Aus der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg / Saar Direktor: Prof. Dr. med. R. Larsen

# Einfluss des Ca<sup>2+</sup>-Signalsystems auf die Stressgenexpression von Hämoxygenase-1/Hitzeschockprotein 32 und Hitzeschockprotein 70 im oxidativen Stressmodell in isolierten Ratten-Hepatozyten

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2006

vorgelegt von:

Julia Nolting geb. am: 03. Juli 1976 in Bünde Meinen Eltern Angela und Friedrich

## Inhaltsverzeichnis

				Seite			
1.	Zusammenfassung, Summary						
	1.1	1 Zusammenfassung					
	1.2	1.2 Summary					
2.	Einle	eitung					
3.	Material und Methodik						
	3.1	Chemikalien					
	3.2	Versuchsvorbereitung					
		3.2.1	Kollagenbeschichtung von Petrischalen	32			
		3.2.2	Zellisolierung	32			
	3.3	Versu	Versuchsablauf				
	3.4	Versuchsgruppen					
		3.4.1	Glutathiondepletion durch Phorone und BSO	35			
		3.4.2	Inkubation mit Thapsigargin	36			
		3.4.3	Inkubation mit Ionophor A23187	36			
		3.4.4	Inkubation mit EDTA	37			
		3.4.5	Inkubation mit BAPTA-AM	38			
		3.4.6	Inkubation mit Diltiazem	39			
		3.4.7	Inkubation mit Verapamil	39			
		3.4.8	DMSO-Kontrollen	40			
	3.5	Ribon	ibonukleinsäure (RNA)- Isolierung und Northern Blot Analyse				
4.	Ergebnisse						
	4.1	Abhängigkeit der Induktion der Hämoxygenase-1 Genexpression vom					
		zellulären Ca <sup>2+</sup> -Signalsystem in Hepatozyten					
		4.1.1	Einfluss des extrazellulären Ca <sup>2+</sup> auf die Phorone/BSO-	42			
			abhängige HO-1 Induktion				
		4.1.2	Einfluss der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Homöostase auf die	44			
			Phorone/BSO-abhängige HO-1 Genexpression				
			4.1.2.1 Modulation der zytosolischen Ca <sup>2+</sup> -Homöostase	44			

durch BAPTA-AM

			4.1.2.2	Modulation der zytosolischen Ca <sup>2+</sup> -Homöostase durch Thansigargin	45			
			4.1.2.3	Kombination von BAPTA-AM und Thapsigargin	46			
			4.1.2.4	Modulation der zytosolischen Ca <sup>2+</sup> -Homöostase durch	47			
				Ca <sup>2+</sup> -Ionophor A23187				
		4.1.3	Einfluss	s der Kalziumkanalblockade mit Diltiazem und	48			
			Verapamil auf die Phorone/BSO-abhängige HO-1 Induktion					
	4.2	2 Abhängigkeit der Induktion der Hitzeschockprotein-70 Genexpression						
		vom zellulären Ca <sup>2+</sup> -Signalsystem in Hepatozyten						
		4.2.1	Einfluss	s von intra- und extrazellulärer Ca <sup>2+</sup> -Depletion durch	49			
			EDTA oder BAPTA-AM auf die Phorone/BSO-abhängige					
			hsp70 Induktion					
		4.2.2	Einfluss des intrazellulären Ca <sup>2+</sup> auf die Phorone/BSO-					
			abhängi	abhängige hsp70 Induktion				
			4.2.2.1	Modulation der zytosolischen Ca <sup>2+</sup> -Homöostase durch	51			
				Thapsigargin				
			4.2.2.2	Modulation der zytosolischen Ca <sup>2+</sup> -Homöostase durch	52			
				Ionophor A23187				
		4.2.3	Einfluss	s der Kalziumkanalblockade mit Diltiazem und	53			
			Verapar	nil auf die Phorone/BSO-abhängige hsp70 Induktion				
5.	Diskussion							
	5.1 Oxidativer Stress							
	5.2 Hämoxygenase-1							
	5.3 Hitzeschockprotein-70							
6.	Literaturverzeichnis							
7.	Danksagung							
8.	Lebenslauf							
9.	Anhang: Abkürzungen							

## 1. Zusammenfassung, Summary

## 1.1 Zusammenfassung

Hitzeschockproteine (hsp) wie Hämoxygenase-1/hsp32 und hsp70 werden in Säugetierzellen durch eine Vielzahl pathophysiologischer Stressereignisse (Hitzeschock, Schwermetalle, Infektion, Entzündung, etc.) induziert und spielen eine wichtige Rolle in der Zellprotektion *in vitro* und *in vivo*. Auch wenn die genauen zellulären Mechanismen der Induktion dieser Hitzeschockproteine noch nicht vollständig charakterisiert sind, kann die Expression dieser Gene durch Modulation der intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen wie intrazellulärer pH, cAMP, Na<sup>+</sup>, Inositoltriphosphat, Proteinkinase C und Proteinphosphatasen induziert werden. Die freie zytosolische Kalziumkonzentration ([Ca<sup>2+</sup>]), ein bekannter potenter Regulator der Genexpression, scheint eine signifikante Rolle in der Induktion der hsp Genexpression zu spielen. Die genauen Regulationsmechanismen der Stressgenexpression in Abhängigkeit von der zytosolische Unterschiede aufzuweisen.

Die funktionelle Bedeutung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Signalsystems für die Aktivierung von hsp in Leberparenchymzellen ist bislang nicht untersucht. In *in vivo* Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass HO-1 und hsp70 in Ratten-Hepatozyten nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie induziert werden. Für die HO-1 Genexpression konnte eine Abhängigkeit von der Sauerstoffradikal-induzierten Aktivator-Protein-1 (AP-1)-Aktivierung gezeigt werden. Im gleichen tierexperimentellen Modell wurde eine Störung der hepatozellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase beobachtet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Stressgenexpression am Beispiel von HO-1 und hsp70 und der zellulären Ca<sup>2+</sup>-Regulation *in vitro* an isolierten Ratten-Hepatozyten zu untersuchen.

Zur systematischen Klärung dieser Fragestellung wurden Versuche an isolierten, kultivierten Hepatozyten von männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Als oxidatives wurde eine Glutathiondepletion mittels Phorone-Buthioninsulfoximin Stressmodell (Phorone/BSO) verwandt. Die Depletion der intra- und extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration Ca<sup>2+</sup>-Chelatoren mit den erfolgte durch Vorinkubation der Hepatozyten Ca<sup>2+</sup>-Depletion) Ethylendiamintetraessigsäure (extrazelluläre (EDTA) und

5

1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethan-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetra (acetoxymethyl) (BAPTA-AM) ester (zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Depletion). Der Effekt der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Homöostase auf die Genexpression wurde durch Verwendung des Ca<sup>2+</sup>-Ionophors A23187 sowie mittels einer Depletion der Ca<sup>2+</sup>-Speicher des endoplasmatischen Retikulums (ER) durch Thapsigargin, jeweils mit und ohne zvtosolische Ca<sup>2+</sup>-Chelatierung durch BAPTA-AM untersucht. Um die Rolle des Einstroms Kalziumionen aus dem von Extrazellulärraum via "receptor-operated calcium channels" (ROCC) zu erfassen, wurden die Zellen mit den Kalziumkanal-Blockern Diltiazem und Verapamil, mit und ohne Glutathiondepletion, inkubiert. Jeweils 6 Stunden nach Versuchsbeginn wurde die mRNA der Hepatozyten isoliert. Die semiquantitative Analyse der HO-1 und hsp70 Genexpression erfolgte mittels Northern-Blot Analyse.

Oxidativer Stress durch Glutathiondepletion führte zu einer deutlichen Expression *beider* Gene, welche nach Vorinkubation mit dem zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Chelator BAPTA-AM vollständig supprimiert wurde. Während eine extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Chelatierung durch EDTA ebenfalls zur Inhibition der hsp70 Expression nach oxidativem Stress führte, hatte diese auf die HO-1 Expression keinen inhibierenden Einfluss.

Durch Thapsigargin allein, einem Hemmer der endoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-ATPase, konnte eine dosisabhängige HO-1 Expression induziert werden, welche nach Vorinkubation mit BAPTA-AM vollständig supprimiert wurde. In Kombination mit Phorone/BSO zeigte sich eine überadditive Induktion der Genexpression. Eine hsp70 Expression nach Thapsigargin wurde nicht beobachtet.

Die Inkubation mit Ionophor A23187, welches die Plasmamembran permeabilisiert und so einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem Extrazellulärraum zur Folge hat, führte zu einer geringen HO-1 (2fach) sowie zeit- und dosisabhängigen hsp70 (5,2fach) mRNA Expression.

Nach Blockade der ROCC mit Verapamil und Diltiazem wurde eine geringe, nach simultaner Glutathiondepletion eine potenzierte HO-1 Genexpression beobachtet (Anstieg um 46-55% durch Diltiazem, 29-68% durch Verapamil) im Vergleich zur mRNA Expression nach Glutathiondepletion allein. Im Gegensatz dazu hatten beide Kalziumkanalblocker keinen Einfluss auf die Induktion der hsp70 Genexpression mit und ohne oxidativen Stress.

Die Ergebnisse legen eine unterschiedliche Regulation der beiden Stressgene in isolierten Hepatozyten in Abhängigkeit von der zellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase nahe. Die Phorone/BSOinduzierte Expression *beider* Gene scheint dabei abhängig von einem, durch den zytosolisch wirksamen Ca<sup>2+</sup>-Chelator BAPTA-AM supprimierbaren, Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zu sein. Dabei scheint die Quelle der Ca<sup>2+</sup>-Ionen, die zu diesem Konzentrationsanstieg führen, eine bedeutende Rolle zu spielen. Während der Ca<sup>2+</sup>-Fluss aus intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-speichernden Kompartimenten ein Hauptmechanismus für die Induktion der HO-1 Genexpression nach oxidativem Stress zu sein scheint, spielt im Gegensatz dazu der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem Extrazellulärraum offensichtlich eine signifikante Rolle in der Induktion der hsp70 Genexpression. Durch welche zytosolischen und nukleären Mechanismen der Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration die Expression der beiden Stressgene in isolierten Hepatozyten vermittelt und welche weiteren Aktivierungsprozesse möglicherweise involviert sind, bleibt zu untersuchen.

#### 1.2 Summary

Heat shock proteins (hsp) are induced in mammalian cells under a variety of pathophysiological conditions (e.g. heat shock, heavy metalls, infection) and play an important role in cellular protection *in vitro* and *in vivo*. Although the exact mechanisms how hsp confer protection are not clearly understood, their gene expression can be modulated by cell signal transducers, such as changes in intracellular pH, cyclic AMP, Na<sup>+</sup>, inositol triphosphate, protein kinase C, and protein phosphatases. Free intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) is known to be a potent regulator of gene expression and appears to play a significant role in the induction of hsp gene expression, although the pathways leading to induction of a certain hsp seem to be cell type specific. The mechanisms of regulation of stress gene expression by changes in  $[Ca^{2+}]_i$  are not fully understood.

At present, no data are available assessing the role of the intracellular  $Ca^{2+}$  messenger system in the activation of hsp in liver parenchymal cells. Previous studies could demonstrate an induction of hsp32/ HO-1 and hsp70 in hepatocytes in a rat model of hemorrhagic shock and resuscitation. It was further demonstrated that induction of HO-1 is mediated by oxygen free radical dependent activation of the transcription factor activator protein-1 (AP-1). In the same animal model a substantial disturbance of hepatocellular  $Ca^{2+}$  regulation was observed.

The present study investigated the role of calcium signaling in the induction of two important stress response genes, heme oxygenase-1 (HO-1)/hsp32 and hsp70, in isolated rat hepatocytes in a model of oxidative stress.

Therefore, in the present study we used an *in vitro* oxidative stress model with cellular glutathione depletion by incubating the cells with a combination of phorone (2,6 dimethyl-2,5 heptadien-4-on) and buthionine sulfoxime (BSO). Extracellular and

cytosolic  $[Ca^{2+}]$  of isolated hepatocytes from male Sprague-Dawley rats were depleted by preincubation of the hepatocytes with the Ca<sup>2+</sup> chelators ethylene-diamine-tetraacetic-acid (EDTA) and 1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethane-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetra (acetoxymethyl)esther (BAPTA-AM), respectively. Furthermore, we studied the effect of cellular Ca<sup>2+</sup>-homeostasis on hsp gene expression by using the calcium ionophor A23187 and an experimental depletion of ER calcium stores by thapsigargin, with and without depletion of the cytoplasmic Ca<sup>2+</sup>- pool by BAPTA-AM. To further investigate the influx of calcium ions from extracellular via "receptor-operated calcium channels" (ROCC) cells were incubated with the calcium channel blockers verapamil and diltiazem with and without glutathione depletion.

6 hours after begin of each experiment RNA was extracted from hepatocytes. Northern blot analysis was performed using a radiolabeled hsp32/ HO-1 and hsp70 cDNA probe. Both genes were induced following oxidative stress by cellular glutathione depletion. This induction could be prevented by preloading the cells with the cytoplasmic Ca<sup>2+</sup>-chelator BAPTA-AM. Culturing of hepatocytes in calcium-free medium prevented induction of hsp70 gene expression after glutathione depletion without affecting HO-1 gene expression. Thapsigargin (Tg), an inhibitor of the endoplasmic Ca<sup>2+</sup>-ATP-ase, increased hsp32/HO-1 but not hsp70 gene expression. Tg-induced hsp32/ HO-1 induction was completely inhibited by preloading the cells with BAPTA-AM. Incubation with the Ca<sup>2+</sup>-ionophor A23187, that permeabilizes the plasma membrane and induces a leakage of  $Ca^{2+}$  with a subsequent increase of the cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration, augmented hsp32/ HO-1 (two fold) and hsp70 (5.2 fold) transcript steady state concentrations. Inhibiting receptor-operated calcium channels (ROCC) by verapamil and diltiazem led only to a slight induction of hsp32/HO-1, whereas a simultaneous glutathione depletion resulted in a potentiated gene expression (increase of 46-55% by diltiazem, 29-68% by verapamil) compared to glutathione depletion alone. In contrast both calcium channel blockers did not influence hsp 70 gene expression under normal conditions and after oxidative stress. In summary, we could identify different Ca<sup>2+</sup> dependent signaling mechanisms in the induction of the two stress genes hsp32/ HO-1 and hsp70 in isolated rat hepatocytes. An increase in cytoplasmic calcium activity seems to play a key role in the signaling cascade leading to induction of both genes. However, the source of the calcium ions which flux into the cytoplasm are different. Our data provide evidence, that for induction of hsp32/ HO-1 gene expression Ca2+ flux from intracellular stores (e.g. endoplasmic reticulum) and for hsp70 gene expression  $Ca^{2+}$  flux from the extracellular medium seems to be a main mechanism in a complex cascade of cellular signaling events.

## <u>2. Einleitung</u>

Nach Trauma, Verbrennungen, Sepsis oder Schock haben die Patienten durch rasche Primärstabilisierung der Kreislauffunktion zunächst eine gute Überlebenschance. Während der weiteren intensivmedizinischen Betreuung folgt jedoch einem solchen Stressereignis oft das Versagen einzelner oder mehrerer primär nicht geschädigter Organe im Sinne eines Multiorganversagens. Dieses schockassoziierte Organversagen ist derzeit noch immer die häufigste Ursache für die hohe Spätletalität polytraumatisierter Patienten. Die Pathogenese dieses Syndroms ist bisher nicht vollständig geklärt. Ursächlich wird eine komplexe Kombination von Mikrozirkulationsstörung, Ischämie-Reperfusionssyndrom und Dysregulation der Immunantwort diskutiert (Cryer et al., 1999). In retrospektiven Studien wurde festgestellt, dass sich in der Mehrheit der Fälle das Multiorganversagen bereits in den ersten 24 Stunden nach dem Trauma entwickelt (Cryer et al., 1999; Waydhas et al., 1992). Betrachtet man das Versagen der Organe im Einzelnen, so konnte gezeigt werden, dass das Leberversagen die höchste Letalität aufweist (64%). Noch vor einigen Jahren stand das akute Nierenversagen (Inzidenz 67%, Letaliät 60%) sowie das posttraumatische Lungenversagen, das sog. "Adult respiratory distress syndrome" (ARDS) (Inzidenz 100%, Letalität 55%), im Vordergrund (Faist et al., 1983). Durch verbesserte Volumensubstitution, Dialyse und Hämofiltrationsverfahren sowie neue Erkenntnisse in der Beatmungstherapie konnte die posttraumatische Spätletalität erheblich gesenkt und die Überlebenszeit von durchschnittlich 7,5 auf 16,8 Tage verlängert werden. Mit der Überwindung dieser posttraumatischen Komplikationen wurde jedoch zunehmend eine Beeinträchtigung der Leberfunktion im Spätverlauf beobachtet (Seekamp et al., 1991). Aufgrund der hier nach wie vor weitgehend fehlenden klinisch etablierten therapeutischen Möglichkeiten zum Ersatz der vielfältigen Leberfunktionen überrascht die hohe Letalität des Leberversagens nicht.

Einen hämorrhagischen Schock erleiden nicht nur traumatisierte Patienten. Bei Operationen wie der eines rupturierten Bauchaortenaneurysmas oder aber auch bei der täglichen chirurgischen Versorgung von Patienten treten immer wieder schwerwiegende intraoperative Blutungskomplikationen auf. Nach primär erfolgreicher Kreislaufstabilisierung entwickeln diese Patienten häufig eine systemische Entzündungsreaktion ("Systemic Inflammatory Response Syndrome", SIRS), die dann, wie bereits beschrieben, in eine Organdysfunktion bis hin zum Organversagen führen kann. Eine klinisch evidente Prophylaxe dieses

Organversagens durch eine spezifische Beeinflussung der inflammatorischen Reaktion in der Frühphase nach einem solchen Ereignis ist derzeit noch nicht etabliert (Baue et al., 1998). Der Schock als prädisponierender Faktor für ein späteres Organversagen ist per definitionem ein Zirkulationsversagen mit einem Missverhältnis von Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf an die Zellen der verschiedenen Gewebe (Larsen, 1999; Marzi, 1996). Der empfindlichste Gefäßabschnitt ist dabei das Kapillarbett, in dem Substratzufuhr und Abtransport der Metabolite zu und von den Zellen stattfindet. Im Schockzustand kommt es zu einer Verlangsamung des Blutflusses bis hin zum vollständigen Stillstand der Blutzufuhr im Endstromgebiet. Nach therapeutischer Volumentherapie erfolgt zunächst eine Wiederherstellung der Makrohämodynamik, wobei die Mikrozirkulationsstörung persistiert. Trotz Normalisierung der systemhämodynamischen Parameter konnte in Organen wie der Muskulatur, aber eben auch der Leber eine Perfusionsheterogenität in der Mikrostrombahn mit Koexistenz von minder- und normalperfundierten Arealen oder sogar hyperämischen Arealen gezeigt werden (Bauer et al., 1995; Clemens et al., 1985; Vollmar et al., 1994). Diesen nach Ischämie und Reperfusion verbleibenden regionalen Perfusionsunterschieden wird eine herausragende Bedeutung in der Entwicklung eines Organversagens beigemessen. Es konnte gezeigt werden, dass das Versagen der Mikrozirkulation in der Leber ein determinierender Faktor in der Entwicklung des Leberzellschadens bis zum Zelltod ist. Der Verlust des sinusoidalen Blutflusses korrelierte hierbei in hohem Maße mit dem Verlust der Vitalität der Hepatozyten (Chun et al., 1994). Drugas veranschaulichte diese Perfusionsheterogenität in Form von Häufigkeitsverteilungen (Abb.1). In einem Ischämie-Reperfusionsmodell an Rattenlebern wurde den Tieren am Ende der Reperfusion Fluorescein-Isothiozyanat injiziert und an mehreren Leberschnitten intravitalmikroskopisch die Anzahl der perfundierten Sinusoide pro Untersuchungsfeld bestimmt. Diese wurden gegen die Häufigkeit der Beobachtungen in einem Diagramm aufgetragen und ergaben eine unimodale Gaußsche Verteilungskurve. Versuchsgruppen mit Ischämie/Reperfusion wiesen eine deutliche Linksverschiebung der Kurve gegenüber den scheinoperierten Kontrollgruppen auf (Drugas et al., 1991).



Abb.1:Effekt von Ischämie/Reperfusion auf die Anzahl der perfundierten Sinusoide i.V. zur<br/>Kontrollgruppe. (Drugas et al., 1991)Sham:scheinoperierte Kontrollgruppe

- Abszisse: Anzahl der perfundierten Sinusoide/Untersuchungsfeld
- Ordinate: Anzahl der Beobachtungen

Die Ursachen und verantwortlichen Mechanismen persistierenden dieser Mikrozirkulationsstörung bei normalisierter Makrohämodynamik sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Veränderung des Gefäßstatus wird dabei als Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels von stressinduzierten vaskulären Mediatoren wie Endothelin, Stickstoffmonoxidsynthetase (NOS), Hämoxygenase (HO), der Bildung freier Sauerstoffradikale ("Oxygen Free Radicals", OFR) und einer Veränderung der Rezeptorenexpression angesehen (Clemens et al., 1997). Solange die Balance zwischen antagonistisch wirkenden Vasokonstriktoren und -dilatatoren aufrechterhalten wird, hat dies einen protektiven Effekt auf die Organperfusion. Eine lokale Imbalance resultiert in einer fokalen Ischämie mit nachfolgendem Zell- und Organschaden. Die hepatische mikrovaskuläre Reaktion nach Ischämie und Reperfusion kann möglicherweise als Paradigma bei der Betrachtung der Veränderungen des Gesamtorganismus nach hämorrhagischem Schock dienen (Bauer et al., 1996; Clemens et al., 1997).

Aus klinischer Sicht ist die Volumentherapie mit Reperfusion der im Schock ischämischen Gewebe obligat. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass gerade diese notwendige Reperfusion eines zuvor ischämischen Organs zu einer Aggravierung des Gewebeschadens führt. Erste für diesen Sachverhalt lieferten Granger et al. 1986 anhand Daten eines Ischämie/Reperfusionsmodells am Katzendarm. Bei Betrachtung der intestinalen vaskulären Permeabilität zeigte sich eine signifikante Exazerbation der Darmwandschädigung während der Reperfusion nach einer begrenzten Zeit der Ischämie, welche selbst nur eine moderate Permeabilitätsteigerung verursachte. Aufgrund der klinisch und morphologisch unmöglichen Abgrenzbarkeit zwischen ischämischen und reperfusionsbedingten Gewebeschäden wurde der Begriff des Ischämie-Reperfusionssyndroms (I/R-Syndrom) geprägt (Granger et al., 1986; Parks et al., 1983). Dabei handelt es sich um eine Subsummierung pathophysiologischer Vorgänge, die bei einer Vielzahl täglicher klinischer Ereignisse wie beim Myokardinfarkt, Apoplex, hämorrhagischen Schock oder bei Transplantationen ablaufen. Verschiedene Mechanismen werden als Ursache für eine zelluläre Dysfunktion nach I/R-Ereignissen angesehen.

Die Arbeitsgruppe um Granger zeigte in experimentellen Untersuchungen, dass die Bildung freier Sauerstoffradikale möglicherweise eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Parenchymschädigung nach I/R-Ereignissen spielt. Sie entwickelten ein Schema, das den pathophysiologischen Mechanismus unter Wirkung freier Sauerstoffradikale im I/R-Syndrom darstellt (Abb.2). Dieses Schema, basierend auf vielen experimentellen Untersuchungen, hat inzwischen weitgehende Akzeptanz gefunden und wird herangezogen, um I/R-Schäden in einer Vielzahl von Organen, wie z.B. der Leber, zu erklären (Granger et al., 1986).



