

Aus der Medizinischen Klinik IV – Endokrinologie und Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss von Acetylcystein auf Transient Receptor Potential
Canonical Typ 6 (TRPC6)- Kanäle auf humanen Monozyten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nora Dorothea Förste

aus Hamburg

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. M. Tepel
 2. Priv.- Doz. Dr. med. R. Vetter
 3. Prof. Dr. med. B. Sanner

Datum der Promotion: 08.04.2011

Abkürzungsverzeichnis

2APB	2- Aminoethoxydiphenylboran
ACC	Acetylcystein
ADP	Adenosindiphosphat
AHA	American Heart Association
ANOVA	Analysis of Variances
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD11a	Alpha L integrin chain, LFA-1 alpha
CIF	Calcium Influx Factor
CKF	Chronic kidney failure
	Chronische Niereninsuffizienz
COPD	Chronic obstructive pulmonal disease
CRAC	Calcium- release- activated
	Calcium- channel
DAG	Diacylglycerin
DCF	Dichlorofluorescein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
(p)ERK	(Phosphorylierte) Extracellular- signal Regulated Kinase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et. al.	Und Andere
FSGS	Fokale segmentale Glomerulosklerose
GAPDH	Glycerinaldehyd- 3- Phosphat Dehydrogenase
GSH	Glutathion
H ₂ DCF- DA	2', 7'Dichlorodihydrofluorescindiacetat
HBSS	Hanks balanced salt solution
HC	Homocystein
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
InsP3	Inositoltriphosphat

IP3 Rezeptor	Inositoltriphosphat- Rezeptor
LDL	Low density lipoprotein
MAPEG	Membrane- associated proteins in eicosanoid and glutathion metabolism
MAPK	Mitogen- aktivierte Protein Kinase
MCP 1	Monocyte chemoattractant protein 1
MK	MAPK activated protein kinase
MPC	Magnetic particle concentrator
NADH	Nicotinamid- Adenin- Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid- Adenin- Dinukleotid- Phosphat
NF κB	Nuklearfaktor κB
n. s.	Nicht signifikant
OAG	1- Oleoyl- 2 Acetyl-sn-Glycerol
Orai1	Calcium Release- activated Calcium Modulator 1
PIP2	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol- 12- myristat- 13- acetat
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species Reaktive Sauerstoffspezies
SOC	Store operated channel
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
siRNA	small interference RNA
STIM1	Stromal interaction molecule 1
TNF α	Tumor necrose factor α
TRPA	Transient Receptor Potential Ankyrin
TRPC	Transient Receptor Potential Canonical
TRPM	Transient Receptor Potential Melastatin
TRPML	Transient Receptor Potential Mucolipin

TRPN	Transient Receptor Potential no mechanoreceptor potential C
TRPP	Transient Receptor Potential Polycystin
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung.....	8
2	Grundlagen.....	10
2.1	Die TRP- Superfamilie.....	10
2.1.1	Phylogenetische Einteilung der TRP- Superfamilie	10
2.1.2	TRPC- Kanäle.....	12
2.1.3	Aktivierungsmechanismen der TRPC- Kanäle.....	12
2.1.4	TRPC6 und assoziierte Erkrankungen.....	14
2.2	Oxidativer Stress.....	15
2.3	Acetylcystein und Glutathion.....	17
2.3.1	Acetylcystein.....	17
2.3.2	Glutathion	19
2.4	Homocystein.....	22
2.4.1	Arteriosklerose.....	22
2.4.2	Homocystein als Risikofaktor.....	23
2.5	Calciumhomöostase und Calcium- Signalkaskade.....	26
3	Material und Methoden.....	27
3.1	Materialien.....	27
3.2	Patientencharakterisierung.....	30
3.3	Monozytenisolierung.....	30
3.4	In- Cell- Western Assay (Immundetektion).....	31
3.5	Fluoreszenz- Messung der intrazellulären Calcium- Konzentration	32
3.6	Fluoreszenz- Messung der reaktiven Sauerstoffspezies.....	33
3.7	Chemotaxis.....	33
3.8	Statistische Auswertung.....	35
4	Ergebnisse.....	36
4.1	Effekte von ACC auf die TRPC6- Expression.....	36

4.2	Effekte von ACC auf die Signaltransduktion (ERK/ pERK).....	42
4.3	Einfluss von ACC auf die Calcium- Konzentration	46
4.4	Effekte von Acetylcystein und Homocystein auf reaktive Sauerstoffspezies.....	48
4.5	Effekte von Acetylcystein und Homocystein auf das chemotaktische Verhalten der Monozyten.....	50
5	Diskussion	52
6	Zusammenfassung	56
7	Summary.....	58
8	Anhang.....	59

1 Einleitung und Fragestellung

Die Gruppe der Transient Receptor Potential (TRP)- Kanäle ist eine Superfamilie membranständiger, spannungsunabhängiger Kationenkanäle, die sich anhand von Sequenzhomologien in sieben (bei Säugern sechs) Untergruppen einteilen lassen (Nilius *et al.*, 2007). Bisher sind bei Säugern innerhalb der Untergruppen 27 Vertreter bekannt. Erstmals entdeckt wurden sie 1969 in den Photorezeptoren der *Drosophila melanogaster* (Hotta and Benzer, 1969). Bei den Transient Receptor Potential Canonical (TRPC)- Kanälen handelt es sich um die Unterfamilie, die die meiste Ähnlichkeit zu den TRP- Kanälen der *Drosophila* aufweist. TRPC- Kanäle konnten in diversen Geweben nachgewiesen werden (Nilius *et al.*, 2007). Als nicht- selektive Kationenkanäle sind TRPC- Kanäle u. a. durchlässig für Calcium und folglich an der Calciumhomöostase beteiligt. Bedenkt man, wie viele zelluläre Mechanismen calciumabhängig sind, könnten Fehlfunktionen der TRPC- Kanäle weit reichende Folgen haben (Nilius *et al.*, 2007).

Acetylcystein (ACC) ist ein Derivat der proteinogenen Aminosäure Cystein. Ursprünglich wurde es als Mukolytikum eingesetzt. Es stellte sich jedoch heraus, dass es ein wirksamer Radikalfänger ist und seither wird die Wirkung von ACC insbesondere bei Erkrankungen erforscht, die im Zusammenhang mit einer Verschiebung des Redoxgleichgewichtes der Zelle stehen. Hierzu zählt u. a. Krebs, Leberversagen und Nierenversagen ebenso wie die HIV- Infektion (Aitio, 2006).

Als Modellzellen wurden in der vorliegenden Arbeit Monozyten verwendet. Monozyten sind bei entzündlichen Vorgängen beteiligt, da sie von Mediatoren in das entzündete Gewebe gelockt werden. Dort setzen sie selbst inflammatorische Zytokine frei, wodurch weitere Entzündungszellen angelockt werden. Dies ist bei Erkrankungen, die mit chronischen Entzündungszuständen einhergehen von Bedeutung, wie der Arteriosklerose. Eine durch Zytokine bedingte vermehrte Monozytenaktivität führt zur Aufrechterhaltung des Entzündungszustandes und damit zum Fortschreiten der Erkrankung. Arteriosklerose ist als eine Folgeerkrankung zu sehen von u. a. Diabetes und essentieller Hypertonie, bei denen bereits eine erhöhte TRPC- Expression nachgewiesen werden konnte (Liu *et al.*, 2007; Wuensch *et al.*, 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, in wie weit die Inkubation humaner Monozyten zu einer Reduktion des oxidativen Stress führt und ob dies Auswirkungen auf die TRPC6- Expression der Zelle hat.

Um auf dem bisherigen Kenntnisstand aufzubauen wurden folgende Fragen formuliert:

1. Hat die Inkubation mit ACC einen Einfluss auf die TRPC6- Expression von Monozyten auf Proteinebene?
2. Wie wirkt sich eine veränderte TRPC6- Expression auf Monozyten aus?
3. Lässt sich durch ACC eine verminderte Aktivierung von Monozyten erzielen?

2 Grundlagen

2.1 Die TRP- Superfamilie

Bei den Transient Rezeptor Potential (TRP-) Kanälen handelt es sich um eine Gruppe Ionenkanäle, deren gemeinsames Merkmal die Durchlässigkeit für mono- und/ oder bivalente Kationen ist und für die eine bemerkenswerte Vielfalt von Aktivierungsmechanismen beschrieben worden ist. Sie werden in praktisch allen Geweben und Zelltypen exprimiert und spielen eine große Rolle bei der Regulation verschiedenster Zellfunktionen (Nilius *et al.*, 2007).

Erstmalig beschrieben wurde ein TRP- Kanal 1969 bei der Taufliegenart *Drosophila melanogaster* (Hotta and Benzer, 1969). Bei der Untersuchung eines Phospholipase C (PLC)- abhängigen Vorgangs im Zusammenhang mit der visuellen Wahrnehmung fielen einige Taufliegenmutanten durch ein verändertes Elektroretinogramm auf. Bei den Mutanten kam es auf einen andauernden Lichtreiz hin nur zu einem transienten Rezeptorpotential, wohingegen die nicht- mutierten Artgenossen ein permanentes Rezeptorpotential aufwiesen. Mit dem transienten Rezeptorpotential einher ging eine Störung des Calciumeinstroms, die Sinneszellen waren folglich funktionsunfähig. Aufgrund dieser Untersuchung erhielt der verantwortliche Proteinkomplex den Namen TRP – Transient Rezeptor Potential.

2.1.1 Phylogenetische Einteilung der TRP- Superfamilie

Bis heute unterscheidet man bei Säugetieren 6 Untergruppen (siehe Abbildung 1). Anhand von Sequenzhomologien lassen sich diese zu zwei Gruppen zusammenfassen: Zu der ersten Gruppe zählen die TRPC (Canonical bzw. Classical), TRPV (Vanilloid), TRPM (Melastatin) und TRPA (Ankyrin), zu der zweiten Gruppe die TRPP (Polycystin) und TRPML (Mucolipin)- Kanäle (Nilius *et al.*, 2007; Venkatachalam and Montell, 2007). Eine siebte Untergruppe, die TRPN- Kanäle (auch NOMP, no mechanopotential) wurde bisher nur bei *Drosophila melanogaster*, *C. elegans* (Würmern) und dem Zebrafisch gefunden. Vermutlich gibt es sie bei Säugetieren nicht (Nilius *et al.*, 2007).

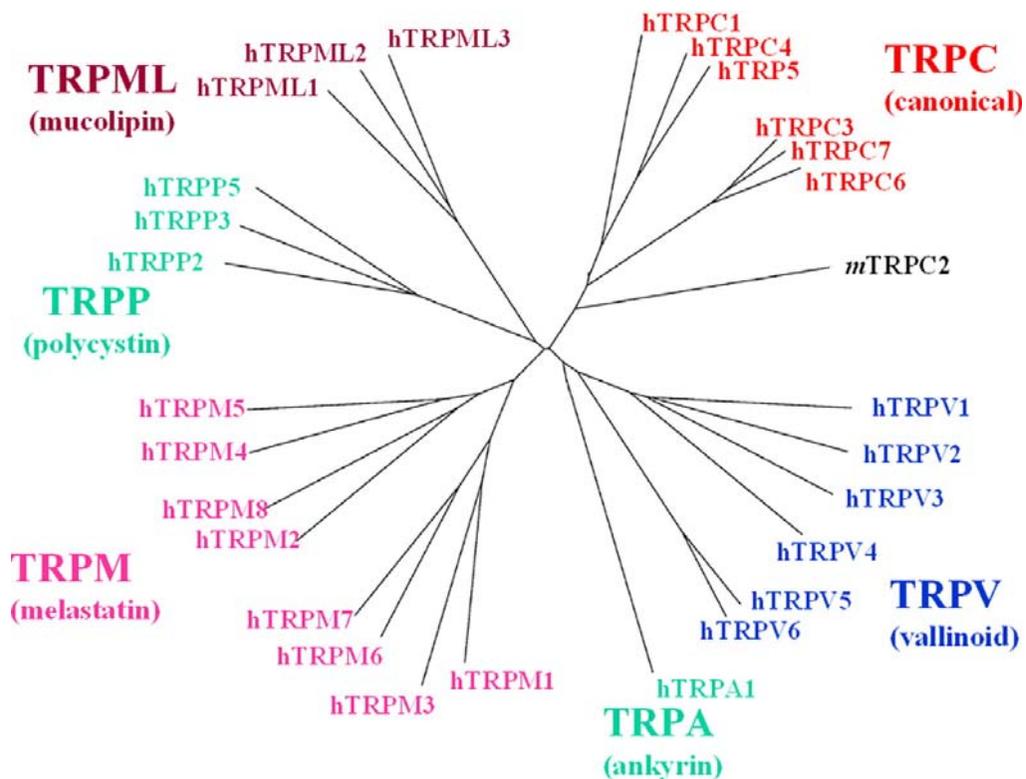


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der TRP- Familie bei Säugetieren (Nilius *et al.*, 2007)

Allen TRP- Kanälen gemeinsam sind 6 Transmembrandomänen, wobei sich zwischen der fünften und der sechsten Transmembrandomäne eine porenbildende hydrophobe Schleife befindet (vgl. Abbildung 2). Sowohl N- als auch C- Terminus liegen intrazellulär. Es bestehen Sequenzhomologien der Transmembrandomänen zwischen den verschiedenen TRP- Kanälen, die allerdings teilweise nur bei etwa 20% liegen (Clapham *et al.*, 2003). Ein funktionsfähiger Ionenkanal besteht aus einem Tetramer, wobei sowohl Homo- als auch bestimmte Heterotetramere aus eng verwandten Kanälen innerhalb der Untergruppen vorliegen können (Schaefer, 2005).

