der Atmungskette entstehenden Superoxidanionen (O^{2-}) durch die Superoxiddismutase (SOD) mit Wasser (H_2O) zu H_2O_2. Anschließend reagiert H_2O_2 mit Amplex UltraRed zu H_2O und dem fluorometrisch nachweisbaren Resorufin. Diese Reaktion wird durch das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) katalysiert.

Die primär gebildeten O_2^--Radikale reagieren zunächst durch die endogene und von extern hinzugegebene SOD zu H_2O_2 [48, 73]. Die anschließende Reaktion H_2O_2 mit Amplex UltraRed wird durch das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) katalysiert [73, 92]. Als Reaktionsprodukt wird Wasser und das rot fluoreszierende Resorufin freigesetzt [73, 92]. Aufgrund dieser Reaktion ist die emittierte Fluoreszenz-Intensität direkt proportional zum entstandenen H_2O_2, wobei H_2O_2 verbraucht wird und die Konzentration in der Zellsuspension nahe 0 ist [73, 92]. Die H_2O_2-Produktion kann folglich als positive erste Ableitung des Resorufin Signals berechnet werden.

Vor den Experimenten wurde der Oxygraph mit denselben Vorgaben wie bei der alleinigen Sauerstoffmessung kalibriert. Außerdem wurden dieselben Einstellungen und Versuchsbedingungen gewählt. Die Fluorometer wurden mit einer Polarisationsspannung von 800mV und einem Gain von 1000 eingesetzt. Zur Ermittlung der Messwerte wurden analog zur JO_2-Messung die Mittelwerte der Plateaus verwendet. Für die Werte des Sauerstoffverbrauchs wurden die Plateaus der ersten negativen Ableitung der gemessenen Sauerstoffkonzentration verwendet, während für die H_2O_2-Messung die Werte der ersten Ableitung des Resorufin-Signals als Grundlage der Berechnung herangezogen wurden. In der folgenden Abbildung 6 ist der Ablauf des Experiments sowohl im gekoppelten (Abb. 6A)) als auch im entkoppelten Zustand (Abb. 6B)) der Atmungskette dargestellt.

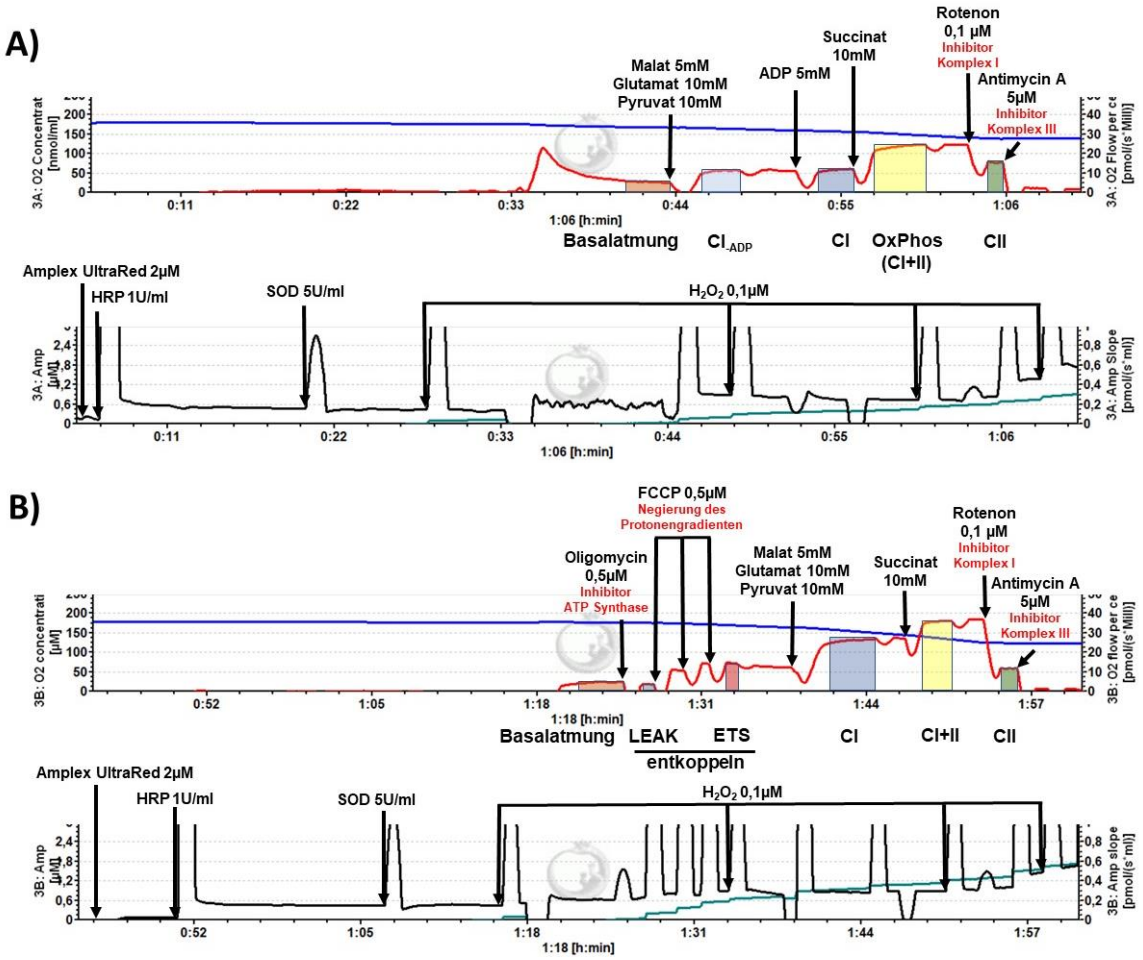

Abbildung 6: Darstellung des Ablaufs eines Experiments zur Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs mit simultaner Messung der Produktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2). In A) ist der Ablauf im gekoppelten Zustand der Atmungskette dargestellt, während in B) der Ablauf im entkoppelten Zustand der Atmungskette abgebildet ist. Die Hinzugabe von Substraten oder Inhibitoren der Atmungskette ist im jeweils oberen Graph mit einem Pfeil markiert. Durch die farbigen Kästen im jeweils oberen Schaubild und die darunterliegende Beschriftung ist der jeweilige Zustand der Atmungskette dargestellt. Mit der blauen Kurve wird die gemessene Sauerstoffkonzentration in den Versuchskammern in $\frac{\mathbf{nmol}}{\mathbf{ml}}$ dargestellt. Die rote Linie ist die erste negative Ableitung der blauen Linie und gibt den aktuellen Sauerstoffverbrauch der Zellen in den Kammern in $\frac{\mathbf{pmol}}{\mathbf{s{*}10^6\ Zellen}}$ an. Die Applikation von Substanzen, die zur H_2O_2-Messung benötigt werden, ist im jeweils unteren Graph dargestellt. In diesem Graph ist in türkis die fluorometrisch gemessene Resorufin-Konzentration in µM dargestellt. Die erste Ableitung hiervon, also die Resorufin-Änderung in $\frac{\mathbf{pmol}}{\mathbf{s{*}ml}}$, ist in schwarz abgebildet. Diese Resorufin-Änderung entspricht der Menge an pro Zeiteinheit entstandenen H_2O_2. Angegeben sind der Sauerstoffverbrauch nach Aktivierung von Komplex I vor Adenosindiphosphat- (ADP-) Gabe (CI_{-ADP}), nach ADP-Gabe (CI), nach Aktivierung von Komplex I und II (OxPhos (CI+II)), nach alleiniger Komplex II-Aktivierung (CII), die durch Hemmung von Komplex I erreicht wurde, und nach Aktivierung von Komplex IV (CIV). Der Sauerstoffverbrauch nach Hemmung der Adenosintriphosphat- (ATP-) Synthase wird LEAK und nach vollständiger Entkoppelung der Atmungskette wird ETS genannt. Ruheaktivität der Atmungskette/LEAK respiration (LEAK), maximale intrinsische Aktivität des Elektronen-Transfer-Systems (ETS). Carbonilcyanid-p-Triflouromethoxyphenylhydrazon (FCCP), Meerrettichperoxidase (HRP), Sauerstoff (O2), maximale oxidative Phosphorylierungskapazität (OxPhos), Superoxiddismutase (SOD).

Als Erstes wurden in die Kammern die für die Messung der H_2O_2-Produktion benötigten Substanzen gespritzt. In kurzen Abständen mit Abwarten von Plateaus nach jeder Applikation wurden der Reihe nach Amplex UltraRed in einer Konzentration von 2µM, HRP in einer Konzentration von 1U/ml und SOD mit einer Konzentration von 5U/ml hinzugegeben. Durch das Abwarten der Plateaus konnte validiert werden, ob die Reaktion von Amplex UltraRed durch HRP zu Resorufin erfolgreich detektiert werden kann. Insbesondere war hierdurch ersichtlich, dass Amplex UltraRed erst nach Hinzugabe von HRP zu Resorufin reagiert und nicht unspezifisch, nicht-enzymatisch reagiert. Im nächsten Schritt wurden zur Kalibration der H_2O_2-Messung 5µl einer 40µM H_2O_2-Lösung eingespritzt, was einer Applikation von 0,1µM H_2O_2 entspricht. Hierdurch kam es im Rahmen der Reaktion von H_2O_2 mit Amplex UltraRed zu einem plötzlichen Anstieg von Resorufin. Dieser Anstieg zeigte sich in einer Steigerung des fluorometrisch gemessenen Signals. Rückfolgend kann hierdurch dem Anstieg des Signals die entsprechende Menge H_2O_2 bestimmt werden [73]. Da diese Reaktion enzymgesteuert abläuft, kommt es durch die im Verlauf des Experiments ansteigende Konzentration von Resorufin zu einer zunehmenden Hemmung der Reaktion, sodass mit zunehmender Resorufin-Konzentration der Signalanstieg, welcher durch dieselbe Menge H_2O_2 verursacht wird, kontinuierlich abnimmt [73]. Um einer zunehmenden Ungenauigkeit der Messung vorzubeugen, wurden deshalb im Verlauf des Experiments mehrfach H_2O_2-Kalibrationen nach dem genannten Verfahren vorgenommen.

Nach erfolgreicher Kalibration wurden die Neurone, welche in 200µl MirO5 suspendiert wurden, in die Kammern gegeben. Pro Kammer wurden 3 Millionen Zellen appliziert, sodass mit 1,5 Millionen Zellen pro Milliliter eine doppelt so hohe Konzentration wie für die Experimente zur Sauerstoffverbrauchsmessung verwendet wurde. Diese höhere Zellzahl war von Nöten, da nur sehr geringe Mengen an H_2O_2 entstehen und durch eine Erhöhung der Zellzahl die Sensitivität der Messung erhöht werden konnte [73].

Nach Abwarten der Basalatmung und der basalen H_2O_2-Produktionsrate wurde wie bei den Messungen des Sauerstoffverbrauchs in einer Kammer das Experiment im gekoppelten und in der anderen Kammer im entkoppelten Zustand der Atmungskette durchgeführt. Zur Entkoppelung wurden analog zu den JO_2-Experimenten zunächst 5µM Oligomycin appliziert und das erste Plateau abgewartet. Dieses Plateau mit erniedrigtem Sauerstoffverbrauch und erhöhter H_2O_2-Produktion wird analog zur JO_2-Messung als LEAK respiration bezeichnet (LEAK in Abb. 6B)) [50, 73]. Zur weiteren Entkoppelung wurden anschließend drei bis fünf Dosen FCCP, welche jeweils die Konzentration um 0,125µM anhoben, appliziert. Sobald die

letzte FCCP-Gabe keine weitere Steigung bewirkte, wurde das Plateau der ETS capacity erreicht (ETS in Abb. 6B)) [50, 73]. Nachfolgend wurde eine weitere H_2O_2-Kalibration in dieser Kammer durchgeführt.

Der weitere Verlauf des Experiments war, abgesehen von einer ADP-Gabe bei gekoppelter Atmungskette, sowohl im gekoppelten Zustand als auch im entkoppelten Zustand identisch. Zunächst wurde entsprechend den JO_2-Experimenten durch Hinzugabe von Malat (5mM), Glutamat (10mM) und Pyruvat (10mM) der Komplex I maximal stimuliert. Nach Abwarten des Plateaus wurde in beiden Kammern eine erneute H_2O_2-Kalibration durchgeführt. Um im gekoppelten Zustand eine partielle Hemmung von Komplex V zu verhindern, wurde anschließend 5mM ADP in die Kammer gegeben. Als Sauerstoffverbrauch nach maximaler Stimulation von CI wurde im gekoppelten Zustand das Plateau nach ADP-Gabe und im entkoppelten Zustand das Plateau nach Malat/Glutamat/Pyruvat-Gabe identifiziert (CI in Abb. 6).

Auf die im JO_2-Protokoll an dieser Stelle folgende Cytochrom C-Gabe wurde im Rahmen der ROS-Experimente verzichtet, da Cytochrom C als sehr aktive Substanz im Rahmen von Redoxreaktionen die Reaktionsabläufe, die zur Resorufin-Freisetzung entscheidend sind, beeinflussen würde [73]. Darüber hinaus konnten wir in den JO_2-Experimenten zeigen, dass unsere Zellpräparation qualitativ sehr hochwertig war und somit die Gabe von externem Cytochrom C ohnehin nicht von Nöten gewesen wäre [40, 42].

Deshalb wurde das Protokoll mit der Stimulation von Komplex II durch die Gabe von Succinat in einer Konzentration von 10mM fortgesetzt (OxPhos CI+II in Abb. 6). Vergleichend zu den Experimenten zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs entspricht dieser Zustand einer maximalen Aktivität von CI und CII und wird als maximale oxidative Phosphorylierungskapazität bezeichnet. Nach Abwarten eines Plateaus wurde an dieser Stelle erneut eine H_2O_2-Kalibration durchgeführt.

Nachfolgend wurde zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs und der H_2O_2-Produktion, welche auf die Aktivität von CII zurückzuführen sind, der CI-Inhibitor Rotenon in einer Konzentration von 0,1µM in die Kammern gespritzt (CII in Abb. 6). Anschließend wurde durch die Hinzugabe des CIII-Inhibitors Antimycin A in einer Konzentration von 5µM die Atmungskette vollständig gehemmt [24, 57, 142]. An dieser Stelle wurde vor Beendigung des Experiments eine letzte H_2O_2-Kalibration durchgeführt. Eine Messung des Sauerstoffverbrauchs und der H_2O_2-Produktion durch Komplex IV konnte nicht durchgeführt

werden, da Ascorbat/TMPD ähnlich wie Cytochrom C als sehr starke Trigger von Redoxreaktionen die Reaktionsabläufe, die zur Resorufin-Freisetzung entscheidend sind, beeinflussen würde [73].

2.4 Citrat-Synthase Aktivität

Der Sauerstoffverbrauch der Zellen wird neben der Aktivität der Atmungskette wesentlich von der Masse an Mitochondrien bestimmt [41]. Es ist leicht vorzustellen, dass eine größere Menge an Mitochondrien mit einem größeren Sauerstoffverbrauch assoziiert ist. Deshalb ist es wichtig, die Mitochondrienmasse zu bestimmen und zu analysieren, ob eine Veränderung des Sauerstoffverbrauchs auf eine Änderung der Mitochondrienmasse oder eine veränderte Aktivität der einzelnen Komplexe der Atmungskette zurückzuführen ist.

Da eine direkte Bestimmung der Mitochondrienmasse nicht verlässlich genug durchführbar ist, wird diese häufig indirekt über die Bestimmung von Mitochondrien spezifischen Markern durchgeführt [41]. Eine der gängigsten Methoden zur Bestimmung der Mitochondrienmasse ist die Quantifizierung der Citrat-Synthase (CS-) Aktivität [30, 41, 123, 124]. Die Citrat-Synthase ist ein Schüsselenzym des Citratzyklus und im Mitochondrium lokalisiert [30, 41, 123, 124]. Die Messung der CS-Aktivität eignet sich sehr gut zur Bestimmung der mitochondrialen Masse, da diese im selben Gewebe stets konstant zur Menge an mitochondrialen Protein exprimiert wird [30, 41, 123, 124]. Zur Bestimmung der CS-Aktivität wird die durch die CS katalysierte Reaktion mit einer weiteren Reaktion gekoppelt, bei welcher das photometrisch messbare Thionitrobenzoat (TNB) freigesetzt wird. Im Folgenden sind die beiden Reaktionen aufgezeigt:

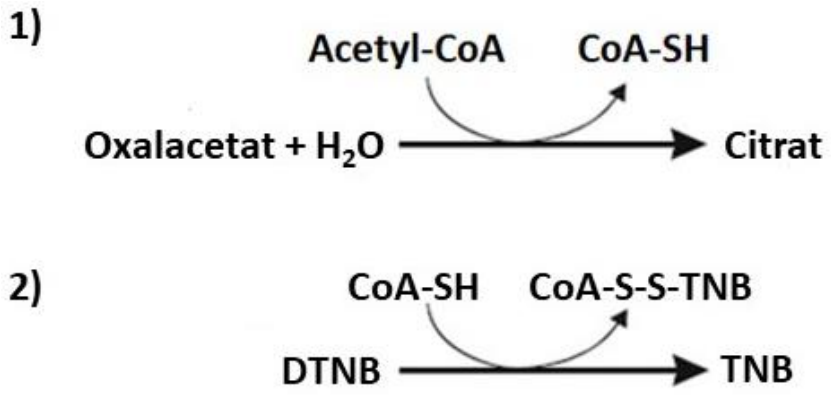

Abbildung 7: Reaktionsgleichungen zur Bestimmung der Citrat-Synthase Aktivität: In der ersten Reaktion katalysiert die Citrat-Synthase (CS) die Reaktion von Oxalacetat, Wasser (H_2O) und Acetyl-Coenzym A (CoA) zu Citrat und freiem Coenzym A (CoA-SH). In der zweiten Reaktion reagiert Coenzym A mit Dithionitrobenzoesäure (DTNB) zu Thionitrobenzoat (TNB), dessen Absorption gemessen wird, und Thionitrobenzoat-Coenzym A (CoA-S-S-TNB).

In Reaktionsgleichung 1 ist die Reaktion dargestellt, welche durch die Citrat-Synthase katalysiert wird. Hierbei reagieren Oxalacetat, Wasser und Acetyl-CoA zu Citrat und freiem Coenzym A (CoA). Das freie CoA wird in der zweiten Reaktion benötigt, um Dithionitrobenzoesäure (DTNB) zu Thionitrobenzoat (TNB) und Thionitrobenzoat-CoA zu spalten. Hierbei ist die erste Reaktion geschwindigkeitsbestimmend und somit ist die Bildung von TNB direkt abhängig von Aktivität und Menge des Katalysators CS [30]. Die Aktivität der CS ist wie die Aktivität zahlreicher Enzyme temperaturabhängig, weshalb die Experimente stets bei 30°C durchgeführt wurden [30].

Die Messung der Citrat-Synthase Aktivität erfolgte mit dem Photometer Spectra Max190 (Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 412nm und einer Zellzahl von 200.000 pro Milliliter. Während der Messung wurde über einen Zeitraum von 200 Sekunden die Änderung der Absorption gemessen. Diese musste bei sämtlichen Proben annähernd linear verlaufen. Die Ergebnisse wurden stets mit einer H_2O-Kontrolle, einer 10µl MirO5 Kontrolle und zwei unabhängigen CS-Kontrollen mit einer Konzentration von 0,086µg/ml bzw. 0,0172IU/ml durchgeführt. Die CS-Kontrollen wurden verwendet, um einwandfreie Eigenschaften der Chemikalien und des Assays zu überprüfen und um einen definierten Referenzwert zu erhalten [30]. Zur Durchführung der Experimente wurden in der Küvette die in Tabelle 5 abgebildeten Substanzen vermischt. Oxalacetat wurde erst unmittelbar vor der Messung hinzugegeben, da hierdurch die Reaktion gestartet wird. Direkt im Anschluss wurde vorsichtig die Lösung vermischt und die Küvette zur Messung ins Photometer gestellt.

Wasser wurde als Grundmedium gewählt, zu welchem Acetyl-CoA, DTNB und Oxalacetat als Substrate hinzugefügt wurden. Außerdem wurde Triton X-100, welches ein gängiges, nicht denaturierendes Proteinlösungsmittel zur Lösung membrangebundener Enzyme wie die CS ist, beigefügt [71]. Aus der durch das Photometer bestimmten Änderung der Absorption kann mit Hilfe der folgenden Formel die Citrat-Synthase Aktivität berechnet werden [30]:

$$v\ (IU) = \frac{r_a}{\varepsilon_{TNB}} * \frac{V_{Küvette}}{V_{Zellsuspension} * \rho} = \frac{r_a}{13{,}6\,\frac{1}{mMol * cm}} * \frac{1000\mu l}{266{,}6\mu l * 0{,}2 * 10^6\,\frac{Z}{ml}}$$

In dieser Formel wird die Enzymaktivität v bestimmt durch die Absorptionsänderung r_a, welche durch den Extinktionskoeffizienten von TNB (ε_{TNB}; bei 412nm: $13{,}6\frac{1}{mMol*cm}$) dividiert wird. Das Produkt hieraus wird mit dem Produkt des Messvolumens durch das Volumen der hinzugegebenen Zellen, das mit der Zellkonzentration ρ multipliziert wird, multipliziert [30]. Die Citrat-Synthase Aktivität wurde in $\frac{\mu mol*mg}{min*ml}$ angegeben.

Nach 200 Sekunden wurde die Messung beendet. Um Messungenauigkeiten zu minimieren und Messfehler auszuschließen, wurde jede Zellprobe in 2-4 Assays mit jeweils neuer Reagenzlösung gemessen.

2.5 Western Blot

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Western Blots wurden mit Unterstützung von Bettina Stahl und Rosemarie Mayer durchgeführt und entwickelt. Die Auswertung und statistische Aufbereitung der Daten wurden von mir übernommen.

2.5.1 Vorbereitung

Um die Western Blots an den Neuronen durchführen zu können, mussten diese zunächst hierfür aufbereitet werden. Im Rahmen der Vorbereitung wurden die Zellen analog zu den anderen Experimenten zunächst in den Zellkulturflaschen stimuliert, anschließend das Medium durch PBS ersetzt und die Zellen mittels Zellschaber geerntet. Daraufhin wurden die Zellen in einer Zentrifuge bei einer Zentripetalkraft von 600g für 4min bei 4°C zentrifugiert und das Zellpellet mit Lysepuffer, dessen Zusammensetzung in Tabelle 7 dargestellt ist, und Proteaseinhibitor versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen ein weiteres Mal bei 600g und 4°C zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Anschließend wurde das Zelllysat im Mischungsverhältnis 1:50 mit PBS verdünnt und die Probe auf Eis gelagert. Vor Durchführung der folgenden Schritte wurde die Probe für 10s mit Ultraschall beschallt und hierdurch homogenisiert.

Nach erfolgter Aufbereitung der Proben, wurde zunächst die Proteinmenge mittels Photometer und Blaupuffer als Färbereagenz bei einer Wellenlänge von 595nm bestimmt. Um die Proteinbestimmung durchführen zu können, wurde zunächst eine Standardreihe zur Kalibrierung erstellt. Hierfür wurden die Proteinkonzentrationen 125µg/ml, 250µg/ml, 500µg/ml, 750µg/ml, 1000µg/ml und 1500µg/ml gegen einen Leerwert im Photometer gemessen und aus den Ergebnissen die Standardreihe ermittelt. Nach dieser Kalibrierung des Photometers wurden die Zelllysate zur Bestimmung der Proteinmenge 1:10 verdünnt, mit Blaupuffer angefärbt und gemessen. Entsprechend des Ergebnisses wurden anschließend die Proben durch Hinzugabe von Ladepuffer auf die gewünschte Proteinkonzentration von 4mg/ml verdünnt. Der verwendete Ladepuffer besteht aus Glycerol, DTT, Natriumdodecylsulfat (SDS) und Bromphenolblau. Damit die Proben vor der Durchführung des Western Blot regelrecht in die Taschen absinken, wurde durch Glycerol die Probendichte erhöht [86]. Mittels DTT wurden

die Disulfidbrücken der Proteine reduziert und somit die Tertiär- und Quartärstrukturen aufgehoben [86]. Das ebenfalls hinzugegebene anionische SDS bindet an die Proteine, wodurch die Proteine gleichmäßig stark negativ geladen sind und eine alleinige Auftrennung der Proteine entsprechend der Größe stattfinden kann [86]. Bromphenolblau wurde zum Färben der Probe appliziert, damit der Verlauf der Probe visualisiert werden kann [86]. Anschließend wurde die Probe bei 95°C für 5min denaturiert.

2.5.2 Gelelektrophorese

Um Proteine alleinig nach ihrem Molekulargewicht unabhängig von der Ladung aufzutrennen, führten wir eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durch. Zur Gewährleistung einer adäquaten Trennung der Proteine, wurden die Gele mit einem Trenngel und einem Sammelgel gegossen. Die hierfür verwendeten Reagenzien, sowie die zugehörigen Konzentrationsangaben sind in Tabelle 8 angegeben.

Hierbei wurde das Sammelgel mit einer Acrylamid-Konzentration von 4,5% und einem pH=6,8 gegossen, während das Trenngel mit Acrylamid-Konzentrationen von 5-15% und einem pH=8,8 hergestellt wurde. Da mit zunehmenden Acrylamid-Konzentrationen die Poren des Gels immer kleiner werden, können durch höhere Acrylamid-Konzentrationen kleinere Proteine besser aufgetrennt werden [86]. Das Sammelgel, welches deutlich größere Poren als das Trenngel aufweist, ist für eine scharf begrenzte Bandenbildung verantwortlich [86]. Nach Durchmischung der Reagenzien wurde zunächst das Trenngel gegossen. Die obersten 1,5 cm wurden freigelassen und anschließend mit Sammelgel aufgefüllt. Nach einer Mindestaushärtungszeit von einer Stunde wurden die Gele verwendet.

Die Ladetaschen der Gele wurden mit 20µl der Proben (40mg) beladen. Zusätzlich zu den Proben wurde stets auch eine Positiv- und eine Negativkontrolle pro Gel geladen. Die Positivkontrolle, welche aus dem jeweiligen zu detektierenden Protein besteht, wurde zur Identifikation des Zielproteins genutzt. Die Negativkontrolle, bestehend aus β-Actin oder Vinculin, diente dem Ausschluss einer unspezifischen Detektion. Hierbei diente β-Actin als Negativkontrolle für die Proteine Cytochrom-C-Oxidase-4 (COX4), Cytochrom-C-Oxidase-5A (COX5A), Cytochrom-C-Oxidase-5B (COX5B), Saures Gliafaserprotein (GFAP) und Vinculin als Negativkontrolle für die Proteine induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) und Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ Coactivator 1 α (PGC1α). Nach Beladen der Gele, wurden diese in die Elektrophoresekammer eingespannt, vollständig mit Laufpuffer bedeckt und anschließend die

Elektrophorese durch Anlegen einer Gleichspannung von zunächst 90V über 15min und später 180V für weitere 35min durchgeführt. Durch diese Spannung wurden die negativ geladenen Proteine zur Anode gezogen [86]. Da größere Proteine einen größeren Widerstand durch das Gel erfahren, wandern diese langsamer als kleinere Proteine und somit wird das Proteingemisch entsprechend des Molekulargewichts aufgetrennt [86].

2.5.3 Blotting

Nach abgelaufener Elektrophorese müssen die nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf einen festen Träger übertragen werden. Hierfür wurde eine Nitrocellulosemembran direkt auf das Gel gelegt, beides mit Chromatographiepapier umgeben und in die mit Blotpuffer aufgefüllte Blotkammer gelegt. Die Zusammensetzung des Blotpuffers ist in Tabelle 9 angegeben. Durch das Anlegen einer Spannung von 20V für 60min mit der Anode auf der Seite der Nitrocellulosemembran wandern die nach wie vor negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran, auf welcher sie durch den Farbstoff Ponceau S gefärbt und so sichtbar gemacht werden.

2.5.4 Detektion und Entwicklung

Nach dem Blotten der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde diese zunächst mit tris buffered saline (TBS) (2,5% Tris, 8% NaCl in dH_2O) für 5min gewaschen und daraufhin mit Blotto B, dessen Substrate und die zugehörigen Konzentrationen in Tabelle 10 dargestellt sind, geblockt. Hierdurch wird ein unspezifisches Binden der Antikörper an die Membran verhindert [86]. Anschließend wurde die Membran erneut drei Mal mit TBS gewaschen und die Proben mit dem Primärantikörper bei 4°C über Nacht unter leichtem Schwenken inkubiert. Als Primärantikörper wurden Antikörper gegen COX5A (Anti-COX5A), COX5B (Anti-COX5B), COX4 (Anti-COX4), GFAP (Anti-GFAP), iNOS (Anti-iNOS), nNOS (Anti-nNOS) und PGC1α (Anti-PGC1α) verwendet. Am nächsten Morgen wurde die Membran erneut dreimalig mit TBS gewaschen und der Zweitantikörper, welcher spezifisch an den Erstantikörper bindet und diesen dadurch sichtbar macht, bei Raumtemperatur für 1h aufgetragen. Dieser Zweitantikörper hat außerdem HRP gebunden, welches die Detektionsreaktion katalysiert [86]. Nach Hinzugabe der Lösung des Entwicklerkits von Cell Signaling wurde die Detektionsreaktion gestartet und bei vollständiger Dunkelheit im Entwicklerraum ein Film aufgelegt, welcher anschließend entwickelt wurde.

2.5.3 Auswertung

Zur Auswertung wurde das Programm Image J verwendet. Hierbei wurde die Intensität und Dicke der Banden densitometrisch quantifiziert und die Ergebnisse mit Graph Pad 8 statistisch analysiert und grafisch dargestellt. Außerdem wurde für die Darstellung stets das Signal auf die Kontrollprobe, welche nicht stimuliert wurde, bezogen und der entsprechende Quotient gebildet.

2.6 Statistik

Um eine ausreichende Aussagekraft der jeweiligen Experimente zu erhalten und Störfaktoren technischer und biologischer Art zu unterdrücken, wurden alle Experimente mehrfach mit biologischen und technischen Replikaten durchgeführt. Lediglich bei der simultanen Messung von JO_2 und H_2O_2 wurden nur biologische Replikate vorgenommen.

Bei Experimenten zur Bestimmung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs wurden die Zellen derselben Stimulation jeweils mit zwei unterschiedlichen Oxygraphen gemessen und somit technische Replikate generiert. Die Versuche wurden bei zweistündiger Stimulation sechs bis neun Mal wiederholt, sodass insgesamt 12 bis 17 Wiederholungen pro zweistündiger Stimulation durchgeführt wurden. Versuche mit einer 24-stündigen Stimulation der Zellen wurden insgesamt sieben bis acht Mal durchgeführt, sodass insgesamt 14 bis 16 Experimente pro 24-stündiger Stimulation durchgeführt wurden. Als Messwerte wurden die Mittelwerte der entsprechenden Plateaus der Sauerstoffänderung verwendet.

Experimente zur simultanen Bestimmung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs und der H_2O_2-Produktion wurden aufgrund von Ressourcenmangel nur als biologische Replikate durchgeführt. Bei zweistündigen Stimulationen wurden Experimente 8- bis 11-mal wiederholt, während bei 24-stündiger Stimulationen 8 bis 13 Experimente pro Versuchsbedingung durchgeführt wurden. Als Messwerte wurden die Mittelwerte der entsprechenden Plateaus der der Sauerstoffänderungskurve, sowie die Plateaus der Resorufin-Konzentrationsänderung zu Grunde gelegt.

Zur Bestimmung der Citrat-Synthase Aktivität wurde jede Zellsuspension zwei bis vier Mal unabhängig voneinander gemessen. Diese technischen Replikate wurden zu einem Mittelwert gemittelt und mit den anderen biologischen Replikaten zusammen analysiert. Bei 12 bis 14 biologischen Replikaten für die zweistündige Stimulation und 13 bis 16 biologischen

Replikaten für die 24-stündige Stimulation entspricht dies einer Anzahl von 26 bis 31 (2h-Stimulation) bzw. 24 bis 30 (24h-Stimulation) Wiederholungen.