Abb.2: Mechanismen der Sauerstoffradikalproduktion während der Reperfusion im ischämischen Dünndarm. (Granger et al., 1986)

In der ischämischen Periode wird das energiereiche Adenosintriphosphat (ATP) zu Hypoxanthin katabolisiert, welches sich im Gewebe anreichert. Aufgrund des Energieverlustes der Zelle kommt es zum Kalziumeinstrom, welcher über eine Aktivierung der Protease Calpain die Sauerstoffradikal-produzierende Xanthinoxidase (XO) aus der NAD<sup>+</sup>-reduzierenden Xanthindehydrogenase (XD) konvertiert. In der Reperfusionsphase gelangt molekularer Sauerstoff in das Gewebe und reagiert unter Katalyse der Xanthinoxidase mit Hypoxanthin zu Superoxidradikalen und Wasserstoffperoxid. Aus diesen Produkten entsteht über die eisenabhängige Fenton- bzw. Haber-Weiß-Reaktion das hochreaktive und zytotoxische Hydroxylradikal (OH<sup>+</sup>) (Halliwell et al., 1984). Der am besten untersuchte Mechanismus der radikal-vermittelten Gewebeschädigung ist die Lipidperoxidation von Zellmembranen (Haglund et al., 1991). Dabei kommt es zu einer Strukturänderung der Phospholipiddoppelschicht mit einer verminderten Viskosität der Zellmembran, einem Effekt, der profunde Auswirkungen auf Zellfunktionen wie Verformbarkeit, Rezeptorexpression, etc. hat. Eine Degradation von Hyaluronsäure und Kollagen, beides Bestandteile von Basalmembranen, durch Hydroxylradikale wurde bereits 1978 beschrieben (Fridovich, 1978). Die Inaktivierung des von Gefäßendothelzellen freigesetzten "endothelium derived relaxing factor" (EDRF) durch Superoxidradikale führt über Mikrozirkulationsstörungen zu einer fokalen Ischämie des Parenchyms (Gryglewski et al., 1986; Rubanyi et al., 1986). Die Hauptursache für Zelldysfunktionen wird jedoch nicht mehr nur in der direkten morphologischen Schädigung gesehen. Vielmehr scheinen OFR eine Signalfunktion auszuüben und darüber Entzündungsreaktionen zu initiieren sowie die Expression bestimmter Gene (Stressgene) zu aktivieren. Über welchen Mechanismus OFR diese Eigenschaften entfalten, ist noch nicht vollständig geklärt. Im Organismus existieren viele Quellen für OFR, im Kontext mit I/R werden jedoch besonders dem Xanthinoxidase-System des Endothels und dem NADPH-Oxidase-System der Leukozyten eine wichtige Rolle zugesprochen. Die dabei entstehenden Superoxidanione und Wasserstoffperoxide reagieren über die metall-katalysierte Fenton-Reaktion zum hochtoxischen Hydroxylradikal. Einen solchen Katalysator stellt das Eisen dar. Durch Gabe des spezifischen Fe<sup>3+</sup>-Chelators Desferoxamin vor Beginn der Reperfusion beobachteten Drugas et al. 1991 im I/R-Modell an Rattenlebern eine deutliche Zunahme der perfundierten Untersuchungsfeld, was sich in einer Rechtsverschiebung Sinusoide pro der Frequenzverteilungskurve auf nahezu Kontrollniveau zeigte. Ebenso konnte eine Reduktion des hepatozellulären Schadens festgestellt werden, so dass die Hypothese aufgestellt wurde, dass das mikrovaskuläre Versagen mit resultierendem Zelltod zumindest teilweise durch Fe<sup>3+</sup>-abhängige Mechanismen während der Reperfusion entsteht. Durch Aufrechterhalten der Mikrozirkulation kann mit Desferoxamin der Parenchymdefekt vermindert werden, indem die Komponente inhibiert wird, die zur Fe<sup>3+</sup>- bzw. Hydroxylradikalvermittelten Lipidperoxidation führt (Drugas et al., 1991).

Auch aktuellere Studien (Rensing et al., 1999) belegen eine signifikante Rolle von OFR als Vermittler des hepatozellulären Schadens nach I/R-Ereignissen. Sauerstoffradikale entstehen in geringen Mengen auch im normalen Zellmetabolismus. Daher sind suffiziente endogene antioxidative Verteidigungssysteme Grundvoraussetzung des endogenen Schutzes der Zellen. Zu den enzymatischen Verteidigungssystemen gehört die Superoxiddismutase (SOD). Dieses Enzym befindet sich überwiegend im Intrazellulärraum, wo sie das Superoxidanion zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff dismutiert und so die intrazelluläre O<sub>2</sub>- Konzentration niedrig hält (Haglund et al., 1991). Besonders hohe Konzentrationen des Enzyms sind in Erythrozyten und Hepatozyten zu finden (Winterbourn, 1985). Das anfallende Wasserstoffperoxid wird durch Katalase oder Glutathionperoxidase zu Wasser und Sauerstoff detoxifiziert. Katalase findet sich in den Peroxisomen und metabolisiert ausschließlich H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Glutathionperoxidase wohingegen die auch organische Hydroperoxide (z.B. Lipidhydroperoxid) entgiftet. Bei dieser Reaktion entsteht aus zwei Molekülen Glutathion (GSH) die oxidierte Form Glutathiondisulfid (GSSG), die durch Reaktion der Glutathionreduktase unter Verbrauch von NAD(P)H wieder in GSH überführt werden kann (Jones et al., 1981).

Unter pathophysiologischen Bedingungen, wie zum Beispiel im I/R-Syndrom, reicht die Kapazität der endogenen Mechanismen zur Entgiftung freier Sauerstoffradikale nicht aus. Durch den massiven Anfall von OFR in der frühen Reperfusionsphase kommt es zum zellulären Verbrauch von GSH. Die Reaktion der Glutathionreduktase ist jedoch aufgrund des zellulären Mangels an Energieträgern (z.B. ATP) deutlich vermindert. In der Folge führen die Radikale über bereits genannte Mechanismen zur zellulären Dysfunktion und im Makroorganismus schließlich bis hin zum irreversiblen Organversagen. Jennische beobachtete am I/R-Modell von Lebern, dass ein Mangel an Glutathion, pharmakologisch oder diätetisch induziert, in einem weitaus intensiveren hepatozellulären Schaden nach I/R mündet als in Lebern mit normalem GSH-Gehalt (Jennische, 1984). Marubayashi et al. infundierten Ratten exogenes Glutathion vor Beginn der Ischämiephase. Es zeigte sich eine gesteigerte Resynthese von ATP sowie eine deutlich verminderte Bildung von Lipidperoxiden nach Reperfusion (Marubayashi et al., 1985). Daraus wird deutlich, dass dem Glutathionsystem eine herausragende Rolle in der Entgiftung freier Sauerstoffradikale im I/R-Syndrom zukommt.

Die Parenchymschädigung der Leber nach Ischämie-Reperfusionsereignissen beginnt, wenn auch meist noch reversibel, in der ischämischen Periode. Diese Periode ist nicht nur durch ein Versagen der hämodynamischen Kreislauffunktion, sondern auch durch lokale gefäßregulatorische Störungen im Bereich der Mikrozirkulation gekennzeichnet. So richtet sich in letzter Zeit die wissenschaftliche Aufmerksamkeit auf das Phänomen der aktiven Konstriktion der Sinusoide als Mechanismus zur Perfusionsregulation in der Leber. Die Sinusoide können sich reversibel durch Mediatoren wie zum Beispiel Endotheline verengen. Goto et al. untersuchten die Rolle von Endothelin-1 (ET-1), einem hochpotenten

Vasokonstriktor, in der Mikrozirkulationsstörung nach einem I/R-Ereignis der Leber. Die ET-1-Konzentration stieg sofort nach Beginn der Reperfusion auf das 5-6fache an und blieb während der gesamten Reperfusionsdauer konstant auf dem hohen Niveau. Die Oxygenierung sowie der Blutfluss im regionalen Lebergewebe waren hierbei, trotz guter Systemhämodynamik, deutlich vermindert (Goto et al., 1994). In weiteren experimentellen Untersuchungen zeigten sich neben der sinusoidalen Konstriktion auf ET-1-Gabe auch Veränderungen des präsinusoidalen Widerstandes. Die maximale Abnahme des sinusoidalen Durchmessers in der periportalen Region wurde mit niedrigeren Konzentrationen als in der perizentralen Ausflussregion erreicht, weshalb auf eine Clearance durch Bindung oder Abbau im Blutfluss im Verlauf der Lebersinusoide geschlossen wurde. Im Gegensatz zur Infusion in die Portalvene konnte bei systemischer Applikation des Vasokonstriktors kein bleibender Effekt auf die Mikrozirkulation hepatische nachgewiesen werden (Bauer et al., 1994 a, 1994 b). Das Ausmaß der lokalen Vasokonstriktion wird moduliert durch die Wirkung endogener Vasodilatatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenmonoxid (CO), welche unter anderem in den sinusoidalen Randzellen gebildet werden. Die Lebersinusoide nehmen somit eine wichtige lokale Rolle in der Regulation der Leberperfusion ein (Clemens et al., 1999). Ein Missverhältnis in der stressinduzierten Expression von Vasokonstriktoren und -dilatatoren führt somit zu einer lokalen Perfusionsheterogenität, welche zur Entwicklung fokaler Ischämien und daraus folgender Progression eines Leberschadens beitragen kann. Die Rolle der Vasodilatatoren NO und CO in der intrinsischen Kontrolle der sinusoidalen Perfusion wurde 1998 von Pannen et al. an isolierten Rattenlebern untersucht. Während CO zu einer gesteigerten Perfusion führte, konnte bei NO kein Effekt auf die Lebersinusoide nachgewiesen werden. Da das endogen gebildete Kohlenmonoxid die sinusoidale Perfusion nach hämorrhagischem Schock aufrechterhielt, sahen Pannen et al. hierin einen Mechanismus, ein schockinduziertes Leberversagen möglicherweise zu begrenzen (Pannen et al., 1998).

Die Wirkung von NO wird über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase gesteuert. Über einen Anstieg des zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) wird die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung gehemmt, was eine Muskelrelaxation zur Folge hat. Unter physiologischen Bedingungen wird das NO durch Aktivität der konstitutiven Isoformen der NO-Synthetase (NOS-I und NOS-III) freigesetzt. Stressereignisse wie z.B. Endotoxinschock führen zur Expression der induzierbaren Isoform NOS-II in der Leber und Produktion großer Mengen des NO (Billiar et al., 1990; Geller et al., 1994; Rensing et al., 1999). Es existieren Hinweise für zytotoxische (Szabo, 1996) und zytoprotektive Effekte der NOS-II wie z.B. der Erhalt der Leberperfusion in Modellen der Leberinflammation (Nishida et al., 1994; Wang et al., 1995). Obwohl die gefäßdilatierende Wirkung von NO in diesen Modellen unumstritten ist, wird die Rolle als Modulator von Gewebeschäden nach Ischämie/Reperfusion kontrovers diskutiert.

Auch die vasodilatatorische Wirkung von CO erfolgt über eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (Brüne et al., 1990). Die dominierende endogene Quelle des CO ist die Hämoxygenase. Die Hämoxygenase liegt in 3 Isoformen vor, von denen die Hämoxygenase-1 (HO-1), auch als Hitzeschockprotein 32 (hsp32) bekannt, durch oxidativen Stress und auch hämorrhagischen Schock/Volumentherapie induzierbar ist (Bauer et al., 1996; Bauer et al., 1998). Die Hämoxygenase, ein mikrosomales Enzym, katalysiert den Katabolismus von Häm zu äquimolaren Mengen von Bilirubin (einem potenten Antioxidans), Eisen und Kohlenmonoxid (einem potenten Vasodilatator) (Abb.3).



#### Abb.3: Hämoxygenasestoffwechsel.

Die Hämoxygenase katalysiert die sauerstoff- und NADPH-abhängige Spaltung des Hämmoleküls unter Bildung von Biliverdin, das weiter zu Bilirubin reduziert wird. (Tenhunen et al., 1968)

In Geweben wie der Milz und der Leber, die an der Elimination zerstörter roter Blutzellen und Hämoglobin aus der Blutzirkulation beteiligt sind, sind große Mengen dieses Enzyms zu finden (Maines, 1988). Während die physiologische Exposition zu Hämoglobin zu keiner Genexpression der Isoform HO-1 führt, induzieren verschiedene Stressmodelle differenzierte zelltypspezifische und sublobuläre HO-1-Expressionsmuster (Bauer et al., 1998). So wird z.B. nach Endotoxinschock die HO-1 vermehrt in sinusoidalen Randzellen exprimiert, während nach hämorrhagischem Schock/Volumentherapie oder Glutathiondepletion die HO-1 in perizentralen Hepatozyten induziert wird. Letzteres spiegelt möglicherweise die azinusnahe Wirkung der OFR wieder. Während die höchsten Glutathionspiegel in periportalen Arealen zu finden sind, werden die Sauerstoffradikale hauptsächlich in der perizentralen Zone gebildet. Der perizentrale Verlust antioxidativer Verteidigungsmechanismen nach Glutathiondepletion und der frühe Anstieg der OFR in dieser Zone während Reperfusion sind möglicherweise ein Triggerfaktor für die perizentrale HO-1 Expression. Obwohl die funktionelle Bedeutung der HO-1 nach Stressereignissen (hämorrhagischer und septischer Schock, Trauma, Verbrennung, etc.) nicht vollständig geklärt ist, scheint zumindest die Induktion von HO-1 in der Leber nach hämorrhagischem Schock einen protektiven Effekt zu entfalten. So konnte an der Ratte gezeigt werden, dass eine Blockade von HO-1 nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie eine Verschlechterung der portalen Perfusion sowie eine Aggravierung des Leberzellschadens durch reaktive Sauerstoffspezies nach sich zieht (Rensing et al., 1999). Des Weiteren konnte durch die einmalige Zufuhr des unspezifischen zellgängigen Antioxidans Trolox eine signifikante Reduktion der HO-1 Induktion und der Leberzellschädigung erzielt werden. Interessanterweise war dieser Effekt nur in den Parenchymzellen nachweisbar, auf die HO-1 Induktion in nichtparenchymatösen Zellen (Endothelzellen, Kupfferzellen) hatte Trolox keinen Einfluss, so dass in diesen Zelltypen die Induktion anderweitig erfolgen muss. Nath et al. lieferten 1992 Hinweise durch in vivo Versuche, welche die protektive Rolle der HO-1 gegen OFR-vermittelte Rhabdomyolyse mit nachfolgendem Nierenversagen untermauerten (Nath et al., 1992).

Neben oxidativem Stress kann auch die, den "heat shock proteins" namengebende Hyperthermie zu einer starken Induktion der HO-1/hsp32 Genexpression führen, möglicherweise über eine Aktivierung des Hitzeschockfaktors (Shibahara et al., 1987). Obwohl I/R ein bekannter starker Induktor der Hitzeschockantwort ist (Schoeniger et al., 1992) und neben der HO-1 auch andere Hitzeschockproteine wie z. B. das hsp70 verstärkt exprimiert werden, scheint die Induktion der HO-1 Expression in diesem

18

Modell doch komplexer zu sein als die klassische Hitzeschockantwort. Nach Vorbehandlung mit Cycloheximid, einem Hemmer der Proteintranslation, beobachteten Bauer et al. eine Reduktion der HO-1 mRNA-Expression um 65% nach I/R, während kein Effekt auf die Akkumulation der hsp70 mRNA auftrat. Actinomycin D, ein Hemmer der DNA-abhängigen beider verhinderte die RNA-Synthase, mRNA-Expression Hitzeschockproteine (Bauer et al., 1998). Diese Tatsache lässt vermuten, dass die Akkumulation beider Transkripte abhängig ist von einer de novo RNA Synthese. Während für die vollständige HO-1 mRNA Induktion die de novo Synthese eines Proteins, z.B. eines Transkriptionsfaktors, benötigt wird, handelt es sich bei hsp70 um ein typisches "primary response gene" nach I/R. Diese Gene werden per definitionem nach Aktivierung eines latenten Transkriptionsfaktors exprimiert, wie z.B. des Hitzeschockfaktors, ohne eine de novo Proteinsynthese. Ein weiteres Regulationselement des HO-1-Gens ist der redoxsensitive Transkriptionsfaktor AP-1. Zur Bildung dieses aktiven Transkriptionsfaktors wird eine Proteinsynthese benötigt. Da das Glukokortikoid Dexamethason, ein bekannter Inhibitor des AP-1, die HO-1 Genexpression hemmt, wird dem AP-1 eine Regulatorrolle in der durch Schock und Volumentherapie induzierten hepatischen HO-1 Genexpression zugesprochen (Rensing et al., 2001; Yang-Yen et al., 1990).

Von Chu et al. konnte 1997 erstmalig nachgewiesen werden, dass eine dem schädigenden Ereignis vorausgehende Expression der Hitzeschockproteine für deren protektiven Effekt nicht erforderlich ist. Ratten wurden zunächst einem letalen Endotoxinstress und direkt danach einem Hitzeschock ausgesetzt. Damit wurde ein "molekulares Rennen" zwischen zwei verschiedenen Programmen der Genexpression gestartet. Die Akutphase-Antwort, getriggert durch die Endotoxine, aktiviert die Genexpression und Synthese von inflammatorischen Zytokinen (Tumornekrosefaktor-α, Interleukin-1β), wofür unter Normalbedingungen mindestens 1-2 Stunden benötigt werden. Die wesentlich schnellere Hitzeschockantwort erfolgt über eine direkte Transkription der Gene und folgende Translation ohne ein Splicing der mRNA. Es konnte beobachtet werden, dass die Hitzeschockantwort einen deutlich protektiven Effekt auf den sonst letalen Endotoxinstress hatte (Chu et al., 1997). Damit stellt sich nur noch die Frage, wie weit das zeitliche Fenster sein darf, in welchem die Hitzeschockproteine die Zytokinsynthese noch stoppen können. Neu überdacht werden muss daher die möglicherweise protektive Rolle des Fiebers bei Patienten nach Stressexposition. Eine eher skeptische Betrachtung der medizinischen Fiebersenkung einerseits und der potentiellen Konsequenzen der Schaffung eines künstlichen Fiebers andererseits wären die Folge (Buchman, 1997). Über welchen Mechanismus entfalten nun die hsp ihre protektive

Wirkung? Su et al. zeigten an Herzmuskelzellen, dass Zellen mit einem hohen konstitutionellen Gehalt an hsp70 nach Wasserstoffperoxidexposition (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) eine deutlich geringere Lipidperoxidation aufwiesen als Zellen von entsprechenden Kontrollgruppen. Die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte ATP- und GSH-Depletion erfolgte jedoch in beiden Zellgruppen gleichermaßen. Der zelluläre Laktatdehydrogenase (LDH)-Verlust als Zeichen eines irreversiblen Schadens an den Kardiomyozyten war in den hsp70-Zellen vermindert. Ebenso wurde der durch H2O2 induzierte Kalziumioneneinstrom in diesen Zellen nicht beobachtet (Su et al., 1999). Durch welchen Wirkmechanismus das hsp70 seine Lipidprotektion erreicht, ist weiterhin unklar. Eine Modulation von Ca<sup>2+</sup>-Speichern des ER mit Erhalt der Ca<sup>2+</sup>-Homoöostase und daraus folgender Hemmung der mitochondrialen Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme, der Bildung von OFR und der Membranperoxidation wurde z.B. in Bezug auf hsp78 und hsp94 (Schutz der renalen Epithelzellen vor Lipidperoxidation) diskutiert (Liu et al., 1997). Für hsp27 wird ein Anstieg des intrazellulären GSH-Levels vermutet (Mehlen et al., 1996). Hsp70 scheint die Toxizität der OFR im Bereich der Zellmembran abzufangen, da bei zellulärem Stress der membrangebundene Anteil ansteigt (Gudi et al., 1993). Des Weiteren wird eine Hemmung der Phospholipase A2 durch hsp70 vermutet, so dass weniger freie Fettsäuren mit den OFR reagieren können und dadurch möglicherweise die Lipidperoxidation reduziert würde (Jaattela, 1993; Su et al., 1999).

Da Hitzeschock neben der Induktion der hsp zu einer Abnahme des intrazellulären pH-Wertes sowie einem Anstieg der cAMP- und Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt, scheint der Regulationsmechanismus der hsp70-Expression zumindest teilweise darüber zu erfolgen. Beispielhaft wurde die hsp70-Synthese an menschlichen Epidermoidzellen untersucht (Kiang et al., 1994). Ein Anstieg der zellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration oder die Aktivierung von G-Proteinen führten zu einer verstärkten Induktion der Genexpression, während der intrazelluläre pH-Wert und die cAMP-Konzentration keinen Einfluss hatten. Da eine Hemmung der durch Hitzeschock gesteigerten Ca<sup>2+</sup>-Konzentration lediglich zu einer verminderten statt einer vollständig blockierten Genexpression führte, wurden kalziumabhängige und -unabhängige Prozesse bei der hsp70-Synthese diskutiert (Kiang et al., 1994). Der Hitzeschock verursachte zunächst einen gesteigerten Kalziumioneneinstrom gefolgt von einer Mobilisation der Kalziumionen aus intrazellulären Speichern. Dieser Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration war abhängig von der extrazellulären Kalziumkonzentration. Die Kalziumabhängigkeit der Genexpression wurde durch drei Beobachtungen unterstützt: 1. Bei Inkubation der Zellen in einem stark Ca<sup>2+</sup>-haltigen Medium war ein deutlich stärkerer Anstieg der hsp70mRNA nach Hitzeschock

zu verzeichnen als in  $Ca^{2+}$ -freien Medium. 2. Behandlung mit BAPTA-AM, einem zytosolischen Kalziumchelator, führte zu einer stark reduzierten Genexpression nach Hitzeschock. 3. Behandlung mit TMB-8 (Ionomycin-8-(diethylamino)octyl-3,4,5, trimethoxybenzoate), welches die Mobilisation des intrazellulären  $Ca^{2+}$  hemmt, führte ebenfalls zu einer verminderten Genexpression. Die genaue Rolle der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration als Regulationsmechanismus scheint weiterhin unklar, da ein Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Konzentration ohne Hitzeschock zu keiner Induktion der Genexpression führte. Möglicherweise erfolgt nur eine Potenzierung der hsp70 Expression durch den  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsanstieg, der eigentliche Triggerfaktor wie z.B. Hitzeschock setzt jedoch an anderer Stelle an.

Das zelluläre Kalzium ist neben zyklischen Nukleotiden (zyklisches Adenosinmonophosphat, cAMP) das wichtigste zelluläre Signalmolekül in parenchymatösen Organen wie z.B. der Leber (Rasmussen et al., 1984). Das Kalziumion (Ca2+) ist ein nahezu universelles Signalmolekül in Säugetierzellen, über dessen zelluläre Konzentrationsänderungen eine Vielzahl von Zellfunktionen wie z.B. Zellproliferation und Differenzierung, Glukosestoffwechsel, Proteinsynthese oder enzymatische Reaktionen gesteuert werden. Diese Signalfunktion wird sowohl über direkte Enzymaktivierung (z.B. Ca<sup>2+</sup>-aktivierte Proteinkinase C) als auch über zytosolische oder membrangebundene Rezeptorproteine wie das Calmodulin oder Troponin C in Herzund Skelettmuskelzellen erfüllt (Rasmussen et al., 1984). Aufgrund der im Intrazellulärraum vorherrschenden niedrigen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 0,1µM gegenüber 1000µM im Extrazellulärraum wird das Ca<sup>2+</sup> auch als "zelluläres Toxin" bezeichnet, da ein Konzentrations-Exzess dieses quantitativ kleinen Signalmoleküls zum Zelltod führt. Die Aufrechterhaltung der niedrigen intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration erfolgt normalerweise durch aktiven Ca<sup>2+</sup>-Transport aus der Zelle über 2Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher bzw. Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-ATPasen in der Zellmembran (Rasmussen et al., 1984). Weiterhin wird zur Aufrechterhaltung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration Ca<sup>2+</sup> durch einen energieverbrauchenden Prozess (z.B. 2Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Antiporter) in intrazelluläre Kompartimente (wie z.B. Mitochondrien, Kalzisomen, endoplasmatisches/sarkoplasmatisches Retikulum) verschoben. Die Mitochondrien haben dabei eine Reservoir- und Pufferfunktion zur Stabilisierung der niedrigen zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bei intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Akkumulation. Im Mitochondrienmatrixraum steht ein großer Pool von nichtionischem Kalzium im Austausch mit einem kleinen Pool freier Ca<sup>2+</sup>-Ionen, dessen Konzentration ähnlich der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ist und in permanentem Austausch damit steht.

Das endoplasmatische Retikulum stellt dagegen in vielen Zellen die  $Ca^{2+}$ -Quelle für die Initialphase der Aktivierung des zellulären  $Ca^{2+}$ -Signals dar. Für einen geringen Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration ist ein großer Bolus von  $Ca^{2+}$  erforderlich, da erstens die Plasmamembranpumpe über Calmodulin aktiviert wird, was einen gesteigerten  $Ca^{2+}$ -Ausstrom zur Folge hat und zweitens ein Großteil als nichtionisiertes Kalzium im Mitochondrienpool eingelagert wird (Abb.4).



Abb.4: Schematische Darstellung von Ca<sup>2+</sup>-Pools einer Säugetierzelle. CaP: Plasmamembran-Pool; CaZ: Pool des ER; CaX: nichtionischer mitochondrialer Pool Ca-Y: nichtionischer Pool im Zytosol; Ca<sup>2+</sup>: freie Ca<sup>2+</sup>-Ionen in Zytosol und Mitochondrien Schraffierte Fläche: links Plasmamembran, rechts Mitochondrienmembran; ~: aktiver Transport (Rasmussen et al., 1984)

Im Rahmen der Zellaktivierung erfolgt nach Stimulation durch einen extrazellulären "messenger" (z.B. Hormone) eine Erhöhung der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration (0,65-1,5µM), welche aufgrund der o.g. Mechanismen schnell wieder auf Werte unter 0,5µM

sinkt. (z.B. TRH-vermittelte TSH-Sekretion, ANGII-vermittelte Gefäßkonstriktion) (Rasmussen et al., 1984). Die Influx- und Efflux-Raten pendeln sich dabei auf einem erhöhten Level ein (Abb.5).



Abb. 5: Schematische Darstellung der zellulären Ca<sup>2+</sup> Bewegungen nach Zellaktivierung durch Bindung eines Hormons – hypothetisch (schraffierter Balken)

Oben: Veränderung der zytosolischen [Ca<sup>2+</sup>]

Mitte: Ca<sup>2+</sup> -Ein- und Ausstrom über die Plasmamembran

Unten: Veränderungen der freien  $[Ca^{2+}]$  und des Gesamt-Ca<sup>2+</sup> in Mitochondrien als Ergebnis der o.g. Prozesse Abszisse: Zeit in Minuten

Ordinate: Einheiten gemäß Angabe im Diagramm (Rasmussen et al., 1984)

Die Interaktion des Hormon-Rezeptor-Komplexes mit der membrangebundenen Phospholipase C führt zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Diacylglycerol (DG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>), welches die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern (z.B. dem ER) vermittelt. Gleichzeitig kommt es zum gesteigerten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom durch Ca<sup>2+</sup>-Kanäle der Plasmamembran. Möglicherweise ist diese Ca<sup>2+</sup>-Permeabilität Folge einer veränderten Membranstruktur nach Hydrolyse des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (Rasmussen et al., 1984). DG dient als Substrat für die Bildung der Arachidonsäure, woraus in einer durch die Cyclooxygenase katalysierten Reaktion Leukotriene, Prostaglandine und Thromboxane synthetisiert werden können. Darüber hinaus aktiviert DG die Proteinkinase C (Abb.6).