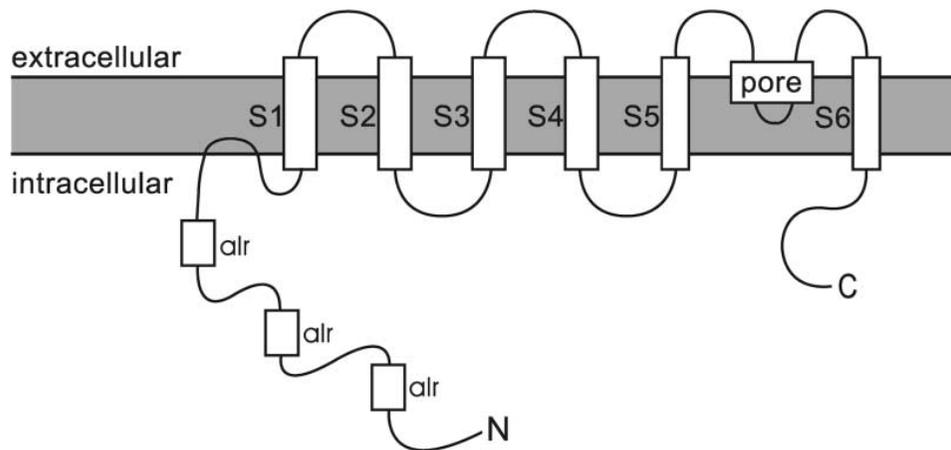


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur der TRP- Kanäle

(alr = ankyrin like repeats) (Zitt *et al.*, 2002).

2.1.2 TRPC- Kanäle

Bei den TRPC– Kanälen handelt es sich um die Unterfamilie mit der größten Ähnlichkeit zu den TRP´s der *Drosophila melanogaster*. Sie vermitteln den Calcium- Einstrom in die Zelle (Liu *et al.*, 2008). Dadurch sind sie maßgeblich an der intrazellulären Calciumhomöostase beteiligt. Bis heute sind 7 TRPC- Kanäle bekannt. Entsprechend ihrer Sequenzhomologien und funktioneller Ähnlichkeiten werden wiederum die TRPC- Kanäle in vier Untergruppen zusammengefasst, nämlich TRPC1, TRPC4 und 5, TRPC3, 6 und 7 sowie TRPC2 (Clapham *et al.*, 2003). TRPC2 wurde bisher in Maus- und Rattengewebe gefunden, liegt beim Menschen aber nur als sog. Pseudogen vor und eine Expression findet nicht statt (Clapham *et al.*, 2003).

2.1.3 Aktivierungsmechanismen der TRPC- Kanäle

Es wurden bisher (neben diversen anderen) hauptsächlich zwei unterschiedliche Aktivierungswege für TRPC- Kanäle diskutiert: Zum einen die Rezeptor- vermittelte, zum anderen die Speicher- vermittelte Aktivierung. Während die Datenlage für TRPC- Kanäle als Rezeptor- reguliert Kanäle relativ eindeutig ist, ist die genaue Identität der speicher- regulierten Kanäle noch weitgehend unbekannt. Um Diese klären zu können wurden insbesondere die TRPC- Kanäle intensiv untersucht, wobei allerdings in über 10 Jahren Forschung keine zufrieden stellenden Ergebnisse erzielt werden konnten, anhand derer die Regulation von TRPC- Kanälen über Speicher- Entleerung eindeutig aufgeklärt werden könnte.

Die speicher- unabhängige, rezeptor- vermittelte Aktivierung (ROC = receptor operated channel) verläuft über einen membranständigen, G- Protein- gekoppelten Rezeptor. Über die α - Untereinheit des G- Proteins wird die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) vermittelt, welche die Bildung von Inositoltriphosphat (InsP3) und Diacylglycerin (DAG) aus dem Membranlipid Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP2) katalysiert (Voets and Nilius, 2007). Es besteht weitgehend Einigkeit darüber, dass die Aktivierung der TRP- Kanäle innerhalb der Signalkaskade abwärts der PLC erfolgt. Der genaue Mechanismus ist hierbei allerdings noch immer unklar, wobei jedoch InsP3 selbst nicht in der Lage ist, TRPC- Kanäle zu aktivieren. Durch DAG aber ist ein deutlicher Effekt zu verzeichnen (Hardie, 2007; Hofmann *et al.*, 1999), welcher durch die Anwesenheit von InsP3 noch stark erhöht wird (Hardie, 2007).

Darüber hinaus wurde für TRPC3, 6 und 7 auch eine direkte, Proteinkinase C (PKC-) unabhängige Aktivierung über DAG (reproduzierbar mittels 1- Oleoyl- 2 Acetyl-sn- Glycerol (OAG), DAG- Analogon) beschrieben (Hofmann *et al.*, 1999), wohingegen TRPC4 und 5 auf DAG nicht reagieren (Nilius *et al.*, 2007).

Weiterhin steht eine Aktivierung bzw. Regulierung durch PIP2 zur Diskussion: Dabei soll PIP2 durch Bindung an Teile des Kanals zu einer Öffnung führen, wobei nicht klar ist, ob hierzu eine Bindung von PIP2 an alle vier Protein- Segmente eines Kanals nötig ist oder die Bindung an einem Segment ausreichend ist. Weiterhin geht man von einer Inaktivierung des Kanals durch Calmodulin aus, welches in der Region des C- Terminus eine Bindungsstelle hat. Diese ist weitgehend überlagert mit der Bindungsstelle für PIP2, so dass es zu einer kompetitiven Verdrängung von Calmodulin durch PIP2 und somit zur Aktivierung des Kanals kommt (Kwon *et al.*, 2007; Voets and Nilius, 2007).

Der sog. Speicher- gesteuerte Aktivierungsmechanismus (store- operated channel, SOC) setzt eine Entleerung der intrazellulären Calcium- Speicher (Endoplasmatisches Retikulum, ER) voraus. Die dadurch erhöhte zytosolische Calciumkonzentration soll zu einer Aktivierung der TRPC- Kanäle führen, wobei allerdings nicht Calcium selbst zu einer Aktivierung führt (Hardie, 2007). Hierbei ging man bisher von drei verschiedenen Mechanismen aus:

Beim sog. „conformational coupling“ wurde eine direkte Verbindung zwischen Calciumspeicher und SOC via Inositoltriphosphat (IP3-) Rezeptor angenommen (Potier and Trebak, 2008).

Eine weitere Theorie postulierte die Existenz eines Calcium Influx Factor (CIF), welcher durch die Speicherentleerung vom ER freigesetzt werden soll und die in der Plasmamembran befindlichen SOCs aktivieren soll (Potier and Trebak, 2008). Die Theorie des sog. „secretion like coupling“ geht vom Einbau fertiger Kanäle in die Membran aus, die entweder in Vesikeln zur Membran gelangen oder durch eine Annäherung des ER zur Plasmamembran.

Neuere Forschungsergebnisse konnten die Mitwirkung von zwei erst kürzlich entdeckten Proteinen an der Aktivierung der SOC nachweisen: Stromal interaction molecule 1 (STIM1) und Calcium Release -activated Calcium Modulator 1 (Orai1). Nach Speicherentleerung kommt es zu Ansammlungen von STIM1 in Regionen des ER, die der Plasmamembran nahe liegen. STIM1 interagiert mit Orai1, wodurch es, vermutlich unter Mitwirkung weiterer Hilfsproteine, zu einer Aktivierung des Kanals kommt (Potier and Trebak, 2008). Scheinbar bildet Orai1 zumindest einen Teil des Kanals (Calcium Release- activated Calcium Channel, CRAC), wobei durch weitere Forschung geklärt werden muss, ob der CRAC allein aus Orai1 oder aus Heteromeren von Orai1 und anderen Proteinen, möglicherweise TRPC- Kanälen, besteht (Nilius *et al.*, 2007).

Die Datenlage bezüglich der Aktivierungsmechanismen ist z. Z. sehr umfangreich und teilweise noch widersprüchlich. Für einige Kanal- Subtypen wurden auch mehrere Mechanismen beschrieben, so z. B. wurde TRPC3 sowohl als SOC als auch als ROC beschrieben (Hardie, 2007).

2.1.4 TRPC6 und assoziierte Erkrankungen

Erkrankungen, die durch Defekte in Genen, die für Ionenkanalproteine kodieren, bedingt sind, bezeichnet man als Channelopathien. Die Kenntnis über den Zusammenhang zwischen Erkrankung und entsprechendem Gendefekt erlaubt die Entwicklung gezielter Therapiemethoden. Um Ionenkanäle als Zielobjekt für medikamentöse Therapien zu nutzen, sind allerdings insbesondere im Fall der TRP-Kanäle mehr Kenntnisse über ihre Physiologie nötig (Nilius *et al.*, 2007).

Jüngste Forschungsergebnisse konnten sechs verschiedene Mutationen des TRPC6-Kanals bei Patienten mit familiärer fokaler segmentaler Glomerulosklerose (FSGS) vom late-onset-Typ nachweisen. FSGS ist eine Nierenerkrankung, die mit gestörter Glomerulusfunktion, Proteinurie und nephrotischem Syndrom einhergeht und die häufig

zu Nierenversagen führt. Im Gegensatz zum early-onset-Typ sind die Schlitzmembran und der glomeruläre Filter zunächst gesund entwickelt und verlieren ihre Funktion zwischen Kindheit und Erwachsenenalter. Zumindest drei der bekannten Mutationen führen zu einer verstärkten Funktion der TRPC6-Kanäle. Der genaue Mechanismus, der vom Gendefekt zur Erkrankung führt ist noch unbekannt. Bemerkenswert ist allerdings die positive Wirkung von Substanzen, die das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System hemmen, wie z. B. ACE-Hemmer.

Weiterhin konnte eine vermehrte Expression von TRPC6-Kanälen auf Monozyten von Diabetes mellitus-Patienten festgestellt werden (Wuensch *et al.*, 2010). Die durch die hyperglykämischen Bedingungen erhöhte Anzahl reaktiver Sauerstoffspezies scheint die Expression von TRPC6-Kanälen zu steigern. Auch hier ist eine genauere Untersuchung, welche Rolle TRPC-Kanäle bei der Entstehung von diabetischen Folgeerkrankungen wie Arteriosklerose oder renaler Dysfunktion nötig, um mögliche Therapieansätze zu finden.

2.2 Oxidativer Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen als Nebenprodukte innerhalb der normalen Stoffwechselfunktion der Zellen. Sie fungieren u. a. als Mediator für Signaltransduktion und Genexpression, haben aber insbesondere in größeren Mengen schädliche Wirkung durch Oxidation und Peroxidation auf DNA, Proteine und Lipide (Aitio, 2006). Oxidativer Stress spielt bei physiologischen Vorgängen wie der Alterung ebenso eine Rolle wie bei diversen Krankheit, u. a. bei kardiovaskulären Erkrankungen, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD), chronischer Niereninsuffizienz, Gelenk- und neurologischen Erkrankungen sowie Krebs (Aitio, 2006).

Durch ROS wird eine inflammatorische Antwort, insbesondere über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuklear Faktor κ B (NF- κ B), initiiert. Es kommt zur Aktivierung von Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) sowie weiteren inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Aitio, 2006). Gleichzeitig ist die Aktivität von NF- κ B abhängig vom Glutathionspiegel der Zelle (Kerksick and Willoughby, 2005). Die bei chronischen Entzündungen durch vermehrten oxidativen Stress reduzierte Menge intrazellulären Glutathion führt über die freigesetzten Zytokine und Chemokine zu deutlichen Effekten auf die Lymphozyten (Aitio, 2006) und damit zur Aufrechterhaltung der Entzündung.

Unter ROS werden folgende Sauerstoffverbindungen verstanden: Das Superoxid-Radikal $O_2^{\cdot-}$, welches aus Sauerstoff durch Aufnahme eines Elektrons entsteht, das Perhydroxylradikal HO_2^{\cdot} , Wasserstoffperoxid H_2O_2 und das Hydroxylradikal OH^{\cdot} (Kerksick and Willoughby, 2005).