Insgesamt wurden Western Blots jeder Bedingung jeweils von fünf biologischen Proben generiert. Jede Probe wurde ein bis drei Mal geblottet. Bei den unterschiedlichen Blots wurden unterschiedliche Belichtungszeiten verwendet, um möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu generieren. Damit durch die unterschiedlich langen Belichtungszeiten die Ergebnisse nicht verfälscht werden, wurden die densitometrischen Quantifizierungen der einzelnen Proben stets auf die zugehörige Kontrolle, welche unstimulierte Neurone umfasste, genormt und der so gebildete Quotient aus Probe/Kontrolle ausgewertet. Hieraus ergibt sich ein n=4-10 bei den in dieser Dissertation abgebildeten Western Blots.

Die statistischen Auswertungen wurden mit den Programmen GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA) und Microsoft Office365 Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) durchgeführt. Alle Ergebnisse, mit Ausnahme der grafischen Darstellung von JO_2 nach 14 bis 24 Tagen in Kultur wurden als Box-Whisker-Plots mit Median, sowie den mittleren Quartilen als Begrenzung der Box dargestellt. Die Whisker markieren die äußeren Quartile. In sämtlichen graphischen Auswertungen werden p-Werte von <0,05, <0,01, <0,001 und <0,0001 jeweils mit *, **, *** und **** dargestellt. Für die Darstellung von JO_2 nach 14 bis 24 Tagen in Kultur wurde der Mittelwert mit der Anzeige der Standardabweichung durch die Whisker gewählt.

Für die statistische Aufarbeitung der Daten wurde zunächst ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, da die Daten der vier unabhängigen Parallelgruppen (DMSO, AP39, LPS+DMSO, LPS+AP39) nicht normalverteilt sind. Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests konnte beim Signifikanzniveau $\alpha=0.05$ untersucht werden, ob die Ränge der Parallelgruppen sich signifikant unterscheiden [74]. Bei vorhandener Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test wurde anschließend für jede Gruppe untersucht, ob es signifikante Unterschiede untereinander gibt. Hierfür wurde der Dunn's-Comparison-Test durchgeführt, welcher die Mittelwerte jeder einzelnen unabhängigen Gruppe jeweils mit den Mittelwerten aller anderen Gruppen auf Signifikanz untersucht [29]. Beim Dunn's-Comparison-Test wählten wir ebenfalls ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch

Durch die HRR mit dem Oxygraph O2k ist es möglich, die Sauerstoffkonzentration in Echtzeit zu messen und somit indirekt den Sauerstoffverbrauch der Zellen zu bestimmen. Eines der wesentlichen Ziele meiner Promotion war die Beantwortung der Frage, wie sich der Sauerstoffverbrauch der Neurone durch Inkubation mit 10nM AP39 ändert und, ob diese Effekte auch im Rahmen einer LPS-Stimulation (1µg/ml) ebenfalls zu detektieren sind. Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die gemessenen Werte der einzelnen Experimente einer Versuchsgruppe zusammengefasst und mit den anderen Versuchsgruppen verglichen.

3.1.1 Wahl des Messzeitpunktes

Da sich der Sauerstoffverbrauch verschieden alter adulter Neurone von Tag zu Tag unterscheidet, wurde in Vorversuchen untersucht, wie sich der Sauerstoffverbrauch der Zellen nach 14 bis 24 Tagen in Kultur verändert, um einen konstanten und vergleichbaren Zeitraum für die Experimente zu wählen. Hierfür verwendete ich unstimulierte Zellen mit demselben Versuchsprotokoll, wie für die definitiven Versuche. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 8 dargestellt. Zur besseren Visualisierung der Unterschiede sind nur die Ergebnisse nach Aktivierung von Komplex I und II im gekoppelten (OxPhos) und entkoppelten (CI+II entkoppelt) Zustand dargestellt.

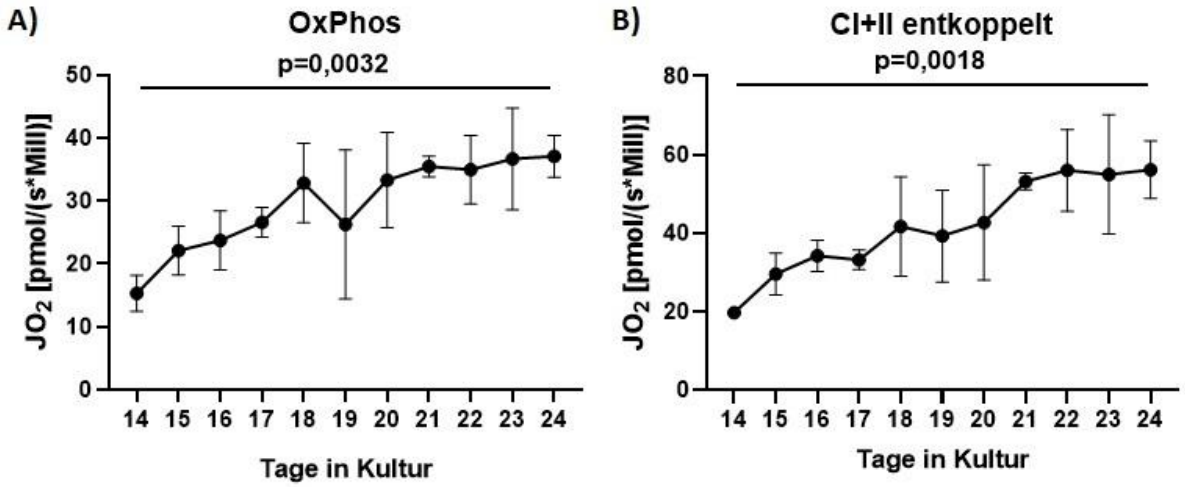

Abbildung 8: Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch (JO_2) von primären corticalen Neuronen nach 14 bis 24 Tagen in Kultur. Darstellung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs (JO_2 in $\frac{\mathbf{pmol}}{\mathbf{s*Millionen\ Zellen}}$) von Neuronen nach 14 bis 24 Tagen in Kultur in A) nach maximaler Stimulation der Komplexe I und II (maximale oxidative Phosphorylierungskapazität/OxPhos) durch Hinzugabe von Malat (5mM), Glutamat (10mM), Pyruvat (10mM), Adenosindiphosphat (5mM), Cytochrom C (10µM) und Succinat (10mM) und in B) nach vorheriger Entkoppelung und anschließender maximaler Stimulation der Komplexe I und II (CI+II entkoppelt) durch Hinzugabe von Oligomycin (5µM), Carbonilcyanid-p-Triflouromethoxyphenylhydrazon (FCCP) (0,375-0,625µM), sowie Malat (5mM), Glutamat (10mM), Pyruvat (10mM) und Succinat (10mM). Die Punkte markieren den Mittelwert, während die Whisker die Standardabweichung darstellen. Die Messungen wurden mit 750.000 Zellen/ml mit dem Oxygraph O2k von Oroboros Instruments durchgeführt. Jeweils n=2-9.

In beiden Graphen ist deutlich ein kontinuierlicher Anstieg des Sauerstoffverbrauchs von Tag 14 bis einschließlich Tag 21 zu erkennen. Von Tag 21 bis Tag 24 ist ein annähernd konstanter mitochondrialer Sauerstoffverbrauch zu beobachten. Diese Ergebnisse sind darüber hinaus auch in anderen Stadien des Experiments, sowie im gekoppelten als auch im entkoppelten Zustand der Atmungskette sichtbar, sodass zusammenfassend im Zeitraum von Tag 21 bis Tag 24 von einem konstanten Niveau des Sauerstoffverbrauchs ausgegangen werden kann.

3.1.2 Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch

3.1.2.1 Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch nach 2h Stimulation

Nachdem der Zeitraum, in welchem die Experimente durchgeführt wurden, definiert war, bestimmte ich den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch der Neurone. In der nachfolgenden Abbildung 9 sind die Ergebnisse der Experimente nach zwei Stunden Stimulation abgebildet.

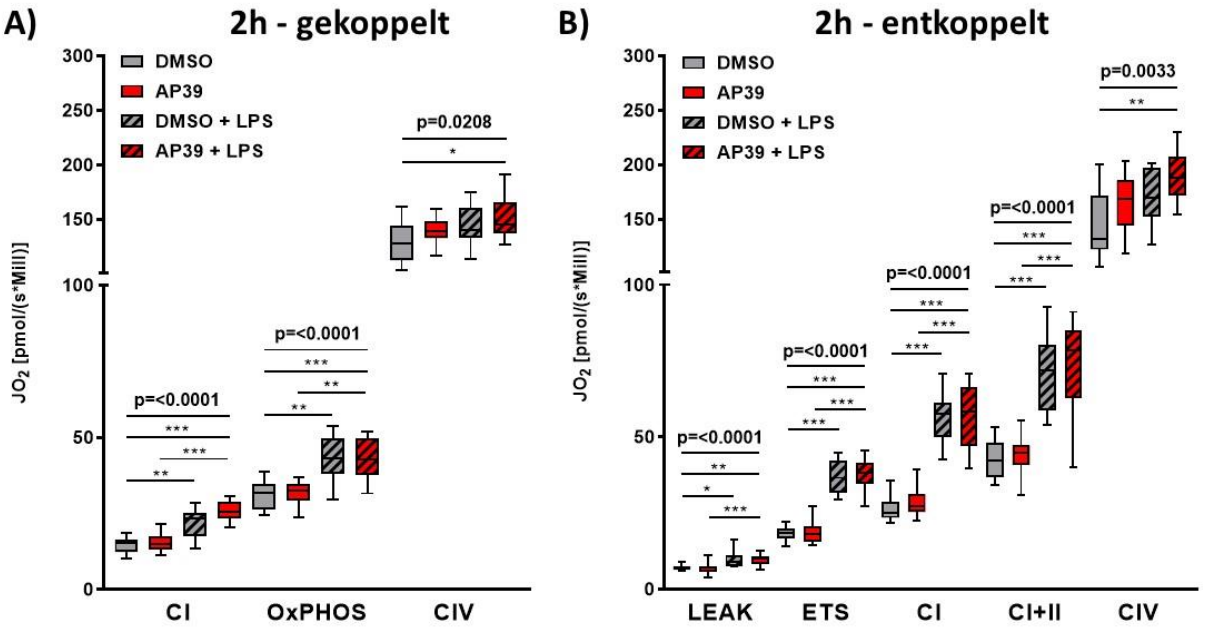

Abbildung 9: Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch (JO_2) von primären corticalen Neuronen nach zweistündiger Stimulation im gekoppelten (A)) und entkoppelten Zustand (B)). Die Abbildung zeigt den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (JO_2 in $\frac{\mathbf{pmol}}{\mathbf{s*10^6 Zellen}}$) von Neuronen nach zweistündiger Stimulation der Zellen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (0,1µl/ml, grau) oder (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphoniumbromid (AP39) (10nM in 0,1µl/ml DMSO, rot) mit und ohne Lipopolysaccharid- (LPS-) Stimulation (1µg/ml, straffiert) im gekoppelten (A)) und entkoppelten Zustand (B)). Dargestellt sind in A) die Zustände nach maximaler Stimulation der Komplexe I (CI), der Komplexe I und II (OxPhos) und des Komplexes IV (CIV), während in B) die Zustände nach Hemmung der Adenosintriphosphat-Synthase (LEAK), vollständiger Entkoppelung der Atmungskette (ETS), sowie im entkoppelten Zustand nach Stimulation der Komplexe I (CI), der Komplexe I und II (CI+II) und des Komplexes IV (CIV) abgebildet sind. Maximale intrinsische Aktivität des Elektronen-Transfer-Systems (ETS), Stunden (h), Ruheaktivität der Atmungskette/LEAK respiration (LEAK), maximale oxidative Phosphorylierungskapazität (OxPhos). Die Messungen wurden mit 750.000 Zellen/ml mit dem Oxygraph O2k von Oroboros Instruments durchgeführt. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median. Die äußere Begrenzung der Box entspricht den mittleren Quartilen. Die Whisker markieren die äußeren Quartile. p-Werte von <0,05, <0,01 und <0,001 sind jeweils mit *, ** und *** dargestellt. Jeweils n=12-17.

In Abbildung 9 A) ist der mitochondriale Sauerstoffverbrauch von PCN nach verschiedenen zweistündigen Stimulationen im gekoppelten Zustand dargestellt. Es ist von CI, über OxPhos zu CIV ein Anstieg des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchst zu beobachten. Die Stimulation der Zellen mit 10nM AP39 zeigte im gekoppelten Zustand keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur zugehörigen Kontrollgruppe. Die Stimulation mit 1µg/ml LPS zeigte nach 2h signifikante Unterschiede im Vergleich zu den nicht mit LPS behandelten Zellen. LPS erhöhte den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch in jedem Zustand. Am deutlichsten ist dieser Effekt bei CI und OxPhos zu erkennen. Eine Co-Stimulation mit DMSO oder AP39 hat keinen weiteren signifikanten Einfluss hierauf.

Im entkoppelten Zustand (Abb. 9 B)) sind minimale Effekte von AP39 auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch zu erkennen. Während in den Entkoppelungszuständen LEAK und ETS keinerlei Unterschiede zwischen DMSO und AP39 erkennbar sind, kann man in den Zuständen CI+CII und CIV der Atmungskette kleinere Unterschiede erkennen. In beiden Zuständen weisen mit AP39 behandelte Zellen einen tendenziell höheren Sauerstoffverbrauch auf als Zellen, welche nur mit DMSO inkubiert wurden. Obwohl diese Unterschiede nicht signifikant sind, so ist dies in den absoluten Zahlen vor allem bei Aktivierung von Komplex IV erkennbar. Nach Aktivierung von CIV ist JO_2 in den AP39 Gruppen $10{,}21\frac{\text{pmol}}{\text{s}*10^6\ \text{Zellen}}$ (AP39) bzw. $9{,}40\frac{\text{pmol}}{\text{s}*10^6\ \text{Zellen}}$ (AP39+LPS) als in der dazugehörigen DMSO-Kontrolle. Außerdem ist der stimulierende Effekt von LPS auf die Atmungskette im entkoppelten Zustand ebenfalls sehr deutlich. Zu jedem Messzeitpunkt mit Ausnahme von CIV ist der Sauerstoffverbrauch sowohl in der DMSO+LPS Gruppe, als auch in der AP39+LPS Gruppe signifikant höher als in der zugehörigen Vergleichsgruppe ohne LPS.

3.1.2.2 Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch nach 24h Stimulation

Analog zu den Versuchen mit zweistündiger Stimulation wurden die Experimente nach einer 24-stündigen Stimulation durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung 10 grafisch dargestellt.

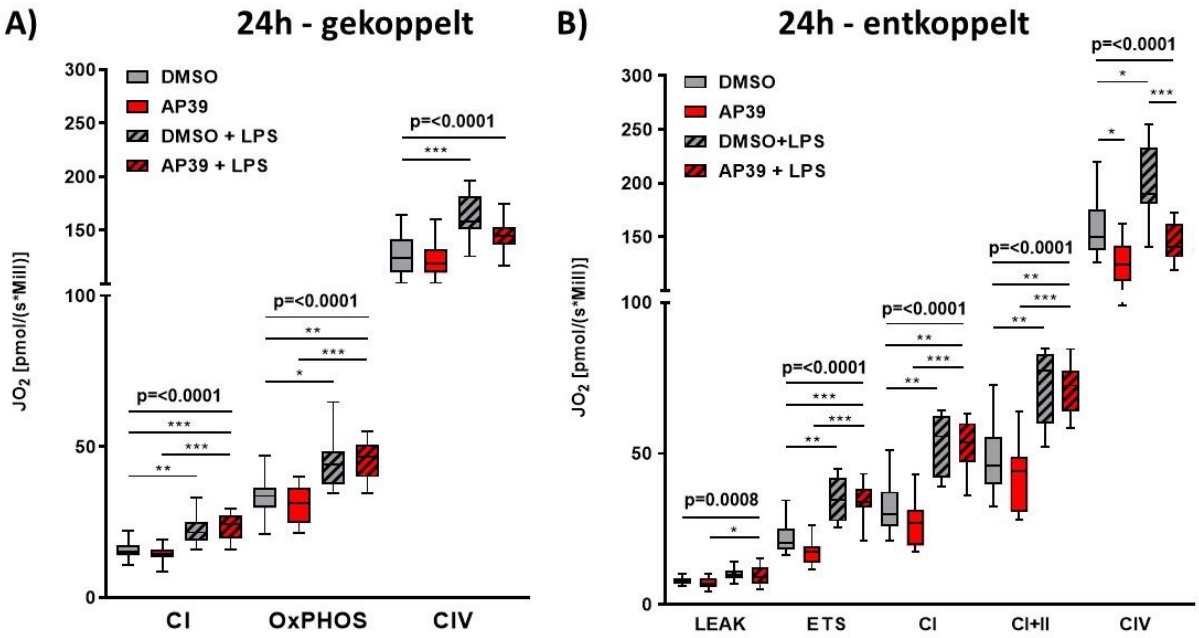

Abbildung 10: Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch (JO_2) von primären corticalen Neuronen nach 24 Stunden (h) Stimulation im gekoppelten (A)) und entkoppelten Zustand (B)). Die Abbildung zeigt den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (JO_2 in $\frac{\mathbf{pmol}}{\mathbf{s*10^6 Zellen}}$) von Neuronen nach 24h Stimulation der Zellen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (0,1µl/ml, grau) oder (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphoniumbromid (AP39) (10nM in 0,1µl/ml DMSO, rot) mit und ohne Lipopolysaccharid- (LPS-) Stimulation (1µg/ml, straffiert) im gekoppelten (A)) und entkoppelten Zustand (B)). Dargestellt sind in A) die Zustände nach maximaler Stimulation der Komplexe I (CI), der Komplexe I und II (OxPhos) und des Komplexes IV (CIV), während in B) die Zustände nach Hemmung der ATP-Synthase (LEAK), vollständiger Entkoppelung der Atmungskette (ETS), sowie im entkoppelten Zustand nach Stimulation der Komplexe I (CI), der Komplexe I und II (CI+II) und des Komplexes IV (CIV) abgebildet sind. Maximale intrinsische Aktivität des Elektronen-Transfer-Systems (ETS), Stunden (h), Ruheaktivität der Atmungskette/LEAK respiration (LEAK), maximale oxidative Phosphorylierungskapazität (OxPhos). Die Messungen wurden mit 750.000 Zellen/ml mit dem Oxygraph O2k von Oroboros Instruments durchgeführt. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median. Die äußere Begrenzung der Box entspricht den mittleren Quartilen. Die Whisker markieren die äußeren Quartile. p-Werte von <0,05, <0,01 und <0,001 sind jeweils mit *, ** und *** dargestellt. Gekoppelt: n=12-16; entkoppelt: n=13-16.

Im Vergleich zur zweistündigen Stimulation sind nach 24-stündiger Stimulation mit 10nM AP39 entgegengesetzte Ergebnisse zu sehen. Während nach zweistündiger Stimulation AP39 tendenziell einen aktivierenden Effekt auf die Atmungskette aufweist, führt eine 24-stündige Stimulation mit AP39 zu entgegengesetzten Effekten.

In Abbildung 10 A) sind weder mit noch ohne LPS-Inkubation signifikante Unterschiede zwischen AP39 und DMSO erkennbar. Allerdings lässt sich nach Aktivierung von CIV ein tendenziell reduzierter Sauerstoffverbrauch von mit AP39+LPS behandelten Zellen im Vergleich zu mit DMSO+LPS behandelten Zellen feststellen. Dieser die Atmungskette hemmende Effekt von AP39 ist in Abbildung 10 B) bei CIV signifikant. Des Weiteren ist in 10 A) erkennbar, dass eine Stimulation mit LPS nach 24 Stunden ähnliche Effekte wie nach einer

zweistündigen Stimulation aufweist: sowohl in der DMSO-Kontrollgruppe als auch in der AP39-Gruppe zeigt sich nach LPS-Stimulation ein signifikant erhöhter Sauerstoffverbrauch in allen Zuständen der gekoppelten Atmungskette.

Im entkoppelten Zustand (Abb. 10 B)) ist ein inhibitorischer Effekt von AP39 auf die Atmungskette detektierbar. Bei Betrachtung von CIV fällt ein signifikant niedrigerer Sauerstoffverbrauch in den AP39-Gruppen im Vergleich zu den dazugehörigen DMSO-Kontrollen auf. Dieser Effekt ist unter zusätzlicher LPS-Stimulation deutlicher ausgeprägt. Eine solche Hemmung ist in den anderen Zuständen der Atmungskette nicht detektiert worden. Neben diesem inhibitorischen Effekt von AP39 sind im entkoppelten Zustand die stimulierenden Wirkungen von LPS auf die Atmungskette, welche nach zwei Stunden deutlich nachweisbar sind, ebenfalls erkennbar. Abgesehen vom LEAK Zustand ist die Aktivierung der Atmungskette durch LPS hoch signifikant.

Zusammenfassend ergibt sich in den JO_2-Experimenten der Hinweis auf einen tendenziell höheren Sauerstoffverbrauch der mit AP39 inkubierten Zellen nach zweistündiger Stimulation, während AP39 nach 24-stündiger Stimulation den Sauerstoffverbrauch insbesondere nach Aktivierung von Komplex IV hemmt. Diese Effekte waren sowohl in den Versuchen mit als auch ohne LPS zu sehen. Des Weiteren führte eine Stimulation der Zellen mit LPS unabhängig von DMSO bzw. AP39 zu einem deutlich erhöhten Sauerstoffverbrauch.

3.1.3 Mitochondriale respiratorische Reservekapazität

Die MRC errechnet sich aus der Differenz zwischen ETS und der zugehörigen Basalatmung und gibt an, wie hoch die bioenergetische Reserve der Atmungskette ist. Insofern ist die MRC ein wichtiger Parameter für den auf die Zelle einwirkenden Stress und gibt an, wie groß die Kompensationsfähigkeiten der Zelle zu diesem Zeitpunkt sind. Umso höher die MRC ist, desto größer sind die zellulären energetischen Reserven. Die MRC ist somit ein Maß dafür, wie gut die Zelle auf Zellstress reagieren kann.

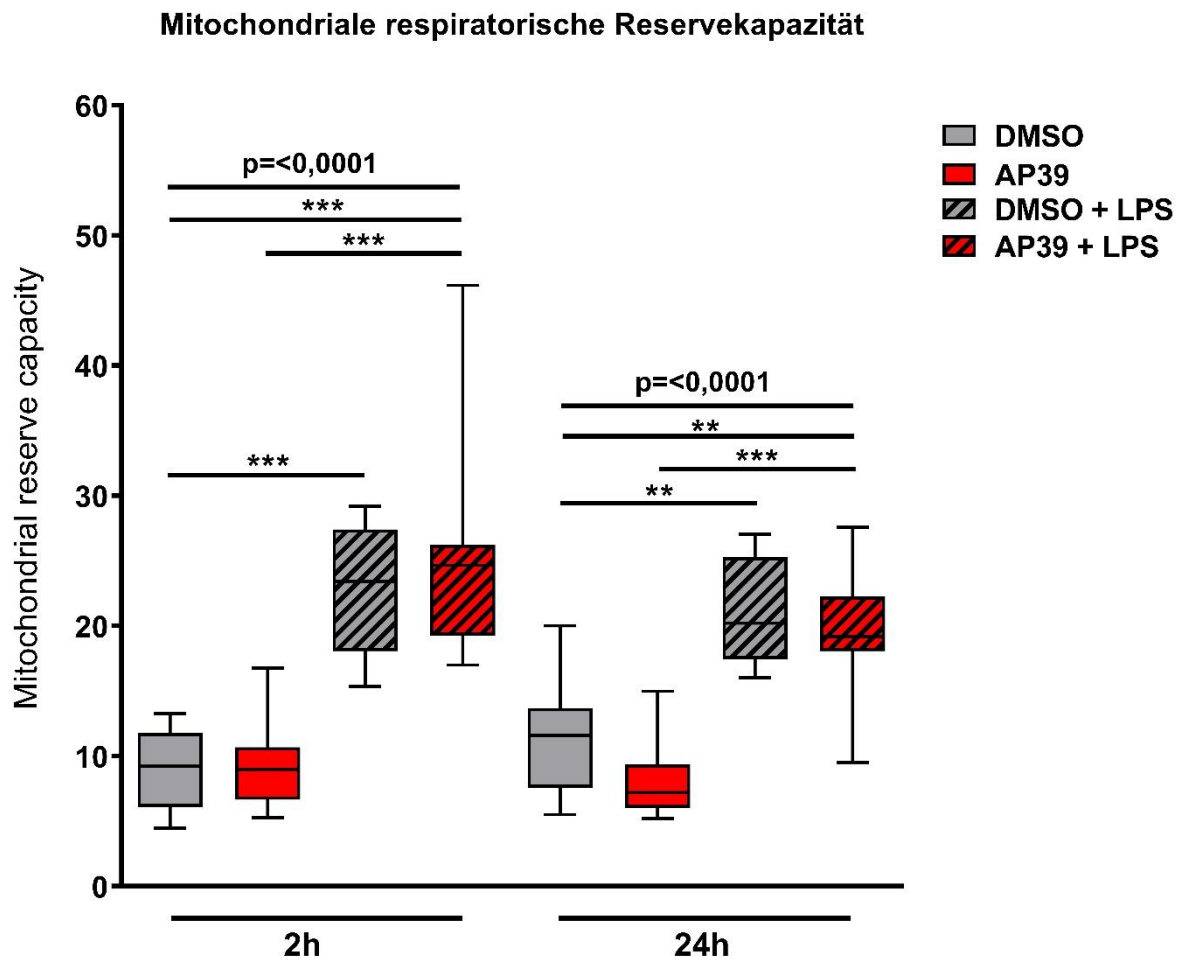

Abbildung 11: Mitochondriale respiratorische Reservekapazität (mitochondrial reserve capacity, MRC) von primären corticalen Neuronen nach 2 Stunden (h) und 24h Stimulation. Die Abbildung zeigt die MRC (=ETS - Basalatmung) von Neuronen nach 2h und 24h Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (0,1µl/ml, grau) oder (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphoniumbromid (AP39) (10nM in 0,1µl/ml DMSO, rot) mit und ohne Lipopolysaccharid- (LPS-) Stimulation (1µg/ml, straffiert). Die ETS wurde durch Hinzugabe von Oligomycin (5µM) und Carbonilcyanid-p-Triflouromethoxyphenylhydrazon (FCCP) (0,375-0,625µM) erreicht. Die Messungen der maximalen intrinsischen Aktivität des Elektronen-Transfer-Systems (ETS) und Basalatmung wurden mit 750.000 Zellen/ml mit dem Oxygraph O2k von Oroboros Instruments durchgeführt. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median. Die äußere Begrenzung der Box entspricht den mittleren Quartilen. Die Whisker markieren die äußeren Quartile. p-Werte von <0,01 und <0,001 sind jeweils mit ** und *** dargestellt. 2h: n=12-17; 24h: n=13-16.

In Abbildung 11 ist sowohl nach zweistündiger als auch nach 24-stündiger Stimulation eine signifikant erhöhte MRC in den LPS-Gruppen erkennbar. Sowohl nach 2 Stunden als auch nach 24 Stunden war die MRC in den LPS-Gruppen zwei bis drei Mal höher als in den LPS-freien Gruppen. Des Weiteren ist weder nach zweistündiger noch nach 24-stündiger Stimulation ein Effekt von AP39, sowohl in alleiniger Stimulation als auch in Kombination mit LPS, auf die MRC erkennbar.

3.1.4 OxPhos Control Ratio

Unter physiologischen Bedingungen wird die Atmungskette durch die Kapazität des Elektronentransfersystems und die Kapazität des Phosphorylierungssystems bestimmt. Die OCR als Produkt $\frac{OxPhos}{CI+II_{entkoppelt}}$ ist ein Maß, mit welchem der Einfluss der Kapazität des Phosphorylierungssystems auf die maximale oxidative Phosphorylierungskapazität der Atmungskette angegeben wird. Die OCR kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen und erreicht umso höhere Werte, desto höher die Kapazität des Phosphorylierungssystems ist.

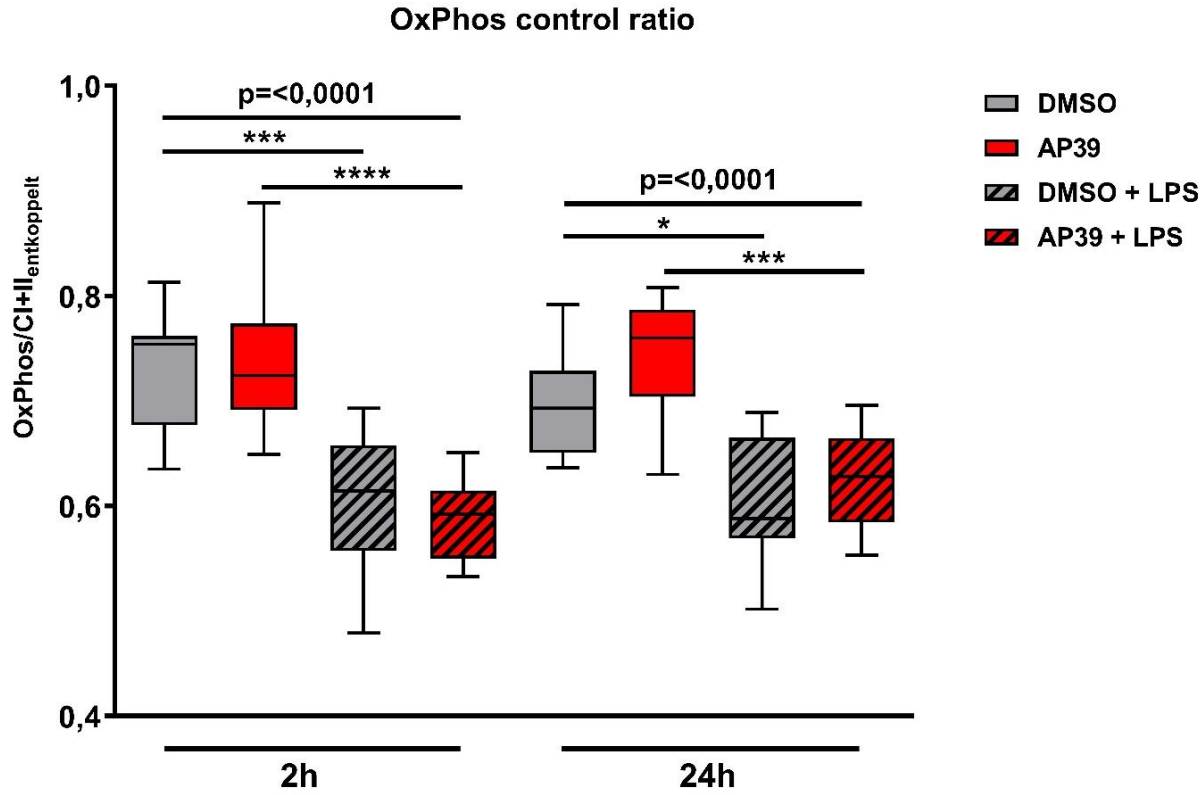

Abbildung 12: OxPhos Control Ratio (OCR) von primären corticalen Neuronen nach 2 Stunden (h) und 24h Stimulation. Die Abbildung zeigt die OCR ($\frac{OxPhos}{CI+II_{entkoppelt}}$) von Neuronen nach 2h bzw. 24h Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (0,1µl/ml, grau) oder (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphoniumbromid (AP39) (10nM in 0,1µl/ml DMSO, rot) mit und ohne Lipopolysaccharid (LPS-) Stimulation (1µg/ml, straffiert). Die maximale oxidative Phosphorylierungskapazität (OxPhos) wurde durch Hinzugabe von Malat (5mM), Glutamat (10mM), Pyruvat (10mM), Adenosindiphosphat (5mM), Cytochrom C (10µM) und Succinat (10mM) erreicht. Die Entkoppelung von Komplex I und II ($CI+II_{entkoppelt}$) wurde durch vorherige Entkoppelung mit Oligomycin (5µM), Carbonilcyanid-p-Triflouromethoxyphenylhydrazon (FCCP) (0,375-0,625µM) und anschließender maximaler Stimulation durch Hinzugabe von Malat (5mM), Glutamat (10mM), Pyruvat (10mM), Cytochrom C (10µM) und Succinat (10mM) erreicht. Die Messungen wurden mit 750.000 Zellen/ml mit dem Oxygraph O2k von Oroboros Instruments durchgeführt. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median. Die äußere Begrenzung der Box entspricht den mittleren Quartilen. Die Whisker markieren die äußeren Quartile. p-Werte von <0,05, <0,001 und <0,0001 sind jeweils mit *, *** und **** dargestellt. 2h: n=12-15; 24h: n=12-16.