Abb.6: Schematische Illustration einer Zellaktivierung nach Hormon-Rezeptor-Bindung R: Rezeptor; PLC: Phospholipase C; Pin4,5Pi: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat; DG: Diacylglycerol; InP<sub>3</sub>: Inositoltriphosphat; InP<sub>2</sub>: Inositolbisphosphat; InP: Inositolmonophosphat; In: freies Inositol; PA<sub>1</sub>: Phosphorsäure; Pin: Phosphatidylinositol; MG: Monoglyceride; AA: Arachidonsäure; LT: Leukotriene; PG:Prostaglandine; TX: Thromboxane (Rasmussen et al., 1984)

Wie erklärt sich nun eine anhaltende Zellantwort aus dem nur kurzen Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration? Kaibuchi und Kawahara untersuchten dieses Phänomen an Thrombozyten. Nach Stimulation durch Thrombin stieg zunächst die zytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration an und aktivierte die  $Ca^{2+}$ -Calmodulin-abhängige Myosin-leichte-Ketten-Kinase. Daneben erfolgte eine weitere Proteinphosphorylierung durch die Proteinkinase C, welche durch DG aktiviert wurde. Wenn nun einer dieser beiden Wege der Zellaktivierung gehemmt wurde, resultierte nur eine submaximale Freisetzungsreaktion (Kaibuchi et al., 1983; Kawahara et al., 1980). Daraus ergab sich die Hypothese, dass die zwei verschiedenen Wege der Zellaktivierung jeweils eine eigene Rolle in der zeitlichen Abfolge

der Ca<sup>2+</sup>-Signaltransduktion haben. Die Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-Aktivierung, welche über eine große Ca<sup>2+</sup>-Amplitude moduliert wird, ist für die initiale schnelle Zellantwort verantwortlich, während die Proteinkinase C, sensitiviert auf einem niedrigeren "steady-state" der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, zu einer lang anhaltenden Zellantwort führt (Abb.7).



#### Abb.7: Schematische Präsentation des Informationsflusses im Ca<sup>2+</sup>-Signalsystem

Die zwei verschiedenen Wege der Zellaktivierung haben jeweils eine eigene Rolle in der zeitlichen Abfolge der  $Ca^{2+}$ -Signaltransduktion. Eine zeitliche Integration führt zu einer gesteigerten und anhaltenden Zellantwort (unten rechts).

H: Hormon; R: Rezeptor; gestrichelte Fläche: Plasmamembran; PLC: Phospholipase C; 4,5Pin: Phosphoinositol 4,5- bisphosphat;  $[Ca^{2+}]_c$ : zytosolische Kalziumkonzentration; REs: Response elements;

CM: Calmodulin; PK: Proteinkinase;  $Pr_{a/b}$ : zelluläre Proteine; DG: Diacylglycerol; C-K: C-Kinase; Ca-Z: Ca<sup>2+</sup>-Aktivator-Pool; In-P<sub>3</sub>: Inositol 1,3,4-triphosphat

(Rasmussen et al., 1984)

Nach oxidativem Stress ist die Ca<sup>2+</sup>-Sequestration über die Membranpumpen von Plasma-, Mitochondrien- und Mikrosomenmembran gestört. Letztere besitzt einen großen Stellenwert im Erhalt der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Homöostase, da bis zu 50% des zellulären  $Ca^{2+}$  im ER, welches den größten Teil des extramitochondrialen Ca2+-Pools einnimmt, aufgenommen werden (Murphy et al., 1980). In Versuchen an isolierten hepatozytären Mikrosomen konnten Jones et al. 1983 zeigen, dass oxidativer Stress in Form von tert-Butylhydroperoxid (t-BOOH) zu einem Verlust der Ca<sup>2+</sup>-Sequestration trotz Anwesenheit von ATP führte. Die Metabolisierung von t-BOOH durch die Glutathionperoxidase resultierte in einer Oxidation von Glutathion und Pyridinnukleotiden. Die gleichzeitige Gabe von Dithiothreitol bzw. Glutathion hatte eine vollständige Protektion gegen den Sequestrationsverlust zur Folge. Daraus wurde geschlossen, dass dieser protektive Effekt auf einer Verhinderung der Oxidation der für die Ca<sup>2+</sup>-ATPasen essentiellen Sulfhydrylgruppen im Enzym beruht (Jones et al., 1983). Im Gegensatz dazu hatte eine selektive Inaktivierung der Glutathionreduktase mit folgendem Anstieg der reduzierten Form des NADPH den gleichen protektiven Effekt auf die mitochondriale Ca<sup>2+</sup>-Sequestration bei weiterhin bestehendem Funktionsverlust der extramitochondrialen Ca<sup>2+</sup>-ATPasen (Bellomo et al., 1982; Richter et al., 1988). Daraus ergab sich die Hypothese, dass die intrazelluläre Ca2+-Sequestration über die Mitochondrienmembran Pyridinnukleotid-abhängig und über die Mikrosomenmembran Sulfhydrylgruppen-abhängig erfolgt (Bellomo et al., 1982) (Abb.8).



**Abb. 8: Oxidation und Hydrolyse von intramitochondrialen Pyridinnukleotiden** (Richter et al., 1988)

Die im oxidativen Stress auftretende Glutathiondepletion führt daher zum Anstieg des Oxidationsproduktes Glutathiondisulfid (GSSG) Oxidation des für die und Glutathionreduktase benötigten NAD(P)H mit einer Abnahme des NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Quotienten (Moore et al., 1990). Der Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration kann kurzzeitig über die Plasmamembranpumpe kompensiert werden. Auf Dauer reagiert jedoch auch diese sensibel auf Oxidation, Alkylierung oder Komplexierung von Sulfhydrylgruppen mit einer Hemmung des Ausstroms (Bellomo et al., 1983). Als zusätzlicher Mechanismus geht der Inaktivierung der Ca<sup>2+</sup>-ATPasen offensichtlich eine erhöhte Permeabilität der Membranen für Ca<sup>2+</sup> durch oxidativen Stress mit einem konsekutiven Einstrom von Ca<sup>2+</sup> entlang des Konzentrationsgefälles voraus. Untersuchungen von Silomon et al. an Rattenhepatozyten bestätigten die bedeutende Rolle von OFR in der schockinduzierten Ca<sup>2+</sup>-Dysregulation. Durch in vivo Gabe von sog. Radikalfängern wie Superoxiddismutase (SOD) oder Katalase konnte sowohl die Lipidperoxidation als auch ein Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration verhindert bzw. vermindert werden. Allerdings spielte die Xanthinoxidase, die als Hauptquelle der schockinduzierten Freisetzung von OFR in diesem Modell diskutiert wird, nur eine untergeordnete Rolle im Rahmen der I/R-induzierten Ca2+-Dysregulation (Silomon et al., 1999). Der resultierende intrazelluläre zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsanstieg ist ein später Mediator in der Entwicklung des oxidativen Zellschadens und führt zu einer abnormen Stimulation von normalerweise physiologischen Funktionen wie z.B. einer vermehrten Aktivierung von Phospholipasen. Die dadurch abnorm gesteigerte Phospholipidhydrolyse endet letztendlich im irreversiblen Zellschaden. Des Weiteren erfolgt eine intrazelluläre Proteindegradation von Rezeptoren, Proteinkinasen und des Zytoskeletts durch Proteasen sowie die Aktivierung von Endonukleasen, welche sonst nur im Rahmen des physiologischen Zelltodes agieren. Trotz der verschiedenen Möglichkeiten zellulären, oxidativen Stress auszulösen ist das Kalziumion ein gemeinsamer Endpunkt in deren "Zelltodmechanismus" (Abb.9).



Abb.9: Schematische Darstellung eines "Zelltodmechanismus" durch Depletion von Sulfhydrylgruppen und Störung der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase. (Moore et al., 1990)

Nach hämorrhagischem Schock zeigten Maitra et al. eine profunde Störung der hepatozellulären  $Ca^{2+}$ -Regulation an der Ratte mit einer signifikanten Erhöhung der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration gegenüber scheinoperierten Kontrolltieren. Diese Veränderungen der  $Ca^{2+}$ -Regulation waren dabei gekoppelt an eine Störung des Laktatmetabolismus und der hepatischen Glukoseproduktion. Aus den erhobenen Daten wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen einer veränderten zellulären  $Ca^{2+}$ -Homöostase und einer Störung der Glukoseproduktion postuliert (Maitra et al., 1992). Des Weiteren konnte nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie eine Abnahme der aktiven Leberzellfunktion anhand der Indocyaningrün-Clearance nachgewiesen werden (Wang et al., 1991). Gegen diese zelluläre Funktionseinschränkung wirkte eine Behandlung der Tiere mit dem Kalziumkanalblocker Diltiazem weitgehend protektiv. Wang vermutete daher einen möglichen Zusammenhang von zellulärer Funktionsstörung und  $Ca^{2+}$ -Dysregulation.

Der protektive Effekt von Diltiazem wurde von Rose et al. 1997 in Bezug auf die hepatozelluläre Ca<sup>2+</sup>-Regulation nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion näher untersucht. Dabei wurde der nach Schock und Volumentherapie beobachtete gesteigerte, zelluläre Ca<sup>2+</sup>-Austausch und membranöse Ca<sup>2+</sup>-Fluss durch Diltiazem bis auf Kontrollniveau gehemmt. Des Weiteren wurde die Lipidperoxidation sowie der Verlust von Glutathion vermindert. Aus den Daten wurde von den Autoren die gesteigerte Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme als ein möglicher Mechanismus für die Entwicklung des oxidativen hepatozellulären Schadens nach hämorrhagischem Schock postuliert (Rose et al., 1997).

Aufgrund der vielfachen Beteiligung des Ca<sup>2+</sup>-Signals an den grundlegenden zellulären Funktionen ist eine Störung der Zellfunktion sowie eine Modulation der Stressgenantwort auf dem Boden der gestörten zellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase z.B. nach Hitzeschock denkbar (Maitra et al., 1992). So führen Stressereignisse neben einer Veränderung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase auch zur Induktion der Synthese von so genannten Akutphase-Proteinen. Nachdem Rose et al. 1994 am Modell einer gramnegativen Sepsis an der Ratte eine Suppression der Akutphase-Antwort in der Leber durch Behandlung mit den Ca<sup>2+</sup>-Kanalblockern Diltiazem und Verapamil nachweisen konnte, legen diese Ergebnisse eine Abhängigkeit der Akutphase-Antwort von der zellulären Ca<sup>2+</sup>-Regulation nahe (Rose et al., 1994). Eine weitere Gruppe von Genen, die durch verschiedene Stressoren in der Leberzelle induziert werden können, sind die zuvor erläuterten Hitzeschockproteine. Zur Abhängigkeit der Induktion der Stressgenexpression von der zellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase liegen bisher nur vereinzelte Untersuchungen an verschiedenen Zellspezies vor. In einer Studie von Koleva et al. konnte eine signifikante Reduktion der Hämoxygenase-Aktivität in der Leber durch dreiwöchige Fütterung mit den Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten Nifedipin, Verapamil und Diltiazem erzielt werden (Koleva et al., 1993). In isolierten neuronalen Kortexzellen von Ratten konnte mit Thapsigargin, einem irreversiblen Inhibitor der Ca<sup>2+</sup>-ATPase des ER, der zu einer zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationssteigerung führt, eine 21-fache Steigerung der HO-1 mRNA-Konzentration erzielt werden. Da sich nach Vorbehandlung der Zellen mit dem zytoplasmatisch wirksamen Ca<sup>2+</sup>-Chelator BAPTA-AM die Konzentrationssteigerung der mRNA kaum supprimieren ließ, wurde auf einen direkten Effekt der Ca<sup>2+</sup>-Depletion im ER geschlossen, der Anstieg der zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration schien dabei kaum eine Rolle zu spielen (Linden et al., 1998). Im Gegensatz dazu konnte in humanen diploiden Fibroblasten eine Suppression der Stressgenantwort (HO-1, hsp70) nach Prostaglandin A2-Zufuhr durch BAPTA-AM sowie eine direkte Induktion dieser Genexpression durch das Ca<sup>2+</sup>-Ionophor A23187 gezeigt werden. Es bestand daher eine direkte Korrelation zwischen der gesteigerten zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und der Stressgenexpression (Choi et al., 1994). In einer Studie von Yamamoto et al. an Tubulusepithelzellen der Ratte konnte die Hitzeschock-abhängige Induktion der hsp70 Expression sowohl durch intrazelluläre als auch durch extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Chelatierung gehemmt werden. Die direkte Beziehung zwischen der Stressgenexpression und der zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationssteigerung zeigte daher eine Abhängigkeit von der extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, so dass auf einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem EZR geschlossen wurde (Yamamoto et al., 1994). Des Weiteren wurde die hsp70-Expression durch Proteinkinase-Inhibitoren gehemmt, so dass der weiterführende Regulationsmechanismus in der Signaltransduktionskaskade vermutet wurde. Ein anderer Aspekt in der Regulation der Stressgenantwort zeigte sich in Versuchen an menschlichen Erythroleukämiezellen von Elia et al. 1996. Die durch Hitzeschock induzierte hsp70-Expression wurde durch gleichzeitige Gabe von Ionophor A23187 vollständig gehemmt, während die Inkubation mit Thapsigargin keinen Effekt auf die stressinduzierte Genexpression zeigte. Daher konnte die Zellantwort auf Ionophor A23187 weder auf einer Ca<sup>2+</sup>-Depletion von intrazellulären Speichern noch auf einer Induktion von "glukose-regulated-proteins" (grp), welche sowohl von Ionophor als auch von Thapsigargin induziert werden, beruhen. Darüber hinaus wurde der Effekt des Kalzium- Ionophors nur beobachtet, wenn es gleichzeitig mit dem Hitzeschock auf die Zellen wirkte, so dass die Initiierung der Signaltransduktionskaskade bereits zu einem stattzufinden schien. Vermutet wurde frühen Zeitpunkt eine Hemmung des Hitzeschocktranskriptionsfaktors, dessen Aktivierung normalerweise über eine mehrstufige Phosphorylierung verläuft (multi-step-Vorgang), wovon durch Ionophor A23187 einige dieser Schritte gehemmt wurden (Elia et al., 1996). Ähnlich konnte an glatten Muskelzellen gezeigt werden, dass eine 2-stündige Inkubation der Zellen mit einem Kalzium-Ionophor oder dem Ca<sup>2+</sup>-Agonist Arginin/Vasopression zu einer Abnahme der HO-1 mRNA Konzentration führte. In diesem Modell wurde deshalb eine Steigerung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration für die Suppression der Genexpression verantwortlich gemacht (Ishizaka et al., 1997). Die ganz unterschiedliche Regulation der Stressgenantwort, die anhand dieser verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, legt eine zellspezifische Regulation der Expression der Hitzeschockproteine in Abhängigkeit von der zellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase nahe.

Eine systematische Untersuchung der Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der zellulären Stressgenantwort in Hepatozyten nach oxidativem Stress liegt bislang noch nicht vor. In der vorliegenden Arbeit wurde daher *in vitro* die Induktion der Genexpression zweier verschiedener Stressgene am Beispiel von HO-1 und hsp70 nach Modulation des zellulären Ca<sup>2+</sup>-Metabolismus untersucht, um mögliche Rückschlüsse auf die Rolle des Ca<sup>2+</sup>-Signalsystems im Hinblick auf die Entwicklung eines hepatozellulären Schadens bzw. eines protektiven Effektes nach oxidativem Stress *in vivo* ziehen zu können.

## 3. Material und Methodik

#### 3.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von Sigma (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen und waren von der jeweils höchsten erhältlichen Reinheit.

#### 3.2 Versuchsvorbereitung

#### **3.2.1** Kollagenbeschichtung von Petrischalen

Zum Beschichten der Zellkulturschalen (60mm Ø Sarstedt, Numbrecht) wurde eine Kollagenstammlösung (10mg Kollagen in 10ml 0,1% Essigsäure gelöst) auf  $40\mu$ g/ml verdünnt und davon 1ml pro Schale verwandt. Diese trockneten dann offen unter der sterilen Werkbank (Laminar Air Flow, Biohit), wurden anschließend verschlossen und über Nacht mit einer UV-Lampe bestrahlt. Dieser Vorgang erfolgte vollständig unter der Air Flow, um die Schalen für den Zellversuch so steril wie möglich zu halten.

#### 3.2.2 Zellisolierung

Zur Isolierung der Leberzellen wurden nach Genehmigung durch die zuständige Landesbehörde (Landratsamt des Saarpfalzkreises, Homburg) männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 250-350g verwendet. Es wurden nur Tiere in die Versuchsserien aufgenommen, die keine Anzeichen von Erkrankungen sowie ein normales Fress- und Putzverhalten zeigten. Die Narkose erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (50mg/kg KG).

Als Protokoll für die Leberzellisolierung wurde ein modifiziertes Protokoll der von Alpini et al. beschriebenen Kollagenase-Perfusionstechnik angewandt (Alpini et al., 1994).

Nach medianer Laparatomie und Heparanisierung (1U/g KG) erfolgte die Kanülierung der Vena portae. Über diese wurde die Leber mit kalziumfreiem, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-haltigem Krebs-Henseleit-Puffer (Zusammensetzung: 6,96 g/l Natriumchlorid; 0,35 g/l Kaliumchlorid; 0,165 g/l Kaliumdihydrogenphosphat; 0,029 g/l EDTA; 2,1 g/l Natriumhydrogencarbonat), der permanent mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) bei 37°C begast wurde, in situ mit einer Flussrate von 10-15ml/min für 10-12 min im nicht rezirkulierenden System perfundiert. Währenddessen wurde die Vena cava inferior distal der Leber eröffnet, um den Abfluss der Pufferlösung zu ermöglichen. Diese Präperfusion diente dem Ausspülen von Blut aus dem Gefäßsystem sowie einer Verminderung der Zelladhärenz, wodurch die Effektivität der folgenden Kollagenaseverdauung erhöht wurde. Während der Perfusion erfolgte die Freipräparation der Leber und die Überführung an der Kanüle hängend in ein auf konstant 37°C erwärmtes Doppelwandglas. In dieses folgte die Zugabe von 0,05% Kollagenaselösung (25mg Kollagenase (collagenase-hepatocyte-qualified, hergestellt Clostridium histolyticum, Life Technologies, aus Grand Island, NY) und 0,5ml Kalziumchlorid (250µM Stocklösung) in 50ml EDTA-freiem Krebs-Henseleit-Puffer). Durch die anschließende rezirkulierende Perfusion der Leber ex situ für 10-15 min bei 37°C und einer Flussgeschwindigkeit von 14,5ml/min sowie unter konstanter Begasung der Perfusionslösung mit Carbogen erfolgte der Verdau der bindegewebigen Organstrukturen. Die Leber wurde dann mit ca. 10ml der Perfusionslösung in eine Petrischale überführt, die Organkapsel eröffnet und das angedaute Gewebe mit einem Metallkamm vorsichtig abgestrichen. Dabei entstand eine Suspension aus Parenchymzellen (Hepatozyten; HC), nichtparenchymatösen Zellen (Endothel-, Kupffer-, hepatische Sternzellen) und unverdautem Bindegewebe. Diese wurde in ein 250ml-Gefäss gegeben und mit 1ml Kalziumchlorid (250µM) und PBS (phosphat buffered saline) auf 100ml aufgefüllt. Bei den weiteren Schritten wurden die Zellsuspensionen immer auf Eis aufbewahrt, um die Aktivität der Kollagenase zu stoppen. Aufgeteilt in 5 Portionen à 20ml wurden diese mit PBS auf 50ml aufgefüllt und bei 100g und 4°C 3 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren des Pellets wurde erneut mit PBS auf ein Volumen von 50ml aufgefüllt und mit 50g 3 min bei 4°C zentrifugiert. Das so entstandene Hepatozytenpellet wurde mit ca. 15ml komplettiertem Williams E-Medium (500ml Williams E-Medium + 50ml Kälberserum + 50mg Gentamycin, GIBCO, BRL, Life Technologies, Scotland) resuspendiert und eine Probe davon zur Bestimmung der Zellzahl und Vitalität mit Trypanblaulösung (0,4%) gefärbt. Die Auszählung erfolgte in einer Neubauer Zählkammer (Improved, Brightline, Assistent) unter einem binokularen Mikroskop bei 40facher Vergrößerung. Die weitere Verwendung der Zellen erfolgte lediglich bei einer Vitalitätsrate >90%. Schließlich wurde die gesamte Zellsuspension mit Williams E-Medium auf die Endkonzentration von  $10^6$  Zellen/ml Medium verdünnt.

#### 3.3 Versuchsablauf

Der gesamte Zellversuch fand unter der Laminar Air Flow statt, um eine bakterielle Kontamination der Hepatozytenkultur zu vermeiden.

Zunächst wurde auf die mit Kollagen beschichteten Zellkulturschalen je 3ml der Zell-Medium-Suspension der Konzentration 10<sup>6</sup> Zellen/ml Medium pipettiert. Diese wurden für 6 Stunden im Brutschrank (5% CO<sub>2</sub> Inkubator, Sanyo) bei konstant 37°C und angefeuchteter Atmosphäre inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem das komplettierte Medium zunächst abgesaugt wurde. Wie unter dem Mikroskop zu sehen war, bildeten die Zellen mittlerweile einen dichten Zellrasen mit guter Adhärenz auf dem Kollagen. Zum Entfernen nicht adhärenter Zellen wurden diese mit 1ml PBS vorsichtig gewaschen und anschließend mit 3ml serumfreiem Williams E-Medium (Williams E-Medium + 50mg Gentamycin) pro Schale über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte vor Versuchsbeginn erneut ein Mediumwechsel. Die Deckel der Schalen wurden entsprechend der verschiedenen Versuchsgruppen beschriftet, wobei jeweils 3 Schalen (bzw. 6 Schalen der EDTA- und BAPTA-Gruppen) angesetzt wurden. Anschließend wurden die einzelnen Substanzen nach einem genauen Pipettierschema und Zeitplan zugegeben. Aufgrund von Voruntersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Stressgenexpression in diesem Modell folgte nun eine Inkubation von 6 Stunden. Diese Zeit war erforderlich um den Einfluss der unterschiedlichen Interventionen auf die Genexpression nachweisen zu können. Da bei einigen Versuchsgruppen verschiedene Substanzen zugegeben wurden und Zeiten zur Vorinkubation eingehalten werden mussten, wurden alle anderen Gruppen, die mit diesen verglichen werden sollten, ebenfalls zeitgleich inkubiert, um den möglichen, systematischen Fehler einer unterschiedlich langen Inkubationszeit zu vermeiden. Die Inkubation der Zellen in Anwesenheit von Phorone und BSO erfolgte jeweils für 75 min. Das Medium wurde anschließend abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und neues Medium mit oder ohne einer weiteren Substanz wieder zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation für weitere 6 Stunden. Um die Umgebungstemperatur möglichst konstant zu halten, wurden die Zellkulturen nur für die einzelnen Pipettierschritte, Medienwechsel, etc. kurz dem Brutschrank entnommen. Ebenso wurden die Deckel der Zellkulturschalen nur unter der sterilen Werkbank möglichst kurz für die Pipettiervorgänge geöffnet, um Verunreinigungen sowie das Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 1ml PBS gewaschen, 0.5mlGuanidinisothiocyanat-Puffer mit (4M Guanidinisothiocyanat, 20mM Natriumcitrat. 0,5% N-laurylsarkosin, 0,1M 2-Mercaptoethanol) zupipettiert und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers (cell scraper, 23cm, Radiation sterilized, NUNC) von den Schalen geerntet. Die Lyse der Zellen erfolgte durch eine mehrfache Aspiration mit einer 22G-Nadel. Die Suspension wurde bis zur Isolierung der RNA bei -20°C gelagert.

#### 3.4 Versuchsgruppen

Im Folgenden wurden Stressmodelle, denen eine Erzeugung von oxidativem Stress sowie Eingriffe in den Ca<sup>2+</sup>-Metabolismus der Zellen zugrunde liegen, auf ihren Einfluss bezüglich einer Induktion der Hämoxygenase-1 (HO-1) und des Hitzeschockproteins 70 (hsp70) untersucht.

#### **3.4.1** Glutathiondepletion durch Phorone und BSO

Durch die Kombination von 1µl/3ml Phorone (2,6 Dimethyl-2,5 heptadien-4-on, (Fluka, Neu-Ulm)), welches über eine Aktivitätssteigerung der Glutathiontransferase Glutathion depletiert (Traber et al., 1992), und 2mM Buthioninsulfoximin (BSO), einem irreversiblen Gammaglutamatcysteinsynthetase-Hemmer (Arrick et al., 1981; Griffith et al., 1979) wurde eine Glutathiondepletion hervorgerufen. Die Inkubationszeit mit Phorone/BSO betrug 75 min, da Voruntersuchungen zeigten, dass diese Inkubationszeit bereits zu einer maximalen Induktion der Genexpression in isolierten Hepatozyten führt. Die beiden Substanzen wurden nach dieser Zeit wie bereits beschrieben heruntergewaschen und die Zellen mit neuem Medium für weitere 6 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Kontrollgruppe wurde mit 3ml Medium zeitgleich mit den anderen Versuchsgruppen im Brutschrank inkubiert.