ROS entstehen insbesondere im Rahmen der Atmungskette. Diese befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran und dient der Energiegewinnung: Aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat wird Adenosintriphosphat (ATP) erzeugt. Schätzungen zufolge sollen 1-4% der Reaktionen der Atmungskette zur Bildung von Superoxid-Radikalen führen (Kannan and Jain, 2000).

Andererseits machen sich Granulozyten die reaktiven Sauerstoffspezies zunutze, indem sie über Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase oder Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH)-Oxidoreduktase extrazelluläres Superoxid erzeugen, welches bakterizid wirkt. Dieser Vorgang wird „oxidative burst“ genannt. (Kerksick and Willoughby, 2005).

Nicht zuletzt entstehen reaktive Sauerstoffspezies auch durch Bestrahlung, zytotoxische Medikamente und Drogen (Kannan and Jain, 2000).

ROS führen zu Schäden an den Biomolekülen. So induzieren sie z. B. Strangbrüche an der DNA, verändern Proteine und führen zur Oxidation von ungesättigten Fettsäuren der Zellmembran. Dieser als Lipidperoxidation bezeichnete Vorgang führt zu einer Verminderung der Fluidität der Membran, welche dadurch weniger durchlässig für Proteine und Nährstoffe wird (Kerksick and Willoughby, 2005).

Um diese Schädigungen zu verhindern werden ROS sowohl enzymatisch als auch nicht-enzymatisch inaktiviert. Die enzymatische Inaktivierung erfolgt mittels Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase und Katalase, die nicht-enzymatische Inaktivierung durch Antioxidantien wie Ascorbinsäure (Vitamin C) oder α -Tocopherol (Vitamin E).

Für bereits eingetretene Schäden an Biomolekülen hält die Zelle Reparaturmechanismen bereit, die eine Instandsetzung oder den Ersatz der beschädigten Strukturen vorsehen (Löffler and Petrides, 2003).

Aufgrund des Zusammenhangs von oxidativem Stress und kardiovaskulärer Erkrankungen wurde die Gabe von Acetylcystein (ACC) als antioxidative Therapie untersucht. Es konnte eine Minderung des Risikos für kardio-vaskuläre Erkrankungen nachgewiesen werden, eine Minderung der Mortalität war allerdings nicht zu verzeichnen (Tepel *et al.*, 2003).

2.3 Acetylcystein und Glutathion

Acetylcystein (ACC) und Glutathion (GSH) stehen beide im Zusammenhang mit einer Reduktion des oxidativen Stresses. Während GSH gemeinsam mit weiteren Enzymen ein körpereigenes Entgiftungssystem darstellt, kommt ACC inzwischen bei verschiedenen Indikationen als Medikament zum Einsatz. Dabei wird die Entfaltung der antioxidativen Wirkung von ACC auch über eine Beeinflussung und Aktivierung des GSH- Systems erzielt. Folglich ergeben sich die meisten bisher untersuchten Therapieansätze von ACC aus der Funktion bzw. dem Funktionsausfall des GSH- Systems.

2.3.1 Acetylcystein

ACC ist ein synthetisches Derivat der proteinogenen Aminosäure L- Cystein und damit gleichzeitig ein Vorläufer von reduziertem GSH (Kelly, 1998). Zunächst aufgrund seiner mukolytischen Eigenschaften wurde es seit den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts eingesetzt (Poppe, 1964). Seitdem ist es Gegenstand intensiver Forschung auf verschiedensten Gebieten, insbesondere von Erkrankungen, die im Zusammenhang mit oxidativem Stress stehen (Aitio, 2006; Kelly, 1998).

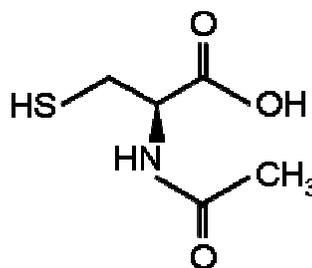


Abbildung 3: Strukturformel Acetylcystein (Sigma Aldrich)

Nach oraler Gabe unterliegt ACC (siehe Abbildung 3) einem hohen First- pass- Effekt, d. h. es wird nach Resorption aus dem Dünndarm auf dem Weg zur und in der Leber fast komplett metabolisiert. So gelangt nur ein geringer Teil ACC in den Blutkreislauf und damit ins Gewebe, die Bioverfügbarkeit ist also anscheinend gering. Da allerdings Cystein und Schwefelverbindungen die wichtigsten Metaboliten und verantwortlich für viele der protektiven Eigenschaften von ACC zu sein scheinen, resultiert dies nicht in einer Wirkminderung (Kelly, 1998).

Die antioxidative Wirkung von ACC wird auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt:

So kommt es durch ACC- Gabe zu einer Stimulation der intrazellulären GSH- Synthese, indem das für die GSH- Synthese notwendige Cystein zur Verfügung gestellt wird (Caylak *et al.*, 2008). Hierbei kommt die antioxidative Wirkung auf indirektem Wege über das GSH- System zur Entfaltung. ACC ist folglich über die Stimulation der GSH- Synthese in der Lage, verminderte GSH- Vorräte der Zelle wieder aufzufüllen (Kelly, 1998).

Für die direkte antioxidative Wirkung ist die Sulfhydrylgruppe verantwortlich, die als Radikalfänger fungiert, indem sie Hydroxylradikale und Wasserstoffperoxid reduzieren kann (Kelly, 1998). Gleichzeitig wirkt ACC membranstabilisierend, indem es mit seiner Sulfhydrylgruppe an Sulfhydrylgruppen von Proteinen bindet und dadurch deren Zerstörung durch reaktive Sauerstoffspezies und Peroxide verhindert.

Als Sulfhydrylgruppen- Quelle ist ACC weiterhin in der Lage, die Aktivität der Glutathion- S- Transferase zu verstärken (Kelly, 1998).

Die mukolytische Wirkung von ACC beruht auf einer Spaltung von Disulfidbrücken der Mukopolysaccharidfasern, weswegen ACC zur Sekretolyse bei Bronchitis eingesetzt wird (Aitio, 2006).

ACC verstärkt den vasodilatierenden Effekt von NO indem beide unter Bildung von S-Nitroso- acetylcystein reagieren, was als relativ langlebiger und biologisch aktiver Speicher von NO gilt (Martina *et al.*, 2008; Scharfstein *et al.*, 1994). Eine weitere Verstärkung der vasodilatatorischen Wirkung resultiert aus dem Einfluss von ACC auf das Angiotensin- System. Dabei liegen zwei Wirkmechanismen zugrunde: Reaktive Sauerstoffspezies sind Teil der Angiotensin- II- Signalkaskade, folglich führt eine durch ACC vermittelte Reduktion der reaktiven Sauerstoffspezies zu einer Senkung des Blutdrucks (Ullian *et al.*, 2005). Zudem kann eine Reaktion der Sulfhydrylgruppe von ACC mit einer der beiden in der extrazellulären Region des Rezeptors gelegenen Disulfidbindung eine Veränderung der Tertiärstruktur bewirken. Dies resultiert in einer verminderten Interaktionsfähigkeit zwischen Angiotensin II und dem Angiotensin- 1a Rezeptor (Ullian *et al.*, 2005).

Darüber hinaus soll durch ACC der durch reaktive Sauerstoffspezies induzierte programmierte Zelltod blockiert werden (Kannan and Jain, 2000).

ACC wird zur Prophylaxe Kontrastmittel- induzierter Nephropathie empfohlen (Tepel and Zidek, 2002), wenn es auch Autoren gibt, die einen prophylaktischen Effekt nur bei geringen Mengen an Kontrastmittel sehen (Boccalandro *et al.*, 2003).

Bei Paracetamolvergiftung wird ACC sehr effektiv als Antidot eingesetzt. Durch die Bereitstellung von Cystein können die GSH- Vorräte der Leber, die zum Abbau der toxischen Paracetamol- Metaboliten notwendig sind, aufgefüllt und so ein Leberversagen verhindert werden (Heard, 2008).

Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz konnte durch intravenöse Gabe von ACC eine Senkung des Plasma- Homocysteinspiegels erzielt werden, der mit einer Senkung des Blutdrucks sowie einer Verbesserung der Endothelfunktion einher ging (Scholze *et al.*, 2004).

Da bei Patienten mit humanem Immundefizienzvirus (HIV) ebenfalls geringe GSH- und Cysteinspiegel vorliegen, wird auch hier seit längerem die Wirkung von ACC untersucht. Die Ergebnisse sind allerdings noch nicht überzeugend (Aitio, 2006; Kelly, 1998).

2.3.2 Glutathion

Bei GSH handelt es sich um ein Tripeptid, bestehend aus den Aminosäuren L- Glutaminsäure, L- Cystein und Glycin. Man findet es in sämtlichen Körperzellen, teilweise in beträchtlichen Mengen. Zu den vielen Funktionen von GSH zählen seine antioxidative Wirkung, die Entgiftung von elektrophilen Fremdstoffen, Speicher und Transport von Cystein sowie die Beteiligung an Prostaglandin- und Leukotrien- Stoffwechsel (Kerksick and Willoughby, 2005).

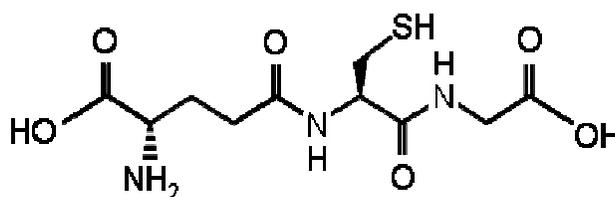


Abbildung 4: Strukturformel Glutathion (Sigma Aldrich)

Abbildung 4 zeigt GSH in seiner reduzierten Form als Monomer, in oxidierten Form liegt es als Dimer vor. Beide Formen gehen im Rahmen von Redoxreaktionen der Zelle ineinander über, was durch ein System an Enzymen katalysiert wird. Dabei liegt die reduzierte Form zu ca. 98%, die oxidierte folglich nur zu ca. 2% vor. Unter Verbrauch von NADH katalysiert die Glutathionreduktase die Bildung von reduziertem GSH aus der als Dimer vorliegenden oxidierten Form (Kerksick and Willoughby, 2005). Als

Bestandteil des Thiol- Puffers ist GSH wesentlich an der Aufrechterhaltung des Redoxstatus der Zelle beteiligt.

GSH ist Substrat mehrerer Enzyme, wodurch ROS, Peroxide und schädliche Stoffe entgiftet werden. Für die antioxidative Wirkung sind insbesondere die Glutathion-Peroxidasen verantwortlich, die Wasserstoffperoxid sowie organische Peroxide mittels Oxidation von Glutathion zu Wasser bzw. Alkohol umsetzen (Löffler and Petrides, 2003; Meister, 1994).

Ebenfalls zum Entgiftungssystem gehört die Gruppe der Glutathion- S- Transferasen. Diese Enzyme können reaktive Verbindungen abfangen, bevor sie ein Elektron auf Sauerstoffverbindungen übertragen können, sowie durch Konjugation mit GSH viele Medikamente und Giftstoffe unschädlich machen (Aitio, 2006). Die Glutathion- S- Transferase ist auch bei der Entgiftung von Cancerogenen beteiligt. Ein Defekt der Glutathion- S- Transferase geht daher mit einem erhöhten Risiko für Krebserkrankungen einher (Löffler and Petrides, 2003).

Auch die Reduktion und damit Aktivierung von oxidiertem α - Tocopherol und Ascorbinsäure erfolgt durch das Glutathion- System (Meister, 1994).

Bei der Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen aus Arachidonsäure spielt GSH ebenfalls eine wichtige Rolle. So ist die Prostaglandin E Synthase ebenso wie die Leukotrien C₄ Synthase GSH- abhängig. Beide gehören zur Superfamilie der sog. MAPEG: Membrane- associated proteins in eicosanoid and glutathion metabolism (Thoren and Jakobsson, 2000).

GSH vermindert die Oxidation von Membranlipiden (Kerksick and Willoughby, 2005). Insbesondere die bereits oben erwähnte Lipidperoxidation wird durch GSH vermindert und damit die Membranfluidität erhalten.

Weiterhin spielt GSH bei der Synthese von Desoxyribonukleotiden und damit bei der Synthese und Reparatur von DNA eine wichtige Rolle, ebenso wie bei der Faltung neu produzierter Proteine durch die Mitwirkung bei der Bildung und Rückbildung von Disulfidbrücken (Meister, 1994).

Da bei der GSH- Synthese immer Cystein den limitierenden Faktor darstellt, kann in Mangelsituationen eine vermehrte Synthese durch ACC initiiert werden (Aitio, 2006).