Sowohl nach zweistündiger als auch nach 24-stündiger Stimulation ist in den LPS Gruppen ein signifikant niedrigere OCR als in den dazugehörigen LPS-freien Gruppen feststellbar (Abb. 12). Dies gilt sowohl für mit DMSO als auch für mit AP39 stimulierte Zellen. Insgesamt kam es durch die LPS-Gabe zu einer Halbierung (DMSO) bis Drittelung (AP39) der OCR nach 2 Stunden, sowie zu einer Halbierung der OCR durch LPS nach 24 Stunden. Weder nach einer zweistündigen noch nach einer 24-stündigen Stimulation konnten Effekte von AP39 sowohl mit als auch ohne LPS auf die OCR der Zellen nachgewiesen werden.

3.2 Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs mit simultaner Messung der H_2O_2-Produktion

Die simultane Messung von JO_2 und H_2O_2 wurde mit dem Oxygraph O2k und der fluorometrischen Bestimmung von Resorufin durchgeführt. Weil die Resorufinbildung direkt von der H_2O_2-Menge in der Probe abhängig ist und die Resorufinkonzentration kontinuierlich gemessen wurde, konnte somit auch die H_2O_2-Produktion kontinuierlich gemessen werden. Da die ROS-Produktion einerseits von der mitochondrialen Integrität und andererseits von der Aktivität der Atmungskette abhängt, gilt es, diese beiden Einflussfaktoren zu differenzieren. Mit der simultanen Messung von H_2O_2 und JO_2 und der anschließenden Bildung des Quotienten $\frac{ROS}{JO_2}$ ist es möglich, zu berechnen, wie groß der Anteil des Sauerstoffverbrauchs ist, der in die H_2O_2-Produktion einfließt.

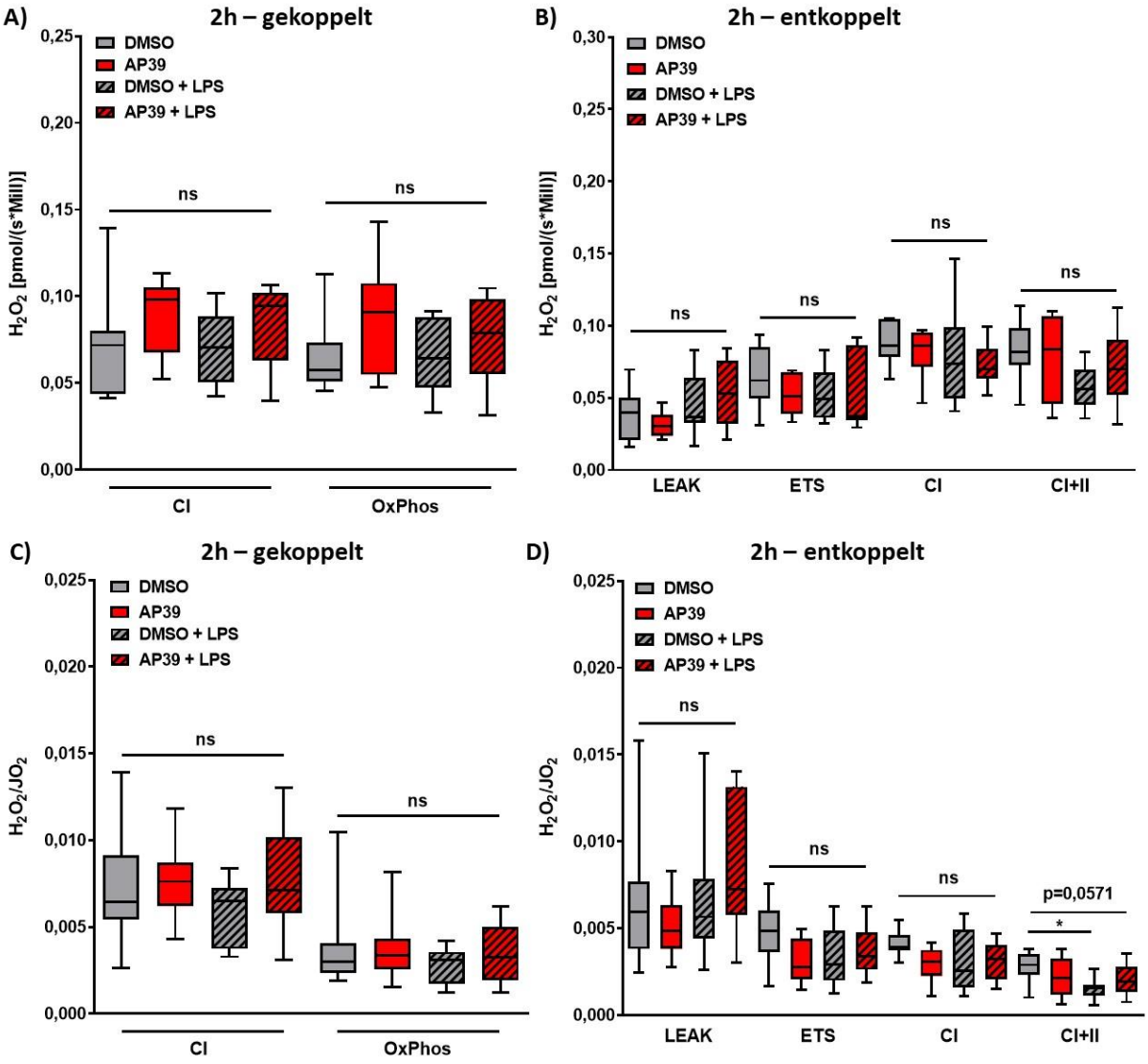

Abbildung 13: Wasserstoffperoxid- (H_2O_2-) Produktion von primären corticalen Neuronen (PCN) nach 2 Stunden (h) Stimulation im gekoppelten A) und entkoppelten B) Zustand; $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotient von PCN nach 2h Stimulation im gekoppelten C) und entkoppelten D) Zustand. Die Abbildungen A) und B) zeigen die H_2O_2-Produktion in $\frac{\mathbf{pmol}}{\mathbf{s*10^6 Zellen}}$ von PCN nach 2h Stimulation der Zellen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (0,1µl/ml, grau) oder (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphoniumbromid (AP39) (10nM in 0,1µl/ml DMSO, rot) mit und ohne Lipopolysaccharid- (LPS-) Stimulation (1µg/ml, straffiert) im gekoppelten (A)) und entkoppelten (B)) Zustand. Die Abbildungen C) und D) bilden den $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten der gleichen Experimente ab. Dargestellt sind in A) und C) die H_2O_2-Produktionen beziehungsweise (bzw.) $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten nach maximaler Stimulation der Komplexe I (CI) und der Komplexe I und II (OxPhos); in B) und D) sind die H_2O_2-Produktionen bzw. $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten im entkoppelten Zustand nach Oligomycin-Gabe (LEAK), vollständiger Entkoppelung (ETS), sowie nach maximaler Stimulation der entkoppelten Komplexe I (CI) und der Komplexe I und II (CI+II) dargestellt. Maximale intrinsische Aktivität des Elektronen-Transfer-Systems (ETS), mitochondrialer Sauerstoffverbrauch (JO_2), Ruheaktivität der Atmungskette/LEAK respiration (LEAK), maximale oxidative Phosphorylierungskapazität (OxPhos). Die Messungen wurden mit 1.500.000 Zellen/ml mit dem Oxygraph O2k von Oroboros Instruments durchgeführt. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median. Die äußere Begrenzung der Box entspricht den mittleren Quartilen. Die Whisker markieren die äußeren Quartile. p-Werte von >0,05 bzw. <0,05 sind mit ns bzw. * dargestellt. Gekoppelt: n=7-11; entkoppelt: n=8-11.

Die H_2O_2-Messungen zeigten im gekoppelten Zustand nach zweistündiger Stimulation einen leichten Anstieg der H_2O_2-Produktion in den AP39-Gruppen gegenüber der DMSO-Kontrolle (Abb. 13 A)). Diese absolut höhere H_2O_2-Produktion in den AP39-Gruppen zeigte in Bezugnahme auf den Sauerstoffverbrauch keinen erhöhten $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten sowohl in den LPS Gruppen als auch in den LPS-freien Gruppen (Abbildung 13 C)). LPS hatte weder auf die H_2O_2-Produktion noch auf den $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten einen ersichtlichen Einfluss.

Im entkoppelten Zustand der Atmungskette zeigte sich demgegenüber keine Erhöhung der H_2O_2-Produktion in den AP39 Gruppen (Abb. 13 B)). Außerdem zeigten sich auch keinerlei Unterschiede zwischen AP39 und DMSO bzw. AP39+LPS und DMSO+LPS im $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten (Abb. 13 D)). Lediglich eine Reduktion des $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten durch LPS zeigte sich im entkoppelten Zustand nach zweistündiger Stimulation in der DMSO+LPS Bedingung verglichen mit DMSO für den Quotienten von CI+CII.

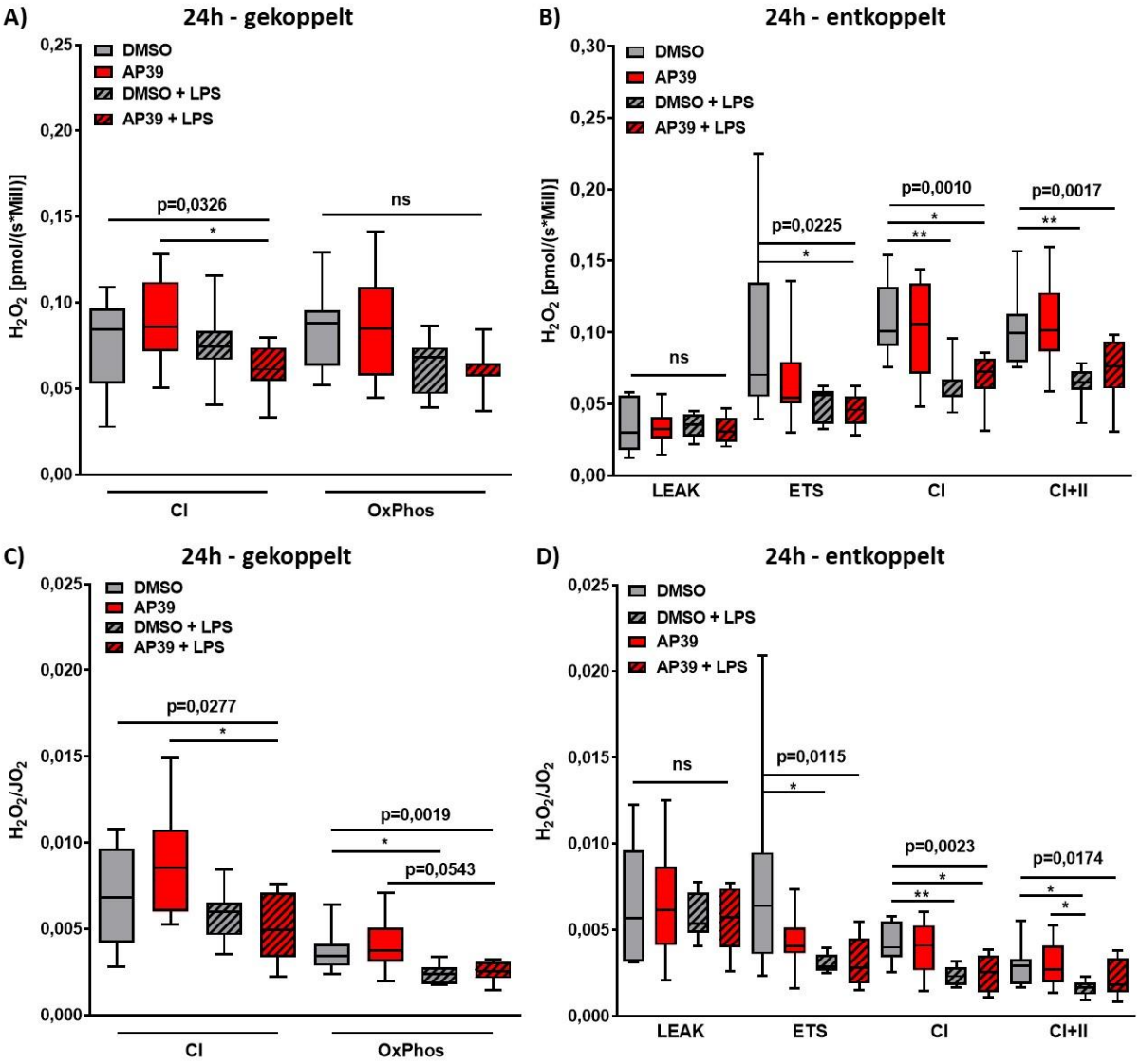

Abbildung 14: Wasserstoffperoxid- (H_2O_2-) Produktion von primären corticalen Neuronen (PCN) nach 24 Stunden (h) Stimulation im gekoppelten A) und entkoppelten B) Zustand; $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotient von PCN nach 24h Stimulation im gekoppelten C) und entkoppelten D) Zustand. Die Abbildungen A) und B) zeigen die H_2O_2-Produktion in $\frac{\mathbf{pmol}}{\mathbf{s*10^6 Zellen}}$ von Neuronen nach 24h Stimulation der Zellen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (0,1µl/ml, grau) oder (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphoniumbromid (AP39) (10nM in 0,1µl/ml DMSO, rot) mit und ohne Lipopolysaccharid- (LPS-) Stimulation (1µg/ml, straffiert) im gekoppelten (A)) und entkoppelten (B)) Zustand. Die Abbildungen C) und D) bilden den $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten der gleichen Experimente ab. Dargestellt sind in A) und C) die H_2O_2-Produktionen beziehungsweise (bzw.) $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten nach maximaler Stimulation der Komplexe I (CI) und der Komplexe I und II (OxPhos); in B) und D) sind die H_2O_2-Produktionen bzw. $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten im entkoppelten Zustand nach Oligomycin-Gabe (LEAK), vollständiger Entkoppelung (ETS), sowie nach maximaler Stimulation der entkoppelten Komplexe I (CI) und der Komplexe I und II (CI+II) dargestellt. Maximale intrinsische Aktivität des Elektronen-Transfer-Systems (ETS), mitochondrialer Sauerstoffverbrauch (JO_2), Ruheaktivität der Atmungskette/LEAK respiration (LEAK), maximale oxidative Phosphorylierungskapazität (OxPhos). Die Messungen wurden mit 1.500.000 Zellen/ml mit dem Oxygraph O2k von Oroboros Instruments durchgeführt. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median. Die äußere Begrenzung der Box entspricht den mittleren Quartilen. Die Whisker markieren die äußeren Quartile. p-Werte von >0,05, <0,05 und <0,01 sind jeweils mit ns, * und ** dargestellt. Gekoppelt: n=8-12; entkoppelt: n=8-13.

Nach 24-stündiger Stimulation zeigten die H_2O_2-Messungen im gekoppelten Zustand der Neurone einen Abfall der ROS-Produktion in den LPS-Gruppen (Abb. 14 A)). Dieser Abfall der H_2O_2-Produktion war nur in CI im Vergleich von AP39+LPS zu AP39 signifikant. Bei Betrachtung des $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten im gekoppelten Zustand sind diese Tendenzen in Bezug auf die H_2O_2-Produktion signifikant (Abb. 14 C)). Da LPS einerseits einen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs und andererseits einen Abfall der H_2O_2-Produktion bewirkt, addiert sich der Gesamteffekt. Wie in Abbildung 14 C) erkennbar, ist der $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotient von AP39+LPS im Vergleich zu AP39 bei Aktivierung von Komplex I signifikant niedriger. Bei Betrachtung des OxPhos-Zustandes weisen beide LPS-Gruppen signifikant bzw. nahezu signifikant niedrigere $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten als die zugehörigen Vergleichsgruppen auf. Effekte von AP39 auf die H_2O_2-Produktion oder den $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten sind im gekoppelten Zustand nicht erkennbar.

Bei Betrachtung der H_2O_2-Produktion im entkoppelten Zustand nach 24-stündiger Stimulation fällt insbesondere nach maximaler Stimulation von Komplex I und von Komplex I und II eine niedrigere H_2O_2-Produktion in den mit LPS behandelten Zellen als in den zugehörigen LPS-freien Vergleichsgruppen auf (Abb. 14 B)). Diese Effekte sind nur in den DMSO-Gruppen signifikant. Die hemmenden Effekte von LPS auf die H_2O_2-Produktion zeigten sich ebenfalls im $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten im entkoppelten Zustand (Abb. 14 D)). In den Zuständen CI und CI+II bewirkte LPS in Kombination mit DMSO einen signifikant niedrigeren $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten als in den LPS-freien Experimenten. Demgegenüber zeigte AP39 keine Veränderungen der ROS-Produktion und des $\frac{ROS}{JO_2}$-Quotienten.

Zusammenfassend zeigte sich nach 2-stündiger Stimulation eine leicht erhöhte H_2O_2-Produktion in den mit AP39 behandelten Zellen, während AP39 nach 24-stündiger Stimulation keine Effekte zeigte. Des Weiteren sind nach 24-stündiger Stimulation hemmende Wirkungen von LPS sowohl auf die ROS-Produktion als auch auf den $\frac{ROS}{JO_2}$-Quotienten in DMSO und AP39 behandelten Zellen feststellbar. Diese Effekte sind im entkoppelten Zustand bereits nach 2-stündiger Stimulation erkennbar gewesen.

3.3 Citrat Synthase

Weil der Sauerstoffverbrauch der Zellen neben der Aktivität der Atmungskette wesentlich von der Mitochondrienmasse bestimmt wird, ist es unerlässlich, diese zu ermitteln, um zu analysieren, ob eine Veränderung des Sauerstoffverbrauchs auf eine Änderung der Mitochondrienmasse oder eine veränderte Aktivität der einzelnen Komplexe der Atmungskette zurückzuführen ist. Nach photometrischer Bestimmung der Absorption durch TNB und Umrechnung des Signals konnte die Citrat-Synthase Aktivität jeder Probe, an welcher Experimente im Rahmen der JO_2-Messung durchgeführt wurden, bestimmt werden und wurde in $\frac{\mu mol * mg}{min * ml}$ angegeben. In der nachfolgenden Abbildung 15 ist die Citrat-Synthase Aktivität der einzelnen Versuchsgruppen grafisch dargestellt.

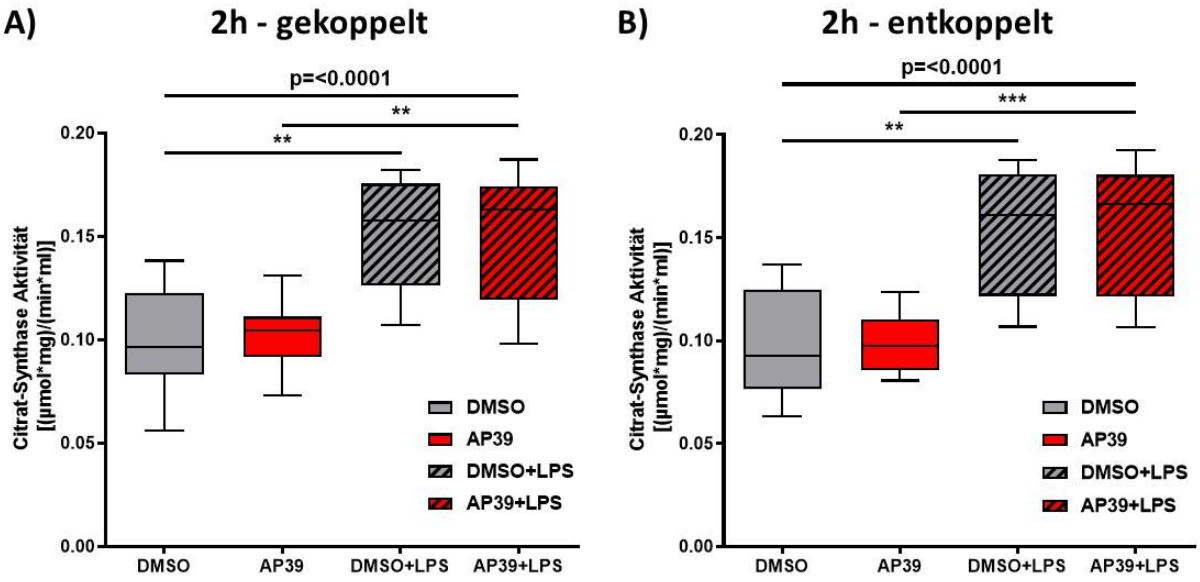

Abbildung 15: Citrat-Synthase (CS-) Aktivität von primären corticalen Neuronen (PCN) nach 2 Stunden (h) Stimulation. Die Abbildung zeigt die CS-Aktivität von PCN in $\frac{\mu mol * mg}{min * ml}$ im gekoppelten (A)) und entkoppelten Zustand (B)) nach 2h Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (0,1µl/ml, grau) oder (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphoniumbromid (AP39) (10nM in 0,1µl/ml DMSO, rot) mit und ohne Lipopolysaccharid- (LPS-) Stimulation (1µg/ml, straffiert). Zur Messung der CS-Aktivität wurde die Bildung von Thionitrobenzoat photometrisch bestimmt. Die Messungen wurden mit 200.000 Zellen/ml mit dem Photometer Spectra Max190 (Molecular Devices) durchgeführt. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median. Die äußere Begrenzung der Box entspricht den mittleren Quartilen. Die Whisker markieren die äußeren Quartile. p-Werte von <0,01 und <0,001 sind jeweils mit **, und *** dargestellt. n=12-14.

Nach zweistündiger Stimulation sind signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Stimulationsgruppen erkennbar (Abb. 15). Eine zweistündige Behandlung mit LPS führte sowohl in den zuvor im JO_2-Experiment gekoppelten als auch in den entkoppelten Neuronen

zu einer deutlichen Steigerung der CS-Aktivität im Vergleich zu den nicht mit LPS behandelten Zellen. Die CS-Aktivität war in allen LPS-Gruppen etwa 50% höher als in den zugehörigen Vergleichsgruppen. Weder gekoppelte noch entkoppelte AP39- bzw. AP39+LPS-Gruppen zeigten einen signifikanten Unterschied zu den zugehörigen DMSO-Kontrollgruppen.

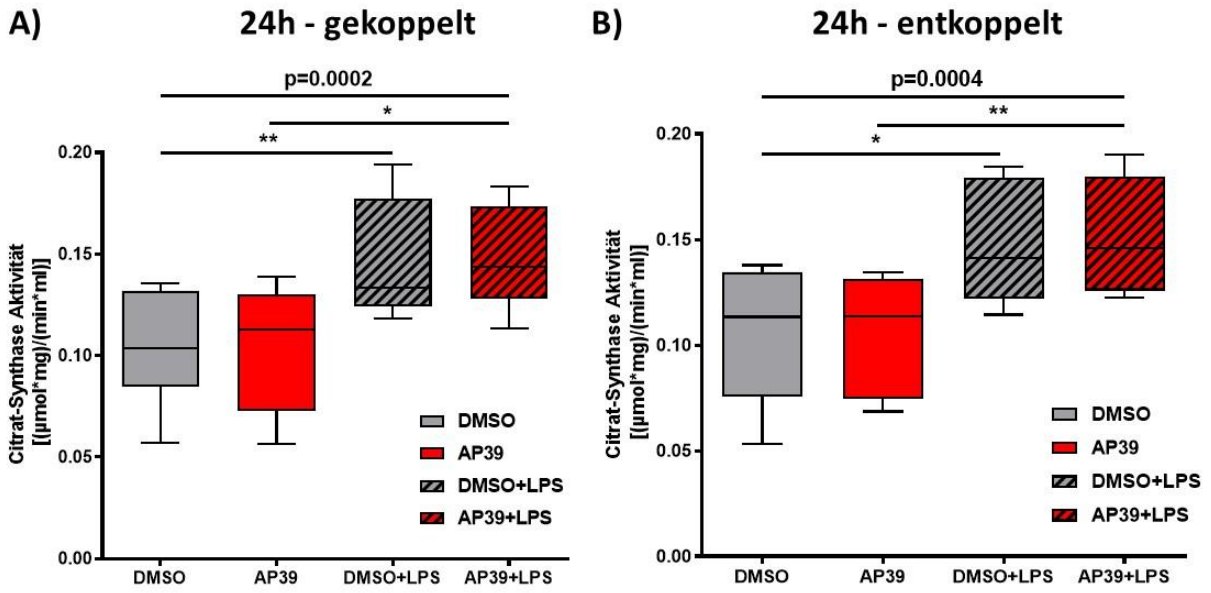

Abbildung 16: Citrat-Synthase (CS-) Aktivität von primären corticalen Neuronen (PCN) nach 24 Stunden (h) Stimulation. Die Abbildung zeigt die CS-Aktivität von PCN in $\frac{\mu mol*mg}{min*ml}$ im gekoppelten (A)) und entkoppelten Zustand (B)) nach 24h Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (0,1µl/ml, grau) oder (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphoniumbromid (AP39) (10nM in 0,1µl/ml DMSO, rot) mit und ohne Lipopolysaccharid- (LPS-) Stimulation (1µg/ml, straffiert). Zur Messung der CS-Aktivität wurde die Bildung von Thionitrobenzoat photometrisch bestimmt. Die Messungen wurden mit 200.000 Zellen/ml mit dem Photometer Spectra Max190 (Molecular Devices) durchgeführt. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median. Die äußere Begrenzung der Box entspricht den mittleren Quartilen. Die Whisker markieren die äußeren Quartile. p-Werte von <0,05 und <0,01 sind jeweils mit * und ** dargestellt. n=11-16.

Nach 24-stündiger Stimulation der Neurone zeigte sich ein sehr ähnliches Bild in Bezug auf die CS-Aktivität wie nach einer zweistündigen Stimulation (Abb. 16). Sowohl im gekoppelten als auch im entkoppelten Zustand war eine deutliche Zunahme der CS-Aktivität im Rahmen einer LPS-Stimulation erkennbar. Diese signifikanten Effekte fielen allerdings weniger deutlich als nach zweistündiger Stimulation aus. Des Weiteren ist in Kongruenz zu den Ergebnissen nach zweistündiger Stimulation auch nach 24-stündiger Stimulation keine Änderung der CS-Aktivität durch AP39 nachweisbar. Zusammenfassend zeigte eine LPS-Stimulation sowohl nach 2h als auch nach 24h eine signifikant erhöhte CS-Aktivität, während eine Stimulation mit AP39 keinen Effekt auf die CS-Aktivität besitzt.

3.4 Western Blots

Die Expression der Proteine COX4, COX5A, COX5B, iNOS, nNOS, PGC1α und GFAP wurde mittels Western Blot quantifiziert. Die Ergebnisse der Western Blots der einzelnen Proteine sind in den nachfolgenden Abbildungen grafisch dargestellt.

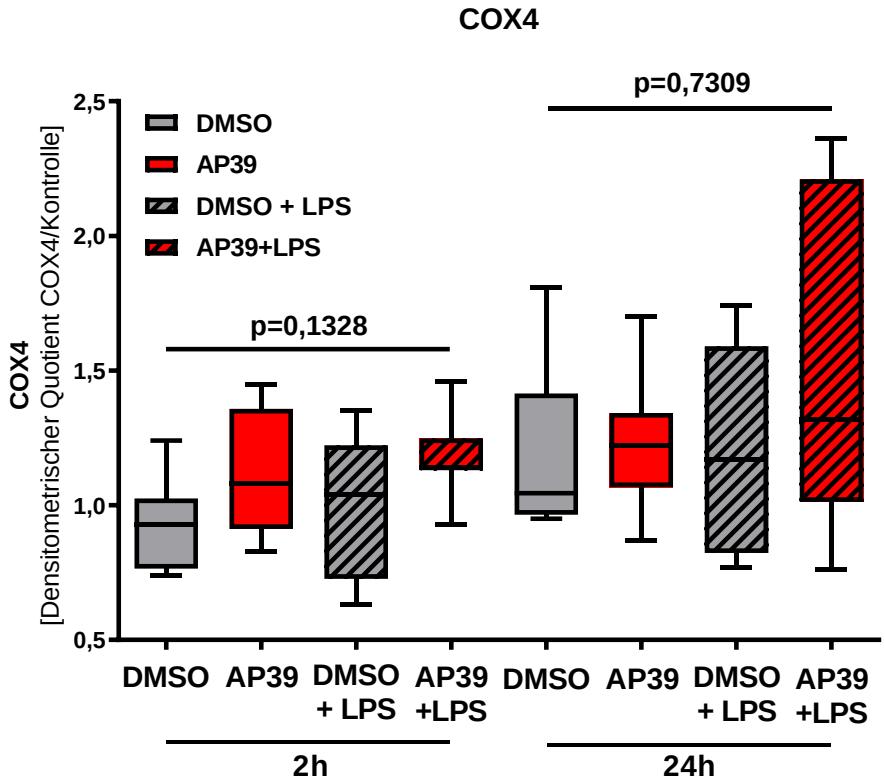

Abbildung 17: Densitometrischer Quotient Cytochrom-C-Oxidase-4 (COX4) / Kontrolle von Western Blots von primären corticalen Neuronen (PCN) nach 2 Stunden (h) und 24h Stimulation. Die Abbildung zeigt den Quotienten der densitometrischen Quantifizierung von COX4/Kontrolle von Neuronen nach 2h (links) und 24h (rechts) Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (0,1µl/ml, grau) oder (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphoniumbromid (AP39) (10nM in 0,1µl/ml DMSO, rot) mit und ohne Lipopolysaccharid- (LPS-) Stimulation (1µg/ml, straffiert). Die densitometrische Quantifizierung wurde mittels Western Blot durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit 40mg Protein pro Probe. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median. Die äußere Begrenzung der Box entspricht den mittleren Quartilen. Die Whisker markieren die äußeren Quartile. Belichtungszeiten: 5 und 8 Sekunden. n=8.

Bei Betrachtung der densitometrischen Quotienten von COX4/Kontrolle von Neuronen sind keine signifikanten Unterschiede nachweisbar (Abb. 17). Allerdings ist eine tendenziell höhere Proteinmenge der Untereinheit 4 der Cytochrom-C-Oxidase nach zweistündiger Stimulation mit AP39+LPS im Vergleich zur DMSO-Kontrolle sichtbar (p=0,1669). Nach 24-stündiger Stimulation zeigen die Neurone keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

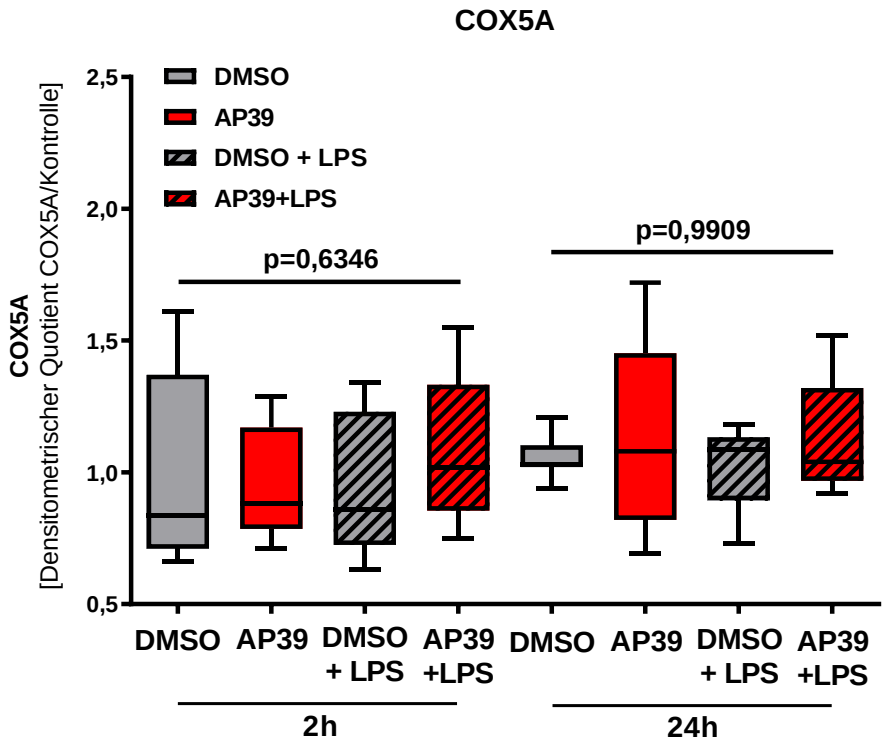

Abbildung 18: Densitometrischer Quotient Cytochrom-C-Oxidase-5A (COX5A) / Kontrolle von Western Blots von primären corticalen Neuronen (PCN) nach 2 Stunden (h) und 24h Stimulation. Die Abbildung zeigt den Quotienten der densitometrischen Quantifizierung von COX5A/Kontrolle von PCN nach 2h (links) und 24h (rechts) Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (0,1µl/ml, grau) oder (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphoniumbromid (AP39) (10nM in 0,1µl/ml DMSO, rot) mit und ohne Lipopolysaccharid- (LPS-) Stimulation (1µg/ml, straffiert). Die densitometrische Quantifizierung wurde mittels Western Blot durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit 40mg Protein pro Probe. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median. Die äußere Begrenzung der Box entspricht den mittleren Quartilen. Die Whisker markieren die äußeren Quartile. Belichtungszeiten: 30, 45 und 60 Sekunden. n=8.