Kontrolle (n=3)
Phorone/BSO (n=3)
n= Anzahl der Versuchsansätze

## 3.4.2 Inkubation mit Thapsigargin

Thapsigargin führt zu einem Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration sowie einem Abfall der  $Ca^{2+}$ -Konzentration des endoplasmatischen Retikulums (ER), da es die  $Ca^{2+}$ -ATPase des ER irreversibel hemmt (Thastrup et al., 1990). Es erfolgt also eine Erhöhung der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration durch einen Shift von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern. Es wurde eine 100 $\mu$ M Stammlösung (0,5mg in 7,682ml Dimethylsulfoxid (DMSO), bei –20°C gelagert) verwendet, von der durch Zugabe verschiedener Volumina auf die Zellkulturschalen die entsprechenden Endkonzentrationen erreicht wurden:

0,1µM Thapsigargin (n=3)
0,25 µM Thapsigargin (n=3)
1µM Thapsigargin (n=3)
5µM Thapsigargin (n=3)
1µM Thapsigargin + Phorone/BSO (n=3)

Bei der letztgenannten Versuchsgruppe wurde nach 30-minütiger Vorinkubation mit Thapsigargin für 75 min Phorone/BSO zupipettiert, die Zellen danach gewaschen und mit 1µM Thapsigargin weitere 6 Stunden inkubiert.

#### 3.4.3 Inkubation mit Ionophor A23187

Ähnlich wie Thapsigargin bewirkt Ionophor einen Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Allerdings permeabilisiert es die Plasmamembran für  $Ca^{2+}$  (Pressman, 1976), so dass hier die Erhöhung der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration durch Verschiebung von  $Ca^{2+}$  aus dem EZR zustande kommt. In dieser Versuchsreihe wurde neben einem dosisabhängigen Effekt auch der zeitliche Verlauf der Inkubation mit Ionophor auf die
Stressgenexpression untersucht. Ionophor A23187 wurde in einer 500 $\mu$ M Stammlösung (1mg in 3,92 ml DMSO, lichtgeschützt bei –20°C gelagert) verwendet. Die Zellen wurden für 1, 2, 4, und 6 Stunden mit 5 $\mu$ M Ionophor inkubiert, gewaschen und bis zum Ende einer 6-stündigen Gesamtinkubationszeit mit neuem Medium ohne Ionophor weiterinkubiert.

Dosis-Wirkungs-Beziehung:

1) 0,2µM Ionophor (n=3)

2) 1µM Ionophor (n=3)

3) 5µM Ionophor (n=3)

4) 25µM Ionophor (n=3)

Zeitlicher Verlauf:

5) 5µM Ionophor 1h (n=3)

6) 5µM Ionophor 2h (n=3)

7) 5µM Ionophor 4h (n=3)

8) 5µM Ionophor 6h (n=3)

#### **3.4.4** Inkubation mit EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)

Bei EDTA handelt es sich um einen extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Chelator, der durch die Komplexbildung die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Extrazellulärraum (EZR) senkt. Es wurden jeweils n=6 Zellkulturschalen angesetzt, da unter EDTA-Inkubation die Zelladhärenz auf dem Kollagen nachlässt und so zu wenig Material für die spätere RNA-Isolierung vorhanden gewesen wäre. Trotz des Adhärenzverlustes konnte in Vorversuchen eine normale Vitalität der Hepatozyten nachgewiesen werden. Die Endkonzentration für EDTA in den Schalen betrug 10mM (Stammlösung: 1,1167g/10ml H<sub>2</sub>O auf pH 7,2-7,4 titriert, im Kühlschrank gelagert).

EDTA 10mM (n=6)
EDTA 10mM + Phorone/BSO (n=6)

Bei der Kombination mit Phorone/BSO wurde 30 min mit EDTA vorinkubiert, für 75 min Phorone/BSO zupipettiert, die Zellen danach gewaschen und mit 10mM EDTA weitere 6 Stunden inkubiert.

Die Kombination sollte zeigen, ob der Effekt von Phorone/BSO auf die Genexpression in Abhängigkeit der extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration steht.

## 3.4.5 Inkubation mit BAPTA-AM

Im Gegensatz zu EDTA ist BAPTA-AM (1,2-bis (o-Aminophenoxy) ethan-N;N;N;N-tetra (acetoxymethyl) ester) ein zytosolisch wirksamer Ca<sup>2+</sup>-Chelator, der somit die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im IZR (Intrazellulärraum) senkt (Gissel et al., 1997). Aufgrund der gleichen Problematik der Zelladhärenz wie bei EDTA wurden auch hier jeweils 6 Schalen angesetzt. Die 6-stündige Inkubation erfolgte bei 33,3 $\mu$ M (Stammlösung: 25mg/19,11ml DMSO, bei –20°C gelagert).

BAPTA-AM 33,3μM (n=6)
BAPTA-AM 33,3μM + 1μM Thapsigargin (n=6)
BAPTA-AM 33,3μM + Phorone/BSO (n=6)

Bei den Gruppen mit Kombinationsbehandlungen wurde wie in 3.3 beschrieben 30 min mit BAPTA-AM vorinkubiert. BAPTA-AM senkt die zytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration durch die Komplexbildung mit  $Ca^{2+}$ -Ionen, so dass diese durch die folgende Substanz nicht mehr erhöht werden kann. Es kommt so zu einer  $Ca^{2+}$ -Depletion der verschiedenen Zellkompartimente ohne den sonst resultierenden Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Die Kombination von BAPTA-AM und Thapsigargin sollte folglich zeigen, ob ein möglicher Thapsigargin-Effekt durch Depletion der  $Ca^{2+}$ -Konzentration im endoplasmatischen Retikulum oder durch den gleichzeitigen Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Zytosol hervorgerufen wird. Die Kombination BAPTA-AM und Phorone/BSO sollte Aufschluss darüber geben, ob der Effekt von Phorone/BSO auf die Genexpression mit der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration in Zusammenhang steht.

#### 3.4.6 Inkubation mit Diltiazem

Bei Diltiazem handelt es sich um ein Benzothiapinderivat. Als Kalziumkanalblocker vermindert es den Einstrom von  $Ca^{2+}$  in die Zelle. Die  $Ca^{2+}$ -Konzentration im IZR sinkt, da der passive  $Ca^{2+}$ -Einstrom entlang des Konzentrationsgradienten entfällt (Mauger et al., 1988; Striggow et al., 1993; Wu et al., 1995).

Die Auswirkungen auf die HO-1- und hsp70-Genexpression wurde bei folgenden Konzentrationen (Stammlösung: 13,5mg/10ml Aqua bidest steril, gelagert im Kühlschrank) sowie unter zusätzlicher Phorone/BSO-Inkubation getestet.

1) 50µM Diltiazem (n=3)

2) 50µM Diltiazem + Phorone/BSO (n=3)

3) 100µM Diltiazem (n=3)

```
4) 100µM Diltiazem + Phorone/BSO (n=3)
```

```
5) 200µM Diltiazem (n=3)
```

```
5) 200µM Diltiazem + Phorone/BSO (n=3)
```

### 3.4.7 Inkubation mit Verapamil

Verapamil gehört zu den Phenylalkylaminderivaten. Als Kalziumkanalblocker senkt es ebenso wie Diltiazem die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im IZR (Hughes et al., 1986). Zum Vergleich wurden die gleichen Konzentrationen (Stammlösung: 14,73mg/10ml Aqua bidest steril, gelagert im Kühlschrank) sowie die Phorone/BSO-Inkubation angesetzt.

```
1) 50µM Verapamil (n=3)
```

```
2) 50µM Verapamil + Phorone/BSO (n=3)
```

- 3) 100µM Verapamil (n=3)
- 4) 100µM Verapamil + Phorone/BSO (n=3)
- 5) 200µM Verapamil (n=3)
- 6) 200µM Verapamil + Phorone/BSO(n=3)

#### 3.4.8 DMSO-Kontrollen

Als Lösungsmittel für Thapsigargin, BAPTA-AM und Ionophor A23187 diente DMSO. Daher wurden 2 Gruppen mit jeweils einer hohen und niedrigen DMSO-Menge als Vehikelkontrollen für 6h inkubiert.

1) 3µl/3ml DMSO (n=3)

2) 150µl/3ml DMSO (n=3)

#### 3.5 Ribonukleinsäure (RNA)-Isolierung und Northern Blot Analyse

Die Gesamt-RNA wurde nach der von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski et al., 1987) beschriebenen Methode aus Hepatozyten isoliert. Um die RNA vor RNasen zu schützen, wurden in den folgenden Versuchsschritten nur RNase-freie Materialien und Lösungsmittel verwendet. Nach Homogenisieren der Leberzellen in Guanidinisothiocyanat-Puffer erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion (wassergesättigtes Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol: 250:49:1). Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation (9500 x g; 30 min) wurde die wässrige, RNA-enthaltende Oberphase abgenommen. Durch Zugabe von 70% igem Isopropylalkohol wurde die RNA bei -20°C gefällt. Konzentration und Reinheit der in mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem H<sub>2</sub>O gelösten RNA wurden durch Messung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm bestimmt. Gleiche Mengen an RNA wurden in Probenpuffer (50%) Formamid. 2,2M Formaldehyd, 50mM 3-(N-morpholino) propansulfonsäure 7,0), Sacharose, Bromphenolblau, (pH 2,72mg 34µg 0,55µg Ethidiumbromid) gelöst und die jeweils 3 bzw. 6 Versuchsansätze gepoolt. 10µg bzw. 8µg der so erhaltenen RNA-Probe wurde dann 30 min im Wasserbad bei 65°C inkubiert und mittels Elektrophorese (1,5 h, 120V) in einem 1,2% igen Agarose-Formaldehyd-Gel der Größe nach aufgetrennt. Für den Transfer der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer Mannheim, Mannheim) durch Kapillarkräfte diente 10xSSC (0,15M Natriumcitrat, 1,5M Natriumchlorid, pH 7,0) als Transferpuffer. Anschließend wurde die RNA durch UV-Bestrahlung (Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, CA) auf der Membran fixiert. Diese wurde dann mit Methylenblaulösung (0,03% Methylenblau in 3M Natriumacetat, pH 5,2) gefärbt und die Signale der 18S Ribosomenbande densitometrisch (Bio-Rad GS-700 Imaging Densitometer, BioRad, Hercules CA, USA) zur Korrektur unterschiedlicher RNA-Beladung gemessen. In einigen Versuchsansätzen wurde das Signal der ATP-Synthase nach Hybridisierung mit radioaktiv markierter cDNA zur Normierung verwendet.

Die Detektion der mRNA-Transkripte erfolgte durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten komplementären DNA (cDNA)-Fragmenten.

Die HO-1 cDNA bestand aus einem EcoR I/Hind III Restriktionsfragment von 0,9 kb Länge einer Ratten HO-1 DNA, die von Dr. S. Shibahara (Department of Applied Physiology and Molecular Biology, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan) zur Verfügung gestellt wurde. Die hsp70 cDNA (humane hsp70 cDNA, ATCC#57494, BamH I/Hind III Restriktionsfragment von 2,3kb Länge) und die ATP-Synthetase cDNA (ATCC#59119, Plasmid von 4,7kb Länge) waren kommerziell erhältlich (ATCC, Bethesda, MD, USA). Zunächst wurden die cDNA-Fragmente mit Hilfe der "random primer labeling" Methode mit alpha(<sup>32</sup>P)-dCTP (50µCi) (Feinberg et al., 1983) markiert und überschüssige, nicht eingebaute Nukleotide durch Aufreinigung über eine kommerzielle Säule aus dem Ansatz entfernt (Qiaquick PCR purification Kit, Qiagen, Hilden). Die Membranen wurden für mindestens zwei Stunden in Hybridisierungslösung (Rapid Hyb; Amersham, Braunschweig) bei 65°C prähybridisiert, die Hybridisierung mit markierter cDNA erfolgte in der gleichen Hybridisierungslösung für mindestens 16 Stunden bei ebenfalls 65°C. Anschließend wurden die Membranen für 20 min bei Raumtemperatur in 2xSSC und 0,1% SDS sowie 2 x 15 min bei 65°C in 0,1xSSC und 0,1% SDS (Natriumdodecylsulfat) gewaschen. In einer Filmkassette wurde ein Röntgenfilm (Kodak Xomat XAR5, Eastman Kodak Co., Rochester, NY) mit Verstärkerfolie belichtet. Die autoradiographische Detektion der gebundenen DNA erfolgte für 1-12 Stunden bei –72°C. Die Signale der interessierenden mRNA wurden mit Hilfe eines Densitometers ausgewertet. Zur Korrektur ungleich geladener RNA-Mengen wurden diese Werte durch Division durch das densitometrische Signal der ATP-Syntethase cDNA bzw. der Methylenblaufärbung normiert.

## 4. Ergebnisse

## 4.1 Abhängigkeit der Induktion der Hämoxygenase-1 Genexpression vom zellulären Ca<sup>2+</sup> Signalsystem im Hepatozyten

Die Effekte der Modulation der leberzellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase auf die Genexpression der Hämoxygenase-1 wurden auf der mRNA-Ebene untersucht.

# 4.1.1 Einfluss des extrazellulären Ca<sup>2+</sup> auf die Phorone/BSO- abhängige HO-1 Induktion

Die Inkubation mit Phorone/BSO führte zu einer 6,5fach erhöhten Genexpression im Vergleich zur Kontrolle. Die extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Depletion durch EDTA bewirkte eine Steigerung der HO-1 mRNA Expression auf ca. das 3fache des Kontrollwertes. Die Kombination von Phorone/BSO mit EDTA ergab einen überadditiven Effekt der Genexpression gegenüber der Inkubation mit den einzelnen Substanzen alleine. Die Ergebnisse sind in Abb.10 zusammengefasst. Im Folgenden zeigen die Abb. A jeweils die repräsentativen Northern blots, die Abb. B die densitometrischen Analysen der HO-1 mRNA-Konzentrationen.



#### Abb. 10: Effekt von EDTA auf die Phorone/BSO induzierte HO-1 mRNA Expression:

Gesamt RNA wurde aus Hepatozyten von unmanipulierten Kontrollen bzw. 6h nach Beginn des jeweils letzten Stressereignisses isoliert: Glutathiondepletion (Phorone/BSO; Phorone: 1µl/Schale, BSO: 2mM), extrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Chelatierung (EDTA 10mM). 10µg gepoolte RNA aus 3 parallelen Ansätzen wurden aufgetragen, mit [<sup>32</sup>P]-dCTP markierten HO-1 cDNA-Fragmenten hybridisiert und das densitometrische Signal auf das Signal der ATP-Synthase normiert.

## 4.1.2 Einfluss der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase auf die Phorone/BSO-abhängige HO-1 Genexpression

## 4.1.2.1 Modulation der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Homöostase durch BAPTA-AM

Die Untersuchung der Expression von HO-1 mRNA nach Glutathiondepletion mit Phorone/BSO zeigte eine 5,8fache HO-1 Induktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Depletion mit BAPTA-AM führte zu einer Hemmung dieser durch Phorone/BSO induzierten HO-1 Genexpression bis auf nahezu Kontrollniveau. Nach alleiniger Inkubation der Zellen mit BAPTA-AM war keine Beeinflussung der HO-1 Genexpression im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten (Abb.11).



#### Abb. 11: Effekt von BAPTA-AM auf die Phorone/BSO induzierte HO-1 mRNA Expression:

Gesamt RNA wurde aus Hepatozyten von unmanipulierten Kontrollen bzw. 6h nach Beginn des jeweils letzten Stressereignisses isoliert: Glutathiondepletion (Phorone/BSO; Phorone: 1µl/Schale, BSO: 2mM), zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Chelatierung (BAPTA-AM 33,3µM). 8µg gepoolte RNA aus 3 parallelen Ansätzen wurden aufgetragen, mit [<sup>32</sup>P]-dCTP markierten HO-1 cDNA-Fragmenten hybridisiert und das densitometrische Signal auf das 18S Ribosomenband (Methylenblaufärbung) normiert.

## 4.1.2.2 Modulation der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Homöostase durch Thapsigargin

Die irreversible Hemmung der Ca<sup>2+</sup>-ATPase des endoplasmatischen Retikulums durch Thapsigargin führte zu einer bis zu 3fachen Steigerung der HO-1 mRNA Expression im Vergleich zur Kontrolle. Dabei war eine dosisabhängige Induktion der HO-1 Genexpression zu verzeichnen. Nach Inkubation der Zellen mit der Kombination von Phorone/BSO und Thapsigargin zeigte sich ein überadditiver Effekt in der HO-1 Induktion gegenüber der Genexpression nach Inkubation mit den Einzelsubstanzen. Die volumenangepasste Kontrolle mit dem Lösungsmittel DMSO zeigte keine Induktion (Abb.12).



#### Abb. 12: Effekt der Thapsigargin-Modulation auf die HO-1mRNA Expression:

Gesamt RNA wurde aus Hepatozyten von unmanipulierten Kontrollen bzw. 6h nach Beginn des jeweils letzten Stressereignisses isoliert: Thapsigargin (Thapsigargin  $0,1\mu$ M;  $0,25\mu$ M;  $1\mu$ M), Glutathiondepletion (Phorone/BSO; Phorone:  $1\mu$ l/Schale, BSO:2mM). 10  $\mu$ g gepoolte RNA aus 3 parallelen Ansätzen wurden aufgetragen, mit [<sup>32</sup>P]-dCTP markierten HO-1 cDNA-Fragmenten hybridisiert und das densitometrische Signal auf das Signal der ATP-Synthase normiert.

#### 4.1.2.3 Kombination von BAPTA-AM und Thapsigargin

Durch gezielte Eingriffe in den zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Metabolismus von Hepatozyten mit den zuvor genannten Substanzen BAPTA-AM und Thapsigargin wurde hier die zytosolische Komponente des Ca<sup>2+</sup>-Signalsystems bezüglich ihrer Auswirkungen auf die HO-1 Induktion untersucht. Wie zuvor gezeigt (4.1.2.1) erfolgte nach zytosolischer Ca<sup>2+</sup>-Chelatierung durch BAPTA-AM keine HO-1mRNA Expression, welche jedoch nach Erhöhung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch Thapsigargin deutlich zu beobachten war. Die gleichzeitige Inkubation der Hepatozyten mit beiden Substanzen führte zu einer vollständigen Suppression der durch Thapsigargin ausgelösten HO-1 Induktion (Abb.13).



Abb. 13: Effekt der Kombination von BAPTA-AM und Thapsigargin auf die HO-1mRNA Expression: Gesamt RNA wurde aus Hepatozyten von unmanipulierten Kontrollen bzw. 6h nach Beginn des jeweils letzten Stressereignisses isoliert: Zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Chelatierung (BAPTA-AM 33,3 $\mu$ M), Thapsigargin (Thapsigargin 1 $\mu$ M). 8 $\mu$ g gepoolte RNA aus 3 parallelen Ansätzen wurden aufgetragen, mit [<sup>32</sup>P]-dCTP markierten HO-1 cDNA-Fragmenten hybridisiert und das densitometrische Signal auf das 18S Ribosomenband (Methylenblaufärbung) normiert.

## 4.1.2.4 Modulation der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Homöostase durch Ca<sup>2+</sup>-Ionphor A23187

Durch Permeabilisierung der Plasmamembran für Ca<sup>2+</sup>-Ionen mit Ionophor A23187 erfolgte eine Steigerung der HO-1 Genexpresion im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 2. Die DMSO-Kontrolle zeigte keinen Effekt (Abb.14). In Vorversuchen konnte nach Inkubation mit Ionophor weder eine Zeit- noch eine Konzentrationsabhängigkeit in der HO-1mRNA Expression nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt).



Abb. 14: Auswirkungen der Ca<sup>2+</sup>-Ionophor Modulation auf die HO-1 mRNA Expression:

Gesamt RNA wurde aus Hepatozyten von unmanipulierten Kontrollen bzw. nach 6-stündiger Inkubation mit Ionophor A23187 isoliert: Ionophor 5µM, DMSO 150µl/Schale. 10µg gepoolte RNA aus 3 parallelen Ansätzen wurden aufgetragen, mit [<sup>32</sup>P]-dCTP markierten HO-1 cDNA-Fragmenten hybridisiert und das densitometrische Signal auf das Signal der ATP-Synthase normiert.

## 4.1.3 Einfluss der Kalziumkanalblockade mit Diltiazem und Verapamil auf die Phorone/BSO-abhängige HO-1 Genexpression

Die Glutathiondepletion mit Phorone/BSO führte, wie zuvor beschrieben, zu einer deutlichen Zunahme der HO-1 Genexpression im Vergleich zur Kontrolle. Eine extrazelluläre Kalziumkanalblockade bei gleichzeitiger Glutathiondepletion führte zu einer Zunahme der HO-1 Genexpression um 46-55% bei Diltiazem und 29-68% bei Verapamil und zeigte damit einen überadditiven Effekt im Vergleich zur Inkubation mit den Einzelsubstanzen. Es konnte jedoch keine Korrelation zur Höhe der Konzentrationen der Kalziumkanalblocker festgestellt werden (Abb. 15).



# Abb. 15: Einfluss der extrazellulären Kalziumkanalblockade auf die P/BSO-abhängige HO-1 mRNA Expression:

Gesamt RNA wurde aus Hepatozyten von unmanipulierten Kontrollen bzw. 6h nach Beginn des jeweils letzten Stressereignisses isoliert: Glutathiondepletion (Phorone/BSO; Phorone: 1µl/Schale, BSO: 2mM), Kalziumkanalblocker (DZ bzw. VP: 10µM, 50µM, 200µM), Phorone/BSO plus Kalziumkanalblocker. 10µg gepoolte RNA aus 3 parallelen Ansätzen wurden aufgetragen, mit [<sup>32</sup>P]-dCTP markierten HO-1 cDNA-Fragmenten hybridisiert und das densitometrische Signal auf das Signal der ATP-Synthase normiert.

# 4.2 Abhängigkeit der Induktion der Hitzeschockprotein 70 Genexpression vom zellulären Ca<sup>2+</sup>-Signalsystem in Hepatozyten

Wie schon für die Hämoxygenase-1 beschrieben, wurden die Effekte der unterschiedlichen Eingriffe in die Ca<sup>2+</sup>-Zellhomöostase von Hepatozyten auf die Genexpression des Hitzeschockproteins 70 auf der mRNA-Ebene der Zellen untersucht. Die Zellen wurden, wie bereits dargestellt, 6 Stunden nach Beginn der letzten Modulation geerntet und die mRNA-Konzentrationen mittels Northern blot Analyse bestimmt.

## 4.2.1 Einfluss von intra- und extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Depletion durch EDTA oder BAPTA-AM auf die Phorone/BSO- abhängige hsp70 Induktion

Die Untersuchung der hsp70 Expression nach Glutathiondepletion mit Phorone/BSO zeigte eine Steigerung der Genexpression um fast das 3fache des Kontrollwertes. Durch Inkubation der Hepatozyten mit BAPTA-AM oder EDTA allein erfolgte keine Induktion (Daten nicht dargelegt). Allerdings führten beide Formen der Ca<sup>2+</sup>-Depletion bei gleichzeitiger Glutathiondepletion zu einer vollständigen Hemmung der durch Phorone/BSO ausgelösten hsp70 Genexpression auf Kontrollniveau. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 zusammengefasst. Im Folgenden zeigen die Abb. A jeweils die repräsentativen Northern blots, die Abb. B die densitometrischen Analysen der hsp70 mRNA-Konzentrationen.



# Abb. 16: Einfluss von intra- und extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Depletion auf die P/BSO- abhängige hsp70 mRNA Expression:

Gesamt RNA wurde aus Hepatozyten von unmanipulierten Kontrollen bzw. 6h nach Beginn des jeweils letzten Stressereignisses isoliert: Glutathiondepletion (Phorone/BSO; Phorone: 1µl/Schale, BSO: 2mM), extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Chelatierung (EDTA 10mM), zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Chelatierung (BAPTA-AM 33,3µM). 8µg gepoolte RNA aus 3 parallelen Ansätzen wurden aufgetragen, mit [<sup>32</sup>P]-dCTP markierten hsp70 cDNA-Fragmenten hybridisiert und das densitometrische Signal auf das 18S Ribosomenband (Methylenblaufärbung) normiert.

# 4.2.2 Einfluss des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> auf die Phorone/BSO-abhängige hsp70 Induktion

## 4.2.2.1 Modulation der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Homöostase durch Thapsigargin

Nach irreversibler Hemmung der  $Ca^{2+}$ -ATPase des endoplasmatischen Retikulums durch Thapsigargin erfolgte im Gegensatz zu HO-1 (4.1.2.2) keine hsp70 Induktion. Der Zusatz von DMSO führte zu keiner Genexpression (Abb. 17).



Abb. 17: Effekt von Thapsigargin auf die hsp70 mRNA Induktion

Gesamt RNA wurde aus Hepatozyten von unmanipulierten Kontrollen bzw. nach 6-stündiger Inkubation mit Thapsigargin isoliert: Thapsigargin 1 $\mu$ M, DMSO 3 $\mu$ l/3ml. 10 $\mu$ g gepoolte RNA aus 3 parallelen Ansätzen wurden aufgetragen, mit [<sup>32</sup>P]-dCTP markierten hsp70 cDNA-Fragmenten hybridisiert und das densitometrische Signal auf das Signal der ATP-Synthase normiert.

## 4.2.2.2 Modulation der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Homöostase durch Ionophor A23187

Durch die Permeabilisierung der Plasmamembran für Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem Extrazellulärraum mit Ionophor A23187 konnte eine Zunahme der hsp70 mRNA-Konzentration bis auf das 5fache des Kontrollwertes beobachtet werden. Die Induktion der Genexpression war hier im Gegensatz zu HO-1 abhängig von der Konzentration und Expositionsdauer des Kalziumionophors (Abb.18).