Erniedrigte GSH- Spiegel treten beim Menschen bei Gendefekten des beteiligten Enzymsystems auf (Gamma- Glutamyl- Zirkel: γ - Glutamylcystein- Ligase, Glutathion-

Synthetase, γ -Glutamyl- Transpeptidase, γ - Glutamyl- Dipeptidase und γ - Glutamyl- 5-Oxoprolinase; nur für die γ - Glutamyl- Cyclotransferase ist noch kein Gendefekt nachgewiesen worden). Diese angeborenen Defekte kommen selten vor und führen bei drastisch reduzierten GSH- Spiegel in i. d. R. zum Tod des Fetus noch vor der Geburt (Ballatori *et al.*, 2009). Bei moderatem Verlauf weisen diese Patienten u. a. hämolytische Anämie, Störungen des zentralen Nervensystems, motorische Störungen und mentale Retardation auf (Meister, 1994).

Reduzierte GSH- Level resultieren in einer Herabsenkung der antioxidativen Kapazität und damit in einer erhöhten Anfälligkeit für oxidativen Stress. Daher konnten reduzierte Glutathionspiegel bisher mit diversen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden: So wurden erniedrigte Spiegel bei älteren Patienten mit Parkinson beschrieben, ein Zusammenhang mit Alzheimer gilt als wahrscheinlich, wenn die Datenlage auch noch etwas widersprüchlich ist (Ballatori *et al.*, 2009).

Eine Assoziation konnte auch mit dem ebenfalls typischerweise im Alter auftretenden Katarakt (Meister, 1994), Glaukom und der Makuladegeneration beobachtet werden (Ballatori *et al.*, 2009).

Ein erniedrigter GSH- Gehalt der Zelle birgt prinzipiell das Risiko der Entartung. Andererseits weisen manche Krebszellen stark erhöhte GSH- Spiegel auf, welche zum Einen schlechter auf Chemotherapeutika ansprechen und zum Anderen weniger zum programmierten Zelltod neigen, da Caspasen u. a. durch niedrige Glutathionspiegel aktiviert werden (Ballatori *et al.*, 2009).

Bei den durch ROS mit verursachten kardiovaskulären Erkrankungen Hypertension und Arteriosklerose, bei Lungenerkrankungen wie COPD und Asthma, aber auch bei Autoimmunerkrankungen wie M. Crohn, systemischer Lupus erythematodes oder Psoriasis wurden erniedrigte Glutathionspiegel beschrieben (Ballatori *et al.*, 2009).

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird durch erniedrigte GSH- Level aktiviert und führt bei HIV- Patienten zu einer Replikation der Viren. Durch ACC konnte dies blockiert werden (Staal *et al.*, 1990).

Auch Diabetes mellitus geht mit erniedrigten GSH- Spiegel einher, was in einer zusätzlichen Wirkungsverstärkung der durch die Hyperglykämie induzierten ROS resultiert (Ballatori *et al.*, 2009).

In dieser kurzen Zusammenfassung sind lediglich Grunderkrankungen mit jeweils einigen Beispielen benannt. Bereits mit dem heutigen Wissensstand ließe sich die Liste

der mit einer Dysregulation der Glutathionspiegel assoziierten Erkrankungen noch deutlich erweitern und es ist zu erwarten, dass im Rahmen zukünftiger Forschung noch viele weitere Erkrankungen hinzukommen. Umso mehr unterstreicht dies die elementare Rolle von GSH im Rahmen der Gesunderhaltung des gesamten Organismus.

2.4 Homocystein

L- Homocystein (HC) (siehe [Abbildung 5](#)) ist eine natürlich vorkommende, nicht-proteinogene Aminosäure, die eine wichtige Rolle im Methionin- Stoffwechsel spielt. Chemisch handelt es sich um ein eine CH_2 - Gruppe längeres Homologe von Cystein, einer bedingt essentiellen Aminosäure, die beim Abbau von Methionin gebildet wird.

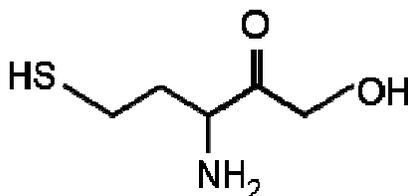


Abbildung 5: Strukturformel Homocystein (Sigma Aldrich)

Eine Akkumulation von Homocystein in Blut und Gewebe, wie z. B. bei einer Störung der Cystathioninsynthaseaktivität, kann zu Endothelschäden bis hin zu Gefäßverschlüssen führen. Erhöhte HC- Werte werden neben erhöhten Cholesterinwerten als wesentlicher ätiologischer Faktor für Arteriosklerose angesehen.

2.4.1 Arteriosklerose

Als Arteriosklerose bezeichnet man eine Erkrankung der arteriellen Gefäßwand, die durch eine chronische Entzündungsreaktion hervorgerufen wird. Sie ist charakterisiert durch die Ausbildung von sog. Plaques, die aus Lipiden, kalzifizierten Regionen, glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Makrophagen und Schaumzellen bestehen (Woollard and Geissmann, 2010). Durch eine fortschreitende Bildung von Plaques kommt es zu einer zunehmenden Verengung der Arterie bis hin zur Stenose.

Als Risikofaktor gilt u. A. arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, chronisches Nierenversagen, Hypercholesterinämie und Hyperhomocysteinämie.

Das initiale Ereignis zur Entstehung der Läsion wurde in verschiedenen Theorien kontrovers diskutiert, wobei man z. Z. davon ausgeht, dass es durch einen verminderten Abtransport zu einer intramuralen Retention von atherogenen Lipoproteinen kommt (Williams and Tabas, 1995). Es kommt zur Oxidation von Low density Lipoprotein (LDL). Hierbei kann leicht oxidiertes LDL Endothel- und Muskelzellen aktivieren, Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP 1) zu exprimieren (Cushing *et al.*, 1990) und somit chemotaktisch auf Monozyten zu wirken. Stärker oxidiertes LDL soll hingegen direkt chemoattraktiv auf Monozyten wirken (Quinn *et al.*, 1987).

Die frühen Läsionen der Arteriosklerose, auch „fatty streaks“ genannt, entstehen durch Einwanderung von Leukozyten, i. d. R. Monozyten und T- Lymphozyten in die Gefäßwand. Die Monozyten differenzieren im Gewebe zu Makrophagen und, durch Lipid- Anreicherung, zu Schaumzellen (Wang *et al.*, 2000). Durch freigesetzte Entzündungsmediatoren wie Zytokine und Chemokine werden weitere Monozyten angelockt, was zu einer Vergrößerung der Läsion führt (Raines and Ross, 1995).

Das Fortschreiten der Läsion geht mit einer Verdickung der Arterienwand einher, bedingt durch eine verstärkte Proliferation glatter Muskelzellen und der Bildung von Bindegewebe (Raines and Ross, 1995; Woollard and Geissmann, 2010). Häufig kommt es zu Nekrosen innerhalb des Entzündungskerns, auf welchem sich im weiteren Verlauf eine fibrotische Kappe bildet, die aus Bindegewebe und eingebetteten Muskelzellen besteht (Raines and Ross, 1995). Durch Ulzeration oder Aufbrechen dieser fibrotischen Kappe kann es zur Bildung eines Thrombus und damit zum vollständigen Verschluss des Blutgefäßes kommen (Woollard and Geissmann, 2010).

Folgen der Arteriosklerose sind Thrombosen, Myokardinfarkt und Schlaganfall. Laut Statistischem Bundesamt sind kardiovaskuläre Erkrankungen in Deutschland seit Jahren die häufigste Todesursache.

2.4.2 Homocystein als Risikofaktor

Gemäß Definition der American Heart Association (AHA) liegen normale Plasmaspiegel zwischen 5 und 15 $\mu\text{mol/L}$. Plasmaspiegel über 100 $\mu\text{mol/L}$ gelten als stark erhöht und sind i. d. R. ein Zeichen für einen angeborenen Defekt des Methioninstoffwechsels (Maron and Loscalzo, 2009). Im Blut existiert HC frei oder proteingebunden als N-homocysteinyliertes oder S- homocysteinyliertes Protein. Ca 80% liegt in gebundener Form vor, frei vorkommendes HC liegt meist oxidiert als Cystin- Dimer oder als Heterodimer mit Cystein vor (Karolczak and Olas, 2009).

In der groß angelegten Hordaland Homocysteine Study (1992- 1993) konnte ein Zusammenhang der Höhe des HC- Spiegels mit dem Lebensstil gezeigt werden. So konnte eine direkte Abhängigkeit der Höhe des HC- Spiegels von der am Tag konsumierten Menge Kaffee sowie der Anzahl gerauchter Zigaretten nachgewiesen werden. Andererseits stellte sich ein geschlechtsspezifischer Unterschied dar: So haben Männer generell höhere HC- Spiegel als Frauen, wobei die Spiegel bei beiden Geschlechtern im Alter anstiegen (Refsum *et al.*, 2006).

HC entsteht während des Abbaus von Methionin und kann im Rahmen einer Vitamin B12 - und Folsäure - abhängigen Remethylierungsreaktion zu Methionin zurück verwandelt werden. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Methionin- Synthase. Alternativ kann Homocystein über den Weg der Transsulfurierung weiter zu Cystathionin abgebaut werden. Diese Reaktion wird durch die Cystathionin- B- Synthase katalysiert, deren Co-Faktor Vitamin B6 (Pyridoxal- Phosphat) ist. In bestimmten Geweben wie Leber und Niere wird die Remethylierung zu Methionin auch über die Betain- Homocystein- Methyltransferase vorgenommen (Maron and Loscalzo, 2009).

Fehlfunktionen der HC- Umsetzung führen zu einer Akkumulation in Blut und Geweben. Dabei kann als Ursache ein angeborener Enzymdefekt zugrunde liegen oder es handelt sich um einen Mangel der als Co- Faktoren benötigten Vitamine B12 und B6 sowie Folsäure.

Als häufigste genetische Ursache wird ein Defekt der Cystathionin- B- Synthase angesehen. Hier sind inzwischen über 100 mit Erkrankungen assoziierte Mutationen bekannt (Maron and Loscalzo, 2009).

Ein Mangel an Folsäure und Vitamin B12 kann entweder durch eine nicht ausreichende Zufuhr mit der Nahrung zustande kommen oder, im Fall von Vitamin B12, durch einen Mangel an Intrinsic factor, wodurch eine adäquate Resorption aus dem Darm verhindert wird (Maron and Loscalzo, 2009). Vitamin B6 hingegen wird in ausreichenden Mengen in der Leber gespeichert und kann in sämtlichen Nahrungsgruppen gefunden werden. Folglich tritt ein Mangel nur bei Patienten auf, bei denen eine Kombination aus Leberschaden und mangelhafter Ernährung vorliegt (Maron and Loscalzo, 2009).

Ein erhöhter HC- Spiegel gilt als unabhängiger Risikofaktor für Arteriosklerose und deren Folgeerkrankungen wie Herzinfarkt, Schlaganfall und Thrombosen. HC wird die

Erzeugung endothelialer Dysfunktion und einer erhöhten Plättchen- Aktivität sowie erhöhter Koagulationsneigung zugeschrieben (Karolczak and Olas, 2009; Wang *et al.*, 2000). Funktionelle Veränderungen des Endothels sollen bereits durch geringe Mengen HC hervorgerufen werden (Karolczak and Olas, 2009).

Durch Homocysteinylierung mehrerer Aminosäuren, darunter Lysin, an Fibrinogen soll die Struktur des Thrombus verändert und möglicherweise stabilisiert werden, da so die Bindungsstellen fibrinolytischer Enzyme belegt würden (Karolczak and Olas, 2009).

Weiterhin wird die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies durch HC verstärkt, wodurch es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, Exprimierung von inflammatorischen Zytokinen (Aitio, 2006; Kerksick and Willoughby, 2005; Wang *et al.*, 2000) aber auch zu einer Verminderung von NO kommt (Karolczak and Olas, 2009). Studien an glatten Muskelzellen der humanen Aorta zeigten nach Inkubation mit HC einen Anstieg der MCP- 1- Expression via Stimulation des Trankriptionsfaktors NF- κ B (Wang *et al.*, 2000).

Nicht nur bei der Entstehung der Arteriosklerose gilt HC als Risikofaktor sondern auch bei neurologischen Erkrankungen wie Demenz, vermutlich auch bei Parkinson und multipler Sklerose (Maron and Loscalzo, 2009). Weiterhin finden sich erhöhte HC- Spiegel bei Osteoporose und damit verbundenen Frakturen, häufig bei End stage Niereninsuffizienz, Hypothyreoidismus und Östrogenmangel (Maron and Loscalzo, 2009).