Bei der Bestimmung des Quotienten COX5A/Kontrolle der densitometrischen Quantifizierung von Western Blots zeigten die untersuchten Neurone weder nach zweistündiger noch nach 24-stündiger Stimulation Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (Abb. 18). Sowohl LPS als auch AP39 hatten keinerlei Effekte auf die Expression der Untereinheit 5A der Cytochrom-C-Oxidase nach zwei und nach 24 Stunden.

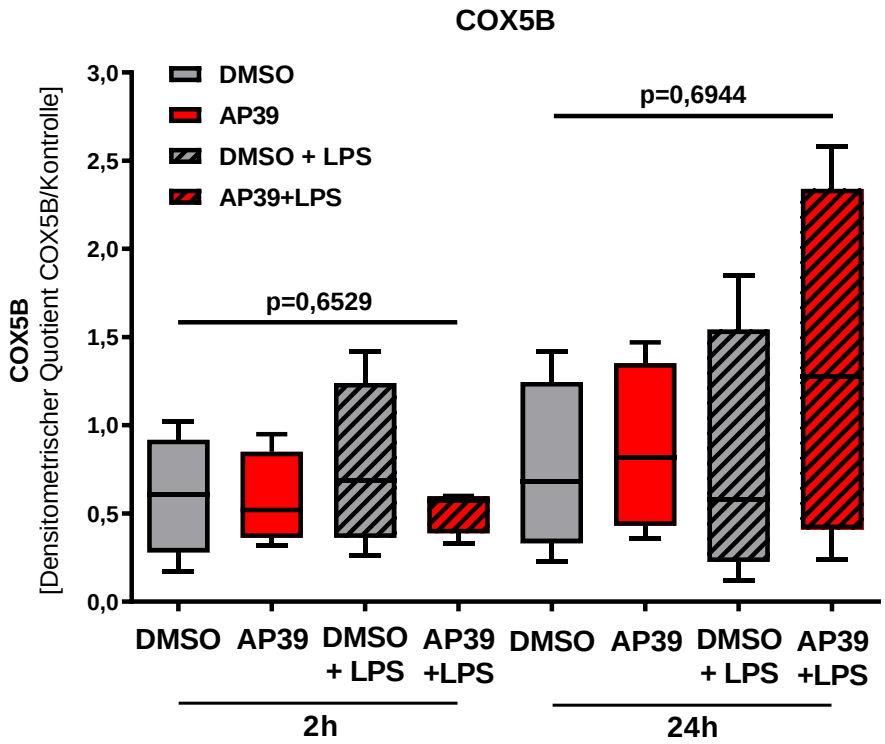

Abbildung 19: Densitometrischer Quotient Cytochrom-C-Oxidase-5B (COX5B) / Kontrolle von Western Blots von primären corticalen Neuronen (PCN) nach 2 Stunden (h) und 24h Stimulation. Die Abbildung zeigt den Quotienten der densitometrischen Quantifizierung von COX5B/Kontrolle von PCN nach 2h (links) und 24h (rechts) Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (0,1µl/ml, grau) oder (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphoniumbromid (AP39) (10nM in 0,1µl/ml DMSO, rot) mit und ohne Lipopolysaccharid- (LPS-) Stimulation (1µg/ml, straffiert). Die densitometrische Quantifizierung wurde mittels Western Blot durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit 40mg Protein pro Probe. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median. Die äußere Begrenzung der Box entspricht den mittleren Quartilen. Die Whisker markieren die äußeren Quartile. Belichtungszeit: 30 Minuten. n=4.

Vergleichend zu den Ergebnissen bei COX5A zeigt auch der Quotient COX5B/Kontrolle der densitometrischen Quantifizierung mittels Western Blot keinerlei Effekt sowohl von AP39 als auch von LPS auf die Proteinmenge der Untereinheit 5B der Cytochrom-C-Oxidase (Abb. 19). Weder nach zweistündiger noch nach 24-stündiger Stimulation zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

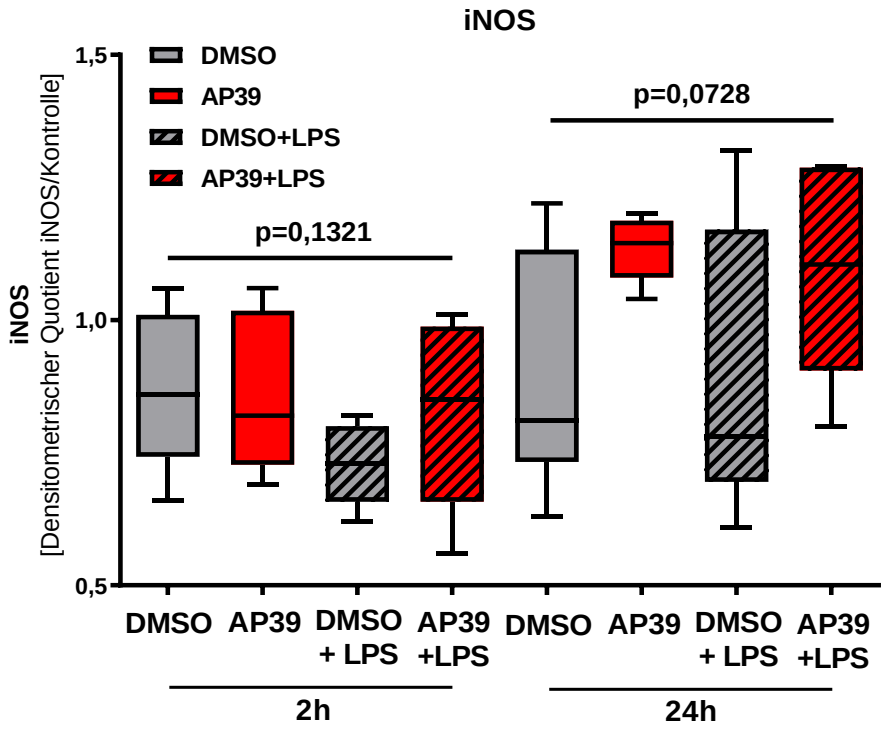

Abbildung 20: Densitometrischer Quotient induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) / Kontrolle von Western Blots von primären corticalen Neuronen (PCN) nach 2 Stunden (h) und 24h Stimulation. Die Abbildung zeigt den Quotienten der densitometrischen Quantifizierung von iNOS/Kontrolle von Neuronen nach 2h (links) und 24h (rechts) Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (0,1µl/ml, grau) oder (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphoniumbromid (AP39) (10nM in 0,1µl/ml DMSO, rot) mit und ohne Lipopolysaccharid- (LPS-) Stimulation (1µg/ml, straffiert). Die densitometrische Quantifizierung wurde mittels Western Blot durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit 40mg Protein pro Probe. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median. Die äußere Begrenzung der Box entspricht den mittleren Quartilen. Die Whisker markieren die äußeren Quartile. Belichtungszeiten: 2 und 4 Minuten. n=8.

Sowohl in den Gruppen, in welchen die Zellen 2h stimuliert wurden, als auch in den Gruppen, welche 24 Stunden stimuliert wurden, lassen sich keinerlei signifikante Unterschiede beim densitometrischen Quotienten von iNOS/Kontrolle zwischen den einzelnen Stimulationen feststellen (Abb. 20). Bei Betrachtung des densitometrischen Quotienten nach vorausgegangener 24-stündiger Stimulation sind allerdings tendenziell erhöhte iNOS/Kontrolle-Quotienten von AP39 gegenüber der zugehörigen DMSO-Kontrolle feststellbar.

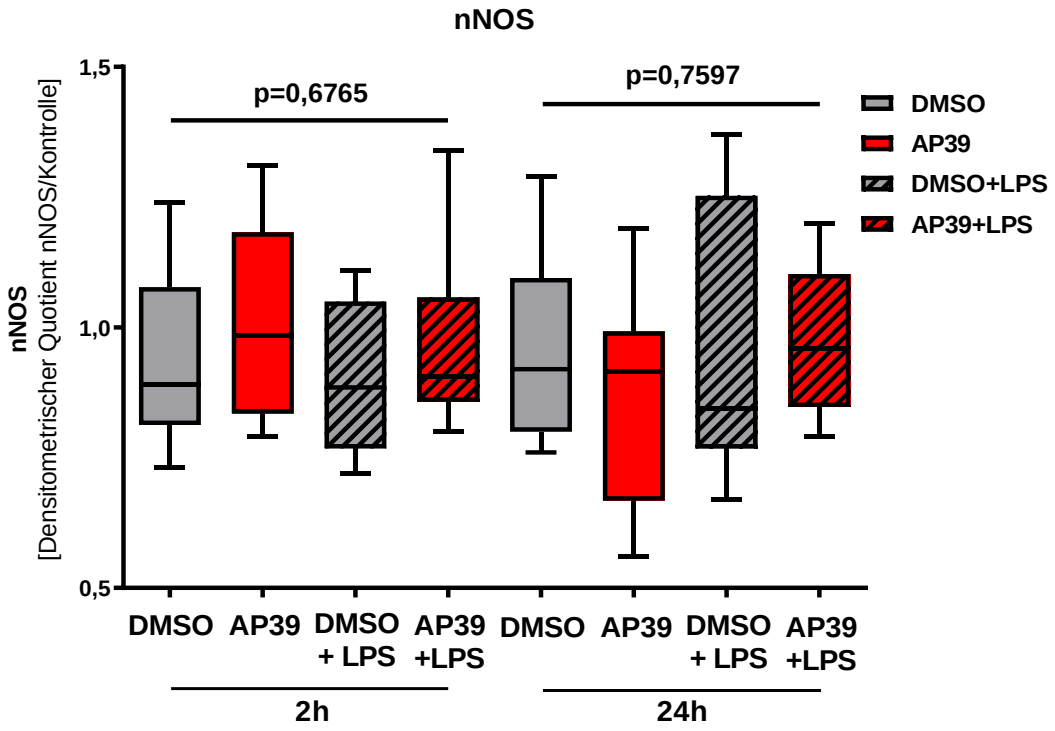

Abbildung 21: Densitometrischer Quotient neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) / Kontrolle von Western Blots von primären corticalen Neuronen (PCN) nach 2 Stunden (h) und 24h Stimulation. Die Abbildung zeigt den Quotienten der densitometrischen Quantifizierung von nNOS/Kontrolle von Neuronen nach 2h (links) und 24h (rechts) Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (0,1µl/ml, grau) oder (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphoniumbromid (AP39) (10nM in 0,1µl/ml DMSO, rot) mit und ohne Lipopolysaccharid- (LPS-) Stimulation (1µg/ml, straffiert). Die densitometrische Quantifizierung wurde mittels Western Blot durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit 40mg Protein pro Probe. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median. Die äußere Begrenzung der Box entspricht den mittleren Quartilen. Die Whisker markieren die äußeren Quartile. Belichtungszeiten: 20 und 30 Sekunden. n=10.

Bei Betrachtung des nNOS/Kontrolle-Quotienten sind sowohl nach zweistündiger als auch nach 24-stündiger Stimulation keinerlei Effekte der verschiedenen Stimulationen auf den gemessenen Quotienten feststellbar (Abb. 21).

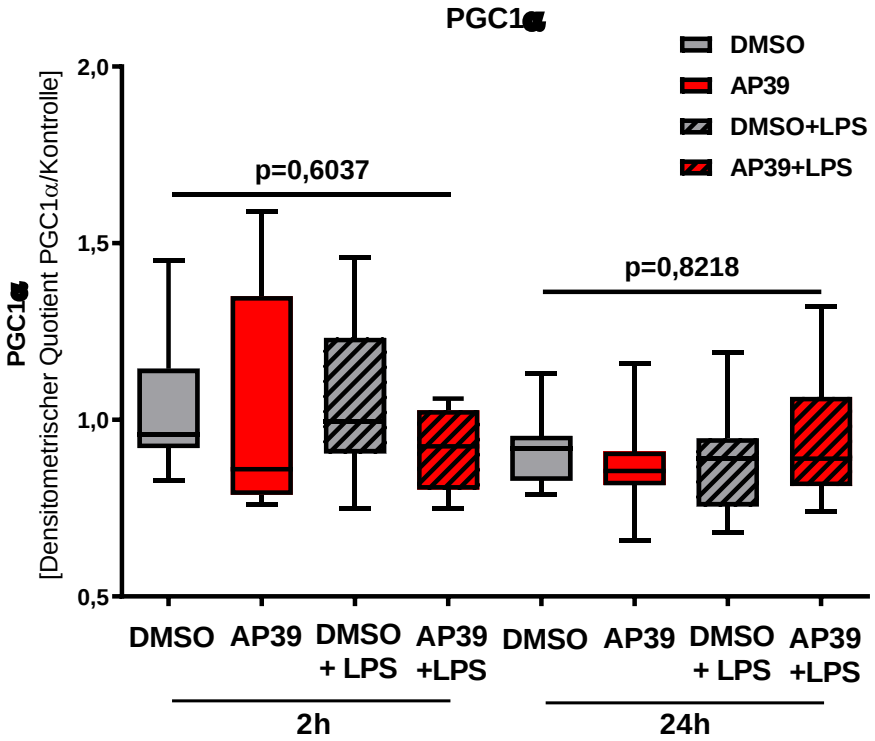

Abbildung 22: Densitometrischer Quotient Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ Coactivator 1 α (PGC1α) / Kontrolle von Western Blots von primären corticalen Neuronen (PCN) nach 2 Stunden (h) und 24h Stimulation. Die Abbildung zeigt den Quotienten der densitometrischen Quantifizierung von PGC1α/Kontrolle von Neuronen nach 2h (links) und 24h (rechts) Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (0,1µl/ml, grau) oder (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphoniumbromid (AP39) (10nM in 0,1µl/ml DMSO, rot) mit und ohne Lipopolysaccharid- (LPS-) Stimulation (1µg/ml, straffiert). Die densitometrische Quantifizierung wurde mittels Western Blot durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit 40mg Protein pro Probe. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median. Die äußere Begrenzung der Box entspricht den mittleren Quartilen. Die Whisker markieren die äußeren Quartile. Belichtungszeiten: 6 und 10 Sekunden. n=8.

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse der Western Blots zum Protein PGC1α dargestellt. Weder LPS noch AP39 hatten nach zweistündiger Stimulation nachweisbare Effekte auf den densitometrisch gemessenen Quotienten PGC1α/Kontrolle. Außerdem waren nach 24-stündiger Stimulation ebenfalls keine Effekte von LPS und/oder AP39 auf den PGC1α/Kontrolle-Quotienten messbar.

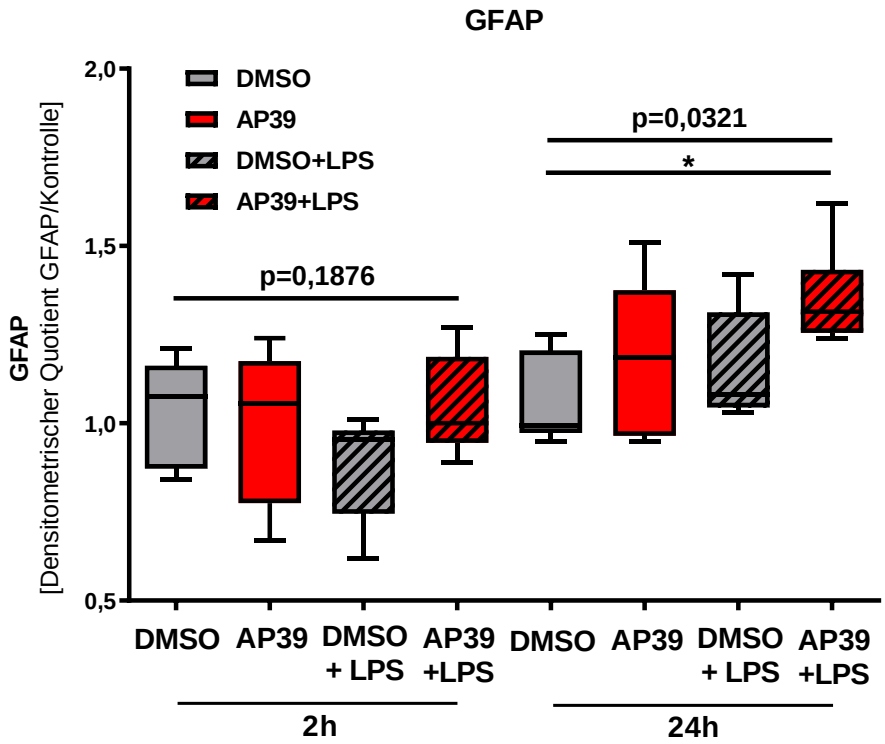

Abbildung 23: Densitometrischer Quotient saures Gliafaserprotein (GFAP) / Kontrolle von Western Blots von primären corticalen Neuronen (PCN) nach 2 Stunden (h) und 24h Stimulation. Die Abbildung zeigt den Quotienten der densitometrischen Quantifizierung von GFAP/Kontrolle von Neuronen nach 2h (links) und 24h (rechts) Stimulation mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (0,1µl/ml, grau) oder (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphoniumbromid (AP39) (10nM in 0,1µl/ml DMSO, rot) mit und ohne Lipopolysaccharid- (LPS-) Stimulation (1µg/ml, straffiert). Die densitometrische Quantifizierung wurde mittels Western Blot durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit 40mg Protein pro Probe. Darstellung als Box-Whisker-Plot mit Median. Die äußere Begrenzung der Box entspricht den mittleren Quartilen. Die Whisker markieren die äußeren Quartile. Ein p-Wert von <0,05 ist mit * dargestellt. Belichtungszeiten: 4 und 6 Minuten. n=8.

Als letztes Protein, welches ich untersucht habe, sind in Abbildung 23 die Quotienten von GFAP dargestellt. Nach zweistündiger Stimulation zeigen sich bei Betrachtung des densitometrischen Quotienten von GFAP/Kontrolle keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Stimulationsgruppen. Dem gegenüber ist nach 24-stündiger Stimulation ein signifikant höherer densitometrischer Quotient von AP39+LPS im Vergleich zu den mit DMSO stimulierten Zellen zu erkennen.

4. Diskussion

Zusammenfassend konnte ich in der vorliegenden Dissertation diverse Effekte des H_2S-Donors AP39, sowie von LPS auf die Atmungskette und weitere mitochondriale und zelluläre Funktionen von Neuronen zeigen. Insbesondere die in der Fragestellung formulierten Fragen dieser Arbeit konnten ausreichend beantwortet werden. Die Auswirkungen von AP39 auf die Atmungskette von embryonalen Rattenneuronen skizierten einen biphasischen Verlauf. Nach der kurzen Stimulationsdauer von zwei Stunden zeigte sich eine diskrete, nicht signifikante Steigerung des Sauerstoffverbrauchs der Neurone durch AP39, während nach 24-stündiger Stimulation der gegenteilige Effekt zu erkennen war. Nach 24-stündiger Stimulation war eine deutliche Hemmung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs insbesondere nach Aktivierung von Komplex IV messbar. Da diese Effekte weder mit nennenswerten Effekten bei der H_2O_2-Produktion noch einer Änderung der Mitochondrienmasse und der Mitochondrial Reserve Capacity einhergehen, ist davon auszugehen, dass die Effekte in erster Linie über eine direkte Wirkung an den Komplexen der Atmungskette hervorgerufen werden.

Des Weiteren konnten deutliche Auswirkungen von LPS auf die Atmungskette, sowie weiterer zellulärer Funktionen gezeigt werden. LPS bewirkt sowohl nach zweistündiger als auch nach 24-stündiger Stimulation eine Steigerung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs. Da diese Steigerung mit einem Anstieg der CS-Aktivität, sowie einer erhöhten MRC und einer erniedrigten OCR einhergehen, ist davon auszugehen, dass diese Effekte über eine Steigerung der Mitochondrienmasse als Reaktion auf vermehrten Zellstress mit einhergehendem erhöhtem Energiebedarf, sowie als Vorbereitung auf weitere Schädigungen ablaufen.

Außerdem konnte ich zeigen, dass die Effekte von AP39 auf die Mitochondrienmasse, den Sauerstoffverbrauch und die H_2O_2-Produktion nicht nur in einer alleinigen Stimulation, sondern auch in einer Co-Stimulation mit LPS, welche ich als Inflammationsmodell nutzte, nachweisbar sind. Darüber hinaus sind die Auswirkungen von AP39 in den Proteinexpressionen nicht durch LPS beeinflusst worden. Ebenso wurden bei Betrachtung der Proteinexpressionen der NO-produzierenden Enzyme keine Veränderungen durch AP39 sowohl mit als auch ohne LPS festgestellt.

4.1 Wahl des Messzeitpunktes

Alle Experimente im Rahmen dieser Dissertation wurden an Neuronen durchgeführt, die 21 bis 24 Tage in Kultur waren. Dieser Zeitraum wurde aus mehreren Gründen so gewählt. Zum einen

war eine Zielsetzung, dass die Experimente an adulten Zellen durchgeführt wurden, zum anderen sollten die Zellen während des Untersuchungszeitraums einen möglichst konstanten Sauerstoffverbrauch aufweisen. Außerdem sollte eine möglichst reine Neuronenzellkultur mit möglichst wenig Glia untersucht werden. In der initialen siebentägigen Entwicklungsphase und der daran anschließenden Wachstumsphase sind die Neurone für äußere Einflüsse sehr anfällig und benötigen Mediatoren und Wachstumsfaktoren, welche unter anderem von Gliazellen freigesetzt werden [26, 122]. Deshalb ist es von entscheidender Bedeutung, dass das Wachstum der Gliazellen nicht zu früh gehemmt wird [10, 11]. Im Rahmen der Voruntersuchungen bestätigte sich dies, da Zellen, welche höheren Konzentrationen an B27 ausgesetzt waren, ein deutlich geringeres Wachstum und einen deutlich geringeren Sauerstoffverbrauch aufwiesen. Nach Analyse der Ergebnisse zeigte sich bei einer Konzentration von 2% B27 im Neurobasalmedium ein optimales Wachstum der Neurone bei im zeitlichen Verlauf zunehmender Apoptose der Glia, sodass ab dem 14. Tag in Kultur ein gutes adultes Entwicklungsstadium der Neurone bei gleichzeitig niedriger Gliadichte zu sehen war. Da allerdings die Ergebnisse des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs ab Tag 14 bis einschließlich Tag 21 einen stetig wachsenden Sauerstoffverbrauch detektierten, eigneten sich die Zellen zu diesem Zeitpunkt nicht für Messungen der mitochondrialen Aktivität (Abb. 8). Erst im Zeitraum vom 21. bis zum 24. Tag in Kultur zeigten die Neurone einen konstanten Sauerstoffverbrauch. Da die Vitalität der Neurone allerdings ab der 4. Woche in Kultur abnimmt, war eine weitere Ausweitung des Messzeitpunktes nicht möglich, sodass wir uns für Messungen an den Tagen 21 bis 24 in Kultur entschieden [10, 11, 26]. Dies ist der bestmögliche Untersuchungszeitraum, da hier der Sauerstoffverbrauch der Zellen konstant ist, das Wachstum der Neurone weit fortgeschritten ist, die Glia zu einem großen Teil bereits apoptotisch ist, während zu späteren Zeitpunkten die Vitalität der Neurone abnimmt.

4.2 Zeitabhängige Effekte von AP39 auf neuronale Mitochondrien

4.2.1 Effekte von AP39 auf den Sauerstoffverbrauch sind zeitabhängig

Wie bereits mehrfach gezeigt wurde, besitzt H_2S bei unterschiedlichen Konzentrationen verschiedene Effekte auf Mitochondrien [46, 90, 128, 129]. Bei niedrigen H_2S-Konzentrationen von bis zu 10µM ist ein stimulatorischer Effekt und damit ein höherer Sauerstoffverbrauch der Zellen zu erkennen [46, 128, 129]. Dies beruht darauf, dass H_2S als eine Art Reservesubstrat in der Atmungskette fungiert, indem H_2S Elektronen über die SOU auf Ubichinon überträgt [46, 128]. Diese Art der Energiegewinnung dient evolutionär alten Lebewesen zur

Energiegewinnung, während sie in Säugetieren darüber hinaus auch zur Elimination von H_2S beiträgt [46, 128]. Steigt die H_2S-Konzentration allerdings in den mittleren bis hohen millimolaren Bereich an, überwiegen die hemmenden Effekte auf die Atmungskette, da H_2S eine reversible Hemmung der Cytochrom-C-Oxidase bewirkt [45, 53, 90, 108, 128]. Dies führt zu einem Elektronenrückstau im ETS und hierdurch zu einer Hemmung der vorangeschalteten Enzyme der Atmungskette und infolgedessen auch zu einem Erliegen der ATP-Synthase [128, 140].

Wird H_2S durch den langsam H_2S-freisetzenden Donor AP39 appliziert, sind diese konzentrationsabhängigen Effekte ebenfalls zu erkennen. Ist die Freisetzungsrate von H_2S durch AP39 größer als die Eliminationskapazität der Zellen führt dies zu einem langsamen Anstieg der H_2S-Konzentration in den Zellen. Zusätzlich führt die Zieldomäne TPP^+ zu einer Akkumulation mit dem Faktor 100 bis 500 von AP39 im Mitochondrium im Vergleich zum Extrazellulärraum [121, 129]. Diese sehr starke Akkumulation resultiert in einer biochemisch relevanten H_2S-Konzentration in den Mitochondrien.

4.2.1.1 Effekte von AP39 nach 2-stündiger Stimulation auf den Sauerstoffverbrauch

In meinen Experimenten zeigte sich nach zweistündiger Stimulation mit AP39 ein tendenziell, aber nicht signifikant, höherer Sauerstoffverbrauch in den Zuständen CI+CII und CIV im entkoppelten Zustand als in den zugehörigen DMSO-Kontrollgruppen (Abb. 9). Dies wurde sowohl in Experimenten mit als auch ohne LPS-Stimulation gezeigt. Der höhere Sauerstoffverbrauch ist darauf zurückzuführen, dass nach zweistündiger Inkubation mit AP39 die H_2S-Konzentration im Mitochondrium so weit angestiegen ist, dass die Atmungskette stimuliert wird. Entsprechend der Literatur zeigt dies, dass die H_2S-Konzentration zu diesem Zeitraum im hohen nanomolaren bis niedrigen mikromolaren Bereich von bis zu 10µM liegt und H_2S von der SOU als Elektronendonor verwendet wird [128]. Dies resultiert in einem verstärkten Sauerstoffverbrauch, da Sauerstoff sowohl bei der Bildung von Thiosulfat aus H_2S durch die SOU als auch bei der Übertragung der Elektronen von Ubichinon letztendlich auf Sauerstoff zur Bildung von Wasser durch Komplex IV verbraucht wird [46, 128]. In unseren Experimenten zeigte sich jeweils im entkoppelten Zustand eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs in den AP39 Gruppen um 4,4% CI+CII (AP39) bzw. 3,1% CI+CII (AP39+LPS) und 13,0% CIV (AP39) bzw. 10,5% CIV (AP39+LPS) im Vergleich zu den zugehörigen DMSO-Kontrollen. Diese Ergebnisse sind kongruent zu bereits veröffentlichten

Studien, da zum Beispiel in Nagern gezeigt wurde, dass 10 bis 20% des Gesamtsauerstoffverbrauchs auf die relative Aktivität der SOU zurückzuführen ist [128].

Somit könnte die Steigerung des Sauerstoffverbrauchs nach Aktivierung von CIV durch die in der Literatur beschriebenen Steigerung nach SOU-Stimulation geschuldet sein, während die Steigerung nach maximaler Stimulation von CI+CII hinter der potenziellen Steigerung zurückbleibt. Hieraus lässt sich der Rückschluss ziehen, dass nach zweistündiger Inkubation der Zellen mit AP39 die H_2S-Konzentration noch nicht so stark angestiegen ist, dass die SOU maximal aktiviert wird. Andererseits könnte eine submaximale Steigerung des Sauerstoffverbrauchs auch durch eine bereits einsetzende partielle Hemmung von Komplex IV durch H_2S hervorgerufen werden und der in den Experimenten gezeigte gesteigerte Sauerstoffverbrauch wäre ein Kumulationsergebnis von Aktivierung der Atmungskette über die SOU und Hemmung der Atmungskette an CIV. Dies ist allerdings bei diesen Ergebnissen ausgeschlossen, da eine Hemmung von CIV durch H_2S einen im Vergleich zu DMSO erniedrigten Sauerstoffverbrauch nach maximaler Stimulation von CIV ergeben würde. Da der Sauerstoffverbrauch nach Stimulation von CIV in den AP39-Gruppen allerdings höher als in den DMSO-Gruppen ist, spricht dies gegen eine bereits einsetzende Hemmung durch H_2S.

Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse fällt außerdem auf, dass Unterschiede nur im entkoppelten Zustand erkennbar sind. Im Rahmen der Entkoppelung wird zum einen der Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran, mittels Membranpermeabilisierung durch FCCP abgebaut [24, 41]. Zum anderen wird mit Oligomycin die ATP-Synthase inhibiert [24, 39, 50]. Unter physiologischen Bedingungen müssen die Komplexe I bis IV, welche das ETS darstellen, gegen diesen Protonengradienten Protonen in den Intermembranraum pumpen [38–41]. Dies führt zu einer natürlichen Hemmung der Enzymaktivität. Als Folge ist die Aktivität des ETS abhängig vom mitochondrialen Membranpotential, der Aktivität der ATP-Synthase und damit auch vom ATP-Bedarf der Zelle [41]. Da das ETS deshalb stets eine leichte negative Rückkoppelung erfährt, ist es im gekoppelten Zustand nicht maximal aktiviert [41]. Im Rahmen der Entkoppelung fällt diese negative Rückkoppelung weg, sodass die Aktivität des ETS zunimmt [41]. Bei fehlender Hemmung des ETS, ist auch die Aktivität der SOU primär von der Substratmenge abhängig und die Auswirkungen von AP39 bzw. H_2S sind deutlicher erkennbar.

Des Weiteren ist ersichtlich, dass die Effekte bei Aktivierung von CIV am deutlichsten erkennbar sind, während sie bei CI+II kaum und bei ETS, LEAK und CI nicht erkennbar sind. Grund hierfür ist die Einspeisung von Elektronen durch die SOU auf Ebene von Ubichinon,

welches Elektronen von Komplex I, II und der SOU auf Komplex III überträgt [128]. Daraus folgt, dass die Metabolisierung von H_2S und damit auch von AP39 keine nennenswerten Effekte auf Komplex I und II aufweist, da die Elektronen über Ubichinon erst an Komplex III ihre Wirkung entfalten. Solange nur Komplex I oder Komplex I und II, aber Komplex III und IV noch nicht aktiviert sind, sind die Effekte der SOU auf den Sauerstoffverbrauch nur begrenzt sichtbar. In dieser Situation entsteht ein relativer Mangel an oxidiertem Ubichinon, auf welches die Komplexe I, II und die SOU Elektronen übertragen, da die Oxidation an Komplex III aufgrund negativer Rückkopplung des submaximal aktiven Komplex IV nicht maximal abläuft. Erst nachdem ein adäquater „Elektronenabfluss“ durch maximale Aktivierung von CIV geschaffen ist, führt dies auch zu einer maximalen Aktivität der SOU, weshalb hierdurch die Effekte von H_2S deutlicher zu erkennen sind. Dennoch ist bei Aktivierung von CI+II in den AP39-Gruppen ein um 3 bis 4% höherer Sauerstoffverbrauch erkennbar. Dies ist durch die schlechtere stöchiometrische Bilanz von 0,75 ($1{,}5O_2/2H_2S$) und dem daraus resultierenden dreifach erhöhten Sauerstoffverbrauch bei der Metabolisierung von H_2S im Vergleich zu NADH und $FADH_2$ erklärbar [46, 128].