Gesamt RNA wurde aus Hepatozyten von unmanipulierten Kontrollen bzw. nach unterschiedlicher Inkubation mit Ionophor A23187 (Zeit und Dosis) isoliert: Ionophor ( $0,2\mu$ M,  $1\mu$ M,  $5\mu$ M).  $10\mu$ g gepoolte RNA aus 3 parallelen Ansätzen wurden aufgetragen, mit [<sup>32</sup>P]-dCTP markierten hsp70 cDNA-Fragmenten hybridisiert und das densitometrische Signal auf Signal der ATP-Synthase normiert.

## 4.2.3 Einfluss der Kalziumkanalblockade mit Diltiazem und Verapamil auf die Phorone/BSO-abhängige hsp70 Induktion

Wie zuvor beschrieben, erfolgte nach Glutathiondepletion mit Phorone/BSO eine Induktion der hsp70 Genexpression. Dagegen war nach extrazellulärer Kalziumkanalblockade durch Diltiazem bzw. Verapamil in aufsteigenden Konzentrationen keine Induktion der hsp70 Genexpression zu erkennen. Ebenso blieben bei gleichzeitiger Inkubation mit Phorone/BSO und einem Kalziumkanalblocker die hsp70 mRNA-Konzentrationen auf dem nach Glutathiondepletion erreichten Niveau und damit von den Kalziumkanalblockern unbeeinflusst (Abb. 19).



**Abb. 19: Einfluss der Kalziumkanalblockade auf die Phorone/BSO-abhängige hsp70 mRNA Expression:** Gesamt RNA wurde aus Hepatozyten von unmanipulierten Kontrollen bzw. 6h nach Beginn des jeweils letzten Stressereignisses isoliert: Glutathiondepletion (Phorone/BSO; Phorone: 1µl/Schale, BSO: 2mM), Kalziumkanalblocker (DZ bzw. VP: 10µM, 50µM, 200µM), Phorone/BSO plus Kalziumkanalblocker. 10µg gepoolte RNA aus 3 parallelen Ansätzen wurden aufgetragen, mit [<sup>32</sup>P]-dCTP markierten hsp70 cDNA-Fragmenten hybridisiert und das densitometrische Signal auf das Signal der ATP-Synthase normiert.

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der zellulären Stressgenexpression am Beispiel von HO-1 und hsp70 nach oxidativem Stress an isolierten Ratten-Hepatozyten *in vitro* untersucht. Obwohl Arbeiten über eine Vielzahl von Stressereignissen existieren, die zur Induktion der Expression beider Gene führen, ist bisher wenig bekannt über die intrazelluläre Signaltransduktion, die zur Regulation der Genexpression führt. Die hier erhobenen Daten legen eine signifikante Rolle der zellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase in der Regulation der Expression der beiden Stressgene nahe. Diese Beobachtung zeigt den Stellenwert des zellulären Ca<sup>2+</sup>-Signalsystems, dessen Modulation sowohl in der Entwicklung eines hepatozellulären Schadens als auch in der Entwicklung zellulärer protektiver Mechanismen nach oxidativem Stress beteiligt ist.

#### 5.1 Oxidativer Stress

Die Hitzeschockantwort wird durch eine Vielzahl verschiedener Stressereignisse wie Hyperthermie, Inflammation, Hormonstimulation, Wachstumsfaktoren und auch oxidativen Stress induziert. In vorausgegangenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass eine Glutathiondepletion mittels Phorone-Buthioninsulfoximin (Phorone/BSO) ein suffizientes oxidatives Stressmodell darstellt, welches zu einer ausgeprägten HO-1 und hsp70 mRNA Expression nach vier bis sechs Stunden führt (Bauer et al., 1998; Bauer et al., 2003). Die vorliegenden Untersuchungen zeigen eine 6fache Steigerung der HO-1 mRNA Expression bzw. eine 3fache hsp70 mRNA-Expression nach Phorone/BSO-Zufuhr im Vergleich zu Kontrollzellen. Phorone als zeitgleich inkubierten bewirkt Substrat der Glutathion-S-Transferase sowohl eine Glutathiondepletion im Zytosol als auch in den Mitochondrien von Rattenhepatozyten (Traber et al., 1992). Glutathion ist ein wichtiges zelluläres Antioxidans. Als Co-Substrat der Glutathionperoxidase schützt es aerobe Organismen vor der Toxizität freier Sauerstoffradikale, welche besonders die Mitochondrien und die DNA betrifft. Der Glutathion-Pool der Mitochondrien wird durch GSH-Aufnahme dem Zytosol aufgefüllt, da diese selbst kein neues Glutathion generieren aus

(Martensson et al., 1990). Gerade für die vielfältigen mitochondrialen Funktionen ist ein intakter Glutathionhaushalt zur Abwendung von Schäden wie z.B. Oxidation von Pyridinnukleotiden mit nachfolgender Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung erforderlich. Untersuchungen von Strubelt et al. zeigten eine Verstärkung des Ethanol-induzierten hepatozellulären Schadens durch Glutathiondepletion (Strubelt et al., 1987). Der Leberzellschaden, gemessen anhand eines Enzymanstieges von Alaninaminotransferase (ALT), Sorbitoldehydrogenase (SDH) und einer Zunahme des Gesamt-Ca<sup>2+</sup>-Gehaltes in isolierten Rattenlebern, wurde nach vorheriger Phoronebehandlung verstärkt. Allerdings konnten nach Phoronegabe allein sowohl *in vitro* als auch *in vivo* diese Zeichen der Hepatotoxizität nicht festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse nach Phorone/BSO-induzierter Glutathiondepletion eine deutliche Induktion der Genexpression beider Hitzeschockproteine als Zeichen einer hepatozellulären Reaktion zur Protektion.

Somit scheint die Kombination von Phorone und BSO einen aus der Glutathiondepletion resultierenden Stress der gesunden, isolierten Hepatozyten zu verursachen. Während die Phorone-induzierte Aktivierung der Glutathion-S-Transferase keinen Einfluss auf die Neusynthese von Glutathion hat, wird diese durch Buthioninsulfoximin, einem potenten und spezifischen, irreversiblen Inhibitor der y-Glutamatcysteinsynthethase, vollständig blockiert (Griffith et al., 1979). Genutzt wurde diese Eigenschaft von BSO unter anderem in der Onkologie, da die starke Glutathiondepletion (< 20% des Kontrolllevels in Nierenzellen) das al., Tumorgewebe für Chemotherapeutika (Meister et 1979) und Radiatio (Dethmers et al., 1981) sensibilisiert. Allerdings erfolgt diese Abnahme des zellulären GSH-Gehaltes ebenso in gesundem Gewebe. Die Auswirkungen eines chronischen zellulären GSH-Mangels wurden von Thanislass et al. durch in vivo Versuche an Ratten-Lungen untersucht. Dabei konnte ein deutlicher Verlust zellulärer antioxidativer Verteidigungsmechanismen aufgezeigt werden. Neben der verminderten Aktivität der y-Glutamatcysteinsynthethase fiel ebenso ein signifikanter Abfall von SOD, Katalase und Glutathionperoxidase auf. Neben diesem Verlust enzymatischer Verteidigungsmechanismen war auch die Konzentration nichtenzymatischer Antioxidantien wie Ascorbinsäure und  $\alpha$ -Tocopherol reduziert. Der relative Verlust dieser unspezifischen antioxidativen Abwehrsysteme und die verminderte Aktivität der Glutathionperoxidase steigerten wiederum das Substrat für SOD und Katalase. Anhand dieser von Thanislass et al. untersuchten Auswirkungen eines Glutathionmangels auf die verschiedenen Mechanismen des gesamten antioxidativen Systems wurde die Schlüsselrolle des Glutathion in diesem System deutlich. Eine Abnahme der antioxidativen führte schließlich zur gesteigerten Lipidperoxidation Kapazität dieses Systems

(Thanislass et al., 1995). Der Zusammenhang von Glutathiondepletion, Lipidperoxidation, Verlust von Proteinsulfhydrylgruppen und Ca<sup>2+</sup>-Homöostase wurde 1987 von Casini et al. anhand des Brombenzen-induzierten Leberschadens dargestellt. Dem früh auftretenden **GSH-Mangel** nach Brombenzen-Gabe folgte ein signifikanter Verlust von Proteinsulfhydrylgruppen sowohl im gesamten Lebergewebe wie auch in den Mikrosomen und Mitochondrien, welcher wiederum mit der ebenfalls schon früh detektierbaren Lipidperoxidation einherging. Dabei konnte eine strikte Korrelation zwischen Lipidperoxidation und dem Ausmaß der Lebernekrose, gemessen anhand der ALT-Serumaktivität, gezeigt werden. Eine ebenso deutliche inverse Korrelation wurde zwischen der Lipidperoxidation und der Ca<sup>2+</sup>-Sequestrationsaktivität der Mikrosomen und Mitochondrien festgestellt (Casini et al., 1987). Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass der Verlust der Ca<sup>2+</sup>-Retention in engem Zusammenhang mit dem zellulären Verlust von Glutathion und anderen reduzierenden Äquivalenten bzw. molekularen Antioxidantien steht. Daraus konnte geschlossen werden, dass diese, der Glutathiondepletion folgende, gestörte Ca<sup>2+</sup>-Homöostase den BSO-induzierten Zellschaden unter anderem vermittelte (Thanislass et al., 1995). Welche molekularen Mechanismen nun diese intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Sequestrationsstörung hervorrufen, war Gegenstand der Untersuchungen von Bellomo an isolierten Rattenhepatozyten. Nach Gabe von tert-Butylhydroperoxid Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung (t-BOOH) wurde zunächst eine von mitochondrialen und extramitochondrialen Kompartimenten, einhergehend mit einer Oxidation des zellulären Glutathion und NADPH, beobachtet. Zur weiteren Differenzierung wurde die NADPH-Oxidation durch selektive Inaktivierung der Glutathionreduktase aufgehoben, woraufhin sich kein Effekt auf den mitochondrialen Ca<sup>2+</sup>-Pool zeigte, während der Ca<sup>2+</sup>-Verlust des extramitochondrialen Pools akzelerierte. Diese Ergebnisse implizierten eine unterschiedliche Regulation der mitochondrialen (NADPH-abhängigen) und Ca<sup>2+</sup>-Sequestration extramitochondrialen (Glutathion/Sulfhydrylgruppen-abhängigen) (Bellomo et al., 1982). Letztere wurde in weiteren Versuchen derselben Arbeitsgruppe an isolierten Plasmamembranfraktionen von Hepatozyten untersucht. Der inhibitorische Effekt von oxidierenden Substanzen wie z.B. t-BOOH auf die ATP-abhängige Ca<sup>2+</sup>-Pumpe konnte durch die Präsenz von Sulfhydrylgruppen abgewendet werden. Daraus wurde geschlossen, dass freie Sulfhydrylgruppen essentiell für die Aktivität der hepatischen Plasmamembran-Ca<sup>2+</sup>-Translokase sind und dass eine Inhibition dieses Enzyms infolge einer Oxidation solcher Ca<sup>2+</sup>-Homöostase gestörten im Proteinanteile zur oxidativen Stress beiträgt (Bellomo et al., 1983). 1985 fanden Thor et al. heraus, dass auch die ATP-abhängige

 $Ca^{2+}$ -Aufnahme der hepatozellulären Mikrosomen durch Alkylierung oder Oxidierung von Protein-Sulfhydrylgruppen inhibiert wird und damit auch die mikrosomale  $Ca^{2+}$ -Sequestration durch den gleichen Schädigungsmechanismus an dem veränderten hepatozellulären  $Ca^{2+}$ -Metabolismus mit zytosolischer  $Ca^{2+}$ -Überladung im oxidativen Stress beteiligt ist (Thor et al., 1985).

Dass oxidativer Stress nicht nur in einer Blockade der  $Ca^{2+}$ -ATPasen-Aktivität mit konsekutiver zytosolischer  $Ca^{2+}$ -Überladung endet, sondern auch Einfluss auf die  $Ca^{2+}$ -Signaltransduktion in aktivierten Zellen hat, machten Versuche von Elliott et al. an Endothelzellen deutlich. Dabei wurde sowohl der mittels Bradykinin stimulierte  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus dem EZR als auch die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern durch t-BOOH gehemmt. Eine Glutathiondepletion durch zusätzliche Vorinkubation mit BSO zeigte die Rolle des intrazellulären Glutathion in der Modulation der  $Ca^{2+}$ -Signaltransduktion. Dabei wurde die zuvor beobachtete Inhibition des Bradykinin-stimulierten  $Ca^{2+}$ -Einstroms nach t-BOOH-Zufuhr durch BSO noch potenziert. Diese Ergebnisse zeigten, dass ein verminderter zellulärer Gehalt an Glutathion die Effekte von oxidativem Stress, wie z.B. durch Hydrogenperoxide, auf den Rezeptor-vermittelten transmembranären  $Ca^{2+}$ -Einstrom und die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern noch weiter potenziert (Elliott et al., 1995). Glutathion in seinem reduzierten Zustand ist somit in aktivierten Zellen ein wichtiger Schutz vor der Funktionseinschränkung der  $Ca^{2+}$ -abhängigen Signaltransduktion.

Die in der vorliegenden Untersuchung erhobenen Daten zeigen eine deutliche hepatozelluläre Stressgenexpression von HO-1 und hsp70 nach Phorone-BSO-Inkubation. Die zuvor genannten Studien zeigten, dass diese Exposition sowohl in Hepatozyten als auch in anderen Zelltypen zur Glutathiondepletion führt. Diese wiederum induziert neben einer Lipidperoxidation den Verlust essentieller Sulfhydrylgruppen der mitochondrialen und extramitochondrialen Ca<sup>2+</sup>-ATPasen sowie die Oxidation von Pyridinnukleotiden mit folgender gestörter zellulärer Ca<sup>2+</sup>-Homöostase bis hin zur Leberzellnekrose. Aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse und unter Einschluss der bereits diskutierten Arbeiten könnte somit eine Abhängigkeit der hepatozellulären Stressgenexpression vom zellulären Ca<sup>2+</sup>-Metabolismus nach oxidativem Stress vermutet werden. Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht und wird im Folgenden für die beiden untersuchten Stressgene diskutiert.

## 5.2 Hämoxygenase-1

Die Phorone/BSO-induzierte HO-1 Genexpression wurde durch den zytosolisch wirksamen  $Ca^{2+}$ -Chelator BAPTA-AM bis auf Kontrollniveau gehemmt. Im Gegensatz dazu war die HO-1 Induktion durch den extrazellulär wirksamen  $Ca^{2+}$ -Chelator EDTA nicht supprimierbar. Die Genexpression scheint daher abhängig von einem Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu sein, wobei  $Ca^{2+}$  aus dem extrazellulären Pool hierbei offensichtlich keine signifikante Rolle zu spielen scheint. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Tatsache, dass Thapsigargin eine bis zu 3fache, dosisabhängige HO-1 Induktion in isolierten Hepatozyten verursacht.

Die Inkubation mit Thapsigargin führt zu einer Verschiebung von  $Ca^{2+}$  aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) in das zytosolische Kompartiment. Dieser intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Speicher spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Die  $Ca^{2+}$ -Aufnahme in das ER entgegen des Konzentrationsgradienten erfolgt als aktiver Transport über membrangebundene ATPasen.

Gemäß der Assoziation mit dem sarko- und endoplasmatischen Retikulum und ihrer Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit werden diese Enzyme auch als SERCA-ATPasen bezeichnet. Den spezifischsten und potentesten Inhibitor dieser Enzymgruppe stellt das Thapsigargin dar (Christensen et al., 1993; Rasmussen et al., 1978). Während verschiedene Autoren Thapsigargin alle Isoformen dieser SERCA-ATPasen hemmt postulierten, dass (Inesi et al., 1994; Lytton et al., 1991; Sagara et al., 1991), zeigten Versuche von Thastrup et al. an Ratten, dass Thapsigargin die ATPasen des sarkoplasmatischen Retikulums von Herz- und Skelettmuskelzellen nicht beeinflusst (Thastrup et al., 1990). Ursachen dieser unterschiedlichen Ergebnisse sind bisher nicht geklärt. Möglicherweise spielen spezies- bzw. zelltypspezifische Unterschiede eine Rolle. Allerdings konnte in allen Arbeiten, darunter auch in den Versuchen an Rattenhepatozyten von Thastrup, einheitlich gezeigt werden, dass die ATPasen des ER hochspezifisch und irreversibel gehemmt werden, indem Thapsigargin mit dem Ca<sup>2+</sup>-freien Enzym einen sog. "dead-end-complex" bildet. Dies führt zu einer Ca<sup>2+</sup>-Depletion des ER (Jackson et al., 1988) mit einem resultierenden dosisabhängigen Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Thastrup et al., 1987; Thastrup et al., 1990). Andere Kation-ATPasen wie z.B. die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, und Ca<sup>2+</sup>-ATPasen der Plasmamembran werden von Thapsigargin nicht beeinflusst (Lytton et al., 1991).

Bei BAPTA-AM handelt es sich um ein verestertes EGTA-Analogon (Ethylenglycoltetraessigsäure), welches die Zellmembran passiert und im Zytosol in der unveresterten Form  $Ca^{2+}$  und andere Kationen bindet (Strayer et al., 1999; Tsien, 1980). Messungen der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration von Gissel et al. an Rattenneuronen belegten eine vollständige Suppression der Thapsigargin-induzierten zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Aktivitätssteigerung bis auf Kontrollniveau (Gissel et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte die durch das oxidative Stressmodell mit Phorone/BSO ausgelöste Induktion der HO-1 Genexpression ebenfalls durch alleinige Inkubation mit Thapsigargin erzeugt werden. Da die Vorinkubation mit BAPTA-AM sowohl die Phorone/BSO- als auch die Thapsigargin-induzierte HO-1 mRNA Expression vollständig supprimierte, scheint folglich ein Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Aktivität, und nicht die Ca<sup>2+</sup>-Depletion des ER, für die HO-1 Genexpression verantwortlich zu sein.

Im Gegensatz dazu beobachtete die Arbeitsgruppe um Linden eine Thapsigargin-induzierte HO-1 Genexpression an Rattenneuronen, welche durch Vorinkubation mit BAPTA-AM nicht supprimierbar war. Daher wurde in diesen Zellen die Ca<sup>2+</sup>-Depletion des ER und nicht die korrespondierende Steigerung der zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Aktivität als Triggerfaktor der Stressgenexpression angesehen (Linden et al., 1998). Choi et al. zeigten 1994 an menschlichen Fibroblasten eine Suppression der durch Prostaglandin A2-Stimulus induzierten HO-1 Expression durch BAPTA-AM (Choi et al., 1994). Ebenso präsentierte Terry 1999 eine HO-1 Genexpression in menschlichen Gefäßendothelzellen nach Exposition mit den Zytokinen Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und Interleukin-1 $\alpha$ , welche durch Inkubation mit BAPTA-AM ebenfalls inhibiert werden konnte (Terry et al., 1999). Die Daten dieser zwei Studien korrelieren eng mit den hier vorliegenden Ergebnissen und stützen die Hypothese, dass die Steigerung der zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Aktivität eine bedeutende Rolle in der Induktion der HO-1 Genexpression nach Stressereignissen zu spielen scheint.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Inkubation von Phorone/BSO mit Thapsigargin einen überadditiven Effekt in der HO-1 Genexpression zur Folge hatte. Der Effekt der Glutathiondepletion auf die HO-1 mRNA Induktion scheint somit nicht ausschließlich über  $Ca^{2+}$ -Verschiebungen aus dem ER in das zytosolische Kompartiment vermittelt zu werden, sondern über weitere signifikante Mechanismen in der Kaskade der Signaltransduktion zur Induktion der HO-1 Genexpression. Während Thapsigargin hochselektiv die  $Ca^{2+}$ -ATPase des ER inhibiert, werden durch die Folgen der Glutathiondepletion die  $Ca^{2+}$ -Sequestrationsaktivität sowohl von Plasmamembran, Mikrosomen als auch Mitochondrien gehemmt. Somit wäre der überadditive Effekt in der

Stressgenexpression nach Kombination von Thapsigargin mit Phorone/BSO zumindest im Ansatz erklärbar.

Nach Inkubation der Hepatozyten mit dem Kalzium-Ionophor A23187 erfolgte im Vergleich zu Thapsigargin lediglich eine geringe HO-1 mRNA Induktion auf das 2fache des Kontrollwertes. Ähnliche Ergebnisse zeigten die zuvor bereits angeführten Versuche von Terry et al. an menschlichen Gefäßendothelzellen, die nach Inkubation mit Ionophor allein eine nicht signifikante Induktion der HO-1 Expression aufwiesen. Eine gleichzeitige Exposition von Zytokinen und Ionophor zeigte sogar eine um 90% geringere Stressgenexpression als die Inkubation von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  allein (Terry et al., 1999). Das Kalzium-Ionophor A23187 führt, wie Thapsigargin und Phorone/BSO, zum Anstieg der zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Allerdings permeabilisiert das Ionophor die Zellmembran für Kalziumionen aus dem Extrazellulärraum (Burgess et al., 1979). Ionophor A23187 bildet lipidlösliche Komplexe mit Kalziumionen und transportiert diese hochselektiv über biologische Membranen. Des Weiteren führt es zur Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus zytosolischen Vesikeln.

Eine zunächst erwartete Steigerung der stressinduzierten HO-1 Genexpression nach Ionophor-Zufuhr konnte in der zuvor genannten Arbeit von Terry nicht bestätigt werden. Interessanterweise wurde nach Inkubation von Ionophor mit einem Aktivator der Proteinkinase-C (PK-C) eine kaum verminderte Stressgenexpression im Vergleich zur Zytokinexposition allein beobachtetet (Terry et al., 1999). Daraus lässt sich vermuten, dass eine Aktivierung der PK-C eine Protein-Kinase-Kaskade (MAP-Kinasen (mitogen-aktivierte Protein-Kinasen)) auslöst, welche in die Induktion der HO-1 Expression involviert ist. Eine deutliche HO-1 Expression nach Gabe eines Phosphatasehemmers untermauerte diese Vermutung (Terry et al., 1999). Möglicherweise war der Ionophor-Effekt auf die Zytokininduzierte HO-1 Expression durch einen Angriffspunkt vor der PK-C-Aktivierung in der Ca<sup>2+</sup>-Signalkaskade zu erklären. Aufgrund der ähnlichen Versuchsresultate wäre eine solche Genregulation in Hepatozyten ebenfalls denkbar. Demnach spielt dieser extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Pool eine untergeordnete Rolle in der HO-1 mRNA Induktion. Scheinbar ist nicht nur eine Steigerung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Aktivität, sondern auch die Quelle der Kalziumionen bzw. die Balance der feinregulierten, im Fließgleichgewicht stehenden unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen von Intra- und Extrazellulärraum einerseits sowie der intrazellulären Kompartimente andererseits entscheidend.

In weiteren Versuchen erfolgte eine Modulation dieses extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Pools. Nach Inkubation mit dem extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Chelator EDTA, welcher im Gegensatz zu allen vorhergehenden Substanzen zunächst zu keiner direkten Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration führt, wurde eine deutliche HO-1 Induktion bis zum 3,5fachen des Kontrollwertes beobachtet. Bei gleichzeitiger Exposition mit Phorone/BSO zeigte sich sogar ein additiver Effekt der Stressgenexpression, woraus sich schließen lässt, dass beide Substanzen über verschiedene Mechanismen zur Induktion der Genexpression führen. Die hier beobachtete Stressgenexpression nach EDTA- und Phorone/BSO-Inkubation war von der Ausprägung vergleichbar mit der nach Thapsigargin- und Phorone/BSO-Inkubation. Möglicherweise findet durch die EDTA-induzierte extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Chelatierung ein Ca<sup>2+</sup>-Shift entlang des neuen Konzentrationsgradienten vom Intra- zum Extrazellulärraum statt. Die zytosolische Kalziumkonzentration könnte kompensatorisch durch eine Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern wie den Mitochondrien, dem ER, etc. aufrechterhalten werden, so dass schließlich ein Thapsigargin-ähnlicher Effekt resultieren würde. Eine solche Erklärung der deutlichen HO-1 Genexpression nach EDTA-Zufuhr wäre prinzipiell denkbar, lässt sich aber anhand der hier vorliegenden Untersuchungen nicht sicher belegen.

Ähnliche Überlegungen stellte Beales 1985 an, als Versuchsergebnisse zeigten, dass ein Ca2+-Einstrom aus dem EZR keine Rolle im Paracetamol-induzierten Leberzellschaden spielte. Dabei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Inkubation im Ca<sup>2+</sup>-freien Medium auch bei Kontrollzellen einen zellulären Stressfaktor darstellte und in einem deutlich messbaren hepatozellulären Schaden resultierte, welcher durch Anreicherung des Mediums mit Ca<sup>2+</sup> vermindert werden konnte. Paradoxerweise wies die Gabe von EDTA wiederum einen zytoprotektiven Effekt sowohl auf Kontroll- als auch auf Paracetamol-gestresste Zellen mit einer Zunahme der Zellvitalität bis fast auf Kontrollniveau auf (Beales et al., 1985). Nach Modulation der extrazellulären Kalziumkonzentration konnten diese Auswirkungen auf die Vitalität von Hepatozyten sowohl von Reed et al. 1990 als auch von Thomas et al. 1988 bestätigt werden. Diese Studien zeigten, dass Veränderungen der extrazellulären Kalziumkonzentration ebenfalls Auswirkungen auf die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Balance hatten und so zum oxidativen Zellschaden führten. In Abwesenheit von extrazellulärem Ca<sup>2+</sup> konnte eine gesteigerte Bildung von Malondialdehyd (MDA), Oxidation von Proteinsulfhydrylgruppen sowie zelluläre Freisetzung von  $K^+$  und Laktatdehydrogenase (LDH) als Zeichen eines Zellunterganges beobachtet werden (Reed et al., 1990; Thomas et al., 1988). Der Zusatz von Ca<sup>2+</sup> in das extrazelluläre Medium zeigte einen dosisabhängigen Rückgang dieser

Stressparameter. Die inverse Beziehung von extrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Konzentration und MDA-Bildung sowie der protektive Effekt verschiedener Antioxidantien und Fe-Chelatoren ließen vermuten, dass die Bildung von Sauerstoffradikalen zum oxidativen hepatozellulären Schaden führte. Der zytoprotektive Effekt von EGTA (Ethylenglycoltetraessigsäure) nach Zusatz in ein  $Ca^{2+}$ -freies Medium war ein weiterer Hinweis dafür, dass intrazelluläre Kalziumionen eine Rolle in der Induktion des Zellschadens spielen.