Bei Kindern mit Enzymdefekten und folglich stark erhöhten HC- Spiegel wurden mentale Retardation, Linsendislokation, Osteoporose und Thromboseneigung beobachtet (Maron and Loscalzo, 2009). Erhöhte Spiegel während der Schwangerschaft können zu Neuralrohrdefekten führen (Maron and Loscalzo, 2009; Refsum *et al.*, 2006)

Als Erfolg versprechender Therapieansatz wurde die Senkung des Plasma-homocysteinspiegels durch Folsäure- und Vitamin B12- Supplementierung angesehen. Leider sind die bisher erzielten Ergebnisse eher enttäuschend, da eine Senkung des HC- Spiegels zwar erzielt werden konnte, allerdings nicht wie erhofft mit einer Senkung des Risikos für kardiovaskuläre oder neurologische Erkrankungen einher ging (Maron and Loscalzo, 2009).

Die schädigende Wirkung erhöhter HC- Spiegel ist seit längerem bekannt und anerkannt. Andererseits gibt es Forschungsergebnisse, die HC in Konzentrationen von 10- 100 $\mu\text{mol/l}$ die Erzeugung von ROS nicht nachweisen konnten (Zappacosta *et al.*, 2000), bzw. sogar einen antioxidativen Effekt aufgrund der Thiolgruppe postulierten (Caylak *et al.*, 2008).

2.5 Calciumhomöostase und Calcium- Signalkaskade

Eine Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration führt fast immer zu einer Aktivierung der Zelle und damit zu einer markanten Änderung des Zellstoffwechsels. Unter Zellaktivierung versteht man die Stimulierung der Zelle zur Ausübung ihrer spezifischen Funktion, wie z. B. Muskelkontraktion, Transmitterfreisetzung, aber auch Proliferation, Transkription und Apoptose werden über Calcium- Ionen vermittelt. Daher ist eine sehr enge Regulation der cytosolischen Calciumkonzentration nötig, die unter normalen Umständen etwa bei 10^{-7} mol/l und erhöht bei etwa 10^{-5} mol/l liegt. Ca-ATPasen und Antiportsysteme halten die Calciumkonzentration im Cytosol konstant. Für eine Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration aus dem Extrazellulärraum stehen sowohl spannungs- als auch liganden- regulierte Calciumkanäle zur Verfügung. Eine Konzentrationserhöhung aus dem Intrazellulärraum erfolgt über InsP3- aktivierte Calciumkanäle aus dem ER.

InsP3 entsteht durch Hydrolyse des Membranlipids Phosphatidylinositol- 4,5- biphosphat (PIP₂) mittels der Phospholipase C (G- Protein- gekoppelt). Als weiteres Produkt entsteht hierbei DAG. Während InsP3 durch Bindung an den IP₃- Rezeptor auf der Membran des ER zu einer Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration führt, aktivieren DAG und Calcium gemeinsam die Proteinkinase C (PKC), welche über die Regulation von Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- κ B auf die Genexpression einwirkt. Die notwendige Menge Calcium entstammt dabei auch dem Extrazellulärraum, da durch die Speicherentleerung Store operated channels auf der Plasmamembran aktiviert werden (Estacion *et al.*, 2004).

3 Material und Methoden

Zur Untersuchung der Wirkung von Acetylcystein (ACC) auf die Transient Rezeptor Potential Canonical Subtyp 6 (TRPC6)- Expression auf humanen Monozyten erfolgten Immunfluoreszenzmessungen und Fluoreszenzmessungen der intrazellulären Calciumkonzentration sowie intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies. Darüber hinaus wurde das Migrationsverhalten untersucht. Voraussetzung für die Durchführung aller Versuche war die Isolation der Monozyten aus Vollblut. Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit der Darstellung der Versuchsdurchführung, der hierzu verwendeten Materialien und Geräte sowie den Zusammensetzungen der benötigten Lösungen.

3.1 Materialien

Chemikalien

Blocking Buffer	Li- Cor Biosciences GmbH, Bad Homburg
BSA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calcein- AM	Calbiochem, San Diego
Calciumchlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat	Calbiochem, San Diego
D- Glucose	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Di- Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Dynabeads CD14	Invitrogen Dynal Biotech ASA, Oslo, Norwegen
Formaldehyd Lösung 35%	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fuchsin	Merck KGaA, Darmstadt
Fura- 2/ AM	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Gadolinium- III- Chlorid hexahydrat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glutathion	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Histopaque 1077	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HEPES	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Homocystein	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid	Fluka Chemie, Buchs
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie, Buchs

L- Glucose	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumchlorid	Fluka Chemie, Buchs
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
N- Acetyl- L- Cystein	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Fluka Chemie, Buchs
RPMI 1640	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TNF α	Calbiochem
Triton X- 100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L- Octylphenoxypolyethoxyethanol	
Tween 20 Detergent	Calbiochem, San Diego

Verbrauchsmaterialien

Einmal- Pasteurpipetten 3,5ml	Neolab, Heidelberg
Papier zur Reinigung optischer Gläser	Neolab, Heidelberg
Pipettenspitzen	Sarstedt Ag & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter	Molecular Bioproducts, San Diego
Polycarbonate Membranes	Neuro probe, Gaithersburg, USA
8 μ m pores, 25 x 80 mm	
Safe- seal Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt Ag & Co., Nümbrecht
Safe- seal Reagiergefäß 2ml	Sarstedt Ag & Co., Nümbrecht
Vacutainer 11,0ml	Becton Dickinson, Plymouth
96 Well- Platte	Nalge nunc international, Rochester
nunc13710 / 96F Nunclon Delta black microwell si	
96 Well Platte	Nalge nunc international, Rochester
26530 96 Well optical Btm Plt Polymer Base black w/o lid	

Puffer und Lösungen

Fixing Solution	0,5 ml Formaldehyd 35%, 4,5 ml HBSS
HBSS	136 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,44 mM
Hanks Balanced Salt Solution	KH ₂ PO ₄ , 0,34 mM Na ₂ HPO ₄ , 5,6 mM D-Glucose, 1,0 mM CaCl ₂ , 1,0 mM MgCl ₂ , 10 mM HEPES, pH 7,4 mit 1M NaOH einstellen
Triton Washing Solution	0,5 ml 10% Triton X- 100, 49,5 ml HBSS
Tween Washing Solution	0,25 ml 20% Tween 20, 49,75 ml BHSS

Geräte

Boyden chamber 5P48 645	Neuro probe, Gaithersburg, USA
Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
Fluoroskan Ascent FL	Labsystems, Helsinki
Magnetic particle concentrator	Invitrogen Dynal Biotech
Mikroskop ID03	Zeiss, Jena
Odyssey Infrared Imaging System	Li- Cor Biosciences GmbH, Bad Homburg
pH- Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Plattenschüttler IKA MTS 2/4 digital	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Rührer Variomag mono, Komet	H + P Labortechnik GmbH, Hackermoos
Vortexer Vibrofix VF1 Electronic	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Waage LE 623 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad SW 22	Julabo, Seelbach
Zählkammer Neubauer	Laboroptik, Friedrichsdorf
Zentrifuge Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg

Software

Ascent Software Version 2.4.2
Odyssey v1.2
Microsoft Excel 2003
GraphPad Prism 5.0

Antikörper

Rabbit anti human TRPC6	Alomone Labs, Jerusalem
Sheep anti rabbit 800	Rockland Immunochemicals, Gilbertsville
Goat anti human GAPDH	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California
Donkey anti goat 680	Invitrogen, Carlsbad, Californien
Rat anti human CD11a	Serotec, Martinsried, Deutschland
Goat anti rat	Invitrogen, Carlsbad, Californien
Rabbit anti human ERK	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California
Rabbit anti human pERK	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California

3.2 Patientencharakterisierung

Monozyten wurden aus dem Blut von 27 Personen (17 Männer, 10 Frauen) gewonnen. Bei drei Personen handelte es sich um Diabetiker (3 Frauen), bei 8 Personen um Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (6 Männer, 2 Frauen). Für die Untersuchungen an den Blutzellen besteht ein zustimmendes Votum der Ethikkommission der Charité- Universitätsmedizin Berlin. Alle Patienten gaben ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Untersuchung.

3.3 Monozytenisolierung

Zur Isolierung der Monozyten aus heparinisiertem Vollblut wurden jeweils 20ml Blut auf zwei Zentrifugenröhrchen (Vacutainer, Becton Dickinson, Plymouth) verteilt und 10 Minuten bei 2100 Rotationen pro Minute zentrifugiert. Das in der oberen Hälfte des Zentrifugenröhrchens befindliche Plasma wurde mit Einmal- Pasteurpipetten abpipettiert und verworfen. Der Hämatokrit wurde mit 3ml HBSS gemischt. In neue Röhrchen wurde jeweils 3ml Histopaque ® 1077 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) vorgelegt, auf welches das Zellgemisch vorsichtig hinauf gegeben wurde, ohne dass es zu einer Vermischung der beiden Schichten kam. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 15

Minuten bei 2300 Rotationen pro Minute. Die im Histopaque ®1077 enthaltene Polysaccharose führt zu einer Aggregation der Erythrozyten und Granulozyten, wodurch diese schneller sedimentieren. Durch diese Dichtegradientenzentrifugation erfolgt eine Auftrennung der Zellgemischbestandteile: Oben befindet sich Plasma, darunter – als weißer Ring – mononukleäre Zellen, darunter Histopaque ® 1077 und am Grund Erythrozyten und Granulozyten. Die Ringe mit den Monozyten wurden abpipettiert, in neue Röhrchen gegeben und erneut für fünf Minuten bei 3000 Rotationen pro Minute zentrifugiert. Anschließend wurde der Flüssigkeitsüberstand dekantiert und das Pellet in 1ml HBSS resuspendiert. Um nun die Monozyten aus den mononukleären Zellen zu isolieren, wurde je ml Zellsuspension 25µl Dyna beads (Dynabeads CD14, Invitrogen Dynal Biotech ASA, Oslo) hinzu gegeben. Dynabeads binden selektiv an Zellen, die auf ihrer Oberfläche das Antigen CD14 präsentieren, was bei humanen Monozyten zutrifft. Gleichzeitig sind sie paramagnetisch, sodass mit Hilfe eines Magneten (MPC magnetic particle concentrator, Invitrogen Dynal Biotech ASA, Oslo) die an Dynabeads gebundenen Monozyten von den restlichen Bestandteilen der Suspension getrennt werden können. Die Inkubation mit den Dynabeads erfolgte bei 4°C für 60 Minuten. Sämtliche andere Arbeitsschritte zur Monozytenisolierung erfolgten bei Raumtemperatur.

3.4 In- Cell- Western Assay (Immundetektion)

Mit dem In- Cell Western Assay lässt sich ein gewünschtes Protein in einer Zelle nachweisen. Hierbei bindet ein erster Antikörper spezifisch an das gesuchte Protein. Ein zweiter fluoreszierender Antikörper bindet wiederum spezifisch an den ersten Antikörper und kann schließlich durch das Li- Cor Odyssey Gerät gemessen und durch die Odyssey v1.2- Software visualisiert werden. Da das System mit zwei Fluoreszenzkanälen arbeitet, lässt sich neben dem Zielprotein ein weiteres sog. Referenzprotein nachweisen. Hierfür bedient man sich des Nachweises eines „housekeeping“ Proteins, das in allen Zellen in gleicher Menge exprimiert werden soll. In der vorliegenden Arbeit wurden als Referenzproteine Glycerinaldehyd- 3- Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und Alpha L integrin chain (CD11a) verwendet. Die Ausbeute des Zielproteins wird auf die des Referenzproteins bezogen, das Ergebnis wird also normalisiert. So führen eventuelle Zellzahlunterschiede innerhalb der Wells nicht zu einer Verfälschung der Ergebnisse.

Im Anschluss an die Monozytenisolierung wurden die Zellen drei Mal in Hanks balanced salt solution (HBSS) gewaschen, wobei einem Verlust der Zellen durch die Anwendung des Magnetic particle concentrator (MPC) vorgebeugt wurde, und in einem dem jeweiligen Versuch angepassten Volumen HBSS aufgenommen. Es wurden – je nach Versuchsaufbau - mehrere Ansätze Zellsuspension mit verschiedenen Substanzen versetzt und für vier Stunden im Wasserbad (Julebo SW 22, Seelbach) bei 37°C inkubiert. Von der Zellsuspension jedes Ansatzes wurde anschließend 100µl je Well auf eine 96 Well Mikroplatte (Nalge nunc international, Rochester) pipettiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte für 20 Minuten mit Fixing Solution (4,5ml HBSS, 0,5ml 35% Formaldehyd). Sollte GAPDH als Referenz nachgewiesen werden, wurden die Zellen nun mit Triton Washing Solution (49,5ml HBSS, 0,5ml Triton X 100) permeabilisiert. Wurde CD11a als Referenz verwendet, war eine Permeabilisierung nicht notwendig, da sich CD11a ebenso wie TRPC6 an der Zelloberfläche befindet.