4.2.1.2 Effekte von AP39 nach 24-stündiger Stimulation auf den Sauerstoffverbrauch

Während AP39 nach zweistündiger Inkubation die Atmungskette der Neurone stimuliert, zeigt sich nach 24-stündiger Stimulation ein gegenteiliger Effekt. Nach 24-stündiger Stimulation ist der Sauerstoffverbrauch der Neurone sowohl in der AP39 als auch in der AP39+LPS-Gruppe im Vergleich zu der zugehörigen DMSO-Kontrolle erniedrigt (Abb. 10). Dies zeigt sich im entkoppelten Zustand nach maximaler Aktivierung von Komplex IV, sowie auch angedeutet im gekoppelten Zustand bei Betrachtung der AP39+LPS-Gruppe im Zustand CIV (Abb. 10). Diese Ergebnisse sind dadurch zu erklären, dass H_2S in höheren Konzentrationen die Atmungskette über eine reversible Hemmung der Cytochrom-C Oxidase hemmt [53, 45, 77, 90, 108, 128]. Eine komplette Hemmung führt zu einem vollständigen Erliegen der Atmungskette und damit zu einem Sauerstoffverbrauch nahe 0, wie es nach Applikation des Komplex III-Inhibitors Antimycin A sichtbar ist [128, 140]. Es ist anzunehmen, dass die H_2S-Konzentration in den neuronalen Mitochondrien deutlich größer als 10µM ist, da der inhibitorische Effekt gegenüber dem stimulativen Effekt deutlich überwiegt. Allerdings ist die H_2S-Konzentration nicht so hoch, dass die Atmungskette vollständig zum Erliegen gekommen ist. Genauer gesagt zeigten die mit AP39 behandelten Zellen im entkoppelten Zustand noch 82,9% CIV (AP39) bzw. 71,03% CIV (AP39+LPS) des Sauerstoffverbrauchs der zugehörigen DMSO-Kontrollen. Folglich resultierte aus der Inkubation mit AP39 nur eine partielle

Hemmung der Atmungskette, sodass wichtige zelluläre Funktionen und die Viabilität der Zellen wahrscheinlich nicht wesentlich beeinträchtigt sind. Dies macht es wahrscheinlich, dass AP39 auch nach 24 Stunden immer noch H_2S freisetzt. Sobald AP39 kein H_2S freisetzt, fallen die H_2S-Spiegel in den Mitochondrien rasch auf physiologische Level ab, sodass innerhalb von 10 bis 30min eine nahezu normale Funktion der Atmungskette wieder hergestellt ist [22, 128]. Um diese Aussage zu verifizieren, benötigt es allerdings weiterer Versuche zu späteren Zeitpunkten, um eine mögliche irreversible Mitochondrienschädigung und einen hieraus resultierenden erniedrigten Sauerstoffverbrauch auszuschließen.

Es sind außerdem nach 24-stündiger Inkubation im entkoppelten Zustand nur minimale hemmende bis gar keine Effekte in den Zuständen CI und CI+II zu erkennen (Abb. 10 B)). Aus der maximalen Aktivierung von CI und CI+CII resultiert eine starke Steigerung der Reduktion von Ubichinon und dadurch indirekt auch eine verstärkte Reduktion von Cytochrom C. Reduziertes Cytochrom C wird durch CIV oxidiert und damit CIII wieder zur Verfügung gestellt [53, 77, 90, 108, 128]. Dementsprechend führt eine Hemmung von Komplex IV zu einem Elektronenrückstau in der Atmungskette und folglich zu einem Mangel an oxidiertem Ubichinon, wodurch hemmende Effekte auch in den Zuständen CI und CI+CII sichtbar sein müssten [128]. In meinen Ergebnissen sind jedoch keine hemmenden Effekte erkennbar. Dies ist dadurch zu erklären, dass im entkoppelten Zustand nur ca. 17% (AP39) bzw. 29% (AP39+LPS) der Komplex IV-Enzyme gehemmt sind. Der weiterhin aktive Großteil der Enzyme ist in der Lage, die vermehrt anfallenden reduzierten Cytochrom C Moleküle zu oxidieren, sodass ein Elektronenrückstau in der Atmungskette verhindert wird.

Sowohl nach zweistündiger als auch nach 24-stündiger Stimulation sind keine Effekte im gekoppelten Zustand erkennbar, da, wie bereits erwähnt, im gekoppelten Zustand das ETS durch den Protonengradient und das Phosphorylierungssystem beeinflusst wird und hierdurch Effekte auf das ETS weniger deutlich erkennbar sind (Abb. 9 A) und 10 A)).

Zusammenfassend bewirkt die Applikation von AP39 eine Veränderung der konzentrationsabhängigen Effekte von H_2S hin zu zeitabhängigen Effekten. Nach einer kurzen Inkubationszeit von zwei Stunden führt AP39 wahrscheinlich zu einer geringen Akkumulation von H_2S im einstelligem mirkomolarem Bereich, was an einem gesteigerten Sauerstoffverbrauch sichtbar ist. Mit zunehmender Inkubationsdauer bewirkt AP39 wahrscheinlich eine zunehmende Akkumulation von H_2S, sodass nach 24-stündiger Inkubation H_2S eine partielle Hemmung von CIV hervorruft, die an der Reduktion des Sauerstoffverbrauchs der Neurone erkennbar ist.

4.2.2 AP39 hat keinen Einfluss auf die Citrat-Synthase Aktivität

Der Sauerstoffverbrauch von Zellen wird neben der Aktivität der Atmungskette, wesentlich von der Mitochondrienmasse bestimmt [41]. Mit Hilfe der Bestimmung der Citrat-Synthase Aktivität lässt sich die Mitochondrienmasse indirekt bestimmen, sodass hierdurch analysiert werden konnte, ob eine Veränderung des Sauerstoffverbrauchs auf eine Änderung der Aktivität der Atmungskette oder auf eine Änderung der Mitochondrienmasse zurückzuführen ist [30, 41, 123, 124]. Während AP39 sowohl nach zweistündiger als auch nach 24-stündiger Stimulation den Sauerstoffverbrauch der Zellen sichtbar beeinflusst, zeigen sich keine Auswirkungen auf die Citrat-Synthase Aktivität (Abb. 15 und 16). Hieran ist zu erkennen, dass AP39 und damit H_2S die Effekte auf den Sauerstoffverbrauch nicht über eine Veränderung der Mitochondrienmasse bewirkt. Stattdessen ist zu vermuten, dass die Effekte einzig über eine veränderte Aktivität der mitochondrialen Atmungskette vermittelt wurden. Diese Ergebnisse stehen in Übereinkunft mit der Literatur, da H_2S entweder als Elektronendonor oder als Inhibitor der Atmungskette den Sauerstoffverbrauch der Zellen beeinflusst [46, 90, 128, 129].

4.2.3 AP39 verändert die mitochondriale respiratorische Reservekapazität nicht

Die mitochondriale respiratorische Reservekapazität ist ein errechneter Wert für die bioenergetische Reserve der Atmungskette und die Kompensationsfähigkeit der Zelle auf einwirkenden Zellstress [40, 97, 110]. Eine Zelle produziert immer nur so viel Energie, wie sie benötigt, weshalb die Atmungskette meistens nur einen Bruchteil ihrer potenziellen Kapazität nutzt [40, 97, 110]. Die MRC gibt an, wie stark die Zelle ihre Kapazität steigern und somit auf Energiemangelzustände reagieren kann [40, 97, 110]. Bei der Berechnung der MRC der Neurone fällt weder mit noch ohne LPS und weder nach zweistündiger noch nach 24-stündiger Stimulation ein Unterschied zwischen AP39 und der zugehörigen DMSO-Kontrolle auf (Abb. 11). Eine Erhöhung der MRC ist häufig eine Anpassungsreaktion der Zelle auf einen aktuellen oder bevorstehenden höheren Energiebedarf. Dieser höhere Energiebedarf kann beispielsweise durch Zellstress oder Hypoxie hervorgerufen werden, oder regelmäßig zum Beispiel durch Kontraktion von Kardiomyozyten erzeugt werden, weshalb diese physiologisch eine hohe MRC aufweisen [110]. Diese Erhöhung der MRC wird in erste Linie durch eine Aktivierung von Komplex II der Atmungskette hervorgerufen, wodurch sowohl Citrat-Zyklus als auch die Atmungskette gesteigert werden [110]. Dies erklärt auch, warum nach einer zweistündigen AP39 Inkubation keine direkten Effekte auf die MRC sichtbar sind, da H_2S Elektronen auf Ubichinon, und damit dem Komplex II nachgeschalten, in die Atmungskette einspeist. Die Aktivität von Komplex II bleibt dementsprechend unbeeinflusst. Allerdings wäre ein indirekter

Effekt ebenfalls denkbar, da H_2S Zellstress für die Neurone darstellen könnte. Ein solcher Zellstress durch AP39 würde sich durch eine erhöhte MRC zeigen [97, 110]. Da AP39 keine Effekte auf die MRC zeigt, bleiben auch diese Effekte unwahrscheinlich. Auch nach 24-stündiger Stimulation bewirkt AP39 und damit H_2S keine Effekte auf die MRC. Hieran ist zu erkennen, dass die Hemmung von CIV keinen Energiemangelzustand in der Zelle auslöst, welcher ansonsten durch eine Steigerung der MRC kompensiert werden würde. Folglich ist die partielle Hemmung von CIV durch 10nM AP39 nicht mit erhöhtem Zellstress verbunden.

4.2.4 AP39 verändert die OxPhos Control Ratio nicht

Die Atmungskette kann grob in zwei Bereiche unterteilt werden. Das Elektronen-Transfer-System umfasst die Komplexe I bis IV und bewirkt den Aufbau des Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran, während das Phosphorylierungssystem im Wesentlichen aus Komplex V besteht und die Bildung von ATP aus ADP unter Nutzung des Protonengradienten katalysiert [40, 41, 107]. Die OCR ($\frac{OxPhos}{CI+II_{entkoppelt}}$), welche Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann, ist ein berechneter Quotient, der das Verhältnis der Aktivität der beiden Bereiche der Atmungskette zueinander angibt und damit ein Maß für die begrenzende Regulierung der maximalen oxidativen Phosphorylierungskapazität durch das Phosphorylierungssystem ist [40, 107]. Werte von 1 werden erreicht, wenn die Kapazität des Phosphorylierungssystems die Elektronentransferkapazität übersteigt oder äquivalent zu ihr ist [40]. Allerdings kann die OCR durch eine physiologische oder artifizielle Entkoppelung während der OxPhos-Messung ebenfalls höhere Werte erreichen, da bei einer Entkoppelung die Limitierung der Atmungskette nicht mehr durch das abgekoppelte Phosphorylierungssystem beeinflusst wird [40, 107]. Eine OCR von 1 kann folglich auf zwei Arten erreicht werden: 1. Die Phosphorylierungskapazität ist gleich groß oder größer als die Kapazität des Elektronentransfersystems. 2. Die Phosphorylierungskapazität wirkt aufgrund einer Entkoppelung nicht mehr hemmend auf die Aktivität der Atmungskette [40, 107].

Die Berechnung der OCR zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen AP39 bzw. AP39+LPS und der zugehörigen DMSO-Kontrolle sowohl nach zweistündiger als auch nach 24-stündiger Stimulation (Abb. 12). Hieran ist zu erkennen, dass eine Stimulation mit AP39 keine Einflüsse auf das Aktivitätsverhältnis des ETS zum Phosphorylierungssystem hat. Des Weiteren zeigt dies, dass es im Rahmen der AP39-Stimulation nicht zu einer messbaren Entkoppelung der Atmungskette kommt. Dies steht in Übereinkunft mit der durch AP39 unveränderten Citrat-Synthase Aktivität und der unveränderten MRC, da ein unverändertes

OCR ebenfalls zeigt, dass sich die maximale Aktivität des ETS, welche direkt von der Enzymmasse abhängig ist, nicht verändert.

4.3 Effekte von LPS auf neuronale Mitochondrien

4.3.1 LPS als Inflammationsmodell

Da ein Sepsismodell in vitro aufgrund der Komplexität des Pathomechanismus nur schwer umsetzbar und mit zahlreichen Störfaktoren verbunden ist, verwendete ich in dieser Dissertation ein Inflammationsmodell auf der Grundlage einer LPS-Stimulation [23]. Der inflammatorische Stimulus, welcher durch LPS hervorgerufen wird, simuliert in vitro eine akute Inflammationsreaktion, wie sie zum Beispiel in der frühen Sepsis auftritt, und wurde bereits in vielen Studien erprobt [4, 13, 23, 49, 59]. LPS, als wichtigstes PAMP von Gram-negativen Bakterien, induziert nach Applikation eine systemische Immunreaktion mit Aktivierung von Immunzellen und Freisetzung inflammatorischer Mediatoren [23, 49]. Neben LPS spielen aber auch andere PAMPs wichtige Rollen bei der Hyperinflammation. Diese PAMPs interagieren teilweise über andere Mechanismen, sodass durch eine Co-Stimulation mehrerer PAMPs stärkere Reaktionen hervorgerufen werden können [23]. Wie stark die Aktivierung des Immunsystems abläuft, ist abhängig von der Bakterienart und vom befallenen Organismus. So ist zum Beispiel das LPS von Enterobacteriaceae wesentlich potenter als von anderen Bakterien und der Mensch reagiert bis zu 250 Mal empfindlicher auf LPS als Mäuse [23]. LPS bietet den Vorteil, dass es neben der Wirkung auf das Immunsystem auch direkt auf Zellen durch Induktion einer mitochondrialen Dysfunktion wirkt [4, 13, 49, 59]. Die Wirkungen auf das Immunsystem können auch in der Neuronenzellkultur beobachtet werden, da die verwendete Zellkultur stets einen geringen Anteil an Mikroglia, den Immunzellen des Nervensystems, aufweist. Im Gegensatz zu anderen Simulationsmodellen, wie der Applikation von Bakterien, septischem Serum oder Liquor, ist LPS wesentlich genauer dosierbar und dadurch auch besser reproduzierbar [23]. Während die Applikation von septischem Serum oder Liquor zwar die volle Bandbreite der Immunreaktion auf zum Beispiel eine Sepsis abbilden würde, bleibt eine reproduzierbare Applikation mit immer denselben Dosen schwer umsetzbar [72]. Eine Applikation von Bakterien ist ebenfalls nicht denkbar, da die Zellkultur standardmäßig mit Penicillin und Streptomycin zur Vermeidung von Kontaminationen behandelt wurde. Ein weiterer Vorteil von LPS gegenüber Bakterien ist die metabolische Inaktivität, sodass die Messungen des Sauerstoffverbrauchs nicht verfälscht werden. Deshalb

eignet sich LPS am besten zur Simulation einer akuten Inflammationsreaktion in der neuronalen Zellkultur.

4.3.2 LPS steigert den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch von Neuronen

Neben den zahlreichen immunmodulatorischen Effekten, die von LPS vermittelt werden, wirkt LPS auch direkt auf die Mitochondrien und den Sauerstoffverbrauch der Zellen [13, 49, 59, 104]. Eine der wichtigsten Funktionen von Mitochondrien ist der Aufbau eines Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran [40, 41, 104, 107]. Grundlegend für den Aufbau des Protonengradienten ist eine Impermeabilität der inneren Mitochondrienmembran [104]. LPS beeinflusst diese Impermeabilität über verschiedene Mechanismen und führt zu einem Protonenleck in der inneren Mitochondrienmembran [4, 104, 147]. Hieraus resultiert eine Veränderung der Aktivität der Atmungskette und des Sauerstoffverbrauchs der Zellen [35, 59, 104, 140]. Diese Veränderungen im Sauerstoffverbrauch sind auch in meinen Ergebnissen deutlich erkennbar. LPS hatte in jeder Bedingung und zu jedem Zeitpunkt der Experimente eine signifikante Steigerung des Sauerstoffverbrauchs der Zellen zur Folge (Abb. 9 und 10). Es ist davon auszugehen, dass LPS nicht direkt mit einem Enzym der Atmungskette interagiert, da der gesteigerte Sauerstoffverbrauch zu jedem Zeitpunkt des Experiments und nicht nur spezifisch nach Aktivierung eines bestimmten Komplexes erkennbar ist. Des Weiteren ist der erhöhte Sauerstoffverbrauch nicht auf eine vermehrte Entkoppelung der Atmungskette zurückzuführen, weil die Effekte im gekoppelten und im entkoppelten Zustand erkennbar sind.

Stattdessen sind die Effekte von LPS am ehesten auf eine vermehrte Öffnung von mitochondrialen Permeability Transistion Pores (mPTPs) zurückzuführen [8, 13, 35, 56, 104]. mPTPs werden aus ATP-Synthase Dimeren gebildet, wodurch das Enzym vom Energiebereitsteller zu einem Energieverbraucher wird [8]. Die Öffnung von mPTPs ist verbunden mit einer mitochondrialen Depolarisation, sowie einem Abbau des Protonengradienten, und damit einer Hemmung der ATP-Synthese, sowie der vermehrten Freisetzung von Ca^{2+} und mitochondrialer DNA [8, 63, 104]. Dies resultiert in einer mitochondrialen Dysfunktion bis hin zum Untergang der Zelle [8, 63, 140]. Eine vermehrte Öffnung von mPTPs durch LPS beruht auf einer Erhöhung mitochondrialer Ca^{2+}-Spiegel [8, 56, 104, 140]. Neben einer vermehrten Öffnung von mPTPs führen die erhöhten Ca^{2+}-Level auch zur Freisetzung von Cytochrom C und der vermehrten Aktivierung von Caspasen, welche wichtige Mediatoren der Apoptose sind [52, 55, 63, 104]. Die erhöhten Ca^{2+}-Spiegel sind Folge

eines LPS-induzierten vermehrten Stress auf das Endoplasmatische Retikulum (ER), woraus ein vermehrter Ca^{2+}-Ausstrom aus dem und verminderter Einstrom in das ER resultiert [52, 55, 104]. Zusätzlich bewirkt LPS auch indirekt über die vermehrte Freisetzung der Inflammationsmediatoren TNFα und IL-1β eine weitere Freisetzung von Ca^{2+}-Ionen aus dem ER [13, 15, 28]. Letztendlich führt die durch erhöhte Ca^{2+}-Spiegel induzierte vermehrte Öffnung von mPTPs zu einem LPS vermittelten Protonenleck in der inneren Mitochondrienmembran und damit zu Veränderungen der Energiebereitstellung und des Sauerstoffverbrauchs durch die Atmungskette.

Neben der vermehrten Öffnung von mPTPs existiert noch ein weiterer bedeutender Mechanismus, welcher zu einem LPS-induziertem Protonenleck in der inneren Mitochondrienmembran führt. LPS resultiert in einer verstärkten Expression von mitochondrialen Uncoupling Proteins (UCP), welche sich in der inneren Mitochondrienmembran befinden [31, 104, 147]. Die Familie der UCPs zeichnet sich durch die Eigenschaft aus, ein physiologisches Protonenleck in der inneren Mitochondrienmembran zu bilden, wodurch der Protonengradient abgebaut wird [31, 104, 140, 147]. Dies ist unter verschiedenen Bedingungen sinnvoll. Zum Beispiel ist das UCP 1 in braunem Fettgewebe anzutreffen und übernimmt durch zielgenaue Entkoppelung der Atmungskette wichtige Funktionen in der Thermoregulation und beim Temperaturerhalt [31, 104, 140, 147]. Das UCP 3 reguliert zum Beispiel die ROS-Produktion, indem das Elektronen-Transport-System nicht durch einen zu großen Protonengradienten gehemmt wird, sodass immer ausreichend oxidiertes Ubichinon zur Übertragung von Elektronen zur Verfügung steht [140]. Das ubiquitär und damit auch im ZNS vorkommende UCP 2 spielt neben der Regulation der ROS-Produktion eine wichtige Rolle im Glukosestoffwechsel und bei der Nahrungsaufnahme [104, 140, 147]. UCP 4 und 5 werden überwiegend im Gehirn exprimiert und regulieren dort ROS-Produktion und Temperatur [104, 147]. Im Rahmen einer LPS-Stimulation werden UCP 2, 3 und 5 drei- bis fünffach verstärkt exprimiert [147]. Die vermehrte Expression wird überwiegend über die freigesetzten Zytokine TNFα und IL-1β vermittelt und führt zu einer vermehrten Entkoppelung der Atmungskette, wodurch die Aktivität des ETS gesteigert wird [31, 104, 140, 147]. Infolgedessen wird viel Energie in Form von Wärme freigesetzt, sodass die Körpertemperatur ansteigt, was einen der wichtigsten Mechanismen in der Induktion von Fieber im Rahmen der Inflammationsreaktion darstellt [31, 104, 140, 147]. Des Weiteren beugen UCPs einer mitochondrialen Calciumüberladung vor und schützen somit die Zelle vor Apoptose [104, 147].

Die vermehrte Öffnung von mPTPs und die vermehrte Expression von UCPs als Folge einer LPS-Stimulation stellen zwei Mechanismen der Bildung eines Protonenlecks in der inneren Mitochondrienmembran dar [35, 59, 104, 140]. In der Folge kommt es zu einer reduzierten ATP-Produktion [35, 59, 104, 140]. Um den Protonengradienten aufrecht zu erhalten und einen ATP-Mangelzustand zu verhindern, wird das ETS der Neurone reaktiv aktiviert. Diese Aktivierung resultiert in dem in den Experimenten gemessenem erhöhten Sauerstoffverbrauch.

4.3.3 LPS erhöht die Citrat-Synthase Aktivität

Sowohl nach zweistündiger als auch nach 24-stündiger Stimulation zeigte sich im gekoppelten und entkoppelten Zustand bei den Messungen eine deutlich erhöhte CS-Aktivität sowohl in der LPS-Gruppe als auch in der AP39+LPS-Gruppe (Abb. 15 und 16). Anhand der erhöhten CS-Aktivität in sämtlichen mit LPS behandelten Zellen ist zu erkennen, dass LPS die Mitochondrienmasse sowohl nach zwei Stunden als auch nach 24 Stunden unabhängig von AP39 erhöht.

Wie bereits im letzten Kapitel erwähnt, bewirkt LPS ein Protonenleck in der inneren Mitochondrienmembran. Der daraus resultierende drohende ATP-Mangel bewirkt eine Aktivitätssteigerung des ETS. Anhand der erhöhten CS-Aktivität ist erkennbar, dass diese Aktivitätssteigerung allein nicht ausreichend ist, weshalb konsekutiv die Mitochondrienmasse ansteigt, damit der drohende ATP-Mangel kompensiert werden kann. Um dies zu ermöglichen, steigt auch der Sauerstoffverbrauch der Neurone an, wie ich in den Experimenten nachweisen konnte. Die Steigerung der Mitochondrienmasse wird über eine stark gesteigerte mitochondriale Biogenese vermittelt [14, 104, 136]. Die Synthese neuer, funktionstüchtiger Mitochondrien ist von großer Bedeutung, da zeitgleich eine Autophagie der Mitochondrien, die sogenannte Mitophagie abläuft [14, 104, 136]. Durch die Mitophagie werden durch LPS geschädigte Mitochondrien in Autophagosomen aufgenommen, welche anschließend mit Lysosomen fusionieren und somit das Mitochondrium abgebaut wird [104, 136]. Auf diese Weise schützt sich die Zelle vor von geschädigten Mitochondrien freigesetzten proapoptotischen Faktoren wie Cytochrom C und Caspasen [14, 104, 136]. Die stark gestiegene mitochondriale Biogenese kompensiert in kritisch kranken Patienten den gestiegenen Energiebedarf und verbessert somit das Überleben [14, 104].

Zusammenfassend ist die in den LPS-Gruppen gesteigerte Citrat-Synthase Aktivität als Kompensation des LPS-induzierten Protonenlecks in der inneren Mitochondrienmembran und dem damit drohenden ATP-Mangel, sowie anderer LPS vermittelter Schäden zu verstehen,

sodass die Zelle hierdurch die LPS bedingte mitochondriale Dysfunktion kompensiert und einer Apoptose entgegenwirken kann.

4.3.4 LPS erhöht die mitochondriale respiratorische Reservekapazität

Um dem LPS-induzierten Zellstress besser entgegenwirken zu können, greift die Zelle auf ihre metabolische Reserve, welche mit der MRC berechnet werden kann, zurück [40, 110]. Der vermehrte Zellstress führt neben einer verstärkten Aktivierung der Atmungskette und einer verstärkten Biogenese neuer Mitochondrien zu einem Anstieg der MRC und damit der bioenergetischen Reserve der Zelle [14, 40, 104, 110, 136, 145]. Vermittelt wird die Erhöhung der MRC in erster Linie durch eine Aktivierung von Komplex II via Aktivierung der Enzyme Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK), Pyruvatdehydrogenase und Nicotinamidadenindinukleotid-abhängige Deacetylase Sirtuin 3 (SIRT3), wodurch sowohl der Citrat-Zyklus als auch die Atmungskette direkt aktiviert werden [110]. Neben diesem Mechanismus wird die MRC auch durch verstärkte Glukose- oder Fettsäureoxidation erhöht [110]. Durch die höhere MRC und die damit verbundene höhere energetische Reserve ist die Zelle in der Lage, dem Zellstress besser entgegenzuwirken, was in einer geringeren Apoptoserate resultiert [97, 110]. Der Anstieg der MRC lässt sich in meinen Experimenten in allen mit LPS behandelten Zellen, sowohl nach zweistündiger als auch nach 24-stündiger Stimulation, sowohl in den DMSO+LPS-Gruppen als auch in den AP39+LPS-Gruppen nachweisen (Abb. 11). Durch den Anstieg der bioenergetischen Reserve als Folge der LPS-Inkubation sind die Neurone in der Lage, den LPS-induzierten Zellstress besser zu kompensieren und könnten somit einer ATP-mangelinduzierten Apoptose vorbeugen [40, 97, 110]. Somit ist die erhöhte MRC als Reaktion auf das durch LPS hervorgerufene Protonenleck in der inneren Mitochondrienmembran zurückzuführen.

4.3.5 LPS senkt die OxPhos Control Ratio von Neuronen

Die mitochondriale Atmungskette kann grob in das Elektronentransfersystem und das Phosphorylierungssystem unterteilt werden. Wie sich die Aktivität der beiden Teile der Atmungskette zueinander verhält wird durch die OCR angegeben [40, 41, 107].

Bei Inkubation der Zellen mit LPS ist sowohl nach zwei Stunden als auch nach 24 Stunden unabhängig von einer zusätzlichen Inkubation mit AP39 stets eine erniedrigte OCR im Vergleich zu den zugehörigen LPS-freien Gruppen erkennbar (Abb. 12). Die erniedrigte OCR zeigt an, dass die Aktivität des Phosphorylierungssystem im Verhältnis zur Aktivität des ETS

relativ abgenommen hat [40, 41, 107]. Dies bedeutet, dass die Aktivität des Phosphorylierungssystem tatsächlich abgenommen und oder die Aktivität des ETS zugenommen hat. Auch eine Aktivitätsminderung der gesamten Atmungskette mit Betonung des Phosphorylierungssystems oder eine Aktivitätssteigerung der gesamten Atmungskette mit einer Betonung des ETS wären möglich. In Anbetracht der gestiegenen Mitochondrienmasse und der erhöhten MRC ist wahrscheinlich der Gesamtumsatz sowohl des ETS als auch des Phosphorylierungssystems der Neurone mit Betonung des ETS gestiegen. Diese Betonung der Steigerung der Aktivität des ETS der Neurone ist in Bezug auf das gewachsene Protonenleck zu interpretieren. Aufgrund des Protonenlecks kommt es zu einem Abbau des Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran [4, 104, 147]. Um den für die ATP-Synthese elementar wichtigen Protonengradienten dennoch aufrecht erhalten zu können, muss die Gesamtaktivität des ETS gesteigert werden.

In der Zusammenschau der Ergebnisse von JO_2, Citrat-Synthase-Aktivität, MRC und OCR ist ersichtlich, dass LPS-induzierter Zellstress und LPS-induzierte mitochondriale Dysfunktion durch eine erhöhte Mitochondrienmasse, welche anhand des gestiegenen JO_2 und der erhöhten CS-Aktivität ersichtlich ist, und durch eine gesteigerte bioenergetische Reserve, die mit der erhöhten MRC gezeigt wurde, kompensiert werden. Aus der gesunkenen OCR ist erkennbar, dass die gesteigerte Mitochondrienmasse überwiegend aus einer Steigerung des ETS resultiert. Aufgrund des Anstiegs von JO_2 und CS-Aktivität ist es wahrscheinlich, dass neben dem ETS auch die Kapazität des Phosphorylierungssystem gesteigert wird. Durch diese Anpassungsmechanismen gleicht die Zelle das vermehrte Protonenleck in der inneren Mitochondrienmembran aus und schützt sich auf diese Weise vor einer mitochondrial-induzierten Apoptose.

4.4 Effekte von AP39 auf die Atmungskette unter LPS-Stimulation

Die Effekte von AP39 auf die Atmungskette werden im Rahmen einer zusätzlichen Stimulation mit LPS, verglichen mit LPS-freien Bedingungen, in geringem Umfang verändert und zeigen sich nur bei Betrachtung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs, während die Citrat-Synthase Aktivität, MRC und OCR unbeeinflusst bleiben.

Nach zweistündiger Stimulation bewirkt AP39 in Anwesenheit von LPS einen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs nach Aktivierung von CIV im entkoppelten Modus um 10,5%, während die Steigerung in den LPS-freien Experimenten 13,0% beträgt (Abb. 9 B)). Bei Betrachtung der absoluten Zahlen ist kein relevanter Unterschied erkennbar, da die AP39 induzierte Steigerung

in den LPS-freien Experimenten 18,91$\frac{\text{pmol}}{\text{s}*10^6\ \text{Zellen}}$ und in den mit LPS behandelten Experimenten 17,89 $\frac{\text{pmol}}{\text{s}*10^6\ \text{Zellen}}$ beträgt. Wie an der niedrigeren OCR zu erkennen ist, bewirkt LPS eine Steigerung der Gesamtaktivität des ETS. Auf diese Weise kompensiert die Zelle das größere Protonenleck in der inneren Mitochondrienmembran. Dies resultiert in einem generell erhöhten Sauerstoffverbrauch. Demgegenüber ist erkennbar, dass mit AP39 behandelte Zellen eine konstante absolute Steigerung des Sauerstoffverbrauchs unabhängig von LPS aufweisen. Folglich erhöhen nach zweistündiger Stimulation sowohl LPS als auch AP39 den Sauerstoffverbrauch der Neurone. Die prozentuale Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs durch AP39 ist deshalb niedriger, da AP39 sowohl in den LPS als auch in den LPS-freien Gruppen JO_2 immer um denselben absoluten Wert erhöht. Da JO_2 unter LPS allerdings erhöht ist, führt dieselbe absolute Steigerung zu einem geringeren prozentualen Anstieg. Neben dieser einfachen mathematischen Betrachtung könnten auch noch weitere Einflüsse, die bei der Analyse der Ergebnisse nach 24-stündiger Stimulation diskutiert werden, eine Rolle spielen. Zusammenfassend werden die Effekte von AP39 nach zweistündiger Stimulation nicht durch eine LPS-Gabe beeinflusst.