Aufgrund der zentralen Rolle der Mitochondrien in der zellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase wäre es denkbar, dass eine Abnahme der extrazellulären Kalziumkonzentration Auswirkungen auf die Mitochondrienfunktion hat. Unterstützt wird diese Hypothese durch den schnellen und fast vollständigen Verlust des mitochondrialen Glutathions im Ca<sup>2+</sup>-freien Medium. Übertragen auf die hier beobachtete deutliche Induktion der HO-1 Genexpression nach EDTA-Inkubation ist es vom Mechanismus daher auch denkbar, dass die Abnahme der extrazellulären Kalziumkonzentration über eine Störung der gesamten intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase zum oxidativen Zellschaden mit nachfolgender ähnlicher Stressgenexpression wie durch Glutathiondepletion nach Phorone/BSO-Gabe führt.

Weitere Untersuchungen zur Rolle des Ca<sup>2+</sup>-Flusses aus dem extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Pool in das zytosolische Kompartiment erfolgten durch Zusatz von Kalziumkanal-Blockern. Verwendet wurden Diltiazem und Verapamil als klassische Vertreter der Phenylalkylamine bzw. Benzothiapine - zwei Hauptklassen der Kalziumkanal-Blocker. Dabei zeigte sich bei beiden Substanzen eine geringe, dosisunabhängige HO-1 Genexpression. Nach Glutathiondepletion mit Phorone/BSO, welche in diesen Zellen eine 30fache HO-1 Expression verursachte, konnte unter gleichzeitiger Zufuhr eines Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten eine überadditive Steigerung dieser Stressgenexpression um 46-55% bei Diltiazem sowie um 29-68% bei Verapamil beobachtet werden, welche nicht mit der Konzentration korrelierte. Aufgrund des potenzierenden Effektes muss es sich hierbei um verschiedene, jedoch abhängige Mechanismen von Phorone/BSO und den Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten handeln. Die Kalziumkanal-Blockade führt nach pathophysiologischem und pharmakologischem Verständnis weder zu einem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration noch zu einem veränderten Konzentrationsgradienten zwischen Extra- und Intrazellulärraum, was einen Teil des zellulären Mechanismus darstellen könnte, der zur Genexpression führt.

In zahlreichen vorausgehenden Arbeiten wurde in verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Stressmodellen ein deutlicher hepatoprotektiver Effekt der Kalziumkanal-Blocker beschrieben (Farghali et al., 2000; Wu et al., 1995). Im Modell der gramnegativen Sepsis konnte nach

Gabe von Diltiazem eine Reduktion der Akut-Phase Reaktion mit Verminderung von Laktatfreisetzung, Akut-Phase Proteinen, Fieber und Letalität beobachtet werden (Rose et al., 1994). Ähnliche Ergebnisse zeigten Versuche von Maitra und Wang an Rattenlebern am Modell des hämorrhagischen Schocks. Die Perfusion mit Diltiazem führte zur Normalisierung von Herzfrequenz und kardialer Auswurfleistung, des Blutzuckerspiegels, des effektiven hepatischen Blutflusses sowie der hepatischen Mikrozirkulation, zu erhöhter Zellvitalität bei reduzierter LDH-Freisetzung (Thurman et al., 1988) und verbesserter Überlebensrate (Maitra et al., 1991; Wang et al., 1991). Da es sich hierbei um in vivo Versuche handelte, blieb unklar, welche Zellen überhaupt Effektzellen der Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten Endothelzellen, Parenchymzellen, hepatische Sternzellen. waren: Kupfferzellen, Möglicherweise wird der in den verschiedenen Untersuchungen beobachtete hepatoprotektive Effekt der Kalziumkanal-Blocker zumindest teilweise durch die in dieser Studie in vitro gezeigte HO-1 Expression der Hepatozyten vermittelt.

Wie zuvor beschrieben hat die Hämoxygenase-1 über ihre Reaktionsprodukte sowohl vasodilatierende (CO) als auch antioxidative (Bilirubin) und damit organprotektive Eigenschaften. Des Weiteren wirken die Kalziumkanal-Blocker selbst vasodilatierend, worauf sich ihre Indikation z.B. in der Therapie der arteriellen Hypertonie gründet, und damit über eine Verbesserung der zellulären Energie- und Sauerstoffversorgung aufgrund eines gesteigerten regionalen Blutflusses hepatoprotektiv.

Auf zellulärer Ebene kann die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigte Zellreaktion in Form einer Induktion der Stressgenexpression einerseits als Zeichen einer hepatozellulären Schädigung durch die Kalziumkanal-Blocker andererseits als direkte Aktivierung eines protektiven Mechanismus interpretiert werden. Der genaue Wirkmechanismus der Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten in Hepatozyten ist bislang unklar. Die zuvor beschriebenen protektiven Effekte, welche sich überwiegend auf den Reperfusionsschaden bezogen, konnten von Gasbarrini et al. für die Anoxie-Phase in einem I/R-Modell an isolierten Hepatozyten nicht bestätigt werden. Die Gabe von Verapamil, Nifedipin oder Diltiazem während der Ischämie-Phase konnte weder den massiven Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration noch den zellulären LDH-Verlust verhindern (Gasbarrini et al., 1992; Gasbarrini et al., 1993). Es konnte weiter gezeigt werden, dass der zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsanstieg in Hepatozyten sowohl nach Ischämie (Gasbarrini et al., 1992) als auch nach Hormoninduktion (Mauger et al., 1988) einen biphasischen Verlauf aufweist. Dabei wird der initiale Ca<sup>2+</sup>-peak durch eine Freisetzung aus intrazellulären Speichern hervorgerufen, während die zweite anhaltende Phase durch Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem Extrazellulärraum zustande kommt. Diese zweite Phase der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationssteigerung konnte nur durch wesentlich höhere Dosen der Kalziumkanal-Blocker gehemmt werden, als zur Inhibition von "voltage-operated-calcium-channels" (VOCC) erforderlich sind. Die VOCC werden hochspezifisch von Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten blockiert und sind normalerweise in exzitatorischen Zellen von Herz- und Skelettmuskel zu finden. Daher muss davon ausgegangen werden, dass diese Kalziumkanäle in Hepatozyten wahrscheinlich nicht exponiert sind und die Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten in höherer Dosierung unspezifisch sowohl an "receptor-operated-calciumchannels" (ROCC) als auch an anderen Kalziumkanälen wirken. Die Öffnung von ROCC erfolgt nach einer Hormon-Rezeptor-Bindung und G-Protein-stimulierter Freisetzung der "second-messenger" Diacylglycerin (DG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) (Mauger et al., 1988). Der zunächst von Wu et al. 1995 postulierte protektive Effekt der Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten auf die Brombenzen-induzierte Toxizität in Hepatozyten wies ebenfalls eine deutliche Dosisabhängigkeit auf. Die Inhibition der ROCC durch Verapamil, Nifedipin und Diltiazem erfolgte in wesentlich höheren Konzentrationen (100-200µM) als für den zytoprotektiven Effekt erforderlich (15-45µM). Eine Steigerung der Diltiazem-Konzentration auf 45µM nach Brombenzen-Exposition zeigte schon eine Abnahme des protektiven Effektes und sogar eine höhere LDH-Freisetzung als nach Brombenzen allein (Wu et al., 1995).

Eine hepatotoxische Wirkung von Diltiazem wurde ebenfalls von Yamamoto et al. 1992 beobachtet (Yamamoto et al., 1992). Die Diskrepanz der Konzentrationen, welche für die Zellprotektion einerseits und für die Blockade von ROCC andererseits erforderlich sind, impliziert, dass andere Mechanismen als die Kalziumkanalblockade für den protektiven Effekt nach oxidativem Stress verantwortlich sind. Dazu gehören vielfältige unspezifische zelluläre Effekte wie Antagonismus an α-adrenergen Rezeptoren (Godfraind et al., 1986), Hemmung des Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Antiporters (Erdreich et al., 1983; Takeo et al., 1985), Stimulation der ATP-abhängigen Ca<sup>2+</sup>-Pumpe sowie der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (David-Dufilho et al., 1984; Pan et al., 1984), Hemmung der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Wang et al., 1984) sowie Inhibition der Bildung von Sauerstoffradikalen (Simchowitz et al., 1979), über welche die Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten möglicherweise protektiv wirken.

Die Arbeitsgruppe um Gasbarrini konnte im I/R-Modell an isolierten Hepatozyten eine direkte Korrelation zwischen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration und Zellschaden, gemessen anhand der LDH-Freisetzung, aufzeigen. Der Zusatz von Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten im Konzentrationsbereich von 100nM-10µM während des oxidativen Stresses hatte keine Auswirkungen auf den biphasischen Verlauf der intrazellulären

Kalziumkonzentration. Daher musste der Kalziumioneneinstrom aus dem Extrazellulärraum über Mechanismen erfolgen, die nicht durch  $Ca^{2+}$ -Antagonisten inhibierbar waren. Welche Kanäle bzw. Transporter dabei involviert sind, ist bislang unklar. Möglicherweise ist eine vermehrte Aktivität des Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Antiporters im "reversed mode" im oxidativen Stress beteiligt. Während nach Verapamil-Gabe neben der unveränderten Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auch eine gleich bleibende LDH-Freisetzung beobachtet wurde, führte die Exposition mit 1µM-10µM Diltiazem und Nifedipin zu einer doppelten bis dreifachen LDH-Freisetzung (Gasbarrini et al., 1993). Daher muss hier sogar noch ein weiterer zellschädigender Mechanismus neben der Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration vorliegen. Darüber hinaus wurden bei allen drei Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten bisher klinisch hepatotoxische Effekte beim Menschen beschrieben: Verapamil kann zur Hepatitis (Burgunder et al., 1994) und Diltiazem zur granulomatösen Hepatitis (Toft et al., 1991; Traverse et al., 1994) führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Inkubation mit den Kalziumkanal-Blockern Verapamil und Diltiazem allein eine geringe Steigerung der HO-1 Genexpression beobachtet. Die überadditive HO-1 mRNA Expression nach Kombination von oxidativem Stress und Kalziumkanal-Blockade lässt, analog der Ergebnisse von Gasbarrini et al., auf einen zusätzlichen Stressor auf die Hepatozyten durch Verapamil und Diltiazem schließen. Da diese Substanzen, zumindest im Konzentrationsbereich von 10µM-50µM, die zytosolische Kalziumkonzentration nicht beeinflussen, mag hier ein weiterer zellschädigender Mechanismus vorliegen. Ob die höher dosierte Gabe von 200µM Verapamil bzw. Diltiazem über eine Blockade von ROCC oder unspezifischen Kalziumkanälen zu einer Abnahme der intrazellulären Kalziumkonzentration führte, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Da jedoch kein signifikanter Unterschied der Stressgenexpression in Abhängigkeit der Konzentrationen der Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten beobachtet wurde, lässt sich vermuten, dass die Kalziumkanal-Blocker in allen drei verwendeten Konzentrationen gleichsam wirken. Eine Hemmung des  $Na^+/Ca^{2+}$ -Antiporters oder eine direkt toxische Wirkung der  $Ca^{2+}$ -Antagonisten auf Hepatozyten, welche dann im Phorone/BSO-Modell zur Potenzierung der Stressgenexpression führt, wäre denkbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durch Glutathiondepletion induzierte HO-1 Genexpression abhängig von einem, durch den zytosolisch wirksamen Ca<sup>2+</sup>-Chelator BAPTA-AM supprimierbaren, Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration zu sein scheint. Da durch den extrazellulär wirksamen Ca<sup>2+</sup>-Chelator EDTA keine Suppression der Induktion erfolgt, scheint vor allem eine Erhöhung der HO-1 zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-speichernden intrazellulären Kalziumkonzentration Kompartimenten aus (ER, Calcisomen) verantwortlich zu sein. Diese Annahme wird durch die dosisabhängige Induktion der HO-1 Genexpression durch Thapsigargin und eine nur geringe, nicht dosisabhängige Induktion durch Ionophor unterstützt. Die überadditive HO-1 Genexpression nach Kombination von Glutathiondepletion und Thapsigargin lässt darauf schließen, dass die hochselektive Hemmung der Ca<sup>2+</sup>-ATPase des ER durch Thapsigargin sowie die Inhibition der Ca<sup>2+</sup>-Sequestrationsaktivität nach Phorone/BSO eine potenzierende Wirkung haben und somit durch verschiedene Mechanismen Einfluss auf die zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Regulation und folgende Stressgenexpression haben. Aufgrund der fehlenden Hemmung der HO-1 Induktion sowohl durch EDTA als auch durch die Kalziumkanal-Blocker Verapamil und Diltiazem scheint eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration aus dem extrazellulären Medium keine Rolle zu spielen. Die sogar gesteigerte Genexpression weist auf zusätzliche Mechanismen hin, die hier involviert sein müssen. Diese Mechanismen können sowohl Ca<sup>2+</sup>-abhängig als auch Ca<sup>2+</sup>-unabhängig sein. Eine Störung der gesamten zellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase mit folgendem oxidativem Zellschaden und Auswirkungen auf die normale Mitochondrienfunktion, eine Aktivierung des Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauschers im "reversed mode" mit zytosolischer Ca<sup>2+</sup>-Überladung oder eine Potenzierung des zellulären Na<sup>+</sup>-overloads nach zusätzlichem oxidativen Stress als Folge eines verminderten Ca<sup>2+</sup>-vermittelten Na<sup>+</sup>-Ausstroms bei extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Depletion werden diskutiert. Ebenso wird der hier aufgrund der Stressgenexpression als zellschädigend interpretierte Effekt der Kalziumkanal-Blocker auf die Hepatozyten in der Literatur von zytoprotektiv bis zytotoxisch kontrovers diskutiert. Da für den zuvor erläuterten biphasischen Verlauf der zytosolischen Kalziumkonzentration nach oxidativem Stress, Hyperthermie oder Hormon-Rezeptor-Aktivierung die zweite Phase durch Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem Extrazellulärraum zustande kommt, ist es denkbar, dass für die Induktion der HO-1 Genexpression nur der initiale kurze Ca<sup>2+</sup>-peak, hervorgerufen durch zytosolischen Einstrom aus intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speichern, eine signifikante Rolle spielt und damit den eigentlichen Triggermechanismus für die nachfolgende Signaltransduktionskaskade darstellt.

### 5.3 Hitzeschockprotein 70

Das hier verwendete oxidative Stressmodell durch Phorone/BSO führte zu einer 3fachen Steigerung der hsp70 mRNA Konzentration im Vergleich zu Kontrollversuchen. Wie auch für das HO-1 Gen gezeigt, wurde diese Genexpression durch Vorinkubation mit dem zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Chelator BAPTA-AM vollständig inhibiert. Im Gegensatz zu HO-1 wurde die hsp70 Genexpression in diesem Stressmodell nach extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Depletion durch EDTA ebenfalls bis auf Kontrollniveau gehemmt. Diese Daten legen, wie auch für die Hämoxygenase-1, eine signifikante Rolle der zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Aktivitätssteigerung in der hsp70 Genexpression in diesem oxidativen Stressmodell nahe. Darüber hinaus scheint allerdings, im Gegensatz zur HO-1 Genregulation, der extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Pool eine wichtige Rolle bei der zellulären Signaltransduktion zu spielen.

Die Arbeitsgruppe um Kiang zeigte 1994 in Versuchen an menschlichen Epidermoidzellen nach Hitzeschock eine eindeutige Abhängigkeit der Genexpression von einem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration. Diese wiederum wies eine Abhängigkeit von der extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auf, da sowohl die Vorinkubation mit BAPTA-AM als auch mit EGTA zu einer vollständigen Depletion der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bis unter Kontrollniveau führte (Kiang et al., 1994). Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen konnte jedoch sowohl nach intra- als auch nach extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Chelatierung noch eine geringe (3fach versus Hitzeschock-Zellen 13fach) hsp70 mRNA Expression aufgezeigt werden. Aufgrund der fehlenden vollständigen Inhibition der Hitzeschockantwort wurden parallele Ca<sup>2+</sup>-abhängige und –unabhängige Regulationsmechanismen diskutiert. Im gleichen Versuchsmodell an Mammatumorzellen (Kiang et al., 1998) hatte Hitzeschock ebenfalls eine Steigerung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch Einstrom der Kalziumionen aus dem Extrazellulärraum zur Folge. Während die Vorinkubation mit BAPTA-AM hier zu einer fast vollständigen Inhibition der hsp70 Genexpression führte, wurde nach EGTA-Zufuhr, im Gegensatz zu der zuvor genannten Arbeit, überhaupt kein hemmender Effekt auf die Stressgenexpression beobachtet. Daher wurde angenommen, dass der extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Pool zwar die Quelle der Kalziumionen zur Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration nach Hitzeschock war, an der hsp70 Induktion jedoch noch Ca2+-unabhängige Signaltransduktionswege beteiligt gewesen sein müssen. Des dieses Gen von zelltypspezifischen unterschiedlichen Weiteren muss auch für

Signaltransduktionsmechanismen bezüglich der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen hsp70 Expression ausgegangen werden.

Ein weiteres Beispiel für diese interzellulär unterschiedlichen Wege der Induktion der Stressgenexpression sind Versuche von Drummond et al. 1988 an Drosophila melanogaster-Zellen. Hitzeschock führte in Speichelzellen zu einem 10fachen, in embryonalen Zellen zu einem 3fachen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration. Da eine während des Hitzeschocks durchgeführte extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Depletion durch EDTA keinen Einfluss auf die Steigerung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration hatte und eine extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Chelatierung vor Beginn der Hyperthermie diese auch nicht inhibieren, sondern nur vermindern konnte, wurde angenommen, dass der im Hitzeschock auftretende zytosolische Kalziumkonzentrationsanstieg durch Freisetzung der Ionen aus intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Chelatierung keinen inhibitorischen Effekt auf die Genexpression von hsp70 und einer weiteren Reihe von Hitzeschockproteinen. Daher wurde, im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen, von Drummond et al. postuliert, dass die Induktion der hsp-Synthese, zumindest in diesem Zelltyp, vollkommen unabhängig von einer zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Aktivitätssteigerung sei (Drummond et al., 1988).

Die zuvor zitierte Arbeit von Choi et al. an menschlichen Fibroblasten zeigte, im Gegensatz dazu, nach PGA2-induziertem Wachstumsstillstand neben HO-1 ebenfalls eine deutliche hsp70 Expression. Analog zu den hier dargestellten Resultaten konnte nach Vorinkubation mit BAPTA-AM eine vollständige Suppression beider Stressgenexpressionen beobachtet werden. Ein PGA2-induzierter Wachstumsstillstand resultierte in einem kurzen, schnellen Anstieg der zytoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration, einem sog.  $Ca^{2+}$ -Spike, welche dann über ein niedrigeres Plateau-Level langsam zum Kontrollniveau abnahm. In nicht proliferierenden Zellen wurde dieser Ca<sup>2+</sup>-spike nach PGA2-Zufuhr, einhergehend mit einer fast fehlenden Stressgenantwort, nicht beobachtet. Von den Autoren wurde dieser frühe Ca<sup>2+</sup>-spike daher als möglicher Triggerfaktor in der PGA2-induzierten hsp-Synthese angesehen (Choi et al., 1994). Ebenso präsentierten Yamamoto et al. eine hsp70 Genexpression in proximalen Tubulusepithelzellen von Ratten nach Hitzeschock. Der stressinduzierte Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration erfolgte dabei durch Einstrom der Ionen aus dem Extrazellulärraum. Während nach Vorinkubation der Zellen mit EGTA, trotz vollständiger Hemmung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsanstieges, nur eine Reduktion der hsp70 Genexpression auf ca. 60% erfolgte, konnte nach zytosolischer Ca<sup>2+</sup>-Chelatierung mit Quin2 eine vollständige Inhibition der hsp70 mRNA-Synthese bis auf Kontrollniveau beobachtet werden (Yamamoto et al., 1994). Die Autoren postulierten daher, dass die verbleibende Stressgenexpression nach EGTA-Zufuhr möglicherweise durch einen zusätzlichen EGTA-induzierten Zellschaden hervorgerufen wurde, wie bereits für das HO-1 Gen diskutiert, oder dass die zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch Chelatierung mit Quin2 in größerem Ausmaß erniedrigt wird als nach EGTA.

Im Einklang mit den hier erhobenen Daten zeigten Lamarche et al. 1985, dass eine extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Chelatierung durch EGTA die hsp-Synthese, darunter auch hsp70, in Rattenleberzellen nach Hitzeschock inhibierte. Allerdings konnte dieser Effekt nur beobachtet werden, wenn eine Inkubation mit EGTA vor dem eigentlichen Stressereignis erfolgte. Die Zufuhr von EGTA während oder nach Hitzeschock hatte hingegen keinen Einfluss mehr auf die stressinduzierte hsp70 mRNA Expression, so dass von einem frühen Ca2+-abhängigen Ereignis in der durch den Hitzeschock induzierten Signalkaskade ausgegangen werden muss. Obwohl im EGTA-haltigen Medium die hsp-Synthese blockiert wurde, konnte in einem prolongierten, 4-stündigen Hitzeschock eine um 10<sup>3</sup> fach gesteigerte Zellvitalität im Vergleich zum Ca<sup>2+</sup>-haltigen Medium beobachtet werden. Nach anschließender Gabe in ein normales, Ca<sup>2+</sup>-haltiges Wachstumsmedium zeigten die Hepatozyten wieder eine normale Thermosensitivität mit fast vollständigem Vitalitätsverlust der Zellen. Daher muss hier dem EGTA eine auch den Hitzeschockproteinen zugeschriebene protektive Wirkung auf die Zellvitalität im Hitzeschock zugesprochen werden (Lamarche et al., 1985). Möglicherweise ist eine Hemmung des zum Zelltod führenden zellulären "Ca<sup>2+</sup>-overload" als Ursache anzusehen. Allerdings bezieht sich diese protektive Wirkung wahrscheinlich nur auf die isolierten Hepatozyten selbst, da die dort synthetisierten hsp ihre protektive Wirkung primär auf andere Zellen des Organs ausüben. Die aufgeführten Ergebnisse der verschiedenen Studien lassen letztendlich auf sehr komplexe, unterschiedliche, zelltypspezifische wie auch Ca<sup>2+</sup>-abhängige Ca<sup>2+</sup>-unabhängige. Stressfaktor-bedingte, sowohl als auch Regulationsmechanismen der hsp70 Genexpression schließen.

Die zuvor aufgestellte Hypothese, dass die in dieser Arbeit durch Phorone/BSO erzeugte Induktion der hsp70 Genexpression vor allem durch eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration aus dem extrazellulären Medium bedingt ist, wird durch die gesteigerte hsp70 mRNA Transkription durch Ionophor A23187 sowie die fehlende mRNA-Synthese durch Thapsigargin unterstützt. Nach Erhöhung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration aus intrazellulären Speichern mit Thapsigargin (Inesi et al., 1994; Jackson et al., 1988; Thastrup et al., 1987; Thastrup et al., 1990) konnte, im Gegensatz zur deutlichen Induktion der HO-1-Antwort, überhaupt keine hsp70 Genexpression beobachtet werden. Dagegen führte die Permeabilisierung der Zellmembran für Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem Extrazellulärraum durch Ionophor (Burgess et al., 1979; Pressman, 1976) zu einer deutlichen dosis- und zeitabhängigen hsp70 Induktion bis auf das 5fache des Kontrollwertes, während hier für HO-1 nur eine geringe mRNA Expression beobachtet wurde.

Gegensätzliche Ergebnisse dazu zeigte eine Studie von Elia et al. 1996 anhand einer Hitzeschock-induzierten hsp70 Genexpression in menschlichen Leukämiezellen. Die zusätzliche Inkubation der Zellen mit Ionophor A23187 führte neben einer "glucose-regulated protein" (grp)-78 Induktion zu einer fast vollständigen Inhibition der hsp70 mRNA-Synthese. Dieser Effekt trat jedoch nur auf, wenn Ionophor während des Hitzeschocks zugeführt wurde. Eine Inkubation vor oder nach dem Hitzeschock hatte keinen hemmenden Effekt auf die hsp70 Induktion. Daher schien dieser blockierende Effekt nicht auf einem durch das Ca<sup>2+</sup>-Ionophor verursachten generalisierten irreversiblen Zellschaden, sondern eher auf einem frühen Ereignis in der Signaltransduktion der hsp70-Genexpression zu beruhen. Die durch Ionophor induzierte Hemmung der hsp70 mRNA-Synthese konnte nicht durch Thapsigargin, welches ebenfalls eine grp78 Synthese induzierte, imitiert werden, so dass weder die grp78 mRNA Expression noch die Depletion der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher diesen inhibitorischen Effekt vermittelten. Interessanterweise wurde dagegen nach extrazellulärer Ca2+-Depletion durch EGTA die Ionophor-induzierte Blockade der Hitzeschockantwort aufgehoben. Daher muss hier davon ausgegangen werden, dass der Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem Extrazellulärraum, entgegen der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse, eine inhibitorische Wirkung auf die hsp70 Genexpression nach Hitzeschock hatte (Elia et al., 1996).