Die Zellen wurden nun für 60 Minuten bei 4°C in Blocking Buffer (Li- Cor Biosciences GmbH, Bad Homburg) aufgenommen, wodurch unspezifische Bindungsstellen besetzt werden sollten.

Anschließend erfolgte die Zugabe des 1. Antikörpers. Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden unter leichtem Schütteln (Plattenschüttler IKA MTS 2/4 digital, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen). Nach Inkubation wurde die überschüssige Menge Antikörper durch viermaliges Waschen mit Tween Washing solution (49,75ml HBSS, 0,25ml Tween 20 Detergent) entfernt. Analog erfolgte nun das Vorgehen mit dem 2. Antikörper, welcher allerdings nur eine Stunde inkubierte. Zuletzt wurde Blocking Buffer (Li- Cor Biosciences GmbH, Bad Homburg) in die Wells gegeben und die Platte im Odyssey Infrared Imaging System (Li- Cor Biosciences GmbH, Bad Homburg) vermessen.

3.5 Fluoreszenz- Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration

Die intrazelluläre Calcium- Konzentration kann mithilfe des Calcium- Chelators Fura 2/ AM (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) bestimmt werden. Die Zellen werden für ca. 40 Minuten (Herstellerangabe) mit Fura-2/ AM inkubiert. Bei Fura- 2/ AM handelt es sich um einen Acetoxymethylester, der membranpermeabel ist und in die Zellen aufgenommen wird. Durch intrazelluläre Esterasen erfolgen die Aufspaltungen der

Esterbindungen und damit die Aktivierung zu Fura-2. Im Gegensatz zu Fura-2/AM ist die aktivierte Form Fura-2 nicht membranpermeabel und kann nicht wieder aus den Zellen hinaus diffundieren. Das Absorptionsmaximum der calciumgebundenen Form von Fura-2 liegt bei 340nm, das der calciumungebundenen Form bei 380nm.

Nach Isolierung der Monozyten erfolgte die Inkubation mit Fura-2/AM für eine Stunde. Im Anschluss wurden die Zellen drei Mal in HBSS gewaschen und auf eine 96 Well Platte (26530 96 Well optical Btm Plt Polymer Base black w/o lid, Nalge nunc international, Rochester) aufgetragen. Die Messung der Fluoreszenz bei den Anregungswellenlängen $\lambda_1 = 340\text{nm}$ und $\lambda_2 = 380\text{nm}$ wurde mit dem Fluoroskan Ascent FL (Labsystems, Helsinki) sowie die Berechnung des Quotienten λ_1 / λ_2 mit der dazugehörigen Ascent Software Version 2.4.2 durchgeführt.

3.6 Fluoreszenz- Messung der reaktiven Sauerstoffspezies

Ähnlich der Calciummessung wurde auch zur Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ein fluoreszierender Farbstoff verwendet. Die lipophile Substanz 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat gelangt durch Diffusion in die Zelle. Dort erfolgt eine Aufspaltung der Esterbindung durch Esterasen und es entsteht 2',7'-Dichlorofluorescein, welches in Anwesenheit von ROS zu Dichlorofluorescein oxidiert wird. Die Fluoreszenzintensität von Dichlorofluorescein ist direkt proportional zur intrazellulären ROS- Konzentration.

Die isolierten Monozyten wurden für eine Stunde mit H₂DCF-DA inkubiert, anschließend drei Mal mit HBSS gewaschen und auf eine 96 Well Platte (26530 96 Well optical Btm Plt Polymer Base black w/o lid, Nalge nunc international, Rochester) pipettiert. Auch hier wurde analog zur Calciummessung der Fluoroskan Ascent FL (Labsystems, Helsinki) mit entsprechender Software verwendet. Die Excitationswellenlänge betrug 485nm, die Emissionswellenlänge 530nm.

3.7 Chemotaxis

Zur Untersuchung der Migrationsfähigkeit der Zellen nach Inkubation mit Acetylcystein und Homocystein kam ein Versuchsaufbau nach Boyden zur Anwendung (siehe [Abbildung 6](#)). Bei der sog. Boyden Chamber sind zwei Kompartimente durch eine Membran getrennt, wobei sich im oberen Kompartiment Zellen in Nährlösung, im unteren Kompartiment Nährlösung mit einem Lockstoff befindet. Der Porendurchmesser

der Membran muss eine Transmigration der Zellen erlauben, welche schließlich auf der Unterseite der Membran detektiert werden.

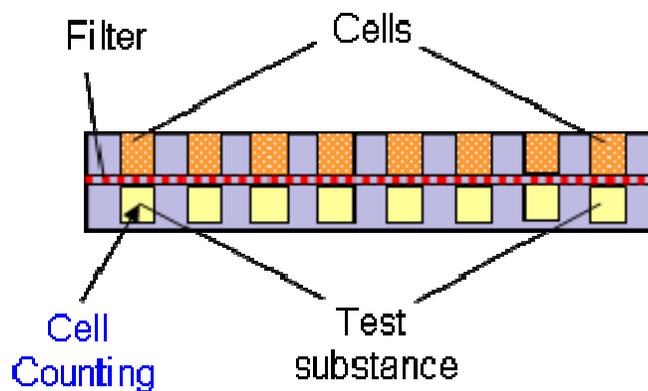


Abbildung 6: Aufbau der Boyden Chamber

In der vorliegenden Arbeit wurden die Monozyten nach Isolierung mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Calcein bzw. Fura 2/AM) versehen und nach einstündiger Inkubation im Nährmedium RPMI 1640 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) mit bovinem Serumalbumin (BSA; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) aufgenommen und mit ACC bzw. HC versetzt. In den unteren Teil der Boyden Chamber wurde in jeweils 6 Wells RPMI mit TNF α pipettiert, welches als Lockstoff fungierte. Als Kontrolle wurde zusätzlich in 6 Wells RPMI ohne TNF α pipettiert. Darüber wurde vorsichtig die Membran (Polycarbonate Membranes 8 μ m pores, 25 x 80 mm, Neuro probe, Gaithersburg, USA) gelegt. Anschließend wurde der obere Teil der Kammer aufgesetzt und fest verschraubt. In die Wells oberhalb der Membran wurde nun Zellsuspension ohne Stimulanz als Kontrolle, Zellsuspension mit ACC sowie Zellsuspension mit Homocystein blasenfrei pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 20 Stunden bei 37°C im Brutschrank (Binder GmbH, Tuttlingen).

Nach der Inkubation wurde die Membran vorsichtig aus der Kammer entfernt, die Zellen von der Oberseite mittels einer Gummilippe entfernt und mit dem Fluoroskan Ascent FL (Labsystems, Helsinki) vermessen sowie mit der Ascent Software Version 2.4.2 (Labsystems, Helsinki) ausgewertet.

3.8 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Messdaten werden als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt.

Zum Vergleich von zwei Gruppen wurde der parametrische t- Test bzw. der nicht-parametrische Mann- Whitney- Test angewendet. Zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde bei vorliegender Normalverteilung die Varianzanalyse nach ANOVA angewandt. Lag keine Normalverteilung vor, wurde der nicht- parametrische Kruskal-Wallis- Test verwendet.

Als Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde $p < 0,05$ als statistisch signifikant, $p < 0,01$ als sehr signifikant und $p < 0,001$ als hochsignifikant angenommen, die in den graphischen Darstellungen mit *, ** und *** gekennzeichnet sind.

Die Berechnung, Auswertung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit der Microsoft Excel 2003 und Graph Pad Prism 5.0 Software.

4 Ergebnisse

Zur Durchführung der Versuche wurden die Monozyten wie in Kapitel 3.3 beschrieben zunächst aus Vollblut isoliert. Anschließend erfolgte für den In- Cell- Western Assay die Inkubation mit Acetylcystein (ACC), Homocystein (HC) bzw. Glutathion (GSH). Für die Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und der Calciumkonzentration wurden die Monozyten zusätzlich mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Als Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz Zellsuspension ohne Stimulanz verwendet.

4.1 Effekte von ACC auf die TRPC6- Expression

Zur Bestimmung der Proteinexpression von Transient Rezeptor Potential Canonical (TRPC6)- Kanälen wurden die isolierten Monozyten in Hanks balanced salt solution (HBSS) aufgenommen und mit ACC (gelöst in HBSS) in ansteigender Konzentration für jeweils 4 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde ein In- Cell- Western Assay durchgeführt, wobei Alpha L integrin chain (CD11a) als Referenz fungierte.

Die Spezifität der verwendeten Antikörper wurde zuvor mittels eines Western Blots nachgewiesen.

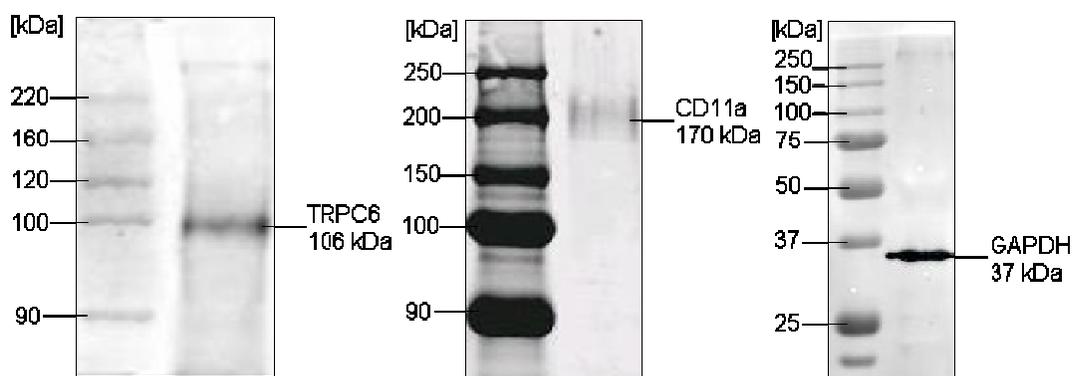


Abbildung 7: Western Blot der verwendeten Antikörper gegen Transient Rezeptor Potential Canonical 6 (TRPC6), Alpha L- integrin chain (CD11a), Glycerinaldehyd- 3- Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). Jeweils links Darstellung der Proteinleiter und rechts Protein- und Antikörpernachweis.

Abbildung 7 zeigt jeweils links die zugehörige Protein Leiter, rechts den Nachweis von Protein und Antikörper. TRPC6 hat eine Größe von 106 kDa, CD11a von 170 kDa und Glycerinaldehyd- 3- Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) von 37 kDa. Anhand der Proteinleiter lässt sich die Größe des mit dem Antikörper markierten Proteins abschätzen und so die Spezifität des jeweiligen Antikörpers bestätigen.

Die eingesetzten ACC- Konzentrationen betragen 50µg/ml, 250µg/ml, 500µg/ml, 750µg/ml sowie 1000µg/ml. In Abbildung 8 ist der Anstieg der TRPC6- Expression im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Die Quantifizierung der Proteinexpression wurde rechnerisch zum verwendeten Referenzprotein (CD11a) normalisiert.

Es zeigte sich bereits ab einer Konzentration von 250µg/ml ACC eine signifikante Steigerung der TRPC6- Expression von $0,047 \pm 0,0013$ (Kontrollgruppe) auf $0,0615 \pm 0,0022$ ($n = 4$; $p < 0,01$). Die Inkubation mit ACC in einer Konzentration von 500µg/ml, 750µg/ml und 1000µg/ml führt zu einer hoch signifikanten Steigerung. Hierbei resultierte eine Konzentration von 500µg/ml in einer Zunahme der Expression auf $0,0655 \pm 0,0022$ ($n = 4$; $p < 0,001$), ACC in der Konzentration von 750µg/ml auf $0,0675 \pm 0,0030$ ($n = 4$; $p < 0,001$) und 1000µg/ml auf $0,0716 \pm 0,0032$ ($n = 4$; $p < 0,001$). Lediglich die durch ACC in der Konzentration von 50µg/ml erreichte Zunahme auf $0,0589 \pm 0,0030$ ($n = 4$; $p = n. s.$) ist nicht signifikant. Die durch ACC bewirkte Steigerung der TRPC6- Proteinexpression ist folglich dosisabhängig.