Nach 24-stündiger Stimulation bewirkt AP39 eine stärkere Hemmung der Atmungskette in Kombination mit LPS gegenüber der DMSO+LPS-Kontrolle als AP39 gegenüber der DMSO-Kontrolle (Abb. 10). Dies ist sowohl im gekoppelten als auch im entkoppelten Zustand sichtbar. Durch die AP39-induzierte Hemmung von CIV im entkoppelten Zustand reduzierte sich der Sauerstoffverbrauch der Zellen gegenüber DMSO in der LPS-freien Stimulation um 17,15% bzw. um 26,19 $\frac{\text{pmol}}{\text{s}*10^6\ \text{Zellen}}$, während sich der Sauerstoffverbrauch durch AP39+LPS um 28,97% bzw. um 58,81 $\frac{\text{pmol}}{\text{s}*10^6\ \text{Zellen}}$ reduzierte. Hieran ist klar sowohl eine absolute als auch eine relative stärkere Senkung des Sauerstoffverbrauchs durch eine Kombination aus AP39+LPS im Vergleich zu einer reinen AP39-Stimulation gegenüber den jeweiligen DMSO-Kontrollen zu erkennen. Diese Unterschiede sind nicht nur durch bloße synergistische Effekte erklärbar, sondern implizieren, dass AP39 im Rahmen einer LPS-Inkubation potenter den Sauerstoffverbrauch senkt als in LPS-freien Versuchen. Dies ist anhand zwei verschiedener Ansätze erklärbar. Wie bereits erwähnt, induziert LPS in den Neuronen Zellstress und mitochondriale Dysfunktion [4, 13, 49, 59, 104, 147]. Bereits in mehreren Studien ist beschrieben worden, dass H_2S zytoprotektiv ist und dem vermehrten Zellstress entgegen wirkt [17, 20, 58, 65, 66, 130, 144, 148, 151]. Einer der wichtigsten Mechanismen wie H_2S dies bewirkt, ist die Reduktion von oxidativem Stress, welcher durch LPS induziert wird [2, 4, 58,

62, 85, 104]. Insbesondere der H_2S-Donor AP39 ist besonders geeignet, um diesem oxidativen Stress entgegenzuwirken, da Sauerstoffradikale überwiegend im Mitochondrium entstehen und AP39 aufgrund der TPP^+-Domäne sich stark im Mitochondrium anreichert [58, 83, 121, 129, 148]. Hierdurch kann H_2S die antioxidative Wirkung direkt am Ort der Entstehung von ROS entfalten [2, 85, 121, 129, 148]. Der folglich verringerte oxidative Stress wirkt sich in einer geringeren mitochondrialen Dysfunktion und einem geringeren Sauerstoffverbrauch aus [7, 33, 127, 148]. Außerdem wirkt AP39 auch desensibilisierend bis blockierend auf mPTPs, welche durch LPS verstärkt geöffnet werden [58, 63, 127]. Hierdurch bewirkt AP39 eine Reduktion des Protonenlecks in der inneren Mitochondrienmembran und damit einen höheren Protonengradienten, welcher von Komplex V zur ATP-Synthese genutzt wird [58, 63, 127]. Dies hat zur Folge, dass das ETS zur Erhaltung des Protonengradienten weniger aktiv sein muss und dadurch der Sauerstoffverbrauch der Zellen sinkt [35, 59, 104, 140]. Aus diesen beiden Effekten lässt sich schlussfolgern, dass der niedrigere Sauerstoffverbrauch der Zellen nicht auf einer stärkeren Hemmung von CIV, sondern vielmehr auf einer Reduktion von Zellstress und mitochondrialer Dysfunktion beruht. Hierdurch benötigt die Zelle weniger Energie und Sauerstoff, sodass sich der Stoffwechsel in den mit AP39+LPS behandelten Zellen an das Niveau von LPS-freien Stimulationen annähert und somit die Effekte von AP39 in Kombination mit LPS potenter erscheinen.

Neben den unterschiedlichen Effekten von AP39 unter LPS-Inkubation auf den Sauerstoffverbrauch zeigen sich kleine Unterschiede bei Betrachtung der OCR nach 24-stündiger Stimulation. In der AP39+LPS-Gruppe ist die OCR nur gering bis nicht gegenüber der DMSO+LPS-Kontrolle erhöht, sodass dieser Unterschied auch im Rahmen der Messungenauigkeit interpretiert werden kann. Demgegenüber sind die Unterschiede in den LPS-freien Gruppen deutlich erkennbar. Eine mögliche Begründung hierfür ist die vermehrte Mitogenese, sowie die deutliche Steigerung der Gesamtaktivität des ETS als Reaktion auf eine LPS-Inkubation. Während die Mitochondrienmasse und die Aktivität des ETS in der LPS-Gruppe höher ist, ist die Konzentration von AP39 im Vergleich zur LPS-freien Stimulation gleich. Da allerdings als Anpassungsreaktion auf LPS CIV in Aktivität und Masse zugenommen hat, ist der Anteil an von AP39 inhibierten CIV kleiner und damit der Effekt auf die OCR geringer bis nicht mehr erkennbar.

Zusammenfassend zeigt AP39 sowohl in LPS-freien Experimenten als auch in Stimulationen mit LPS ähnliche Effekte auf die Atmungskette. Nach zweistündiger Stimulation bewirkt AP39 auch in einer Co-Stimulation mit LPS dieselben Effekte wie in LPS-freien Experimenten.

Aufgrund des generell erhöhten Sauerstoffverbrauchs nach LPS-Inkubation erscheinen die Effekte von AP39 auf JO_2 prozentual betrachtet allerdings etwas gestaucht. Nach 24-stündiger Stimulation bewirkt AP39 in Kombination mit LPS eine deutlich stärkere Senkung von JO_2 als in den LPS-freien Experimenten. Dies kann einerseits auf die antioxidative Wirkung von AP39 zurückgeführt werden, wodurch LPS-induzierter Zellstress vermindert wird. Andererseits bewirkt AP39 eine Desensibilisierung bis hin zur Blockierung von mPTPs, sodass die LPS-vermittelte mitochondriale Dysfunktion kompensiert wird [63, 90]. Folglich postuliere ich, dass die Hemmung von CIV durch AP39 in einer LPS-Inkubation nicht effektiver ist, sondern die schädlichen Effekte von LPS kompensiert werden, sodass von zytoprotektiven Effekten von AP39 gesprochen werden kann.

4.5) Effekte von AP39 und LPS auf die H_2O_2-Produktion

ROS werden einerseits im Zytosol durch die NADPH-Oxidase, welche ein Elektron von NADPH auf Sauerstoff zur Bildung eines O_2^--Radikals überträgt, und andererseits im Mitochondrium im Rahmen der Energiegewinnung produziert [4, 83, 140]. Das im Rahmen dieser Reaktionen gebildete O_2^--Radikal wird durch die SOD rasch zum weniger reaktionsfreudigem und damit stabilerem H_2O_2, welches aufgrund der schnellen Metabolisierung im Mitochondrium in ca. 100-fach höherer Konzentration als O_2^- vorliegt, abgebaut [48, 82, 83]. Sowohl aus dem O_2^--Radikal als aus H_2O_2 entstehen in Folgereaktion andere ROS-Moleküle [48, 82]. Unter physiologischen Bedingungen fließen 1-3% des Sauerstoffverbrauchs der Atmungskette in die ROS-Produktion [3, 48, 83, 93]. Kommt es zum Beispiel im Rahmen einer Inflammation, einer Hypoxie oder eines Ischämie/Reperfusionsschadens zu einer Schädigung der Mitochondrien, führt dies zu einer zunehmenden Entkoppelung und Beeinträchtigung der Atmungskette mit einer hieraus resultierenden erhöhten Produktion von ROS, welche bis auf mehr als das Doppelte ansteigen kann [63, 126].

In der Folge kann die ROS-Produktion die Abbaukapazitäten übersteigen, sodass dies in einer Aggravation der mitochondrialen Dysfunktion und Apoptose resultieren kann [4, 13, 48, 49, 59, 82, 104]. Neben diesen schwerwiegenden Pathologien können auch kleinere Veränderungen an einzelnen Komponenten der Atmungskette die ROS-Produktion signifikant verändern. Da sowohl AP39 als auch LPS die Atmungskette beeinflussen, ist es von großer Bedeutung zu wissen, ob diese Veränderungen auch mit Veränderungen der mitochondrialen ROS-

Produktion einhergehen. In diesem Kapitel werden mögliche Mechanismen einer Veränderung der ROS-Produktion diskutiert.

Der größte Teil an mitochondrialen ROS wird von den Komplexen I und III durch die Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff erzeugt [83]. Anstatt Elektronen auf Ubichinon bzw. Cytochrom C zu übertragen, kommt es teils physiologisch teils akzidentiell zu einer Übertragung auf Sauerstoff, wodurch O_2^--Radikale entstehen [83]. Die mitochondriale ROS-Produktion wird unter anderem durch das mitochondriale Membranpotential, den metabolischen Zustand der Mitochondrien und durch die Sauerstoffkonzentration reguliert [83]. Ein besonders hohes Membranpotential führt zu einem Elektronenrückstau, sodass den Komplexen der Atmungskette zu wenig oxidiertes Ubichinon und Cytochrom C zur Verfügung steht, um Elektronen zu übertragen [83, 128]. Stattdessen werden die Elektronen zum Beispiel auf Sauerstoff übertragen und es entstehen ROS [83, 128]. Umgekehrt resultiert aber auch ein besonders niedriges Membranpotential in erhöhten ROS-Spiegeln, da ein niedriges Membranpotential zu einem NADPH-Mangel führt, wodurch einer der wichtigsten ROS-Eliminationswege inhibiert wird [83]. Im gekoppelten OxPhos Zustand, in welchem Komplex I und II maximal aktiviert sind, sind der Elektronenfluss entlang der Atmungskette, der Sauerstoffverbrauch und die ATP-Produktion sehr hoch, während die ROS-Produktion sehr niedrig ist [83]. Demgegenüber kommen nach Hemmung von Komplex III zum Beispiel durch Antimycin A Elektronenfluss, Sauerstoffverbrauch und ATP-Produktion nahezu zum Erliegen, während die ROS-Produktion sehr hohe Werte annimmt [83]. Hieran ist zu erkennen, dass bei niedrigen metabolischen Aktivitätsraten die ROS-Produktion erhöht ist, während sie bei hoher metabolischer Aktivität verhältnismäßig niedrig ist [83]. Ein weiterer regulierender Faktor der ROS-Spiegel ist die Sauerstoffkonzentration, da die ROS-Produktion mit höheren Sauerstoffkonzentrationen linear ansteigt [83]. Eine Ausnahme hiervon stellt die höhere ROS-Konzentration bei hypoxischen Sauerstoffkonzentrationen dar, da in diesen Konzentrationen der Elektronenfluss in der Atmungskette niedrig und das Membranpotential hoch sind [83]. Diese Effekte sind auch in den durchgeführten Experimenten sichtbar gewesen (Abb. 6). Zu Beginn der Versuche herrscht in den Zellen ein Substratmangel mit niedrigem Membranpotential und niedriger ROS-Produktion. Im Verlauf des Experiments werden die einzelnen Komplexe nacheinander aktiviert, woraus eine konsekutive Steigerung von Sauerstoffverbrauch und ATP-Produktion, aber auch höhere ROS-Spiegel resultieren. Durch eine Hemmung von CIII mittels Antimycin A kommt der Elektronenfluss und die ATP-Produktion nahezu zum Erliegen und in der Folge sind höhere ROS-Konzentrationen detektierbar.

4.5.1 Effekte von AP39 auf die H_2O_2-Produktion

Anhand dieser Mechanismen lassen sich auch die Effekte von AP39 und LPS auf die ROS-Spiegel in den Neuronen erklären. Da stets ein kleiner Anteil des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs in die ROS-Produktion fließt, führt eine Aktivierung der Atmungskette auch zu einer erhöhten ROS-Produktion [3, 4, 83, 93, 140]. Dementsprechend resultiert die zweistündige AP39-Stimulation in einem diskreten Anstieg der ROS-Produktion, wie bei Betrachtung der H_2O_2-Spiegel nach zweistündiger Stimulation im gekoppelten Zustand zu erkennen ist (Abb. 13 A)). Da allerdings immer nur ein geringer Anteil des Sauerstoffs in die ROS-Produktion fließt, sind die Unterschiede auch entsprechend gering. Darüber hinaus ändert sich durch die Aktivierung der Atmungskette der Anteil an Sauerstoff, der in die ROS-Produktion fließt, nicht. Dementsprechend sind die $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten unverändert (Abb. 13 C) und D)).

Die Inhibition vom Komplex IV durch AP39 nach 24-stündiger Stimulation ergab in den Experimenten keine messbaren Unterschiede in den H_2O_2-Konzentrationen gegenüber der DMSO-Kontrolle (Abb. 14 A) und B)). Ebenso sind nach 24-stündiger Stimulation keinerlei Effekte von AP39 auf die $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten im Vergleich zu den zugehörigen DMSO-Kontrollen sichtbar (Abb. 14 C) und D)). Dies ist bemerkenswert, da eine Hemmung von CIV, ähnlich wie eine Hemmung von CIII durch Antimycin A, zu einer Inhibition der gesamten Atmungskette mit vermindertem Elektronenfluss und verminderter ATP-Produktion führt [3, 83, 93, 140]. In der Folge steigt das Membranpotential und es resultiert ein Elektronenrückstau, sodass vermehrt Elektronen auf Sauerstoff mit der Bildung von ROS übertragen werden [83]. Trotz der erhöhten ROS-Produktion in Folge der CIV-Hemmung sind die H_2O_2-Spiegel in den Messungen unverändert gewesen. Aus diesem Grund muss die erhöhte ROS-Produktion durch eine vermehrte Elimination kompensiert worden sein. Wie bereits erwähnt, wirkt H_2S insbesondere im Mitochondrium antioxidativ [7, 33, 127]. Zum einen ist das HS^--Ion, als welches H_2S zu 70-80% in wässriger Lösung vorliegt, selbst ein Antioxidans und kann ROS eliminieren und zum anderen induziert H_2S zahlreiche antioxidative Vorgänge [66, 85, 95, 128]. Einer der wichtigsten Mechanismen, wie H_2S antioxidativ wirkt, ist die vermehrte Bildung und Reduktion von Glutathion, welches eines der wichtigsten Antioxidantien im Körper ist [62, 66, 67, 85]. Neben der Verbesserung des Glutathionmetabolismus aktiviert H_2S auch die SOD, welche O_2^--Ionen zu H_2O_2 umwandelt und damit die erste Reaktion im ROS-Abbau katalysiert [126]. Außerdem bewirkt H_2S durch eine verminderte ROS-Bildung im Zytosol eine Konzentrationssenkung, da der größte Teil der zytosolisch gebildeten ROS durch die NADPH-

Oxidase, deren Expression durch H_2S vermindert wird, synthetisiert wird [94]. Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass AP39 zwar durch die Hemmung von CIV eine erhöhte mitochondriale ROS-Produktion bewirkt, welche allerdings durch eine verminderte zytosolische ROS-Produktion, sowie Steigerung antioxidativer Mechanismen kompensiert wird, sodass die Summe an gemessenem H_2O_2 konstant bleibt [7, 66, 67, 83, 85, 93, 94, 127, 140].

4.5.2 Effekte von LPS auf die H_2O_2-Produktion

Nach 24-stündiger Stimulation bewirkt LPS insbesondere im entkoppelten Zustand eine Reduktion sowohl der H_2O_2-Produktion als auch des $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten (Abb. 14). Diese Effekte sind im entkoppelten Zustand nach zweistündiger DMSO+LPS-Stimulation bei CI+II ebenfalls beim $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten sichtbar (Abb. 13 D)). Da ansonsten LPS in den zweistündigen Stimulationen keinerlei Effekte zeigte, ist davon auszugehen, dass dieser Stimulationszeitraum für signifikante Unterschiede zu kurz ist.

Die niedrigere H_2O_2-Produktion in den mit LPS-behandelten Zellen kann mit Hilfe der Auswirkungen von LPS auf das Protonenleck erklärt werden. Die durch LPS vermehrt freigesetzten Inflammationsmediatoren TNFα und IL-1β führen zu einem Anstieg der mitochondrialen Ca^{2+}-Konzentration, sowie zu einer verstärkten Expression von UCPs [13, 15, 28, 31, 147]. Durch den Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration werden wiederum vermehrt mPTPs geöffnet [8, 56, 63, 104, 140]. Die vermehrte Öffnung von mPTPs und die verstärkte Expression von UCPs resultieren beide in einem größeren Protonenleck in der inneren Mitochondrienmembran [35, 59, 104, 140]. Infolgedessen kommt es zu einem Abfall des Membranpotentials und ein möglicher Elektronenstau wird reduziert, sodass Elektronen auf Ubichinon und Cytochrom C übertragen werden können und die ROS-Produktion folglich abnimmt [83, 128]. Diese Effekte sind in neuronalem Gewebe, in welchem drei von fünf UCP-Subtypen exprimiert werden, besonders ausgeprägt, da LPS in der Lage ist, insbesondere die neuronalen Subtypen UCP 4 und 5 sowie das ubiquitär vorkommende UCP 2 zu aktivieren und somit die ROS-Produktion effektiv zu reduzieren [25, 104, 113].

Ein weiterer Mechanismus, weshalb insbesondere der $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotient in den mit LPS-stimulierten Zellen niedriger ist, kann mit Hilfe der CS-Aktivität erklärt werden. Im Rahmen der LPS-induzierten Steigerung der mitochondrialen Masse, kommt es nicht nur zu einer gesteigerten Mitogenese, sondern auch zu einer vermehrten Biosynthese von Antioxidantien

und wichtigen Proteinen antioxidativer Prozesse [83]. Dies führt dazu, dass durch die Mitogenese die Funktion der Atmungskette und damit der Sauerstoffverbrauch gesteigert wird, während andererseits die hieraus resultierende physiologisch höhere ROS-Produktion in der Atmungskette durch die gesteigerten antioxidativen Prozesse wieder kompensiert wird [83]. Dies drückt sich in dem festgestellten geringeren $\frac{H_2O_2}{JO_2}$-Quotienten aus. Um diesen vermuteten Mechanismus zu beweisen, ist eine Mengenbestimmung antioxidativer Enzyme, wie zum Beispiel SOD, Katalase oder Glutathionperoxidase, von Nöten, welche im Rahmen meiner Dissertation nicht durchgeführt wurde [126].

Zusammenfassend resultiert aus der LPS-Inkubation insbesondere nach 24 Stunden eine reduzierte ROS-Produktion. Diese ist primär auf ein verringertes Membranpotential und einen verringerten Elektronenstau in der Atmungskette zurückzuführen, da durch eine LPS-Stimulation das Protonenleck in der inneren Mitochondrienmembran vergrößert wird und folglich weniger Elektronen auf Sauerstoff übertragen werden. Des Weiteren werden im Rahmen der Mitogenese auch vermehrt antioxidativ wirkende Stoffe synthetisiert, wodurch die gemessene ROS-Konzentration niedriger ist.

4.6 Effekte von AP39 und LPS auf die Proteinexpression

Bei Betrachtung der Ergebnisse der durchgeführten Western Blots ist bei etwa zwei Dritteln der untersuchten Proteine kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen erkennbar. Bei diesen Proteinen, welche keine Reaktion auf LPS und AP39 zeigten, handelt es sich um COX5A, COX5B, iNOS, nNOS und PGC1α. Andererseits ergaben sich bei den Proteinen COX4 und GFAP sichtbare Unterschiede in der Proteinmenge.

4.6.1 COX4, COX5A und COX5B

Die Cytochrom-C-Oxidase, welche als Transmembranprotein in der inneren Mitochondrienmembran gelegen ist, katalysiert als Komplex IV der Atmungskette die Bildung von Wasser durch Elektronenübertragung von Cytochrom C auf Sauerstoff [109, 135]. Die bei dieser Reaktion freigesetzte Energie nutzt CIV zum Transport von H^+-Ionen über die innere Mitochondrienmembran in den Intermembranraum [135]. Das Enzym besteht aus 14 Untereinheiten, wovon COX1, COX2 und COX3 in mitochondrialer DNA und die restlichen in nukleärer DNA kodiert sind [109, 135]. COX 1-3 bilden das reaktive Zentrum, welches von den nukleär kodierten Untereinheiten stabilisiert wird [109, 135]. Die von uns untersuchten Untereinheiten COX4 und COX5A stabilisieren zusammen die mitochondriale Untereinheit

COX1, während COX2 unter anderem von COX5B stabilisiert wird [135]. Die Transkription der Untereinheiten COX5A und COX5B wird abhängig vom Sauerstoffangebot reguliert [117, 135]. Im Rahmen dieser Regulation wird bei Hypoxie einerseits die Untereinheit COX5A weniger exprimiert, während COX5B in Hypoxie vermehrt exprimiert wird [117, 135]. Bei hohen Sauerstoffkonzentrationen wird dagegen COX5A vermehrt und COX5B vermindert transkribiert [117, 135]. Wird bei hohen Sauerstoffkonzentrationen vermehrt COX5A exprimiert, führt dies zu einer höheren Elektronentransferrate und der Substratumsatz steigt an [117]. In unseren Ergebnissen zeigten sich bei beiden Untereinheiten keinerlei Veränderungen durch AP39 oder durch LPS oder eine Kombination aus beidem (Abb. 18 und 19). Daran ist zu erkennen, dass durch keine der beiden Stimulationen die Neurone sowohl nach zweistündiger als auch nach 24-stündiger Stimulation weder Hypoxie noch Hyperoxie ausgesetzt waren.

In Säugetieren werden zwei Unterformen der Untereinheit COX4, COX4-1 und COX4-2, exprimiert, deren Expression über den Hypoxie-induzierten Faktor 1 (HIF-1) reguliert wird [117]. HIF-1, welcher als Folge von Hypoxie vermehrt freigesetzt wird, bewirkt eine vermehrte Expression von COX4-2, die die CIV-Aktivität unter hypoxischen Bedingungen optimiert, während die Expression von COX4-1, welche die CIV-Aktivität unter aeroben Bedingungen verbessert, unverändert bleibt [117]. Die COX4-1 Proteinmenge nimmt allerdings dennoch ab, da HIF-1 eine vermehrte Degradation von COX4-1 bewirkt [117]. Folglich kann HIF-1 die Proteinmenge der beiden Unterformen an die aktuelle Sauerstoffkonzentration anpassen und der Austausch der beiden Unterformen bewirkt eine Aufrechterhaltung der Funktion der Atmungskette, sodass dies eine der schnellsten Reaktionen auf eine Hypoxie darstellt [117]. Eine weitere Funktion der Untereinheit 4 ist eine ATP-abhängige Hemmung von Komplex IV [61, 117]. Bei hohen ATP-Konzentrationen, welche im Rahmen einer guten energetischen Stoffwechselsituation vorkommen, bindet ATP allosterisch an COX4 und hemmt hierdurch das gesamte Enzym, wodurch das Membranpotential und die ROS-Produktion gesenkt werden [61, 117]. Kongruent hierzu zeigte eine Ausschaltung von COX4 in Mäusen eine geringere CIV-Aktivität, sowie geringere ATP-Spiegel [61]. In unseren Experimenten, in welchen die Gesamtmenge der COX4 bestimmt wurde, konnten wir nach zweistündiger und nach 24-stündiger Stimulation keine signifikanten Effekte auf die COX4-Menge nachweisen (Abb. 17). Hieran ist zu erkennen, dass weder LPS noch AP39 die Expression, sowie den Abbau von COX4 in einem detektierbaren Ausmaß verändert. Die lediglich leicht erhöhte COX4-Menge in der AP39+LPS-Gruppe im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach zweistündiger Stimulation korreliert mit dem in dieser Gruppe erhöhten Sauerstoffverbrauch der Zellen und ist als

Anpassung an die höhere Aktivität der Atmungskette zu verstehen. Nach 24-stündiger Stimulation konnten keine Effekte auf COX4 nachgewiesen werden.

Bei Betrachtung aller Western Blots von COX4 (Abb. 17), COX5A (Abb. 18) und COX5B (Abb.19) sind zusammenfassend keine signifikanten Effekte von AP39 erkennbar. Hieran ist zu erkennen, dass die Wirkung von AP39 nicht auf einer strukturellen Veränderung dieser Untereinheiten beruht. Dies bestärkt den angenommenen Wirkmechanismus, dass AP39 selbst nicht mit CIV interagiert, sondern H_2S kompetitiv im reduzierten aktiven Zentrum von CIV ohne strukturverändernde Effekte an Fe^{II} bindet.

4.6.2 nNOS und iNOS

Die beiden Gasotransmitter NO und H_2S sind über mehrere Mechanismen eng miteinander verbunden und beeinflussen gegenseitig ihre Exprimierung [75, 151]. So bewirkt eine Konzentrationssteigerung von NO über eine vermehrte Expression H_2S-produzierender Enzyme wie der CSE in vivo und in vitro in Ratten eine Akkumulation von H_2S in verschiedenen Organen, wie Darm oder Gefäßen [151]. Umgekehrt konnten Kubo et al. in vitro zeigen, dass H_2S auch Einfluss auf die Produktion von NO und die Expression von NO-freisetzenden Enzymen nimmt [75]. NO wird in erster Linie von der NO-Synthase freigesetzt, von welcher im Menschen drei Isoformen existieren [37]. Die eNOS wird überwiegend in Endothelien exprimiert und vermittelt vor allem eine Vasodilatation [75]. Die neuronale NO-Synthase wird überwiegend in Nervenzellen, aber auch zahlreichen anderen Geweben exprimiert und wirkt vasodilatierend oder prokinetisch im Darm [37, 106]. Die letzte Isoform, die induzierbare NO-Synthase, ist unter physiologischen Bedingungen in Geweben kaum nachweisbar, wird aber durch Zytokine wie TNFα oder IL-1β im Rahmen einer Inflammation oder anderer Gewebeschäden vermehrt exprimiert und induziert [37, 106].

Im Rahmen der Western Blot Untersuchungen von iNOS zeigte weder AP39 noch LPS einen signifikanten Unterschied sowohl nach zwei Stunden als auch nach 24 Stunden Stimulationszeit (Abb. 20). Bei Betrachtung der Proteinmengen von nNOS zeigte weder AP39 noch LPS zu keinem untersuchten Zeitpunkt einen Effekt auf die Expression der nNOS (Abb. 21). Hieran ist klar zu erkennen, dass AP39 und damit auch H_2S keinen Einfluss auf die Expression der in Neuronen vorkommenden Isoformen nNOS und iNOS hat. Da H_2S eine Inhibition aller Isoformen der NO-Synthasen (NOS) bewirkt, ist es wahrscheinlich, dass bei gleichbleibender Expression der NO-produzierenden Enzyme, die NO-Konzentration abfällt [60, 75]. Zur

Verifikation dieser Aussage wäre eine direkte NO-Messung nötig, welche im Rahmen dieser Dissertation aber nicht durchgeführt wurde.

4.6.3 PGC1α

PGC1α spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Kohlehydrat- und Lipidstoffwechsels der Zelle [84]. Als Transkriptionscoaktivator erhöht PGC1α die Wahrscheinlichkeit, dass ein Gen transkribiert wird, indem es mit Transkriptionsfaktoren nicht aber mit der DNA interagiert [111]. PGC1α kann in allen Geweben mit hoher Mitochondriendichte und hohem Metabolismus, wie zum Beispiel braunem Fettgewebe, Gehirn, Herz oder Skelettmuskel, in hohen Konzentrationen gemessen werden [84]. Ursprünglich wurde PGC1α als durch Kälte induzierter Transkriptionscoaktivator in braunem Fettgewebe und Skelettmuskel als Aktivator der Thermogenese entdeckt [84]. Vermittelt wird die PGC1α induzierte Thermogenese durch vermehrte Freisetzung der Gasotransmitter NO und CO und eine hieraus resultierende vermehrte Mitogenese und vermehrte Expression von Enzymen der Atmungskette, sowie eine gesteigerte mitochondriale Aktivität [83, 84, 98, 104, 125, 138]. Des Weiteren bewirkt PGC1α einen vermehrten Einbau von UCP1 und UCP2 in die innere Mitochondrienmembran [84, 104]. Neben einer vermehrten Expression von PGC1α durch Kälte konnten Untereiner et al. zeigen, dass CSE-produzierter H_2S, sowie H_2S aus NaHS über eine vermehrte Expression von PGC1α in Hepatozyten von Mäusen die mitochondriale Biogenese steigert [138]. PGC1α kann außerdem durch Endotoxine, wie LPS, freigesetzt werden, weshalb LPS ebenfalls diese stimulatorischen Effekte auf den Energiemetabolismus bewirken kann [78, 104]. Dies resultiert neben einem höheren Substratumsatz auch in einem verbesserten Überleben der Zellen während einer Endotoxämie [78, 104].

In den durchgeführten Western Blots zeigte weder eine AP39- noch eine LPS-Stimulation sowohl nach zwei als auch nach 24 Stunden Unterschiede im Vergleich zu den zugehörigen Kontrollen (Abb. 22). Die unveränderten Expressionen von PGC1α nach AP39-Stimulation stehen in Kontrast zur Literatur. In meinen Ergebnissen ist erkennbar, dass aus 10nM AP39 freigesetzter H_2S weder nach zwei noch nach 24 Stunden eine Wirkung auf die PGC1α-Expression in Neuronen hat. Dies ist in Übereinkunft mit den Ergebnissen der CS-Aktivitätsmessungen, da diese keine Veränderung der Mitochondrienmasse zeigten, welche als Effekt einer PGC1α-vermittelten Mitogenese sichtbar gewesen wären.

Während die Ergebnisse der Sauerstoffverbrauchsmessungen, die hieraus berechneten Quotienten und die Citrat-Synthase Aktivitätsbestimmungen den in der Literatur berichteten

Ergebnissen nach LPS-Stimulation plausibel entsprechen, stehen die Ergebnisse der Western Blots zu PGC1α nach LPS-Stimulation in Kontrast hierzu. Dies spricht dafür, dass LPS ausschließlich über andere Mechanismen die beschriebenen Wirkungen, welche in den anderen Methoden ersichtlich sind, vermittelt. Diese anderen Wirkmechanismen von LPS sind ebenfalls bekannt und wurden in den entsprechenden Kapiteln ausführlich diskutiert. Da allerdings weder LPS noch AP39 die in der Literatur beschriebenen Effekte auf die Expression von PGC1α aufweisen, ist an dieser Stelle kritisch zu hinterfragen, ob die Western Blots zu PGC1α bei geringer Versuchszahl stichhaltige Ergebnisse lieferten.

4.6.4 GFAP

Das saure Gliafaserprotein ist das charakteristische Intermediärfilament von Astrozyten und wird deshalb häufig auch als Marker für diese verwendet [89, 91]. GFAP reguliert in Astrozyten zahlreiche Vorgänge wie Signalübertragung, Zellmorphologie, Zellmigration und Proliferation [89, 91]. Eine der wichtigsten Funktionen ist die mechanische Unterstützung der Zellmembran, weshalb GFAP auch eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Blut-Hirnschranke einnimmt [89]. Außerdem übernimmt GFAP auch wichtige Funktionen im Rahmen von Zellbewegungen, Zellmigration und bei der Mitose, da es sehr plastisch ist und durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung schnell die Struktur der Intermediärfilamente verändert werden kann [89, 91]. Neben diesen Vorgängen spielt GFAP auch bei ZNS-Schäden eine entscheidende Rolle, da es in aktivierten Astrozyten im Rahmen der glialen Reaktion vermehrt exprimiert wird [89, 91, 131, 143]. So konnte gezeigt werden, dass in GFAP knock-out Mäusen die neuronale Funktion eingeschränkt und das Überleben der Neurone nach Ischämie/Reperfusionsschäden vermindert ist [131]. Des Weiteren sind nicht nur bei Ischämie/Reperfusionsschäden oder nach Schädel-Hirn-Traumata, sondern auch im Rahmen einer systemischen Inflammation deutlich höhere GFAP-Konzentrationen messbar [143]. Neben den erhöhten GFAP-Konzentrationen nach einem neurologischen Schaden konnten Pushchina et al. zeigen, dass die Aktivität des H_2S-produzierenden Enzyms CBS und damit die H_2S-Konzentration in Folge eines neurologischen Schadens signifikant ansteigt [112].

In den von mir durchgeführten Western Blots von GFAP zeigten sich nach zweistündiger Inkubation keinerlei Effekte, während nach 24-stündiger Stimulation die Proteinmenge in AP39+LPS signifikant höher als die in der DMSO-Kontrolle war (Abb. 23). Diese signifikant erhöhte GFAP-Expression in der AP39+LPS-Gruppe im Vergleich zur DMSO-Kontrolle deutet auf einen Zellschaden und eine hieraus resultierende gliale Reaktion mit konsekutiver Astrozytenaktivierung hin. Bemerkenswerterweise zeigten die Einzelstimulationen von AP39

und LPS gegenüber der DMSO-Kontrolle keinen signifikanten Unterschied. Folglich führt erst die Kombination aus LPS und AP39 zu einer signifikanten GFAP-Expressionsänderung.