In der bereits zitierten Arbeit von Kiang et al., in der Hitzeschock in menschlichen Epidermoidzellen zu einer Induktion der hsp70 Genexpression nach Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration in Abhängigkeit von der extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führte, konnte nach alleiniger Ionophor-Zufuhr keine hsp70 Genexpression nachgewiesen werden. Die Autoren schlossen daraus, dass eine Aktivitätssteigerung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zwar in den stressinduzierten Signalmechanismus der hsp-Synthese involviert war und diese steigerte, der eigentliche Triggerfaktor jedoch das Stressereignis (Hitzeschock) selbst war (Kiang et al., 1994).

Entgegen dieser Arbeiten wurden in der Studie von Choi et al. 1994 proliferierende wie nichtproliferierende Zellen mit Ionophor A23187 ohne weiteres Stressereignis inkubiert, woraus eine deutliche zytosolische  $Ca^{2+}$ -Aktivitätssteigerung unabhängig vom

Wachstumszustand der Zellen resultierte. Analog zu den hier vorliegenden Ergebnissen wurde auch ohne vorausgehendes Stressereignis, wie die in diesem Modell verwandte PGA2-induzierte Wachstumshemmung, eine gesteigerte hsp70 mRNA Expression beobachtet (Choi et al., 1994). Übereinstimmend dazu konnte in der Studie von Yamamoto et al. 1994 die zunächst durch Hitzeschock ausgelöste hsp70 Expression in Ratten-Tubulusepithelzellen ebenfalls durch alleinige Ionophor-Gabe, wenn auch in geringerer Intensität (3fach versus 18fach), imitiert werden. Die Daten dieser beiden Studien stehen somit in Einklang mit den hier dargestellten Ergebnissen und stützen die Hypothese einer signifikanten Rolle der zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Aktivitätssteigerung in der stressinduzierten hsp70 Genexpression in der extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Pool eine Hepatozyten, wobei wichtige Rolle im Signaltransduktionsmechanismus zu spielen scheint.

Diese Rolle sollte auch in dieser Versuchsserie durch Inkubation mit den zuvor erläuterten Kalziumkanal-Blockern Verapamil und Diltiazem weiter untersucht werden. Beide Substanzen führten zunächst zu keiner hsp70 Genexpression. Während die gleichzeitige Inkubation eines Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten mit Phorone/BSO zu einer überadditiven HO-1 Genexpression führte, blieb die durch Glutathiondepletion induzierte hsp70 Expression davon unbeeinflusst. Allerdings konnte auch keine Inhibition der hsp70 Induktion durch die Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten beobachtet werden.

Wie in den Arbeiten von Gasbarrini et al. 1992 und 1993 gezeigt, hatte die Inkubation mit Ca<sup>2+</sup>Antagonisten bis zu einer Konzentration von 10-50µM keine Auswirkungen auf den biphasischen Verlauf der zytosolischen Kalziumkonzentration nach oxidativem Stress. Eine solche Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration wird biphasische physiologischerweise im Rahmen einer Zellstimulation (z.B. Sekretion) beobachtet. Dabei erfolgt nach G-Protein-vermittelter Aktivierung der Phospholipase C (PL-C) die Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DG), welches die Proteinkinase-C aktiviert. Als intrazellulärer "second messenger" führt IP<sub>3</sub> zum biphasischen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration (s. Abb.20). Nach IP<sub>3</sub>-Rezeptor-vermittelter Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus zytosolischen Speichern wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgt ein kurzer Ca2+-peak (1. Phase), gefolgt von einem anhaltenden Konzentrationsanstieg durch Einstrom von Ca<sup>2+</sup> aus dem Extrazellulärraum (2. Phase) (Llopis et al., 1992; Mauger et al., 1988). Der genaue Mechanismus dieses Ca<sup>2+</sup>-Transports durch biologische Membranen ist nur unzureichend charakterisiert und Gegenstand vieler Untersuchungen. In exzitatorischen

Ca<sup>2+</sup>-Einstrom Zellen erfolgt dieser EZR aus dem durch sog. "voltage-operated calcium channels" (VOCC), welche durch Kalziumkanal-Blocker wie Verapamil und Diltiazem bereits in niedrigen Konzentrationen von wenigen µM inhibierbar sind (Meldolesi et al., 1987). In nicht-exzitatorischen Zellen wie z.B. Hepatozyten existieren diese VOCC nicht, da der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom weder durch die Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten in diesen niedrigen Konzentrationen geblockt noch durch eine Depolarisation stimuliert werden kann (Joseph et al., 1985; Zhang et al., 1991). Die Hormon-induzierte Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Permeabilität erfolgt in Zellen diesen über Kanäle, die als "receptor-operated calcium channels" (ROCC) bezeichnet werden (Mauger et al., 1988).



Abb.20 : Schematische Darstellung eines rezeptor-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms in das Zytosol-direkt oder über intrazelluläre Kompartimente (Hallam et al., 1989)

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen an nicht-exzitatorischen Zellen konnten zeigen, dass dieser  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus dem EZR über drei verschiedene Mechanismen erfolgt. Einerseits wurde eine direkt G-Protein-vermittelte Aktivierung eines  $Ca^{2+}$ -Kanals der Plasmamembran nach Hormon-Rezeptor-Bindung beobachtet (Hughes et al., 1987). Des Weiteren erfolgte eine Stimulation des  $Ca^{2+}$ -Einstroms über ROCC durch den "second messenger" IP<sub>3</sub> an T-Lymphozyten und Hepatozyten (Hansen et al., 1990;
Kuno et al., 1987). Der 3. Mechanismus wird in der Literatur als sog. "capacitative entry" bezeichnet (Putney, 1986; Striggow et al., 1994). Dabei stimuliert derselbe "second messenger" IP<sub>3</sub> einen weiteren Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem EZR über eine Depletion von intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speichern. Dieser Effekt konnte durch Hemmung der Ca<sup>2+</sup>-ATPase des ER mit Thapsigargin imitiert werden. Hierbei erfolgte die Ca<sup>2+</sup>-Depletion des ER jedoch unabhängig von dem "second messenger" IP<sub>3</sub>, so dass das Modell des "capacitative entry" nur vom Ca<sup>2+</sup>-Gehalt des ER abhängig zu sein schien (Zhang et al., 1991). Während Mauger et al. 1988 und Striggow et al. 1994 die IP<sub>3</sub>-induzierte Aktivierung von ROCC als primären Mechanismus des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms aus dem EZR in Hepatozyten ansahen, welcher eine kontinuierliche Hormon-Rezeptor-Bindung erforderte, favorisierten Zhang et al. 1991 das Modell des "capacitative entry" als Hauptregulator des Hormon-stimulierten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über die Plasmamembran korrelierte. Eine kontinuierliche Hormon-Rezeptor-Bindung war hier nicht erforderlich.

Die Existenz dieser zwei zuletzt genannten verschiedenen Mechanismen des Rezeptorvermittelten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms in Hepatozyten wurde von Llopis et al. 1992 sowie von Kass et al. 1994 bestätigt. Allerdings differieren die Ergebnisse bezüglich einer möglichen Hemmung dieses  $Ca^{2+}$ -Einstroms durch  $Ca^{2+}$ -Antagonisten (Kass et al., 1994; Llopis et al., 1992). Während sowohl Striggow et al. als auch Mauger et al. eine Inhibition beider Wege durch Kalziumkanal-Blocker beobachteten, hatten diese in einer Konzentration von 50µM bei Llopis et al. keinen hemmenden Effekt. Ebenso gegensätzliche Ergebnisse zeigte die Arbeitsgruppe um Kass und Llopis in eigenen aufeinander folgenden Arbeiten. Nachdem zunächst 1990 und 1992 postuliert wurde, dass keine Verapamil- oder Nifedipin-sensitiven Kanäle in diese Signalmechanismen involviert waren, konnte 1994 eine konzentrationsabhängige Blockade des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms durch verschiedene andere Kalziumkanal-Blocker beobachtet werden. Striggow et al. zeigten 1993 eine 60%ige Hemmung des Vasopressin-induzierten zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsanstieges durch Verapamil und Diltiazem in einer Konzentration von 200-400µM (Striggow et al., 1993). Von anderen Autoren wurde wiederum eine verminderte Spezifität der Kalziumkanal-Blocker für ROCC in diesen hohen Dosierungen diskutiert. Daraus wird deutlich, wie kontrovers der Einfluss von Kalziumkanal-Blockern auf den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in Hepatozyten diskutiert wird. Möglicherweise spielen die sehr unterschiedlich verwendeten Konzentrationen bzw. Stressereignisse eine Rolle. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich weder eine Inhibition der

Phorone/BSO-induzierten hsp70 Genexpression als Hinweis auf eine Hemmung des  $Ca^{2+}$ -Einstroms noch eine gesteigerte Genexpression als Zeichen einer zusätzlichen Zellschädigung. Möglicherweise wurde in dieser Arbeit eine zu geringe Dosis der Kalziumkanal-Blocker gewählt oder der  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum nach Phorone/BSO-Gabe erfolgt über andere Mechanismen als ROCC.

Daher stellt sich nun die Frage, ob dieses Modell der Zellaktivierung mit G-Protein-vermittelter, biphasisch verlaufender zytosolischer Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationssteigerung nur durch Bindung eines Agonisten an einen extrazellulären Rezeptor oder auch durch Hitzeschock, oxidativen Stress, etc. ausgelöst wird. Versuche an Hamsterfibroblasten zeigten nach Hitzeschock einen Anstieg der zytosolischen IP<sub>3</sub>-Konzentration mit folgendem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem EZR (Stevenson et al., 1986). Die Arbeitsgruppe um Kiang konnte 1994 einen Hitzeschock-induzierten, temperatur- und zeitabhängigen IP<sub>3</sub>-Anstieg an menschlichen Epidermoidzellen bestätigen. Dieser konnte ebenso nach Gabe von GTP-Analoga und G-stimulierendem Protein ohne Hitzeschock beobachtet werden. Da ein zusätzlicher Hitzeschock zu keinem weiteren IP<sub>3</sub>-Anstieg führte, wurde vermutet, dass in beiden Fällen der gleiche Mechanismus abläuft und Hitzeschock ebenfalls über eine Aktivierung der G-Protein-Kaskade wirkt (Kiang et al., 1994).

Korrelierend zu dem hier verwendeten Stressmodell wurde von Renard et al. 1992 nach Glutathiondepletion in Hepatozyten eine Steigerung der Sensitivität der IP<sub>3</sub>- induzierten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung beobachtet. Eine Verminderung von reduziertem Glutathion mit vermehrter Bildung der oxidierten Form des Glutathions (GSSG) führte zur deutlichen Linksverschiebung der Dosis-Antwort-Kurve von IP<sub>3</sub> zur Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Dabei hatte das oxidierte Glutathion weder einen Einfluss auf den IP<sub>3</sub>-Metabolismus noch auf die ATP-abhängige Ca<sup>2+</sup>-Pumpe. Der IP<sub>3</sub>-sensitive Ca<sup>2+</sup>-Pool betrug dabei ca. 40% des maximal möglich freisetzbaren Ca<sup>2+</sup> aus zytosolischen Speichern. Während die Gabe von 100µM IP<sub>3</sub> zu einer ca. 20 %igen Freisetzung dieses sensitiven Pools führte, konnte durch gleichzeitige Gabe von IP<sub>3</sub> und GSSG eine Ausschüttung von ca. 75% erreicht werden. Die maximal mögliche IP<sub>3</sub>-sensitive Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung von 40% des Gesamt-Ca<sup>2+</sup> blieb dabei unverändert (Renard et al., 1992). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass das oxidierte Glutathion den IP3-Rezeptor direkt modifiziert. Möglicherweise war der Effekt des GSSG durch die Bildung von Disulfiden mit Proteinkomponenten vermittelt, die in die IP<sub>3</sub>-getriggerte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung involviert sind. Daher scheint der zytosolische Kalziumkonzentrationsanstieg nach oxidativem Stress

einerseits IP<sub>3</sub>-Rezeptor-vermittelt zu sein, andererseits führt der Glutathionmangel, wie zuvor erläutert, zu einer verminderten  $Ca^{2+}$ -Sequestrationsaktivität der Mikrosomen durch den Verlust essentieller Sulfhydrylgruppen der  $Ca^{2+}$ -ATPasen.

Dieses ließ zunächst eine positive Korrelation zwischen IP<sub>3</sub>-Konzentration und Hitzeschockproteinexpression vermuten, welche von Kiang et al. 1994 an menschlichen Epidermoidzellen bestätigt wurde. Während eine alleinige Erhöhung der zytosolischen IP<sub>3</sub>-Konzentration zu keiner hsp70 Genexpression führte, resultierte ein gleichzeitiger Hitzeschock in einer Potenzierung der Genexpression im Vergleich zum Hitzeschock allein. Die Negativkontrolle durch Gabe eines PLC-Hemmers zum Hitzeschock bestätigte zwar eine Rolle von IP<sub>3</sub> und/oder DG in der Genexpression (Kiang et al., 1994), der eigentliche Triggerfaktor der hsp70 Induktion schien jedoch eher das Stressereignis (HS, oxidativer Stress) selbst zu sein. Nach den Ergebnissen der hier genannten Studien ist es somit durchaus denkbar, dass die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Induktion der hsp70 Genexpression nach Glutathiondepletion über eine IP<sub>3</sub>-sensitivierte, biphasische Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration durch Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus intrazellulären Speichern einerseits, sowie einem möglicherweise IP<sub>3</sub>-Rezeptor-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem EZR andererseits, vermittelt wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durch Glutathiondepletion induzierte hsp70 Genexpression abhängig von einem, durch den zytosolisch wirksamen  $Ca^{2+}$ -Chelator BAPTA-AM supprimierbaren, Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu sein scheint. Da durch den extrazellulär wirkenden  $Ca^{2+}$ -Chelator EDTA ebenfalls eine Suppression der hsp70 Induktion erfolgt, scheint in diesem Mechanismus vor allem eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration aus dem extrazellulären Medium verantwortlich zu sein. Diese Annahme wird durch die dosisabhängige Induktion der Genexpression durch Ionophor sowie die fehlende Induktion durch Thapsigargin unterstützt. Ein aus diesen Ergebnissen postulierter inhibitorischer Effekt der Kalziumkanal-Blocker auf die Phorone/BSO induzierte hsp70 Expression konnte nicht beobachtet werden. Dieser fehlende Einfluss der  $Ca^{2+}$ -Antagonisten auf die Stressgenexpression mag dadurch zu erklären sein, dass der verantwortliche  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch andere Kanäle als ROCCs erfolgt, da diese sowohl von Verapamil als auch Diltiazem geblockt werden können (Gasbarrini et al., 1993; Llopis et al., 1992) oder dass die Kalziumkanal-Blocker in den verwendeten Konzentrationen in den isolierten Hepatozyten die ROCCs nicht suffizient inhibiert haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine unterschiedliche Regulation von HO-1 und hsp70 in isolierten Hepatozyten in Abhängigkeit von der zellulären  $Ca^{2+}$ -Homöostase nahe. Die Phorone/BSO-induzierte Expression *beider* Stressgene scheint dabei abhängig von einem, durch den zytosolisch wirksamen  $Ca^{2+}$ -Chelator BAPTA-AM supprimierbaren, Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu sein. Während für die durch Glutathiondepletion erzeugte HO-1 Induktion vor allem eine Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration aus intrazellulären  $Ca^{2+}$ -speichernden Kompartimenten (z.B. ER, Calcisomen) verantwortlich zu sein scheint, spielt im Gegensatz dazu ein  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus dem extrazellulären Medium eine regulatorische Rolle in der hsp70 Induktion. Durch welche zytosolischen und nukleären Mechanismen der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration die Expression der beiden Stressgene in isolierten Hepatozyten vermittelt und welche weiteren Aktivierungsprozesse möglicherweise involviert sind, bleibt zu untersuchen.

#### 6. Literaturverzeichnis

- 1. Alpini, G, Phillips, JO, Vroman, B, LaRusso, NF (1994) Recent advances in the isolation of liver cells. Hepatology 20: 494-514
- Arrick, BA, Griffith, OW, Cerami, A (1981) Inhibition of glutathione synthesis as a chemotherapeutic strategy for trypanosomiasis. J Exp Med 153: 720-5
- Baue, AE, Durham, R, Faist, E (1998) Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? Shock 10: 79-89
- Bauer, I, Bauer, M, Pannen, BH, Leinwand, MJ, Zhang, JX, Clemens, MG (1995) Chronic ethanol consumption exacerbates liver injury following hemorrhagic shock: role of sinusoidal perfusion failure. Shock 4: 324-31
- Bauer, I, Wanner, GA, Rensing, H, Alte, C, Miescher, EA, Wolf, B, Pannen, BH, Clemens, MG, Bauer, M (1998) Expression pattern of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and stress-exposed rat liver. Hepatology 27: 829-38
- Bauer, I, Rensing, H, Florax, A, Ulrich, C, Pistorius, G, Redl, H, Bauer, M (2003) Expression pattern and regulation of heme oxygenase-1/heat shock protein 32 in human liver cells. Shock 20: 116-22
- Bauer, M, Zhang, JX, Bauer, I, Clemens, MG (1994 a) Endothelin-1 as a regulator of hepatic microcirculation: sublobular distribution of effects and impact on hepatocellular secretory function. Shock 1: 457-65
- Bauer, M, Zhang, JX, Bauer, I, Clemens, MG (1994 b) ET-1 induced alterations of hepatic microcirculation: sinusoidal and extrasinusoidal sites of action. Am J Physiol 267: G143-9

- 9. Bauer, M, Pannen, BH, Bauer, I, Herzog, C, Wanner, GA, Hanselmann, R, Zhang, JX, Clemens, MG, Larsen, R (1996) Evidence for a functional link between stress response and vascular control in hepatic portal circulation. Am J Physiol 271: G929-35
- Beales, D, Hue, DP, McLean, AE (1985) Lipid peroxidation, protein synthesis, and protection by calcium EDTA in paracetamol injury to isolated hepatocytes. Biochem Pharmacol 34: 19-23
- Bellomo, G, Jewell, SA, Thor, H, Orrenius, S (1982) Regulation of intracellular calcium compartmentation: studies with isolated hepatocytes and t-butyl hydroperoxide. Proc Natl Acad Sci U S A 79: 6842-6
- Bellomo, G, Mirabelli, F, Richelmi, P, Orrenius, S (1983) Critical role of sulfhydryl group(s) in ATP-dependent Ca2+ sequestration by the plasma membrane fraction from rat liver. FEBS Lett 163: 136-9
- Billiar, TR, Curran, RD, Harbrecht, BG, Stuehr, DJ, Demetris, AJ, Simmons, RL (1990) Modulation of nitrogen oxide synthesis in vivo: monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin-induced nitrate/nitrate biosynthesis while promoting hepatic damage. J Leukoc Biol 48: 565-9
- 14. Brüne, B, Schmidt, KU, Ullrich, V (1990) Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. Eur J Biochem 192: 683-8
- 15. Buchman, TG (1997) Some like it hot. Crit Care Med 25: 1636
- Burgess, GM, Claret, M, Jenkinson, DH (1979) Effects of catecholamines, ATP and ionophore A23187 on potassium and calcium movements in isolated hepatocytes. Nature 279: 544-6
- Burgunder, JM, Abernethy, DR, Lauterburg, BH (1988) Liver injury due to verapamil. Hepatogastroenterology 35: 169-70

- Casini, AF, Maellaro, E, Pompella, A, Ferrali, M, Comporti, M (1987) Lipid peroxidation, protein thiols and calcium homeostasis in bromobenzene-induced liver damage. Biochem Pharmacol 36: 3689-95
- Choi, AM, Tucker, RW, Carlson, SG, Weigand, G, Holbrook, NJ (1994) Calcium mediates expression of stress-response genes in prostaglandin A2-induced growth arrest. Faseb J 8: 1048-54
- 20. Chomczynski, P, Sacchi, N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162: 156-9
- Christensen, SB, Andersen, A, Poulsen, JC, Treiman, M (1993) Derivatives of thapsigargin as probes of its binding site on endoplasmic reticulum Ca2+ ATPase. Stereoselectivity and important functional groups. FEBS Lett 335: 345-8
- 22. Chu, EK, Ribeiro, SP, Slutsky, AS (1997) Heat stress increases survival rates in lipopolysaccharide-stimulated rats. Crit Care Med 25: 1727-32
- Chun, K, Zhang, J, Biewer, J, Ferguson, D, Clemens, MG (1994) Microcirculatory failure determines lethal hepatocyte injury in ischemic/reperfused rat livers. Shock 1: 3-9
- Clemens, MG, McDonagh, PF, Chaudry, IH, Baue, AE (1985) Hepatic microcirculatory failure after ischemia and reperfusion: improvement with ATP-MgCl2 treatment. Am J Physiol 248: H804-11
- 25. Clemens, MG, Bauer, M, Pannen, BH, Bauer, I, Zhang, JX (1997) Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. Shock 8: 80-5
- 26. Clemens, MG, Zhang, JX (1999) Regulation of sinusoidal perfusion: in vivo methodology and control by endothelins. Semin Liver Dis 19: 383-96
- 27. Cryer, HG, Leong, K, McArthur, DL, Demetriades, D, Bongard, FS, Fleming, AW, Hiatt, JR, Kraus, JF (1999) Multiple organ failure: by the time you predict it, it's already there. J Trauma 46: 597-604; discussion 604-6

- David-Dufilho, M, Devynck, MA, Kazda, S, Meyer, P (1984) Stimulation by nifedipine of calcium transport by cardiac sarcolemmal vesicles from spontaneously hypertensive rats. Eur J Pharmacol 97: 121-7
- 29. Dethmers, JK, Meister, A (1981) Glutathione export by human lymphoid cells: depletion of glutathione by inhibition of its synthesis decreases export and increases sensitivity to irradiation. Proc Natl Acad Sci U S A 78: 7492-6
- 30. Drugas, GT, Paidas, CN, Yahanda, AM, Ferguson, D, Clemens, MG (1991) Conjugated desferoxamine attenuates hepatic microvascular injury following ischemia/reperfusion. Circ Shock 34: 278-83
- 31. Drummond, IA, Livingstone, D, Steinhardt, RA (1988) Heat shock protein synthesis and cytoskeletal rearrangements occur independently of intracellular free calcium increases in Drosophila cells and tissues. Radiat Res 113: 402-13
- 32. Elia, G, De Marco, A, Rossi, A, Santoro, MG (1996) Inhibition of HSP70 expression by calcium ionophore A23187 in human cells. An effect independent of the acquisition of DNA-binding activity by the heat shock transcription factor. J Biol Chem 271: 16111-8
- 33. Elliott, SJ, Doan, TN, Henschke, PN (1995) Reductant substrate for glutathione peroxidase modulates oxidant inhibition of Ca2+ signaling in endothelial cells.
   Am J Physiol 268: H278-87
- 34. Erdreich, A, Spanier, R, Rahamimoff, H (1983) The inhibition of Na-dependent Ca uptake by verapamil in synaptic plasma membrane vesicles. Eur J Pharmacol 90: 193-202
- 35. Faist, E, Baue, AE, Dittmer, H, Heberer, G (1983) Multiple organ failure in polytrauma patients. J Trauma 23: 775-87

- 36. Farghali, H, Kmonickova, E, Lotkova, H, Martinek, J (2000) Evaluation of calcium channel blockers as potential hepatoprotective agents in oxidative stress injury of perfused hepatocytes. Physiol Res 49: 261-8
- 37. Feinberg, AP, Vogelstein, B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem 132: 6-13
- 38. Fridovich, I (1978) The biology of oxygen radicals. Science 201: 875-80
- Gasbarrini, A, Borle, AB, Caraceni, P, Farghali, H, Azzarone, A, Fagiuoli, S, Starzl, TE, Van Thiel, DH (1992) Anoxia/reoxygenation injury in hepatocytes is not prevented by calcium channel blockers. Transplant Proc 24: 2812-3
- 40. Gasbarrini, A, Borle, AB, Van Thiel, DH (1993) Ca2+ antagonists do not protect isolated perfused rat hepatocytes from anoxic injury. Biochim Biophys Acta 1177: 1-7
- Geller, DA, Freeswick, PD, Nguyen, D, Nussler, AK, Di Silvio, M, Shapiro, RA, Wang, SC, Simmons, RL, Billiar, TR (1994) Differential induction of nitric oxide synthase in hepatocytes during endotoxemia and the acute-phase response. Arch Surg 129: 165-71
- 42. Gissel, C, Doutheil, J, Paschen, W (1997) Temporal analysis of changes in neuronal c-fos mRNA levels induced by depletion of endoplasmic reticulum calcium stores: effect of clamping cytoplasmic calcium activity at resting levels. J Neurochem 69: 2538-45
- 43. Godfraind, T, Miller, R, Wibo, M (1986) Calcium antagonism and calcium entry blockade. Pharmacol Rev 38: 321-416
- 44. Goto, M, Takei, Y, Kawano, S, Nagano, K, Tsuji, S, Masuda, E, Nishimura, Y, Okumura, S, Kashiwagi, T, Fusamoto, H, et al. (1994) Endothelin-1 is involved in the pathogenesis of ischemia/reperfusion liver injury by hepatic microcirculatory disturbances. Hepatology 19: 675-81