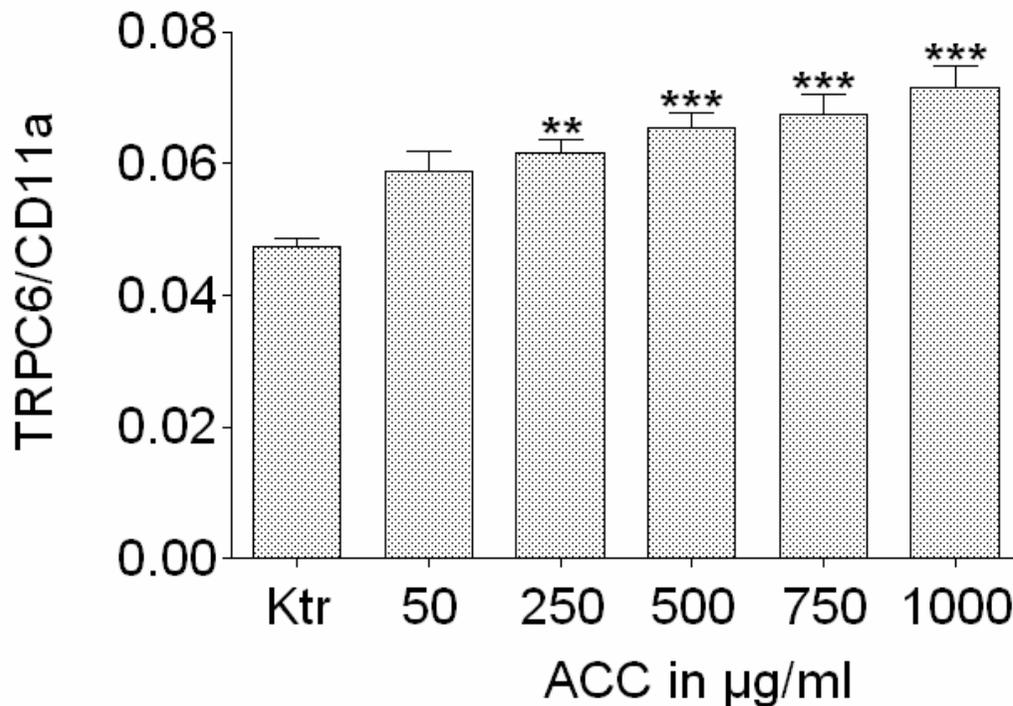


Abbildung 8: Dosisabhängige Steigerung der Expression von TRPC6 Kanälen in Monozyten durch Acetylcystein (ACC). Nachweis mittels quantitativen In- Cell Western Assay und spezifischen primären sowie fluoreszierenden sekundären Antikörpern. Die TRPC6 Expression wurde auf die Expression von Alpha- L integrin chain (CD11a) normalisiert. Inkubation für 4 Stunden in Abwesenheit von ACC (Kontrolle, Ktr) oder in steigenden ACC- Konzentrationen. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Versuchen. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

Um den Zusammenhang von TRPC6- Expression und Inkubationszeit zu untersuchen, wurden isolierte Monozyten mit 500µg/ml ACC für 2, 4 und 20 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Auch hier lief als Kontrolle ein Ansatz mit Zellsuspension ohne Stimulanz mit. Referenzprotein war GAPDH.

Abbildung 9 zeigt den zeitabhängigen Anstieg der TRPC6- Expression: Bei einer Inkubationsdauer von zwei Stunden zeigte sich kein Effekt im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle $0,0633 \pm 0,0031$; nach 2 h $0,0639 \pm 0,0025$; $n = 4$; $p = n. s.$). Nach 4 Stunden Inkubation hingegen ließ sich ein hoch signifikanter Anstieg auf $0,1446 \pm 0,0044$ ($n = 4$; $p < 0,001$) feststellen. Nach 20 Stunden Inkubationsdauer war im Vergleich zur Kontrolle ein noch immer hoch signifikanter Anstieg auf $0,1228 \pm 0,0072$ ($n = 4$; $p <$

0,001) zu verzeichnen. Der leichte Rückgang nach 20 Stunden im Vergleich zu 4 Stunden ist nicht signifikant. Somit scheint die ACC- Wirkung nicht nur dosis- sondern auch zeitabhängig zu sein.

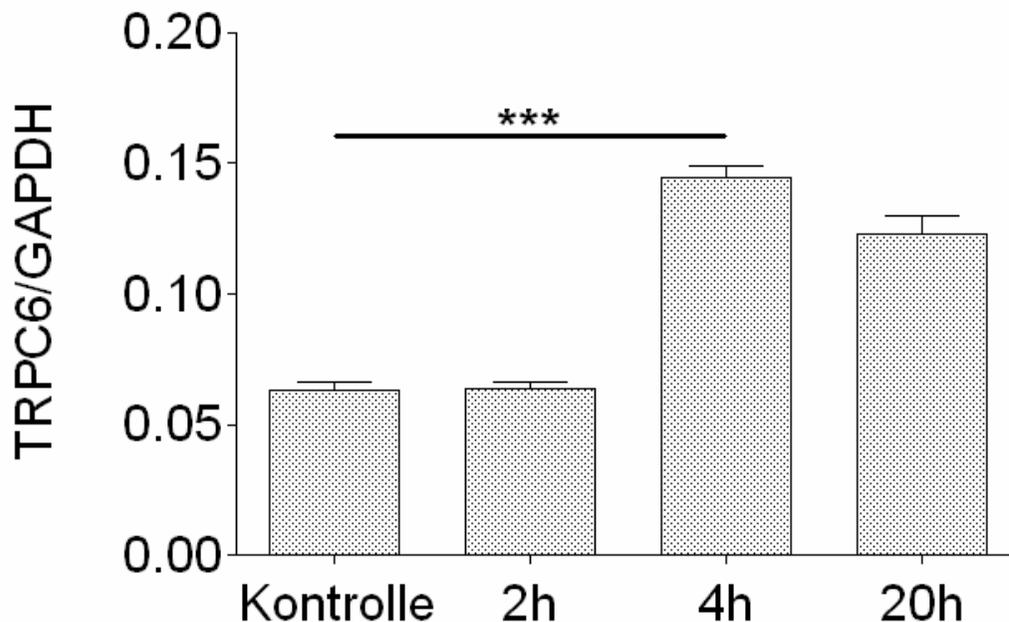


Abbildung 9: Zeitabhängige Steigerung der TRPC6 Expression in Monozyten nach Inkubation mit Acetylcystein (ACC). Nachweis mittel quantitativen In- Cell Western Assay mit spezifischen primären und fluoreszierenden sekundären Antikörpern. Die TRPC6 Expression wurde auf die Expression von Glycerinaldehyd- 3- Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. Inkubation mit 500µg/ml ACC für 2, 4 und 20 Stunden. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Versuchen. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

Neben ACC wurden die Monozyten mit HC und GSH – ebenfalls für 4 Stunden bei 37°C – inkubiert. Abbildung 10 stellt die Ergebnisse zusammen gefasst dar. Im Vergleich zur Kontrolle tritt bei Glutathion kein Effekt auf ($0,0431 \pm 0,0015$ Kontrolle zu $0,0436 \pm 0,0018$ Glutathion; $n = 4$; $p = n. s.$). Dagegen zeigen die mit ACC inkubierten Zellen einen hoch signifikanten Anstieg der TRPC6 Expression auf $0,0549 \pm 0,0024$ ($n = 12$; $p < 0,001$) und die mit HC inkubierten Zellen auf $0,0688 \pm 0,0017$ ($n = 4$; $p < 0,001$).

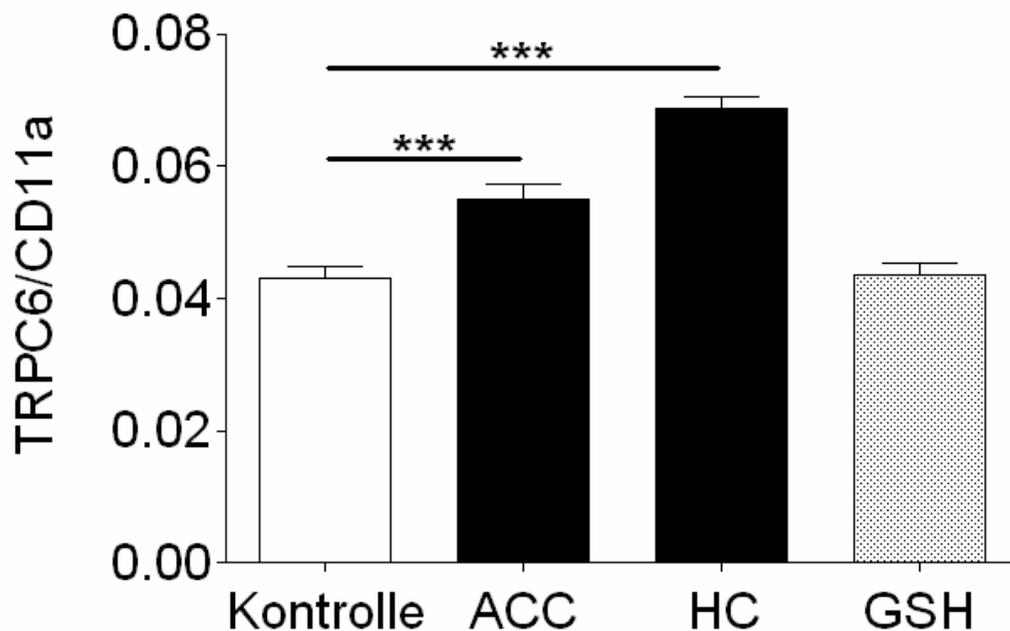


Abbildung 10: Steigerung der TRPC6 Expression in Monozyten durch Acetylcystein (ACC) oder Homocystein (HC), nicht aber durch Glutathion (GSH). Nachweis mittels quantitativen In-Cell Western Assay mit spezifischen primären und fluoreszierenden sekundären Antikörpern. Die TRPC6 Expression wurde auf die Expression von Alpha- L integrin chain (CD11a) normalisiert. Inkubation für 4 Stunden in Abwesenheit aller Substanzen als interne Kontrolle oder mit 500µ/ml ACC, HC oder GSH. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte ± SEM aus 12 (ACC) bzw. 4 (HC, GSH) unabhängigen Versuchen. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

In [Abbildung 11](#) sind die Daten einzeln für Probanden mit chronischer Niereninsuffizienz (CKF), in [Abbildung 12](#) für Probanden ohne CKF dargestellt. Jeweils links ist ein Scan eines repräsentativen Experiments gezeigt. Dargestellt sind TRPC6 im grünen, CD11a im roten Kanal und beide Kanäle als Overlay. Bei Inkubation mit ACC (2. Spalte Wells) und HC (3. Spalte Wells) zeigt sich eine erhöhte Fluoreszenzintensität von TRPC6 im Vergleich zur Kontrolle und mit GSH inkubierten Monozyten.

Aus dem Vergleich der beiden Gruppen wird deutlich, dass der Effekt von ACC und HC bei beiden Gruppen auftritt, bei den Probanden mit CKF aber der Anstieg durch HC signifikant stärker ausfällt. So tritt nach ACC- Inkubation in der Nicht- CKF- Gruppe eine Steigerung von $0,0478 \pm 0,0034$ auf $0,0597 \pm 0,0044$ ($n = 5$; $p < 0,05$), nach HC- Inkubation auf $0,0650 \pm 0,0007$ ($n = 2$; $p < 0,01$) auf. Bei den CKF- Probanden zeigte sich nach ACC- Inkubation eine Steigerung von $0,0403 \pm 0,0015$ auf $0,0520 \pm 0,003$

(n = 7; p < 0,01), nach HC- Inkubation auf $0,0729 \pm 0,0032$ (n = 2; p < 0,001).

Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang mit dem bei CKF- Patienten vorliegenden erhöhten Plasma- Homocysteinspiegel.