Die erhöhte GFAP-Proteinkonzentration kann als Reaktion auf den LPS-induzierten Zellschaden verstanden werden und zeigt eine Astrozytenaktivierung, sowie reaktive Reparaturprozesse an. Diese reaktiven Reparaturprozesse könnten durch die im Rahmen der AP39-Stimulation erhöhte H_2S-Konzentration verstärkt werden, da H_2S zahlreiche neuroprotektive Effekte besitzt [45, 68, 85, 146]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass H_2S Astrozyten vor oxidativem Stress schützt [85]. Dementsprechend könnte H_2S im Rahmen einer LPS-Stimulation direkt protektiv auf Astrozyten wirken und hierdurch effektivere Reparaturprozesse anstoßen. Andererseits könnte die erhöhte GFAP-Expression auch als ein Summationseffekt von LPS und AP39 gewertet werden. Die bekannten zellschädigenden Wirkungen von LPS könnten durch eine zu hohe Konzentrationssteigerung von H_2S in den neurotoxischen Bereich verstärkt werden, sodass die höhere GFAP-Expression nicht nur eine stärkere Astrozytenreaktion, sondern auch eine größere Neurotoxizität anzeigt. Da nach zweistündiger Stimulation die H_2S-Konzentration noch nicht in den toxischen Bereich gestiegen ist, sind nach zweistündiger Stimulation noch keine Effekte erkennbar. Ob AP39 den LPS-induzierten Zellschaden verstärkt oder die durch Astrozyten vermittelten Reparaturprozesse verstärkt, kann nicht abschließend geklärt werden und müsste durch Untersuchungen der Zellviabilität eruiert werden.

4.7 Mögliche therapeutische Ansätze

Die Effekte von H_2S auf die Atmungskette erlauben Überlegungen über einen möglichen therapeutischen Nutzen in der Zukunft. Insbesondere die konzentrationsabhängige, reversible und gezielte Hemmung von Komplex IV und damit der gesamten Atmungskette stellen einen möglichen Therapieansatz dar. Durch die gezielte Inhibierung der Atmungskette kann die Mitochondrienfunktion und damit der gesamte Metabolismus der Zelle heruntergefahren werden [5, 51, 90, 128, 140]. Der hieraus resultierende hypometabolische Zustand wird als „künstlicher Winterschlaf“ bezeichnet [5, 9, 51, 90]. Er kann therapeutisch genutzt werden, um in ansonsten lebensbedrohlichen Zuständen den Metabolismus zu verlangsamen, sodass Organfunktionen aufrechterhalten werden können und hierdurch das Überleben verbessert wird [5, 51, 90]. Diese Intention wird zum Beispiel auch bei der therapeutischen Hypothermie bei Zustand nach Reanimation genutzt [36, 87]. Allerdings geht die therapeutische Hypothermie stets mit zahlreichen Nebenwirkungen, wie einer gestörten Blutgerinnung und einem

geschwächten Immunsystem einher, sodass ein durch H_2S induzierter hypometabolischer Zustand eine potenzielle Alternative darstellen könnte [5, 36, 87]. Die klinische Relevanz eines solchen hypometabolischen Zustandes wird bei einigen Pathologien deutlich. Durch die Induktion eines künstlichen Winterschlafs wird der Sauerstoff- und Substratverbrauch der Zellen reduziert, wodurch Zustände, in welchen ein lokaler oder globaler Sauerstoff- bzw. Substratmangel herrscht, von den Zellen besser toleriert werden können [5, 51, 90]. Dies ist zum Beispiel im Rahmen einer Ischämie der Fall, welche durch thromboembolische Ereignisse oder durch verschiedene Formen des Schocks induziert werden kann [5, 58, 51, 90]. Im Rahmen eines künstlichen Winterschlafs verbrauchen die Zellen weniger Sauerstoff und die Ischämietoleranz, also die Zeit, die Zellen in Hypoxie überleben, verlängert sich [5, 51, 90].

An dieser Stelle ergibt sich allerdings eine entscheidende Einschränkung des therapeutischen Nutzens von H_2S. In niedrigen Konzentrationen bewirkt H_2S durch die Steigerung des Sauerstoffverbrauchs einen gegenteiligen Effekt [46, 51, 128, 139]. Aus diesem Grund ist es elementar wichtig, die Konzentrationsschwelle, ab welcher H_2S inhibitorisch auf die Atmungskette wirkt, schnellstmöglich zu erreichen. Mit der Synthese künstlicher langsam H_2S-freisetzender Donoren wie AP39 ist es gelungen, die Konzentration von H_2S in den Zellen sehr genau zu kontrollieren und eine gleichmäßige H_2S-Freisetzung zu gewährleisten [79, 127, 129]. Auf diese Weise können lokale toxische Effekte, wie eine Mukosaschädigung bei inhalativer Anwendung, oder systemische toxische Konzentrationen bei der intravenösen Applikation als Schwefelsalz vermieden werden [5, 51, 90]. Allerdings ist dieser theoretische Nutzen in der Praxis mit verschiedenen Schwierigkeiten verbunden [5, 51, 90]. Zurückzuführen ist dies unter anderem auf die temperatur-, sauerstoff- und gewebeabhängige Wirkung von H_2S [47, 51, 58, 88]. Insbesondere die Übertragung der Ergebnisse von Studien mit Nagern und anderen kleinen Säugetieren auf größere Säugetiere, wie Schweine gelang nur begrenzt, weil kleinere Säugetiere im Verhältnis zu ihrer Körpergröße einen aktiveren Stoffwechsel besitzen, da der Erhalt der Körpertemperatur bei dem ungünstigerem Oberflächen/Körpergewichts-Verhältnis energieaufwendiger ist [5, 51, 90]. In zahlreichen Studien konnte deshalb die Induktion eines „künstlichen Winterschlafs“ in größeren Säugetieren nicht erreicht werden [5, 51, 90]. Demgegenüber konnte mehrfach eine erfolgreiche lokale Anwendung von H_2S gezeigt werden, sodass hier ein weiterer therapeutischer Nutzen möglich wäre [2, 5, 51, 90, 129, 144, 149]. In zahlreichen verschiedenen Organen, wie Niere, Herz, Leber oder dem Gehirn, kann H_2S gezielt einen zytoprotektive Effekte in Ischämie/Reperfusionsmodellen zeigen [2, 5, 51, 90, 129, 144, 149]. Die hieraus resultierende verbesserte Ischämietoleranz könnte zur Prävention und

Therapie von Ischämie/Reperfusionsschäden oder bei Organtransplantationen einen großen therapeutischen Nutzen eröffnen [2, 5, 51, 58, 90].

Eine weitere mögliche Indikation einer H_2S-Therapie wäre die Anwendung in Patienten mit schweren Inflammationsreaktionen, wie zum Beispiel einer Sepsis. Häufig werden septische Patienten in einem kritischen, aber stabilen Zustand in die Klinik eingewiesen [104, 120]. In diesem Zustand sind die Patienten meist kardiorespiratorisch stabil genug, um den initialen hypermetabolischen Zustand, welcher aus den zu Beginn niedrigen H_2S-Konzentrationen und der damit einhergehenden Stimulation der Atmungskette resultiert, zu kompensieren. Im zeitlichen Verlauf verschlechtert sich der Zustand der Patienten oftmals bis hin zum Krankheitsbild des vital bedrohlichen septischen Schock [104, 120]. In diesem Zustand wäre ein H_2S-induzierter Hypometabolismus eine mögliche therapeutische Anwendung und könnte die Prognose der Patienten verbessern. Die vorliegende Dissertation trägt dazu bei, um eine solche Anwendung in Zukunft realistischer zu machen. Nichtsdestotrotz müssen weitere Studien durchgeführt werden, da die Mechanismen des H_2S-induzierten Hypometabolismus noch nicht ausreichend erforscht sind.

4.8 Limitationen

Im Allgemeinen sind bei einigen untersuchten Effekten nur geringe, teilweise nicht signifikante Unterschiede erkennbar gewesen. Deshalb ergibt sich an dieser Stelle die Frage, ob AP39 bzw. LPS tatsächlich keine Effekte aufweist oder, ob diese aufgrund anderer Faktoren nicht signifikant sind. Insbesondere die gewählte Konzentration von 10nM AP39 ist kritisch zu hinterfragen, da in vergleichbaren Studien AP39 in Konzentrationen von 25-250nM [149] bzw. 30-300nM [2, 58, 129] eingesetzt wurde. Die vergleichsweise niedrige Konzentration von 10nM AP39 wurde bei dieser Dissertation zur besseren Vergleichbarkeit innerhalb meines Institutes gewählt, da verschiedene Studien mit anderen Zelllinien oder im Tierversuch ebenfalls mit dieser Konzentration durchgeführt wurden und in Vorstudien höhere Dosierungen in vivo ein schlechteres Überleben der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten [144]. Besonders deutlich wird diese geringe Dosis bei Betrachtung der durchgeführten Western Blots, da sich AP39 durch die TPP^+-Domäne in 100-500-fach höherer Konzentration im Mitochondrium anreichert, während sämtliche untersuchten Proteine nukleär kodiert werden und hierdurch der ausbleibende Effekt auf die Proteinexpression erklärt werden kann [121, 129].

Kongruent zur Ermittlung des optimalen Messzeitpunktes, wäre in Vorversuchen eine Selektion möglicher AP39-Konzentrationen sinnvoll gewesen. Mit dieser Selektion verschiedener Konzentrationen hätte man die vorliegende Dissertation um mehrere Konzentrationen erweitern können, um somit eine bessere Aussage über die konzentrationsabhängigen Effekte von AP39 treffen zu können. Außerdem beruhen einige der Interpretationen der Effekte von AP39 auf einer anzunehmenden H_2S-Konzentrationssteigerung im Mitochondrium über die Zeit. Um diese Annahme verifizieren zu können, wäre die Messung der tatsächlichen H_2S-Konzentration, wie sie zum Beispiel Szczesny et al. und Ikeda et al. durchgeführt haben, von Interesse gewesen [58, 129]. Des Weiteren ist eine Verifikation der Postulation, dass sich der Sauerstoffverbrauch der Zellen nach Beendigung der H_2S-Freisetzung durch AP39 wieder rasch normalisiert, interessant, da ein weiterer Anstieg der H_2S-Konzentration bis in toxische Bereiche zu irreversiblen Zellschädigungen führen könnte. Eine solch überschießende Steigerung der H_2S-Konzentration könnte durch Messungen nach längeren Inkubationszeiträumen ausgeschlossen werden. Ebenso wäre die Untersuchung der Viabilität der Zellen und Expression von Apoptosemarkern wie Cytochrom C oder Caspasen zu den verschiedenen Messzeitpunkten interessant gewesen, da insbesondere der nach 24 Stunden verringerte Sauerstoffverbrauch nicht nur durch einen hypometabolischen Zustand, sondern auch als Folge eines Zelluntergangs, welcher aus toxischen H_2S-Konzentrationen resultieren würde, entstehen könnte. Bei der H_2O_2-Messung fallen außerdem die sehr geringen Mengen an freigesetztem H_2O_2 deutlich ins Gewicht, da diese Konzentrationen so gering sind, dass eine Messungenauigkeit möglicherweise einzelne Effekte überdecken könnte. Diese Messungenauigkeit wäre durch eine deutlich höhere Zellzahl gegebenenfalls auszugleichen gewesen.

Bei Betrachtung der Proteinexpressionen wäre es interessant, ob Neurone durch eine vermehrte Expression der SOU die Metabolisierung von H_2S beschleunigen könnten oder die Expression H_2S-produzierender Enzyme als Reaktion auf eine AP39-Stimulation verändert werden würde. Bei Betrachtung der Effekte von LPS wäre an dieser Stelle eine Messung der Expression von UCPs, sowie der Öffnungsrate von mPTPs wichtig, um die vermuteten Wirkmechanismen auch in meinen Experimenten zu bestätigen. Des Weiteren wurden die Western Blots mit einer kleinen Versuchsanzahl durchgeführt, sodass bei höheren Versuchszahlen unter Umständen mehr signifikante Unterschiede sichtbar gewesen wären.

Während die bereits genannten Limitationen der Arbeit durch die Durchführung weiterer Methoden, Änderung des Versuchsaufbaus oder Erhöhung der Versuchszahl annulliert werden

könnten, sind auch einige nicht zu behebende Limitation vorhanden. Wie bereits diskutiert ist die Simulation einer klinisch relevanten Inflammationsreaktion in der Zellkultur eine große Herausforderung, welche durch die Applikation von LPS zwar bestmöglich, aber dennoch artifiziell gelöst wurde und komplexe Inflammationsreaktionen, wie zum Beispiel im Rahmen einer Sepsis, nicht vollständig abbilden kann [23, 72]. Eine weitere natürliche Limitation ist die nur begrenzte Übertragbarkeit von Experimenten aus der Zellkultur in das Tiermodell. Während in der Zellkultur zwar einzelne Zelltypen oder auch Zellverbände sehr genau untersucht werden können, sind diese Effekte allerdings kaum auf einen gesamten Organismus, geschweige denn auf den Menschen zu übertragen, sodass zur weiteren Analyse der Effekte von AP39 Untersuchungen in Tiermodellen zwingend erforderlich sind.

4.9 Schlussfolgerung

Das Kernelement dieser Dissertation war die Untersuchung der Effekte des H_2S-Donors AP39 auf Mitochondrien einer neuronalen Zellkultur der Ratte und, ob diese Effekte einer zeitlichen Dynamik unterliegen. Der langsam H_2S-freisetzende Donor AP39 besitzt eine zeitabhängige Wirkung auf die Atmungskette von Neuronen, welche auf die ansteigende H_2S-Konzentration in den Zellen zurückzuführen ist [46, 90, 128, 129]. Nach zweistündiger Stimulation fungiert H_2S aufgrund einer anzunehmenden Konzentration im einstelligen Mikromolarbereich als Substrat der Atmungskette, indem H_2S als Elektronendonor der SOU dient und hierdurch den Sauerstoffverbrauch der Zellen steigert [46, 127]. Aus der zunehmenden Akkumulation von H_2S in der Zelle resultiert eine progrediente Hemmung der Cytochrom-C-Oxidase und damit eine zunehmende Hemmung der gesamten Atmungskette mit einem konsekutiv niedrigerem Sauerstoffverbrauch [45, 53, 128, 129]. Diese Effekte von AP39 gehen wahrscheinlich weder mit einem vermehrten oxidativen Stress oder Energiemangel noch mit einer veränderten Mitochondrienmasse einher, was an einer unveränderten MRC und Citrat-Synthase Aktivität, sowie unveränderten Proteinmengen von COX4, COX5A und COX5B zu erkennen ist. Aus der CIV-Hemmung nach 24-stündiger Stimulation und dem damit verbundenen Elektronenrückstau resultiert eine erhöhte mitochondriale ROS-Produktion, welche allerdings wahrscheinlich durch Induktion verschiedener antioxidativer Effekte, sowie eine verminderte zytosolische ROS-Produktion kompensiert werden, sodass die ROS-Gesamtmenge unverändert bleibt [7, 66, 67, 83, 85, 93, 94, 127, 140].

Das zur Simulation einer akuten Inflammationsreaktion verwendete LPS bewirkt sowohl nach zweistündiger als auch nach 24-stündiger Stimulation einen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs,

welcher in erster Linie auf eine Verstärkung des Protonenlecks in der inneren Mitochondrienmembran durch vermehrte Synthese und Aktivität von mPTPs und UCPs zurückzuführen ist [35, 59, 104, 140]. Um trotz dieser Beeinträchtigung der Atmungskette dennoch die ATP-Produktion aufrecht zu erhalten, reagiert die Zelle mit einer verstärkten Mitogenese, welche an einer erhöhten Citrat-Synthase Aktivität erkennbar ist. Des Weiteren wird die bioenergetische Reserve insbesondere durch eine Steigerung des ETS verbessert, wie an der gestiegenen MRC und der gesunken OCR zu sehen ist.

Neben der Untersuchung der Effekte von AP39 auf die Atmungskette im Normalzustand war ein weiterer Kernpunkt meiner Dissertation die Untersuchung, ob in einer LPS-Stimulation die Effekte von AP39 auf die Atmungskette ebenfalls nachgewiesen werden können. Die Beantwortung dieser Frage ist von elementarer Bedeutung, um klären zu können, ob AP39 in Zukunft einen potenziellen klinischen Nutzen im Rahmen eines Inflammationsgeschehens haben könnte. Deshalb wurden alle Versuche auch in einer Co-Stimulation mit LPS durchgeführt. Nach zweistündiger Stimulation zeigte AP39 in sämtlichen Methoden ähnliche Effekte in einer Kombination mit LPS wie in den LPS-freien Gruppen. Nach 24-stündiger Stimulation waren die Effekte von AP39 auf die Atmungskette in der LPS-Gruppe sogar größer, da AP39 neben der Hemmung von Komplex IV, zahlreiche antioxidative Effekte, welche den LPS-induzierten Zellstress kompensieren, vermittelt [2, 85, 121, 129, 148]. Zusätzlich führt AP39 wahrscheinlich zu einer Desensibilisierung bis hin zur vollkommenen Blockade von mPTPs, sodass das LPS-induzierte Protonenleck verringert wird und die Steigerung des Sauerstoffverbrauchs durch LPS in einer Kombination mit AP39 geringer ausfällt [63, 127].

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass AP39 weder in alleiniger Stimulation noch in einer Co-Stimulation mit LPS Effekte auf die Proteinmengen der NO-bildenden Enzyme iNOS und nNOS hat. Da H_2S jede Isoform der NOS hemmt, ist davon auszugehen, dass im Rahmen einer Inkubation mit AP39 die NO-Konzentration in den Zellen abfällt und hierüber wahrscheinlich weitere Funktionen vermittelt werden [60, 75].

Zusammenfassend bewirkt AP39 in einem Inflammationsmodell neben einer Hemmung von CIV zusätzliche weitere Kompensationsmechanismen. Diese Erkenntnisse legen einen potenziellen therapeutischen Nutzen in der Behandlung einer akuten Inflammationsreaktion, wie zum Beispiel der Behandlung einer Sepsis, nahe, da AP39 nach 24-stündiger Stimulation den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen könnte. Gelänge es, AP39 bereits in einem kompensierten Zustand der Sepsis dem Patienten zu applizieren, so könnte AP39 nach 24 Stunden drohende Schäden durch eine Hypoxie aufgrund eines septischen Schocks vermindern

und die Prognose der Patienten durch Induktion eines reversiblen hypometabolischen Zustandes verbessern. Insbesondere die verhältnismäßig leichte Dosierbarkeit und Applikation von AP39 lässt auf einen therapeutischen Gebrauch hoffen. Allerdings sind noch weitere Studien durchzuführen, um die Erkenntnisse dieser Arbeit von der Zellkultur in den menschlichen Organismus übertragen zu können.

5. Zusammenfassung

Das hochgiftige, wasserlösliche Gas Schwefelwasserstoff (H_2S), welches einen charakteristischen Geruch nach verfaulten Eiern aufweist, ist in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Medizin geraten, da Säugetiere endogen H_2S produzieren und H_2S zahlreiche physiologische Funktionen im Körper übernimmt. Aufgrund der endogenen Produktion, der freien Membranpermeabilität und der Funktion als Mediator, ist H_2S neben Stickstoffmonooxid und Kohlenmonooxid der dritte bekannte Gasotransmitter. Neben antioxidativen Effekten und verschiedenen Funktionen in der Signaltransduktion, wirkt H_2S auch auf die mitochondriale Atmungskette. In Konzentrationen kleiner als 10 mikromolar (µM) bewirkt H_2S eine Steigerung der Atmungskette, da er als Substrat der Sulfide Oxidation Unit Elektronen in die Atmungskette einspeist und somit zur Adenosintriphosphat- (ATP-) Produktion durch die Atmungskette beiträgt. Demgegenüber bewirken höhere Konzentrationen eine reversible Hemmung der Cytochrom-C-Oxidase, dem Komplex IV (CIV) der Atmungskette, wodurch die gesamte Atmungskette zum Erliegen kommt. Durch die Entwicklung des synthetischen langsam H_2S-freisetzenden Donors (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphoniumbromid (AP39), welcher sich dank der Transportdomäne Triphenylphosphonium-Bromid stark im Mitochondrium anreichert, ist es möglich, die H_2S-Konzentration exakt zu titrieren und somit die gewollten Effekte zu erreichen.

Die Sepsis, als Paradebeispiel eines akuten Inflammationsgeschehens, ist definiert als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion, welche durch eine dysregulierte, überschießende Inflammations- und Immunreaktion auf eine Infektion ausgelöst wird. Pathophysiologisch spielt unter anderem ein vergrößertes Protonenleck in der inneren Mitochondrienmembran eine wichtige Rolle. Insbesondere im Gehirn, aber auch in zahlreichen anderen Organen vermittelt H_2S antiinflammatorische, antioxidative und antiapoptotische Effekte, weshalb er eine potenzielle Therapie einer überschießenden Inflammation darstellen könnte.

Um die hierfür zugrunde liegenden Mechanismen genauer zu verstehen, untersuchte ich im Rahmen dieser Dissertation die Auswirkungen von AP39, in einer Konzentration von 10 nanomolar, auf die mitochondriale Atmungskette von Neuronen und, ob diese Effekte eine zeitliche Dynamik aufweisen. In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob diese Effekte ebenfalls in einem mit 10µM Lipopolysaccharid (LPS) simulierten Inflammationsmodell erkennbar sind. Außerdem wurden auch die Effekte von AP39 und LPS auf die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) untersucht, da eine Veränderung der Aktivität der Atmungskette häufig mit veränderten ROS-Konzentrationen einhergeht. Um diese Fragen zu

beantworten, wurden AP39 oder AP39+LPS mit Kontrollen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) beziehungsweise DMSO+LPS verglichen. Zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs wurde die High-resolution Respirometry (HRR) verwendet, sowie verschiedene Berechnungen über die Integrität der Mitochondrien angestellt. Zur näherungsweisen Quantifizierung der ROS-Produktion wurde simultan zur HRR eine fluorometrische indirekte Messung von Wasserstoffperoxid durchgeführt. Des Weiteren wurde mittels Citrat-Synthase Aktivitätsmessung die Mitochondrienmasse bestimmt. Um ein genaueres Bild über die zellulären Reaktionen auf die veränderte Aktivität der Atmungskette zu erhalten, wurde außerdem die Masse diverser Proteine anhand von Western Blots bestimmt.

Durch diese Experimente gelang es mir, zu zeigen, dass AP39 zeitabhängige Effekte auf die Atmungskette von Neuronen besitzt und diese auch in Kombination mit LPS teilweise sogar noch deutlicher erreicht werden. Die langsame Freisetzung von H_2S durch AP39 resultiert wahrscheinlich in einer kontinuierlichen Steigerung der H_2S-Konzentration in den Zellen, sodass nach zweistündiger Inkubation eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs und nach 24-stündiger Inkubation eine Reduzierung des Sauerstoffverbrauchs durch oben erwähnte Effekte erkennbar war. Während diese Effekte einzig auf Veränderungen der Aktivität der Atmungskette zurückzuführen sind, aktivierte LPS durch verstärkte Mitogenese und einer Steigerung des Elektronentransportsystems die Atmungskette und steigerte somit den Sauerstoffverbrauch, um eine adäquate ATP-Produktion zu gewährleisten. AP39 konnte diese Effekte nach 24-stündiger Stimulation am ehesten aufgrund einer Kompensation von LPS-induziertem Zellstress und einer Verringerung des Protonenlecks signifikant reduzieren. Außerdem konnte ich zeigen, dass die partielle Hemmung der Atmungskette durch AP39 weder mit erhöhtem oxidativem Stress noch Energiemangel assoziiert ist.

In Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich, dass AP39 nach 24-stündiger Stimulation einen hypometabolischen Zustand, welcher weder mit erhöhtem Zellstress noch mit Energiemangel verbunden ist, in Neuronen induziert. Dieser Effekt ist im LPS-Inflammationsmodell noch ausgeprägter. Hieraus leitet sich eine potenzielle therapeutische Relevanz ab, da AP39 eine Art künstlichen Winterschlaf in Patienten mit einer akuten Inflammationsreaktion erzeugen könnte und somit Neurone vor hypoxischen Schäden im Rahmen einer Minderperfusion effektiv schützen könnte. Um H_2S allerdings erfolgreich einsetzen zu können, müsste AP39 bereits sehr früh, nämlich in einem kompensierten Zustand des Inflammationsgeschehens, appliziert werden. Sollte eine solche Anwendung möglich werden, könnte AP39 in Zukunft einen wichtigen Teil des Therapiekonzepts dieser Krankheitsbilder darstellen.

6. Literaturverzeichnis

1. Abe K, Kimura H (1996) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. J. Neurosci. 16(3): 1066–1071
2. Ahmad A, Olah G, Szczesny B, Wood ME, Whiteman M, Szabo C (2016) 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(1): 88–97
3. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. Biochemistry Mosc 70(2): 200–214
4. Arulkumaran N, Deutschman CS, Pinsky MR, Zuckerbraun B, Schumacker PT, Gomez H, Gomez A, Murray P, Kellum JA (2016) MITOCHONDRIAL FUNCTION IN SEPSIS. Shock 45(3): 271–281
5. Asfar P, Calzia E, Radermacher P (2014) Is pharmacological, H_2S-induced 'suspended animation' feasible in the ICU? Crit Care 18(2): 215
6. Beauchamp RO, Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA (1984) A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. Crit Rev Toxicol 13(1): 25–97
7. Benedetti F, Curreli S, Krishnan S, Davinelli S, Cocchi F, Scapagnini G, Gallo RC, Zella D (2017) Anti-inflammatory effects of H2S during acute bacterial infection: a review. J Transl Med 15(1): 100
8. Bernardi P, Di Lisa F (2015) The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. J Mol Cell Cardiol 78: 100–106
9. Blackstone E, Morrison M, Roth MB (2005) H2S induces a suspended animation-like state in mice. Science 308(5721): 518
10. Brewer GJ (1995) Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. J Neurosci Res 42(5): 674–683
11. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. J Neurosci Res 35(5): 567–576
12. Brunkhorst F, Schmitz R (2014) Sepsis – Epidemiologie, Biomarker und mikrobiologische Diagnostik. Klinikarzt 43(06): 284–288
13. Cao S, Zhang Q, Wang C, Wu H, Jiao L, Hong Q, Hu C (2018) LPS challenge increased intestinal permeability, disrupted mitochondrial function and triggered mitophagy of piglets. Innate Immun 24(4): 221–230
14. Carré JE, Orban J-C, Re L, Felsmann K, Iffert W, Bauer M, Suliman HB, Piantadosi CA, Mayhew TM, Breen P, Stotz M, Singer M (2010) Survival in critical illness is associated with early activation of mitochondrial biogenesis. Am J Respir Crit Care Med 182(6): 745–751
15. Chensue SW, Terebuh PD, Remick DG, Scales WE, Kunkel SL (1991) In vivo biologic and immunohistochemical analysis of interleukin-1 alpha, beta and tumor necrosis factor during experimental endotoxemia. Kinetics, Kupffer cell expression, and glucocorticoid effects. Am J Pathol 138(2): 395–402
16. Chiang C-C, Cheng W-J, Korinek M, Lin C-Y, Hwang T-L (2019) Neutrophils in Psoriasis. Front Immunol: 2376

17. Collin M, Anuar FBM, Murch O, Bhatia M, Moore PK, Thiemermann C (2005) Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia. Br J Pharmacol 146(4): 498–505
18. Collman JP, Ghosh S, Dey A, Decréau RA (2009) Using a functional enzyme model to understand the chemistry behind hydrogen sulfide induced hibernation. Proc Natl Acad Sci U S A 106(52): 22090–22095
19. Cooper CE, Brown GC (2008) 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(5): 533–539
20. Cuevasanta E, Möller MN, Alvarez B (2017) Biological chemistry of hydrogen sulfide and persulfides. Arch Biochem Biophys 617: 9–25
21. Dai J (2012) Novel molecular fossils of bacteria: insights into hydrothermal origin of life. J Theor Biol 310: 249–256
22. Di Meo I, Fagiolari G, Prelle A, Viscomi C, Zeviani M, Tiranti V (2011) Chronic exposure to sulfide causes accelerated degradation of cytochrome c oxidase in ethylmalonic encephalopathy. Antioxid Redox Signal 15(2): 353–362
23. Dickson K, Lehmann C (2019) Inflammatory Response to Different Toxins in Experimental Sepsis Models. Int J Mol Sci 20(18)
24. Doerrier C, Garcia-Souza LF, Krumschnabel G, Wohlfarter Y, Mészáros AT, Gnaiger E (2018) High-Resolution FluoRespirometry and OXPHOS Protocols for Human Cells, Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Muscle, and Isolated Mitochondria. Methods Mol Biol 1782: 31–70
25. Donadelli M, Dando I, Fiorini C, Palmieri M (2014) UCP2, a mitochondrial protein regulated at multiple levels. Cell Mol Life Sci 71(7): 1171–1190
26. Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. J. Neurosci. 8(4): 1454–1468
27. Dou Y, Wang Z, Chen G (2016) The role of hydrogen sulfide in stroke. Med Gas Res 6(2): 79–84
28. Duncan DJ, Yang Z, Hopkins PM, Steele DS, Harrison SM (2010) TNF-alpha and IL-1beta increase Ca2+ leak from the sarcoplasmic reticulum and susceptibility to arrhythmia in rat ventricular myocytes. Cell Calcium 47(4): 378–386
29. Dunn OJ (1961) Multiple Comparisons among Means. Journal of the American Statistical Association 56(293): 52–64
30. Eigentler A, Draxl A, Gnaiger E (2020) Laboratory Protocol: Citrate synthase a mitochondrial marker enzyme. Mitochondrial Physiology Network (17.04(04):): 1–12
31. Faggioni R, Shigenaga J, Moser A, Feingold KR, Grunfeld C (1998) Induction of UCP2 gene expression by LPS: a potential mechanism for increased thermogenesis during infection. Biochem Biophys Res Commun 244(1): 75–78
32. Faller S, Ryter SW, Choi AMK, Loop T, Schmidt R, Hoetzel A (2010) Inhaled hydrogen sulfide protects against ventilator-induced lung injury. Anesthesiology 113(1): 104–115
33. Faller S, Zimmermann KK, Strosing KM, Engelstaedter H, Buerkle H, Schmidt R, Spassov SG, Hoetzel A (2012) Inhaled hydrogen sulfide protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. Med Gas Res 2(1): 26
34. Filipovic MR (2015) Persulfidation (S-sulfhydration) and H2S. Handb Exp Pharmacol 230: 29–59
35. Fu C, Dai X, Yang Y, Lin M, Cai Y, Cai S (2017) Dexmedetomidine attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting oxidative stress, mitochondrial dysfunction and apoptosis in rats. Mol Med Rep 15(1): 131–138