- 45. Granger, DN, Hollwarth, ME, Parks, DA (1986) Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. Acta Physiol Scand Suppl 548: 47-63
- 46. Griffith, OW, Meister, A (1979) Potent and specific inhibition of glutathione synthesis
  by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine).
  J Biol Chem 254: 7558-60
- 47. Gryglewski, RJ, Palmer, RM, Moncada, S (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. Nature 320: 454-6
- 48. Gudi, T, Gupta, CM (1993) hsp 70-like protein in rhesus erythrocyte cytosol and its interactions with membrane skeleton under heat and pathologic stress. J Biol Chem 268: 21344-50
- 49. Haglund, U, Gerdin, B (1991) Oxygen-free radicals (OFR) and circulatory shock. Circ Shock 34: 405-11
- Hallam, TJ, Rink, TJ (1989) Receptor-mediated Ca2+ entry: diversity of function and mechanism. Trends Pharmacol Sci 10: 8-10
- Halliwell, B, Gutteridge, JM (1984) Role of iron in oxygen radical reactions. Methods Enzymol 105: 47-56
- 52. Hansen, CA, Siemens, IR, Williamson, JR (1990) Calcium entry in rat hepatocytes: stimulation by inositol 1,4,5-trisphosphorothioate. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res 24: 128-33
- 53. Hughes, BP, Milton, SE, Barritt, GJ, Auld, AM (1986) Studies with verapamil and nifedipine provide evidence for the presence in the liver cell plasma membrane of two types of Ca2+ inflow transporter which are dissimilar to potential-operated Ca2+ channels. Biochem Pharmacol 35: 3045-52

- 54. Hughes, BP, Crofts, JN, Auld, AM, Read, LC, Barritt, GJ (1987) Evidence that a pertussis-toxin-sensitive substrate is involved in the stimulation by epidermal growth factor and vasopressin of plasma-membrane Ca2+ inflow in hepatocytes. Biochem J 248: 911-8
- 55. Inesi, G, Sagara, Y (1994) Specific inhibitors of intracellular Ca2+ transport ATPases.J Membr Biol 141: 1-6
- 56. Ishizaka, N, Griendling, KK (1997) Heme oxygenase-1 is regulated by angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells. Hypertension 29: 790-5
- 57. Jaattela, M (1993) Overexpression of major heat shock protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2. J Immunol 151: 4286-94
- 58. Jackson, TR, Patterson, SI, Thastrup, O, Hanley, MR (1988) A novel tumour promoter, thapsigargin, transiently increases cytoplasmic free Ca2+ without generation of inositol phosphates in NG115-401L neuronal cells. Biochem J 253: 81-6
- 59. Jennische, E (1984) Possible influence of glutathione on postischemic liver injury.Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A] 92: 55-64
- 60. Jones, DP, Eklow, L, Thor, H, Orrenius, S (1981) Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H2O2. Arch Biochem Biophys 210: 505-16
- Jones, DP, Thor, H, Smith, MT, Jewell, SA, Orrenius, S (1983) Inhibition of ATP-dependent microsomal Ca2+ sequestration during oxidative stress and its prevention by glutathione. J Biol Chem 258: 6390-3
- Joseph, SK, Coll, KE, Thomas, AP, Rubin, R, Williamson, JR (1985) The role of extracellular Ca2+ in the response of the hepatocyte to Ca2+-dependent hormones. J Biol Chem 260: 12508-15

- Kaesemeyer, WH, Carr, AA, Bottini, PB, Prisant, LM (1994) Verapamil and nifedipine in combination for the treatment of hypertension. J Clin Pharmacol 34: 48-51
- Kaibuchi, K, Takai, Y, Sawamura, M, Hoshijima, M, Fujikura, T, Nishizuka, Y (1983) Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation. J Biol Chem 258: 6701-4
- Kass, GE, Chow, SC, Gahm, A, Webb, DL, Berggren, PO, Llopis, J, Orrenius, S (1994) Two separate plasma membrane Ca2+ carriers participate in receptor-mediated Ca2+ influx in rat hepatocytes. Biochim Biophys Acta 1223: 226-33
- 66. Kawahara, Y, Takai, Y, Minakuchi, R, Sano, K, Nishizuka, Y (1980) Possible involvement of Ca2+-activated, phospholipid-dependent protein kinase in platelet activation. J Biochem (Tokyo) 88: 913-6
- 67. Kiang, JG, Carr, FE, Burns, MR, McClain, DE (1994) HSP-72 synthesis is promoted by increase in [Ca2+]i or activation of G proteins but not pHi or cAMP. Am J Physiol 267: C104-14
- 68. Kiang, JG, Gist, ID, Tsokos, GC (1998) Cytoprotection and regulation of heat shock proteins induced by heat shock in human breast cancer T47-D cells: role of [Ca2+]i and protein kinases. Faseb J 12: 1571-9
- 69. Koleva, M, Stoytchev, T (1993) On the enzyme-inducing action of calcium antagonists. Arch Toxicol 67: 294-6
- 70. Kumar, KL, Colley, CA (1994) Verapamil-induced hepatotoxicity. West J Med 160: 485-6
- 71. Kuno, M, Gardner, P (1987) Ion channels activated by inositol 1,4,5-trisphosphate in plasma membrane of human T-lymphocytes. Nature 326: 301-4

- Lamarche, S, Chretien, P, Landry, J (1985) Inhibition of the heat shock response and synthesis of glucose-regulated proteins in Ca2+-deprived rat hepatoma cells. Biochem Biophys Res Commun 131: 868-76
- 73. Larsen, R (1999) Larsen Lehrbuch Anästhesie, 6. Auflage, Urban & Schwarzenberg Verlag: 815-826
- 74. Linden, T, Doutheil, J, Paschen, W (1998) Role of calcium in the activation of erp72 and heme oxygenase-1 expression on depletion of endoplasmic reticulum calcium stores in rat neuronal cell culture. Neurosci Lett 247: 103-6
- Liu, H, Bowes, RC, 3rd, van de Water, B, Sillence, C, Nagelkerke, JF, Stevens, JL (1997) Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca2+ disturbances, and cell death in renal epithelial cells. J Biol Chem 272: 21751-9
- 76. Llopis, J, Kass, GE, Gahm, A, Orrenius, S (1992) Evidence for two pathways of receptor-mediated Ca2+ entry in hepatocytes. Biochem J 284 (Pt 1): 243-7
- 77. Lytton, J, Westlin, M, Hanley, MR (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. J Biol Chem 266: 17067-71
- Maines, MD (1988) Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. Faseb J 2: 2557-68
- 79. Maitra, SR, Krikhely, M, Dulchavsky, SA, Geller, ER, Kreis, DJ, Jr. (1991) Beneficial effects of diltiazem in hemorrhagic shock. Circ Shock 33: 121-5
- Maitra, SR, Geller, ER, Pan, W, Kennedy, PR, Higgins, LD (1992) Altered cellular calcium regulation and hepatic glucose production during hemorrhagic shock. Circ Shock 38: 14-21

- Martensson, J, Lai, JC, Meister, A (1990) High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 7185-9
- Marubayashi, S, Dohi, K, Kawasaki, T (1985) Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury-prevention of damages by vitamin E, coenzyme Q, or reduced glutathione administration. Surgical Forum 36: 136-138
- 83. Marzi, I (1996) [Hemorrhagic shock]. Anaesthesist 45: 976-92
- 84. Mauger, JP, Claret, M (1988) Calcium channels in hepatocytes. J Hepatol 7: 278-82
- 85. Mehlen, P, Kretz-Remy, C, Preville, X, Arrigo, AP (1996) Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death. Embo J 15: 2695-706
- Meister, A, Griffith, OW (1979) Effects of methionine sulfoximine analogs on the synthesis of glutamine and glutathione: possible chemotherapeutic implications. Cancer Treat Rep 63: 1115-21
- Meldolesi, J, Pozzan, T (1987) Pathways of Ca2+ influx at the plasma membrane:
   voltage-, receptor-, and second messenger-operated channels.
   Exp Cell Res 171: 271-83
- Moore, MM, P., N, S., O (1990) Biochemical mechanisms of oxidative cell injury in isolated hepatocytes in: Cell death: Mechanisms of acute and lethal cell injury (eds Mergner W. J., JRT, Trump B. F.): 179-199
- Murphy, E, Coll, K, Rich, TL, Williamson, JR (1980) Hormonal effects on calcium homeostasis in isolated hepatocytes. J Biol Chem 255: 6600-8

- 90. Nath, KA, Balla, G, Vercellotti, GM, Balla, J, Jacob, HS, Levitt, MD, Rosenberg, ME (1992) Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. J Clin Invest 90: 267-70
- 91. Nishida, J, McCuskey, RS, McDonnell, D, Fox, ES (1994) Protective role of NO in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia. Am J Physiol 267: G1135-41
- 92. Pan, M, Janis, RA (1984) Stimulation of Na+,K+-ATPase of isolated smooth muscle membranes by the Ca2+ channel inhibitors, nimodipine and nitrendipine.
   Biochem Pharmacol 33: 787-91
- 93. Pannen, BH, Kohler, N, Hole, B, Bauer, M, Clemens, MG, Geiger, KK (1998) Protective role of endogenous carbon monoxide in hepatic microcirculatory dysfunction after hemorrhagic shock in rats. J Clin Invest 102: 1220-8
- Parks, DA, Bulkley, GB, Granger, DN (1983) Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. Surgery 94: 415-22
- 95. Pressman, BC (1976) Biological applications of ionophores. Annu Rev Biochem 45: 501-30
- 96. Putney, JW, Jr. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. Cell Calcium 7: 1-12
- 97. Rasmussen, H, Barrett, PQ (1984) Calcium messenger system: an integrated view.Physiol Rev 64: 938-84
- 98. Rasmussen, U, Broogger Christensen, S, Sandberg, F (1978) Thapsigargine and thapsigargicine, two new histamine liberators from Thapsia garganica L. Acta Pharm Suec 15: 133-40
- 99. Reed, DJ, Pascoe, GA, Thomas, CE (1990) Extracellular calcium effects on cell viability and thiol homeostasis. Environ Health Perspect 84: 113-20

- Renard, DC, Seitz, MB, Thomas, AP (1992) Oxidized glutathione causes sensitization of calcium release to inositol 1,4,5-trisphosphate in permeabilized hepatocytes. Biochem J 284 (Pt 2): 507-12
- 101. Rensing, H, Bauer, I, Peters, I, Wein, T, Silomon, M, Jaeschke, H, Bauer, M (1999)
   Role of reactive oxygen species for hepatocellular injury and heme oxygenase-1 gene expression after hemorrhage and resuscitation. Shock 12: 300-8
- 102. Rensing, H, Bauer, I, Datene, V, Patau, C, Pannen, BH, Bauer, M (1999) Differential expression pattern of heme oxygenase-1/heat shock protein 32 and nitric oxide synthase-II and their impact on liver injury in a rat model of hemorrhage and resuscitation. Crit Care Med 27: 2766-75
- 103. Rensing, H, Jaeschke, H, Bauer, I, Patau, C, Datene, V, Pannen, BH, Bauer, M (2001) Differential activation pattern of redox-sensitive transcription factors and stressinducible dilator systems heme oxygenase-1 and inducible nitric oxide synthase in hemorrhagic and endotoxic shock. Crit Care Med 29: 1962-71
- 104. Richter, C, Frei, B (1988) Ca2+ release from mitochondria induced by prooxidants.Free Radic Biol Med 4: 365-75
- 105. Rose, S, Baumann, H, Jahreis, GP, Sayeed, MM (1994) Diltiazem and superoxide dismutase modulate hepatic acute phase response in gram-negative sepsis. Shock 1: 87-93
- Rose, S, Pizanis, A, Silomon, M (1997) Altered hepatocellular Ca2+ regulation during hemorrhagic shock and resuscitation. Hepatology 25: 379-84
- 107. Rubanyi, GM, Vanhoutte, PM (1986) Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. Am J Physiol 250: H822-7
- Sagara, Y, Inesi, G (1991) Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca2+ transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. J Biol Chem 266: 13503-6

- 109. Schoeniger, LO, Reilly, PM, Bulkley, GB, Buchman, TG (1992) Heat-shock gene expression excludes hepatic acute-phase gene expression after resuscitation from hemorrhagic shock. Surgery 112: 355-62; discussion 362-3
- Seekamp, A, Regel, G, Sturm, JA, Tscherne, H (1991) [Liver failure as part of multiple organ failure following polytrauma]. Unfallchirurg 94: 502-7
- 111. Shibahara, S, Muller, RM, Taguchi, H (1987) Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. J Biol Chem 262: 12889-92
- 112. Silomon, M, Pizanis, A, Rose, S (1999) Oxyradical-mediated hepatocellular Ca2+ alterations during hemorrhagic shock and resuscitation. Shock 11: 193-8
- 113. Simchowitz, L, Spilberg, I (1979) Generation of superoxide radicals by human peripheral neutrophils activated by chemotactic factor. Evidence for the role of calcium. J Lab Clin Med 93: 583-93
- 114. Stevenson, MA, Calderwood, SK, Hahn, GM (1986) Rapid increases in inositol trisphosphate and intracellular Ca++ after heat shock. Biochem Biophys Res Commun 137: 826-33
- 115. Strayer, DS, Hoek, JB, Thomas, AP, White, MK (1999) Cellular activation by Ca2+ release from stores in the endoplasmic reticulum but not by increased free Ca2+ in the cytosol. Biochem J 344 Pt 1: 39-46
- 116. Striggow, F, Bohnensack, R (1993) Verapamil and diltiazem inhibit receptor-operated calcium channels and intracellular calcium oscillations in rat hepatocytes. FEBS Lett 318: 341-4
- 117. Striggow, F, Bohnensack, R (1994) Inositol 1,4,5-trisphosphate activates receptormediated calcium entry by two different pathways in hepatocytes. Eur J Biochem 222: 229-34

- 118. Strubelt, O, Younes, M, Pentz, R (1987) Enhancement by glutathione depletion of ethanol-induced acute hepatotoxicity in vitro and in vivo. Toxicology 45: 213-23
- Su, CY, Chong, KY, Edelstein, K, Lille, S, Khardori, R, Lai, CC (1999) Constitutive hsp70 attenuates hydrogen peroxide-induced membrane lipid peroxidation. Biochem Biophys Res Commun 265: 279-84
- 120. Szabo, C (1996) The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. Shock 6: 79-88
- 121. Takeo, S, Adachi, K, Sakanashi, M (1985) A possible action of nicardipine on the cardiac sarcolemmal Na+-Ca2+ exchange. Biochem Pharmacol 34: 2303-8
- 122. Tenhunen, R, Marver, HS, Schmid, R (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. Proc Natl Acad Sci U S A 61: 748-55
- 123. Terry, CM, Clikeman, JA, Hoidal, JR, Callahan, KS (1999) TNF-alpha and IL-1alpha induce heme oxygenase-1 via protein kinase C, Ca2+, and phospholipase A2 in endothelial cells. Am J Physiol 276: H1493-501
- 124. Thanislass, J, Raveendran, M, Devaraj, H (1995) Buthionine sulfoximine-induced glutathione depletion. Its effect on antioxidants, lipid peroxidation and calcium homeostasis in the lung. Biochem Pharmacol 50: 229-34
- 125. Thastrup, O, Foder, B, Scharff, O (1987) The calcium mobilizing tumor promoting agent, thapsigargin elevates the platelet cytoplasmic free calcium concentration to a higher steady state level. A possible mechanism of action for the tumor promotion. Biochem Biophys Res Commun 142: 654-60
- 126. Thastrup, O, Cullen, PJ, Drobak, BK, Hanley, MR, Dawson, AP (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca2+ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca2(+)-ATPase. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 2466-70

- 127. Thomas, CE, Reed, DJ (1988) Effect of extracellular Ca++ omission on isolated hepatocytes. I. Induction of oxidative stress and cell injury. J Pharmacol Exp Ther 245: 493-500
- 128. Thor, H, Hartzell, P, Svensson, SA, Orrenius, S, Mirabelli, F, Marinoni, V, Bellomo, G (1985) On the role of thiol groups in the inhibition of liver microsomal Ca2+ sequestration by toxic agents. Biochem Pharmacol 34: 3717-23
- 129. Thurman, RG, Apel, E, Badr, M, Lemasters, JL (1988) Protection of liver by calcium entry blockers. Ann N Y Acad Sci 522: 757-70
- 130. Toft, E, Vyberg, M, Therkelsen, K (1991) Diltiazem-induced granulomatous hepatitis.Histopathology 18: 474-5
- 131. Traber, J, Suter, M, Walter, P, Richter, C (1992) In vivo modulation of total and mitochondrial glutathione in rat liver. Depletion by phorone and rescue by N-acetylcysteine. Biochem Pharmacol 43: 961-4
- Traverse, JH, Swenson, LJ, McBride, JW (1994) Acute hepatic injury after treatment with diltiazem. Am Heart J 127: 1636-9
- 133. Tsien, RY (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. Biochemistry 19: 2396-404
- 134. Vollmar, B, Glasz, J, Leiderer, R, Post, S, Menger, MD (1994) Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. Am J Pathol 145: 1421-31
- 135. Wang, P, Ba, ZF, Dean, RE, Chaudry, IH (1991) Diltiazem administration after crystalloid resuscitation restores active hepatocellular function and hepatic blood flow after severe hemorrhagic shock. Surgery 110: 390-6; discussion 396-7

- Wang, T, Tsai, LI, Schwartz, A (1984) Effects of verapamil, diltiazem, nisoldipine and felodipine on sarcoplasmic reticulum. Eur J Pharmacol 100: 253-61
- 137. Wang, Y, Mathews, WR, Guido, DM, Farhood, A, Jaeschke, H (1995) Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates reperfusion injury after hepatic ischemia and endotoxemia. Shock 4: 282-8
- 138. Waydhas, C, Nast-Kolb, D, Jochum, M, Trupka, A, Lenk, S, Fritz, H, Duswald, KH, Schweiberer, L (1992) Inflammatory mediators, infection, sepsis, and multiple organ failure after severe trauma. Arch Surg 127: 460-7
- Winterbourn, CC (1985) Free-radical production and oxidative reactions of hemoglobin. Environ Health Perspect 64: 321-30
- 140. Wu, J, Danielsson, A, Lindstrom, P, Karlsson, K, Sehlin, J (1995) Protective effects of calcium channel blockers on acute bromobenzene toxicity to isolated rat hepatocytes. Inhibition of phenylephrine-induced calcium oscillations. Scand J Gastroenterol 30: 590-600
- 141. Yamamoto, N, Smith, MW, Maki, A, Berezesky, IK, Trump, BF (1994) Role of cytosolic Ca2+ and protein kinases in the induction of the hsp70 gene. Kidney Int 45: 1093-104
- 142. Yamamoto, NS, Ishii-Iwamoto, EL, Bracht, A (1992) Metabolic effects of diltiazem in the perfused rat liver. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 77: 17-30
- 143. Yang-Yen, HF, Chambard, JC, Sun, YL, Smeal, T, Schmidt, TJ, Drouin, J, Karin, M (1990) Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. Cell 62: 1205-15
- 144. Zhang, Y, Duszynski, J, Hreniuk, S, Waybill, MM, LaNoue, KF (1991) Regulation of plasma membrane permeability to calcium in primary cultures of rat hepatocytes. Cell Calcium 12: 559-75

#### 7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. R. Larsen, Direktor der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, danke ich für die Möglichkeit, die Experimente im anästhesiologischen Forschungslabor durchführen zu können.

Herrn PD Dr. med. M. Silomon möchte ich für die Themenstellung, die gute Betreuung und insbesondere für die Leitung der Arbeit sowie seine Ratschläge bei der Zusammenstellung der Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. M. Bauer danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Herrn PD Dr. med. H. Rensing danke ich für die Anleitung zur Aufstellung der Versuchsprotokolle.

Frau Dr. rer. nat. I. Bauer möchte ich für ihr Engagement, die Einweisung in die experimentellen Versuchstechniken sowie die Anleitung bei der Umsetzung aller Experimente danken.

Frau B. Wolf danke ich für die Unterstützung und Mithilfe in der Umsetzung einzelner Experimente.

Herrn Prof. Dr. Menger sei für die freundliche Bereitstellung der Räumlichkeiten zur radioaktiven Hybridisierung im Labor für experimentelle Chirurgie gedankt.

Ich danke meinen Eltern und meiner Schwester Agnes für die ständige Motivation und Unterstützung bis zur Fertigstellung dieser Dissertation.

Ich danke meinem Lebenspartner Steffen Heinzmann für die tägliche Geduld und Unterstützung während der Verfassung dieser Dissertation.

# 8. Lebenslauf

### <u>Julia Nolting</u>

Persönliche Angaben	<ul> <li>geboren am: 03. Juli 1976 als Tochter des Lehrers Wolfgang Nolting und der Fremdsprachenkorrespondentin Angela Nolting</li> </ul>			
	• Geburtsort: Bünde / Westfalen			
	• Familienstand: ledig			
	• Staatsangehörigkeit: deutsch			
	• Konfession: evangelisch-lutherisch			
Ausbildung	1983 – 1987	Freiherr-vom-Stein-Grundschule in Lübbecke		
	1987 – 1989	Wittekind-Gymnasium Lübbecke		
	1989 – 1996	Städtisches Gymnasium Oerlinghausen mit Abschluß Abitur, großes Latinum		
	1996	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes		
	1998	Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung		
	1999	Ablegen des 1. Staatsexamens		
	2002	Ablegen des 2. Staatsexamens		
	2003	Ablegen des 3. Staatsexamens		
	2003 - 2004	Ärztin im Praktikum (siehe unten)		
	Okt. 2004	Übernahme ins Assistenzarztverhältnis in der Klinik f. Unfall-, Hand- u. Wiederherstellungs- chirurgie der UnivKliniken des Saarlandes		
Famulaturen	1999 Anästh	nesie an den Städt. Kliniken Bielefeld Mitte		
	1999 Unfall	Unfallchirurgie in der UnivKlinik Wien		
	2000 Chirur	Chirurgie im Spital Zweisimmen, Schweiz		
	2001 Allger	neinmedizin in einer Praxis in Oerlinghausen		

Praktisches Jahr	1. Tertial	<ul> <li>Chirurgie an der UnivKlinik des Saarlandes für</li> <li>Allgemeinchirurgie, Abdominal- und Gefäßchirurgie unter Prof. Dr. Schilling</li> <li>Unfallchirurgie unter Prof. Dr. Pohlemann</li> </ul>
	2. Tertial	Orthopädie an der UnivKlinik des Saarlandes unter Prof. Dr. Kohn
	3. Tertial	Innere Medizin am Spital Zweisimmen, Schweiz
Ärztin im Praktikum	01.07.2003 – 30.09.2004: ÄIP an den Universitätskliniken des Saarlandes, Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungs- chirurgie unter der Leitung von Prof. Dr. Pohlemann, Direktor der Klinik	
Publikationen	Posterpräser Deutschen A Silomon M. M.: Ca <sup>2+</sup> -Al Beispiel vor in: Tarnov Anästhesiek Ebelsbach. S	ntation der Ergebnisse dieser Dissertation auf dem Anästhesiekongress 2002 , Nolting J., Jeblick S., Paxian M., Bauer I., Bauer bhängigkeit der zellulären Stressgenexpression am n HO-1 und hsp70 in isolierten Ratten-Hepatozyten. w J. (Hsg.): Abstractband des deutschen ongresses Juni 2002, Diomed Verlags GmbH, S.188, 2002 (Abstract).

Homburg, den 08.03.2006

# 9. Abkürzungen

ALT	Alaninaminotransferase
AP-1	Aktivator-Protein-1
ARDS	Adult-respiratory-distress-syndrom
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA-AM	1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethan-N,N,N,N',N'-tetra
	(acetoxymethyl) ester
BSO	Buthioninsulfoximin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
СО	Kohlenmonoxid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDRF	endothelium-derived-relaxing-factor
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZR	Extrazellulärraum
ET-1	Endothelin-1
Grp	glucose-related-protein
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
HO-1	Hämoxygenase-1
$H_2O_2$	Wasserstoffperoxid
Hsp	Hitzeschockprotein
Hsp70	Hitzeschockprotein 70
IL-1a	Interleukin-1a
IL-1ß	Interleukin-1ß
IP <sub>3</sub>	Phospatidyl-Inositoltriphosphat
I/R-Syndrom	Ischämie/Reperfusions-Syndrom
IZR	Intrazellulärraum

LDH	Laktatdehydrogenase
MDA	Malondialdehyd
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phophat (reduziert)
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthetase
OH <sup>-</sup>	Hydroxylradikal
OH <sub>2</sub>	Superoxidradikal
OFR	oxygen free radicals
PBS	Phosphat buffered saline
PGA2	Prostaglandin-A2
Phorone	2,6 Dimethyl-2,5 heptadien-4-on
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidyl-Inositolbisphosphat
PK-C	Proteinkinase-C
PL-A <sub>2</sub>	Phopholipase-A <sub>2</sub>
PL-C	Phopholipase-C
RNA	Ribonukleinsäure
ROCC	Receptor-opperated-calcium-channels
SDH	Sorbitoldehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOD	Superoxiddismutase
t-BOOH	tert-Butylhydroxid
TMB-8	Ionomycin-8-(diethylamino)octyl-3,4,5,-
	trimethoxybenzoate
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
VOCC	Volatage-operated-calcium-channels
XD	Xanthindehydrogenase
XO	Xanthinoxidase