36. Geurts M, Macleod MR, Kollmar R, Kremer PHC, van der Worp HB (2014) Therapeutic hypothermia and the risk of infection: a systematic review and meta-analysis. Crit Care Med 42(2): 231–242
37. Ghiselli R, Lucarini G, Orlando F, Ortenzi M, Cardinali L, Provinciali M, Di Primio R, Guerrieri M (2017) Increase of n-NOS and i-NOS in Rat Colon After Sacral Neuromodulation. Neuromodulation 20(8): 761–766
38. Gnaiger E (2008) Polarographic Oxygen Sensors, the Oxygraph, and High-Resolution Respirometry to Assess Mitochondrial Function. In: Dykens JA, Will Y (eds) Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, pp 325–352
39. Gnaiger E (2009) Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. Int J Biochem Cell Biol 41(10): 1837–1845
40. Gnaiger E (2014) Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis. Mitochondrial Physiology Network (19.12): 1–81
41. Gnaiger E, Aasander Frostner E, Abdul Karim N, Abumrad NA, Acuna-Castroviejo D, Adiele RC, Ahn B, Ali SS, Alton L, Alves MG, Amati F, Amoedo ND, Andreadou I, Arago M, Aral C, Arandarcikaite O, Armand A-S, Arnould T, Avram VF, Bailey DM, Bajpeyi S, Bajzikova M, Bakker BM, Barlow J, Bastos Sant'Anna Silva, Ana Carolina, Batterson P, Battino M, Bazil J, Beard DA, Bednarczyk P, Bello F, Ben-Shachar D, Bergdahl A, Berge RK, Bergmeister L, Bernardi P, Berridge MV, Bettinazzi S, Bishop D, Blier PU, Blindheim DF, Boardman NT, Boetker HE, Borchard S, Boros M, Borsheim E, Borutaite V, Botella J, Bouillaud F, Bouitbir J, Boushel RC, Bovard J, Breton S, Brown DA, Brown GC, Brown RA, Brozinick JT, Buettner GR, Burtscher J, Calabria E, Calbet JA, Calzia E, Cannon DT, Cano Sanchez M, Canto Alvarez C, Cardoso LHD, Carvalho E, Casado Pinna M, Cassar S, Cassina AM, Castelo MP, Gonzalez-Franquesa A, Cavalcanti-de-Albuquerque JP, Cervinkova Z, Chabi B, Chakrabarti L, Chakrabarti S, Chaurasia B, Chen Q, Chicco AJ, Chinopoulos C, Chowdhury SK, Cizmarova B, Clementi E, Coen PM, Cohen BH, Coker RH, Collin A, Crisostomo L, Dahdah N, Dalgaard LT, Dambrova M, Danhelovska T, Darveau CA, Das AM, Dash RK, Davidova E, Davis MS, Goede P de, Palma C de, Dembinska-Kiec A, Detraux D, Devaux Y, Di Marcello M, Dias TR, Distefano G, Doermann N, Doerrier C, Dong L-F, Donnelly C, Drahota Z, Duarte FV, Dubouchaud H, Duchen MR, Dumas J-F, Durham WJ, Dymkowska D, Dyrstad SE, Dyson A, Dzialowski EM, Eaton S, Ehinger J, Elmer E, Endlicher R, Engin AB, Escames G, Ezrova Z, Falk MJ, Fell DA, Ferdinandy P, Ferko M, Ferreira JCB, Ferreira R, Ferri A, Fessel JP, Filipovska A, Fisar Z, Fischer C, Fischer M, Fisher G, Fisher JJ, Ford E, Fornaro M, Galina A, Galkin A, Gallee L, Galli GL, Gama Perez P, Gan Z, Ganetzky R, Garcia-Rivas G, Garcia-Roves PM, Garcia-Souza LF, Garipi E, Garlid KD, Garrabou G, Garten A, Gastaldelli A, Gayen J, Genders AJ, Genova ML, Giovarelli M, Goncalo Teixeira da Silva, Rui, Goncalves DF, Gonzalez-Armenta JL, Gonzalez-Freire M, Gonzalo H, Goodpaster BH, Gorr TA, Gourlay CW, Granata C, Grefte S, Guarch ME, Gueguen N, Gumeni S, Haas CB, Haavik J, Haendeler J, Haider M, Hamann A, Han J, Han WH, Hancock CR, Hand SC, Handl J, Hargreaves IP, Harper ME, Harrison DK, Hassan H, Hausenloy DJ, Heales S, JR, Heiestad C, Hellgren KT, Hepple RT, Hernansanz-Agustin P, Hewakapuge S, Hickey AJ, Ho DH, Hoehn KL, Hoel F, Holland OJ, Holloway GP, Hoppel CL, Hoppel F, Houstek J, Huete-Ortega M, Hyrossova P, Iglesias-Gonzalez J, Irving BA, Isola R, Iyer S, Jackson CB, Jadiya P, Jana PF, Jang DH, Jang YC, Janowska J, Jansen K, Jansen-Duerr P, Jansone B, Jarmuszkiewicz W, Jaskiewicz A, Jedlicka J, Jespersen NR, Jha RK, Jurczak MJ, Jurk D, Kaambre T, Kaczor JJ, Kainulainen H, Kampa RP, Kandel SM, Kane DA, Kapferer W, Kappler L, Karabatsiakis A, Karkucinska-Wieckowska A, Kaur S, Keijer J, Keller MA, Keppner G, Khamoui AV, Kidere D, Kilbaugh T, Kim HK, Kim JKS, Klepinin A, Klepinina L, Klingenspor M, Klocker H, Komlódi T, Koopman WJH, Kopitar-Jerala N, Kowaltowski AJ, Kozlov

AV, Krajcova A, Krako Jakovljevic N, Kristal BS, Krycer JR, Kuang J, Kucera O, Kuka J, Kwak HB, Kwast K, Laasmaa M, Labieniec-Watala M, Lai N, Land JM, Lane N, Laner V, Lanza IR, Larsen TS, Lavery GG, Lazou A, Lee HK, Leeuwenburgh C, Lehti M, Lemieux H, Lenaz G, Lerfall J, Li PA, Li Puma L, Liepins E, Lionett S, Liu J, Lopez LC, Lucchinetti E, Ma T, Macedo MP, Maciej S, MacMillan-Crow LA, Majtnerova P, Makarova E, Makrecka-Kuka M, Malik AN, Markova M, Martin DS, Martins AD, Martins JD, Maseko TE, Maull F, Mazat JP, McKenna HT, McKenzie M, Menze MA, Merz T, Meszaros AT, Methner A, Michalak S, Moellering DR, Moisoi N, Molina AJA, Montaigne D, Moore AL, Moreau K, Moreira BP, Moreno-Sanchez R, Mracek T, Muccini AM, Muntane J, Muntean DM, Murray AJ, Musiol E, Nabben M, Nair KS, Nehlin JO, Nemec M, Neufer PD, Neuzil J, Neviere R, Newsom SA, Nozickova K, O'Brien KA, O'Gorman D, Olgar Y, Oliveira B, Oliveira MF, Oliveira MT, Oliveira PF, Oliveira PJ, Orynbayeva Z, Osiewacz HD, Pak YK, Pallotta ML, Palmeira CM, Parajuli N, Passos JF, Passrugger M, Patel HH, Pavlova N, Pecina P, Pedersen TM, Pereira da Silva Grilo da Silva, Filomena, Perez Valencia JA, Perks KL, Pesta D, Petit PX, Pettersen IKN, Pichaud N, Pichler I, Piel S, Pietka TA, Pino MF, Pirkmajer S, Plangger M, Porter C, Porter RK, Procaccio V, Prochownik EV, Prola A, Pulinilkunnil T, Puskarich MA, Puurand M, Radenkovic F, Ramzan R, Rattan SIS, Reboredo P, Renner-Sattler K, Rial E, Robinson MM, Roden M, Rodriguez E, Rodriguez-Enriquez S, Roesland GV, Rohlena J, Rolo AP, Ropelle ER, Rossignol R, Rossiter HB, Rubelj I, Rybacka-Mossakowska J, Saada A, Safaei Z, Sarlak S, Salin K, Salvadego D, Sandi C, Saner N, Sanz A, Sazanov LA, Scatena R, Schartner M, Scheibye-Knudsen M, Schilling JM, Schlattner U, Schoenfeld P, Schots PC, Schulz R, Schwarzer C, Scott GR, Selman C, Shabalina IG, Sharma P, Sharma V, Shevchuk I, Shirazi R, Shiroma JG, Siewiera K, Silber AM, Silva AM, Sims CA, Singer D, Singh BK, Skolik RA, Smenes BT, Smith J, Soares FAA, Sobotka O, Sokolova I, Sonkar VK, Sowton AP, Sparagna GC, Sparks LM, Spinazzi M, Stankova P, Starr J, Stary C, Stelfa G, Stepto NK, Stiban J, Stier A, Stocker R, Storder J, Sumbalova Z, Suomalainen WA, Suravajhala P, Svalbe B, Swerdlow RH, Swiniuch D, Szabo I, Szewczyk A, Szibor M, Tanaka M, Tandler B, Tarnopolsky MA, Tausan D, Tavernarakis N, Tepp K, Thakkar H, Thapa M, Thyfault JP, Tomar D, Ton R, Torp M-K, Towheed A, Tretter L, Trewin AJ, Trifunovic A, Trivigno C, Tronstad KJ, Trougakos IP, Truu L, Tuncay E, Turan B, Tyrrell DJ, Urban T, Valentine JM, van Bergen NJ, van Hove J, Varricchio F, Vella J, Vendelin M, Vercesi AE, Victor VM, Vieira Ligo Teixeira C, Vidimce J, Viel C, Vieyra A, Vilks K, Villena JA, Vincent V, Vinogradov AD, Viscomi C, Vitorino RMP, Vogt S, Volani C, Volska K, Votion D-M, Vujacic-Mirski K, Wagner BA, Ward ML, Warnsmann V, Wasserman DH, Watala C, Wei Y-H, Whitfield J, Wickert A, Wieckowski MR, Wiesner RJ, Williams CM, Winwood-Smith H, Wohlgemuth SE, Wohlwend M, Wolff JN, Wrutniak-Cabello C, Wuest RCI, Yokota T, Zablocki K, Zanon A, Zanou N, Zaugg K, Zaugg M, Zdrazilova L, Zhang Y, Zhang YZ, Zikova A, Zischka H, Zorzano A, Zvejniece L, Lagarrigue S, Munro D, Pereira S, Laranjinha J, Almeida A, Diederich M, Hecker M, Jusic A, Prigione A, Sommer N, Weissig V, Abdel-Rahman EA, Sova M, Amorim R, Beleza J, Bravo-Sagua R, Celen MC, Coxito P, Crispim M, Dias C, Evinova A, Fuertes Agudo M, Gao Y, Garcia G, Goikoetxea Usandizaga N, Grilo L, Minuzzi LM, Hachmo Y, Hajrulahovic A, Hatokova Z, Henrique A, Holzner L, Kimoloi S, am Ledo, Machado IF, Magalhaes J, Magri A, Nunes S, Oliveira J, Pinho SA, Preguica I, Reano S, Rodrigues AS, Santos D, Sardao V, Stevanovic J, Teodoro J, van der Ende M, Zujovic T, Djafarzadeh S, Schneider Gasser EM, Jaspers RT, Arias-Reyes C, Bairam A, Laouafa S, Marcouiller F, Soliz J, Glatz J, Antunes D, Bach de Courtade SM, Bardal T, Di Paola FJ, Fulton M, Grams B, Joseph V, Kwon OS, Liang L, Mila Guasch M, Moore C, Norman J, O'Brien K, Olsen RE, Paez H, Rees BB, Roshanravan B, Scaife P, Sendon PM, Vlachaki Walker J, Crossland H, Jones JG, Bento G, Perales JC, Aragones Lopez J (2019) Mitochondrial respiratory states and rates. MitoFit Preprint Archives

42. Gnaiger E, Kuznetsov AV (2002) Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrome c. Biochem Soc Trans 30(2): 252–258
43. Gnaiger E, Kuznetsov AV, Schneeberger S, Seiler R, Brandacher G, Steurer W, Margreiter R (2000) Mitochondria in the Cold. In: Heldmaier G, Klingenspor M (eds) Life in the Cold. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 431–442
44. Gnaiger E, Plangger I, Hunger M (2019) Mitochondrial respiration medium: MiR05-Kit. Mitochondrial Physiology Network (22.10(03):): 1–2
45. Goodwin LR, Francom D, Dieken FP, Taylor JD, Warenycia MW, Reiffenstein RJ, Dowling G (1989) Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. J Anal Toxicol 13(2): 105–109
46. Goubern M, Andriamihaja M, Nübel T, Blachier F, Bouillaud F (2007) Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. FASEB J 21(8): 1699–1706
47. Groeger M, Matallo J, McCook O, Wagner F, Wachter U, Bastian O, Gierer S, Reich V, Stahl B, Huber-Lang M, Szabó C, Georgieff M, Radermacher P, Calzia E, Wagner K (2012) Temperature and cell-type dependency of sulfide effects on mitochondrial respiration. Shock 38(4): 367–374
48. Halliwell B (1996) Antioxidants in human health and disease. Annu Rev Nutr 16: 33–50
49. Hansen ME, Simmons KJ, Tippetts TS, Thatcher MO, Saito RR, Hubbard ST, Trumbull AM, Parker BA, Taylor OJ, Bikman BT (2015) Lipopolysaccharide Disrupts Mitochondrial Physiology in Skeletal Muscle via Disparate Effects on Sphingolipid Metabolism. Shock 44(6): 585–592
50. Hartmann C, Gröger M, Noirhomme J-P, Scheuerle A, Möller P, Wachter U, Huber-Lang M, Nussbaum B, Jung B, Merz T, McCook O, Kress S, Stahl B, Calzia E, Georgieff M, Radermacher P, Wepler M (2019) In-Depth Characterization of the Effects of Cigarette Smoke Exposure on the Acute Trauma Response and Hemorrhage in Mice. Shock 51(1): 68–77
51. Hartmann C, Nussbaum B, Calzia E, Radermacher P, Wepler M (2017) Gaseous Mediators and Mitochondrial Function: The Future of Pharmacologically Induced Suspended Animation? Front Physiol 8: 691
52. Hassoun SM, Marechal X, Montaigne D, Bouazza Y, Decoster B, Lancel S, Neviere R (2008) Prevention of endotoxin-induced sarcoplasmic reticulum calcium leak improves mitochondrial and myocardial dysfunction. Crit Care Med 36(9): 2590–2596
53. Hill BC, Woon TC, Nicholls P, Peterson J, Greenwood C, Thomson AJ (1984) Interactions of sulphide and other ligands with cytochrome c oxidase. An electron-paramagnetic-resonance study. Biochem J 224(2): 591–600
54. Hu L-F, Wong PT-H, Moore PK, Bian J-S (2007) Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia. J Neurochem 100(4): 1121–1128
55. Huang CW, Feng W, Peh MT, Peh K, Dymock BW, Moore PK (2016) A novel slow-releasing hydrogen sulfide donor, FW1256, exerts anti-inflammatory effects in mouse macrophages and in vivo. Pharmacol Res 113(Pt A): 533–546
56. Huang D, Jiang Y (2020) MKP1 reduces neuroinflammation via inhibiting endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction. J Cell Physiol 235(5): 4316–4325
57. Iglesias DE, Bombicino SS, Valdez LB, Boveris A (2015) Nitric oxide interacts with mitochondrial complex III producing antimycin-like effects. Free Radic Biol Med 89: 602–613
58. Ikeda K, Marutani E, Hirai S, Wood ME, Whiteman M, Ichinose F (2015) Mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor AP39 improves neurological outcomes after cardiac arrest in mice. Nitric Oxide 49: 90–96

59. Jeger V, Brandt S, Porta F, Jakob SM, Takala J, Djafarzadeh S (2015) Dose response of endotoxin on hepatocyte and muscle mitochondrial respiration in vitro. Biomed Res Int 2015: 353074
60. Jeong S-O, Pae H-O, Oh G-S, Jeong G-S, Lee B-S, Lee S, Du Kim Y, Rhew HY, Lee K-M, Chung H-T (2006) Hydrogen sulfide potentiates interleukin-1beta-induced nitric oxide production via enhancement of extracellular signal-regulated kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun 345(3): 938–944
61. Kadenbach B, Hüttemann M (2015) The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase. Mitochondrion 24: 64–76
62. Kamat PK, Kalani A, Tyagi N (2015) Role of hydrogen sulfide in brain synaptic remodeling. Meth Enzymol 555: 207–229
63. Karwi QG, Bornbaum J, Boengler K, Torregrossa R, Whiteman M, Wood ME, Schulz R, Baxter GF (2017) AP39, a mitochondria-targeting hydrogen sulfide (H2 S) donor, protects against myocardial reperfusion injury independently of salvage kinase signalling. Br J Pharmacol 174(4): 287–301
64. Kimura H (2011) Hydrogen sulfide: its production and functions. Exp Physiol 96(9): 833–835
65. Kimura H (2011) Hydrogen sulfide: its production, release and functions. Amino Acids 41(1): 113–121
66. Kimura H (2014) Production and physiological effects of hydrogen sulfide. Antioxid Redox Signal 20(5): 783–793
67. Kimura Y, Goto Y-I, Kimura H (2010) Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. Antioxid Redox Signal 12(1): 1–13
68. Kimura Y, Kimura H (2004) Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. FASEB J 18(10): 1165–1167
69. Kiss L, Deitch EA, Szabó C (2008) Hydrogen sulfide decreases adenosine triphosphate levels in aortic rings and leads to vasorelaxation via metabolic inhibition. Life Sci 83(17-18): 589–594
70. Koenitzer JR, Isbell TS, Patel HD, Benavides GA, Dickinson DA, Patel RP, Darley-Usmar VM, Lancaster JR, Doeller JE, Kraus DW (2007) Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O2-dependent manner. Am J Physiol Heart Circ Physiol 292(4): H1953-60
71. Koley D, Bard AJ (2010) Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). Proc Natl Acad Sci U S A 107(39): 16783–16787
72. Krüger-Genge A, Jung F, Fuhrmann R, Franke R-P (2016) Shear resistance of endothelial cells in a pathological environment. Clin Hemorheol Microcirc 64(3): 383–389
73. Krumschnabel G, Fontana-Ayoub M, Sumbalova Z, Heidler J, Gauper K, Fasching M, Gnaiger E (2015) Simultaneous high-resolution measurement of mitochondrial respiration and hydrogen peroxide production. Methods Mol Biol 1264: 245–261
74. Kruskal WH, Wallis WA (1952) Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. Journal of the American Statistical Association 47(260): 583–621
75. Kubo S, Kurokawa Y, Doe I, Masuko T, Sekiguchi F, Kawabata A (2007) Hydrogen sulfide inhibits activity of three isoforms of recombinant nitric oxide synthase. Toxicology 241(1-2): 92–97
76. Kuznetsov AV, Gnaiger E (2015) Oxygraph assay of cytochrome c oxidase activity: chemical background correction. Mitochondrial Physiology Network (06.06:): 1–4
77. Lagoutte E, Mimoun S, Andriamihaja M, Chaumontet C, Blachier F, Bouillaud F (2010) Oxidation of hydrogen sulfide remains a priority in mammalian cells and causes reverse electron transfer in colonocytes. Biochim Biophys Acta 1797(8): 1500–1511

78. Lancel S, Hassoun SM, Favory R, Decoster B, Motterlini R, Neviere R (2009) Carbon monoxide rescues mice from lethal sepsis by supporting mitochondrial energetic metabolism and activating mitochondrial biogenesis. J Pharmacol Exp Ther 329(2): 641–648
79. Le Trionnaire S, Perry A, Szczesny B, Szabo C, Winyard PG, Whatmore JL, Wood ME, Whiteman M (2014) 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(6): 728–736
80. Li L, Rose P, Moore PK (2011) Hydrogen sulfide and cell signaling. Annu Rev Pharmacol Toxicol 51: 169–187
81. Li L, Whiteman M, Guan YY, Neo KL, Cheng Y, Lee SW, Zhao Y, Baskar R, Tan C-H, Moore PK (2008) Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. Circulation 117(18): 2351–2360
82. Li R, Jia Z, Trush MA (2016) Defining ROS in Biology and Medicine. React Oxyg Species (Apex) 1(1): 9–21
83. Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H, Yang X (2013) Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. J Hematol Oncol 6: 19
84. Liang H, Ward WF (2006) PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. Adv Physiol Educ 30(4): 145–151
85. Lu M, Hu L-F, Hu G, Bian J-S (2008) Hydrogen sulfide protects astrocytes against H(2)O(2)-induced neural injury via enhancing glutamate uptake. Free Radic Biol Med 45(12): 1705–1713
86. Mahmood T, Yang P-C (2012) Western blot: technique, theory, and trouble shooting. N Am J Med Sci 4(9): 429–434
87. Martini WZ, Pusateri AE, Uscilowicz JM, Delgado AV, Holcomb JB (2005) Independent contributions of hypothermia and acidosis to coagulopathy in swine. J Trauma 58(5): 1002-9; discussion 1009-10
88. Matallo J, Vogt J, McCook O, Wachter U, Tillmans F, Groeger M, Szabo C, Georgieff M, Radermacher P, Calzia E (2014) Sulfide-inhibition of mitochondrial respiration at very low oxygen concentrations. Nitric Oxide 41: 79–84
89. Middeldorp J, Hol EM (2011) GFAP in health and disease. Prog Neurobiol 93(3): 421–443
90. Módis K, Bos EM, Calzia E, van Goor H, Coletta C, Papapetropoulos A, Hellmich MR, Radermacher P, Bouillaud F, Szabo C (2014) Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part II. Pathophysiological and therapeutic aspects. Br J Pharmacol 171(8): 2123–2146
91. Moeton M, Stassen OMJA, Sluijs JA, van der Meer VWN, Kluivers LJ, van Hoorn H, Schmidt T, Reits EAJ, van Strien ME, Hol EM (2016) GFAP isoforms control intermediate filament network dynamics, cell morphology, and focal adhesions. Cell Mol Life Sci 73(21): 4101–4120
92. Mohanty J, Jaffe JS, Schulman ES, Raible DG (1997) A highly sensitive fluorescent micro-assay of H2O2 release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. Journal of Immunological Methods 202(2): 133–141
93. Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem J 417(1): 1–13
94. Muzaffar S, Shukla N, Bond M, Newby AC, Angelini GD, Sparatore A, Del Soldato P, Jeremy JY (2008) Exogenous hydrogen sulfide inhibits superoxide formation, NOX-1 expression and Rac1 activity in human vascular smooth muscle cells. J Vasc Res 45(6): 521–528
95. Nagy P, Winterbourn CC (2010) Rapid reaction of hydrogen sulfide with the neutrophil oxidant hypochlorous acid to generate polysulfides. Chem Res Toxicol 23(10): 1541–1543

96. Negelein E (1928) Über die Wirkung des Schwefelwasserstoffs auf chemische Vorgänge in Zellen. In: Warburg O (ed) Über die Katalytischen Wirkungen der Lebendigen Substanz. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 199–209
97. Nickens KP, Wikstrom JD, Shirihai OS, Patierno SR, Ceryak S (2013) A bioenergetic profile of non-transformed fibroblasts uncovers a link between death-resistance and enhanced spare respiratory capacity. Mitochondrion 13(6): 662–667
98. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO (2003) Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. Science 299(5608): 896–899
99. Nystul TG, Roth MB (2004) Carbon monoxide-induced suspended animation protects against hypoxic damage in Caenorhabditis elegans. Proc Natl Acad Sci U S A 101(24): 9133–9136
100. Olson KR (2012) A practical look at the chemistry and biology of hydrogen sulfide. Antioxid Redox Signal 17(1): 32–44
101. Olson KR (2015) Hydrogen sulfide as an oxygen sensor. Antioxid Redox Signal 22(5): 377–397
102. Olson KR, Whitfield NL (2010) Hydrogen sulfide and oxygen sensing in the cardiovascular system. Antioxid Redox Signal 12(10): 1219–1234
103. Packer L, Mustafa MG (1966) Pathways of electron flow established by tetramethyl-phenylenediamine in mitochondria and ascites tumor cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation 113(1): 1–12
104. Pan P, Wang X, Liu D (2018) The potential mechanism of mitochondrial dysfunction in septic cardiomyopathy. J Int Med Res 46(6): 2157–2169
105. Panagaki T, Randi EB, Augsburger F, Szabo C (2019) Overproduction of H2S, generated by CBS, inhibits mitochondrial Complex IV and suppresses oxidative phosphorylation in Down syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 116(38): 18769–18771
106. Papapetropoulos A (1999) Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. Cardiovascular Research 43(3): 509–520
107. Pesta D, Gnaiger E (2012) High-Resolution Respirometry: OXPHOS Protocols for Human Cells and Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Human Muscle. In: Palmeira CM, Moreno AJ (eds) Mitochondrial Bioenergetics, vol 810. Humana Press, Totowa, NJ, pp 25–58
108. Petersen LC (1977) The effect of inhibitors on the oxygen kinetics of cytochrome c oxidase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 460(2): 299–307
109. Pfenninger M, Lerp H, Tobler M, Passow C, Kelley JL, Funke E, Greshake B, Erkoc UK, Berberich T, Plath M (2014) Parallel evolution of cox genes in H2S-tolerant fish as key adaptation to a toxic environment. Nat Commun: 3873
110. Pfleger J, He M, Abdellatif M (2015) 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(7): e1835-e1835
111. Puigserver P, Spiegelman BM (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. Endocr Rev 24(1): 78–90
112. Pushchina E, Varaksin A, Obukhov D, Prudnikov I (2020) GFAP expression in the optic nerve and increased H 2 S generation in the integration centers of the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) brain after unilateral eye injury. Neural Regen Res 15(10): 1867
113. Ramsden DB, Ho PW-L, Ho JW-M, Liu H-F, So DH-F, Tse H-M, Chan K-H, Ho S-L (2012) Human neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): structural properties, regulation, and

physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Brain Behav 2(4): 468–478

114. Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH (1992) Toxicology of Hydrogen Sulfide. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32(1): 109–134
115. Schoen M, Reichel JM, Demestre M, Putz S, Deshpande D, Proepper C, Liebau S, Schmeisser MJ, Ludolph AC, Michaelis J, Boeckers TM (2016) Super-Resolution Microscopy Reveals Presynaptic Localization of the ALS/FTD Related Protein FUS in Hippocampal Neurons. Front. Cell. Neurosci. 9
116. Searcy DG, Lee SH (1998) Sulfur reduction by human erythrocytes. J. Exp. Zool. 282(3): 310–322
117. Semenza GL (2007) Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. Biochemical Journal 405(1): 1–9
118. Sies H (1985) Oxidative Stress. Elsevier Science, Burlington
119. Simon F, Giudici R, Duy CN, Schelzig H, Oter S, Gröger M, Wachter U, Vogt J, Speit G, Szabó C, Radermacher P, Calzia E (2008) Hemodynamic and metabolic effects of hydrogen sulfide during porcine ischemia/reperfusion injury. Shock 30(4): 359–364
120. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent J-L, Angus DC (2016) The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA 315(8): 801
121. Smith RA, Hartley RC, Murphy MP (2011) Mitochondria-Targeted Small Molecule Therapeutics and Probes. Antioxid Redox Signal 15(12): 3021–3038
122. Song I, Dityatev A (2018) Crosstalk between glia, extracellular matrix and neurons. Brain Research Bulletin 136: 101–108
123. Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, Salviati L, Angelini C (2012) Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. Nat Protoc 7(6): 1235–1246
124. Srere PA (1969) [1] Citrate synthase. In: Citric Acid Cycle, vol 13. Elsevier, pp 3–11
125. Suliman HB, Carraway MS, Tatro LG, Piantadosi CA (2007) A new activating role for CO in cardiac mitochondrial biogenesis. J Cell Sci: 299–308
126. Sun W-H, Liu F, Chen Y, Zhu Y-C (2012) 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(2): 164–169
127. Szabo C, Papapetropoulos A (2017) 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(4): 497–564
128. Szabo C, Ransy C, Módis K, Andriamihaja M, Murghes B, Coletta C, Olah G, Yanagi K, Bouillaud F (2014) Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. Br J Pharmacol 171(8): 2099–2122
129. Szczesny B, Módis K, Yanagi K, Coletta C, Le Trionnaire S, Perry A, Wood ME, Whiteman M, Szabo C (2014) 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: 120–130
130. Tamizhselvi R, Moore PK, Bhatia M (2008) Inhibition of Hydrogen Sulfide Synthesis Attenuates Chemokine Production and Protects Mice Against Acute Pancreatitis and Associated Lung Injury. Pancreas 36(4): e24-e31
131. Tanaka H, Katoh A, Oguro K, Shimazaki K, Gomi H, Itohara S, Masuzawa T, Kawai N (2002) Disturbance of hippocampal long-term potentiation after transient ischemia in GFAP deficient mice. J. Neurosci. Res. 67(1): 11–20

132. Telezhkin V, Brazier SP, Cayzac S, Müller CT, Riccardi D, Kemp PJ (2009) Hydrogen sulfide inhibits human BK(Ca) channels. Adv Exp Med Biol 648: 65–72
133. Telezhkin V, Brazier SP, Cayzac SH, Wilkinson WJ, Riccardi D, Kemp PJ (2010) Mechanism of inhibition by hydrogen sulfide of native and recombinant BKCa channels. Respir Physiol Neurobiol 172(3): 169–178
134. Teodoro RO, O'Farrell PH (2003) Nitric oxide-induced suspended animation promotes survival during hypoxia. The EMBO Journal 22(3): 580–587
135. Timón-Gómez A, Nývltová E, Abriata LA, Vila AJ, Hosler J, Barrientos A (2018) Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis: Recent developments. Seminars in Cell & Developmental Biology 76: 163–178
136. Turdi S, Han X, Huff AF, Roe ND, Hu N, Gao F, Ren J (2012) Cardiac-specific overexpression of catalase attenuates lipopolysaccharide-induced myocardial contractile dysfunction: Role of autophagy. Free Radical Biology and Medicine 53(6): 1327–1338
137. Ubuka T, Ohta J, Yao W-B, Abe T, Teraoka T, Kurozumi Y (1992) l-Cysteine metabolism via 3-mercaptopyruvate pathway and sulfate formation in rat liver mitochondria. Amino Acids 2(1-2): 143–155
138. Untereiner AA, Fu M, Módis K, Wang R, Ju Y, Wu L (2016) Stimulatory effect of CSE-generated H2S on hepatic mitochondrial biogenesis and the underlying mechanisms. Nitric Oxide: 67–76
139. Wächtershäuser G (1992) Groundworks for an evolutionary biochemistry: The iron-sulphur world. Progress in Biophysics and Molecular Biology 58(2): 85–201
140. Wallace DC (2002) Animal Models for Mitochondrial Disease. In: Copeland WC (ed) Mitochondrial DNA, vol 197. Humana Press, New Jersey, pp 3–54
141. Wang R (2002) Two's company, three's a crowd: can H 2 S be the third endogenous gaseous transmitter? FASEB j. 16(13): 1792–1798
142. Wang Y, Hekimi S (2013) Mitochondrial respiration without ubiquinone biosynthesis. Human Molecular Genetics 22(23): 4768–4783
143. Warford J, Lamport A-C, Kennedy B, Easton AS (2017) Human Brain Chemokine and Cytokine Expression in Sepsis: A Report of Three Cases. Can. J. Neurol. Sci. 44(1): 96–104
144. Wepler M, Merz T, Wachter U, Vogt J, Calzia E, Scheuerle A, Möller P, Gröger 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 (2019) The Mitochondria-Targeted H2S-Donor AP39 in a Murine Model of Combined Hemorrhagic Shock and Blunt Chest Trauma. SHOCK 52(2): 230–239
145. Yadava N, Nicholls DG (2007) Spare Respiratory Capacity Rather Than Oxidative Stress Regulates Glutamate Excitotoxicity after Partial Respiratory Inhibition of Mitochondrial Complex I with Rotenone. Journal of Neuroscience 27(27): 7310–7317
146. Yin J, Tu C, Zhao J, Ou D, Chen G, Liu Y, Xiao X (2013) Exogenous hydrogen sulfide protects against global cerebral ischemia/reperfusion injury via its anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in rats. Brain Research 1491: 188–196
147. Yu XX, Barger JL, Boyer BB, Brand MD, Pan G, Adams SH (2000) Impact of endotoxin on UCP homolog mRNA abundance, thermoregulation, and mitochondrial proton leak kinetics. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 279(2): E433-E446
148. Zhang H, Feng Y, Yao Y (2018) Potential therapy strategy: targeting mitochondrial dysfunction in sepsis. Military Med Res 5(1)
149. Zhao F, Fang F, Qiao P, Yan N, Gao D, Yan Y (2016) AP39, a Mitochondria-Targeted Hydrogen Sulfide Donor, Supports Cellular Bioenergetics and Protects against Alzheimer’s Disease by

Preserving Mitochondrial Function in APP/PS1 Mice and Neurons. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2016: 1–19

150. Zhao M-H, Kim N-H, Cui X-S (2016) GlutaMAX prolongs the shelf life of the culture medium for porcine parthenotes. Theriogenology 85(3): 368–375

151. Zhao W (2001) The vasorelaxant effect of H2S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. The EMBO Journal 20(21): 6008–6016

152. Zhao W, Wang R (2002) H(2)S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. Am J Physiol Heart Circ Physiol 283(2): H474-80

7. Danksagung

In der online auf OPARU veröffentlichten Version ist die Danksagung nicht enthalten.

8. Lebenslauf

Die auf OPARU online veröffentlichte Version enthält an dieser Stelle keine weiterführenden Informationen zum Lebenslauf. Auf Anfrage können ausführliche Informationen zugesendet werden.