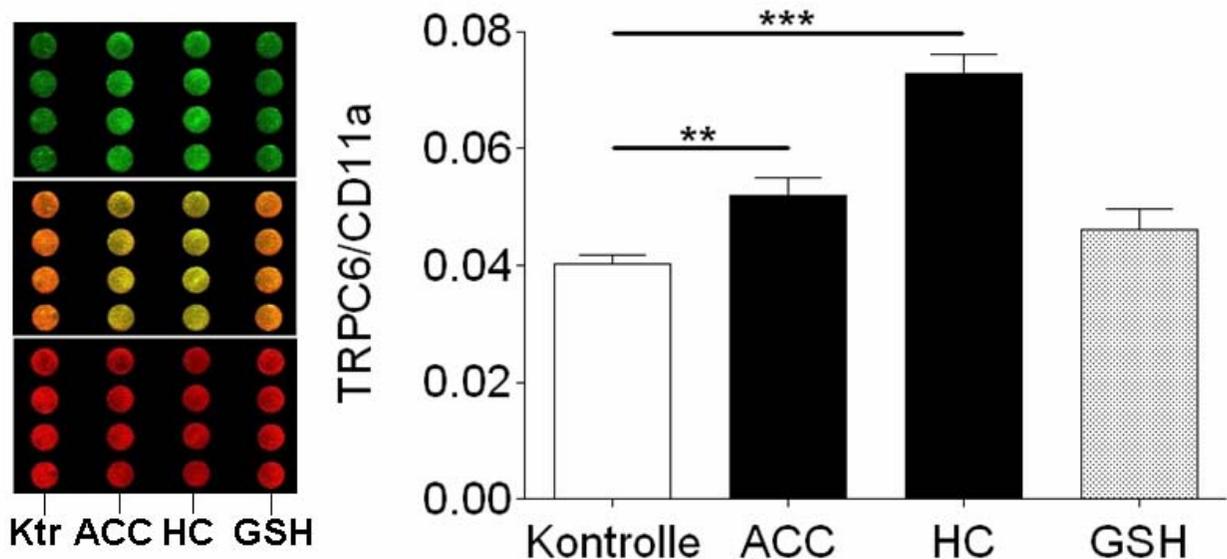


Abbildung 11: Steigerung der TRPC6 Expression durch Acetylcystein (ACC) oder Homocystein (HC), nicht aber durch Glutathion (GSH) bei Personen mit chronischer Niereninsuffizienz (CKF). Nachweis mittels quantitativen In- Cell Western Assay und spezifischen primären und fluoreszierenden sekundären Antikörpern. Inkubation für 4 Stunden in Abwesenheit aller Substanzen oder mit 500µg/ml ACC, HC oder GSH. Links ist der Scan eines repräsentativen Experiments dargestellt. Nachweis von TRPC6 im grünen Kanal (oben), des Referenzproteins Alpha-L integrin chain (CD11a) im roten Kanal (unten) sowie Darstellung beider Kanäle als Overlay (Mitte). Die Belegung der Wells entspricht in Spalten der Reihenfolge von links nach rechts den Säulen im Blockdiagramm. Deutliche Intensitätssteigerung der Fluoreszenz bei ACC und HC. Rechts Darstellung der Daten im Blockdiagramm als Mittelwerte \pm SEM aus 7 (ACC) bzw. 2 (HC, GSH) unabhängigen Versuchen. Die TRPC6 Expression wurde auf die Expression von GAPDH normalisiert. ** p < 0,01, *** p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle (Ktr).

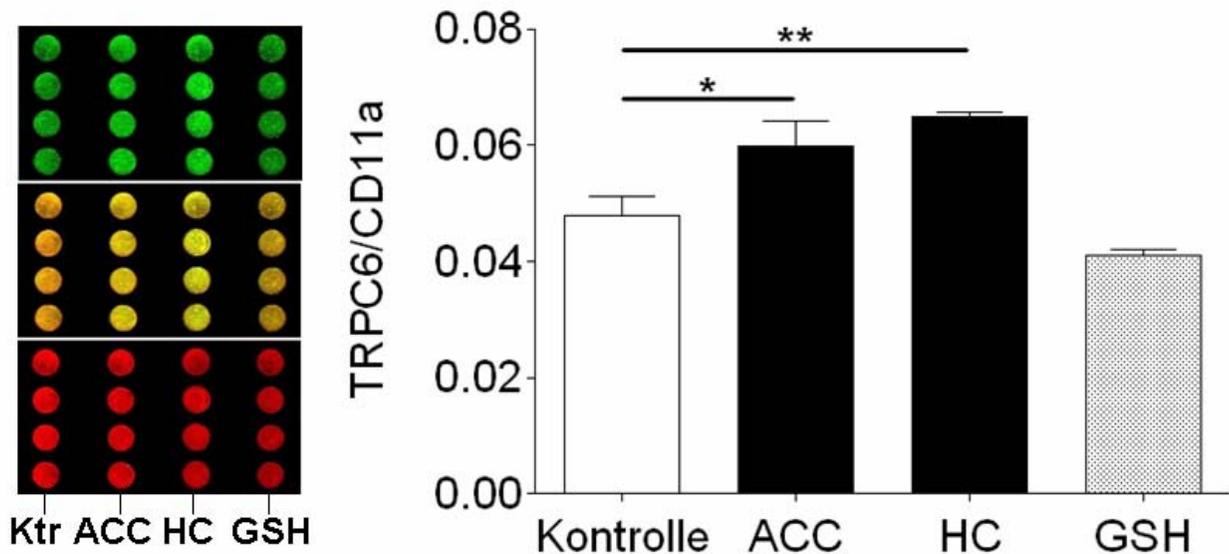


Abbildung 12: Steigerung der TRPC6 Expression durch Acetylcystein (ACC) oder Homocystein (HC), nicht aber durch Glutathion (GSH) bei Personen ohne chronische Niereninsuffizienz (CKF). Nachweis mittels quantitativen In- Cell Western Assay und spezifischen primären und fluoreszierenden sekundären Antikörpern. Inkubation für 4 Stunden in Abwesenheit aller Substanzen oder mit 500µg/ml ACC, HC oder GSH. Links ist der Scan eines repräsentativen Experiments dargestellt. Nachweis von TRPC6 im grünen Kanal (oben), des Referenzproteins Alpha- L integrin chain (CD11a) im roten Kanal (unten) sowie Darstellung beider Kanäle als Overlay (Mitte). Die Belegung der Wells entspricht in Spalten der Reihenfolge von links nach rechts den Säulen im Blockdiagramm. Deutliche Intensitätssteigerung der Fluoreszenz bei ACC und HC. Rechts Darstellung der Daten im Blockdiagramm als Mittelwerte \pm SEM aus 5 (ACC) bzw. 2 (HC, GSH) unabhängigen Versuchen. Die TRPC6 Expression wurde auf die Expression von CD11a normalisiert. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle (Ktr).

4.2 Effekte von ACC auf die Signaltransduktion (ERK/ pERK)

Mitogen- aktivierte Protein Kinase Kaskaden (MAPK- Kaskaden) sind wichtige Signalwege der Zelle im Rahmen von Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Insbesondere bei Krebserkrankungen liegt häufig eine durch Mutation verursachte verstärkte Aktivierung der MAPK- Kaskade vor, weshalb intensiv nach möglichen therapeutischen Ansätzen geforscht wird. Daher ist dieser Signalweg vergleichsweise gut verstanden (Roberts and Der, 2007).

Die durch die MAP- Kinase- Kaskade aktivierte Extracellular – signal Regulated Kinase (ERK) (bzw. ihre phosphorylierte Form pERK) kann durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Genexpression der Zelle beeinflussen, oder durch Aktivierung diverser Proteine im Zytoplasma auf verschiedenste Zellfunktionen einwirken. Hierzu zählen z. B. die Regulation der Motilität sowie die Beteiligung am Integrin- Signaling oder der dynamischen Umstrukturierung des Cytoskeletts (Pullikuth and Catling, 2007).

In einem In- Cell- Western Assay wurden ERK sowie pERK nachgewiesen, wobei je ein Ansatz Kontrolle, ein Ansatz mit ACC und zwei Ansätze mit ACC und einem Kationenkanal- Blocker – Gadolinium oder 2- Aminoethoxydiphenylboran (2APB) – für 4 Stunden bei 37°C inkubiert wurden. Referenzprotein war GAPDH. Auch hier war zuvor die Spezifität der verwendeten Antikörper mittels eines Western Blot nachgewiesen worden. Abbildung 13 stellt analog zu Abbildung 7 links die Proteinleiter und rechts den Nachweis des markierten Proteins dar. pERK hat eine Größe von 42kDa, ERK von 40 kDa.

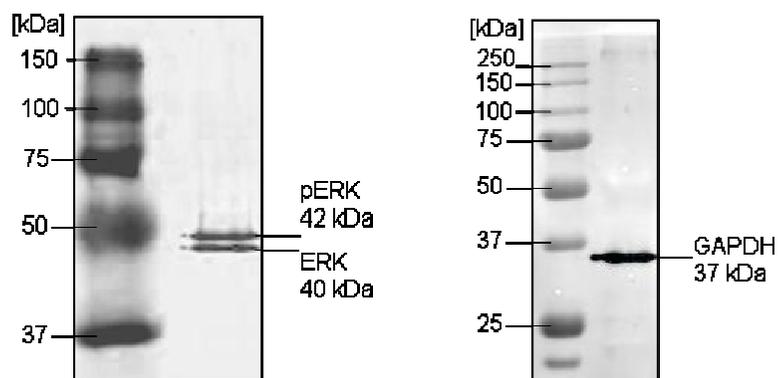


Abbildung 13: Western Blot der verwendeten Antikörper gegen (phosphorylierte) Extracellular-signal Regulated Kinase (pERK/ ERK) und Glycerinaldehyd- 3- Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). Jeweils links Darstellung der Proteinleiter und rechts Protein- und Antikörpernachweis.

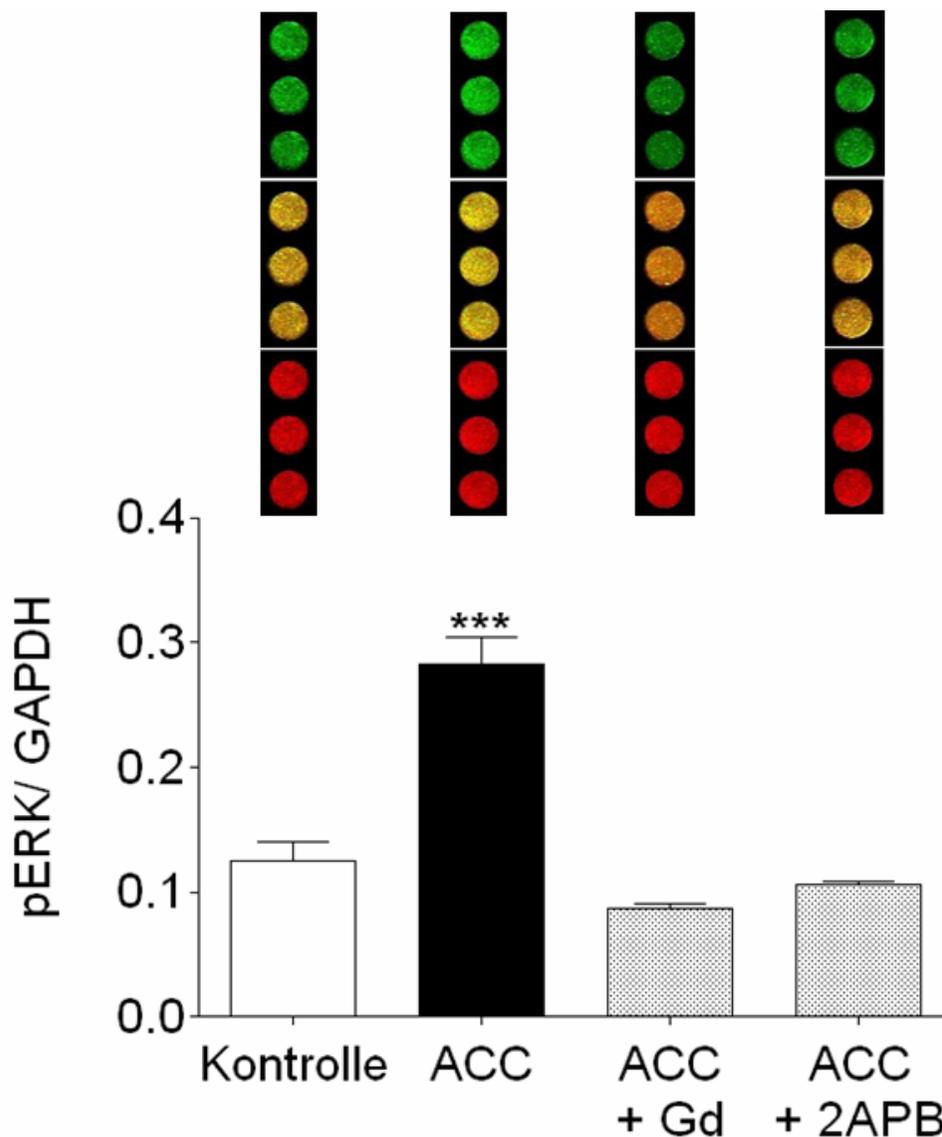


Abbildung 14: Steigerung von phospho- Extracellular- signal Regulated Kinase (pERK) durch Inkubation mit Acetylcystein (ACC) und Aufhebung dieser Wirkung durch Gadolinium (Gd) oder 2- Aminoethoxydiphenyl- Boran (2APB). Nachweis mittels quantitativem In- Cell Western Assay und spezifischen primären und fluoreszierenden sekundären Antikörpern. Inkubation für 4 Stunden in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle) oder mit 500µg/ml ACC, ACC und 10mM Gd oder ACC und 10mM 2APB. Oben ist der Scan eines repräsentativen Experiments dargestellt. Nachweis von pERK im grünen Kanal, des Referenzproteins Glycerinaldehyd- 3 Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) im roten Kanal sowie Darstellung beider Kanäle als Overlay. Die Belegung der Wells entspricht den jeweils darunter abgebildeten Säulen des Blockdiagramms. Deutliche Intensitätssteigerung der Fluoreszenz bei Inkubation mit ACC. Unten Darstellung der Daten im Blockdiagramm als Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Versuchen. Die TRPC6 Expression wurde auf die Expression von GAPDH normalisiert. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

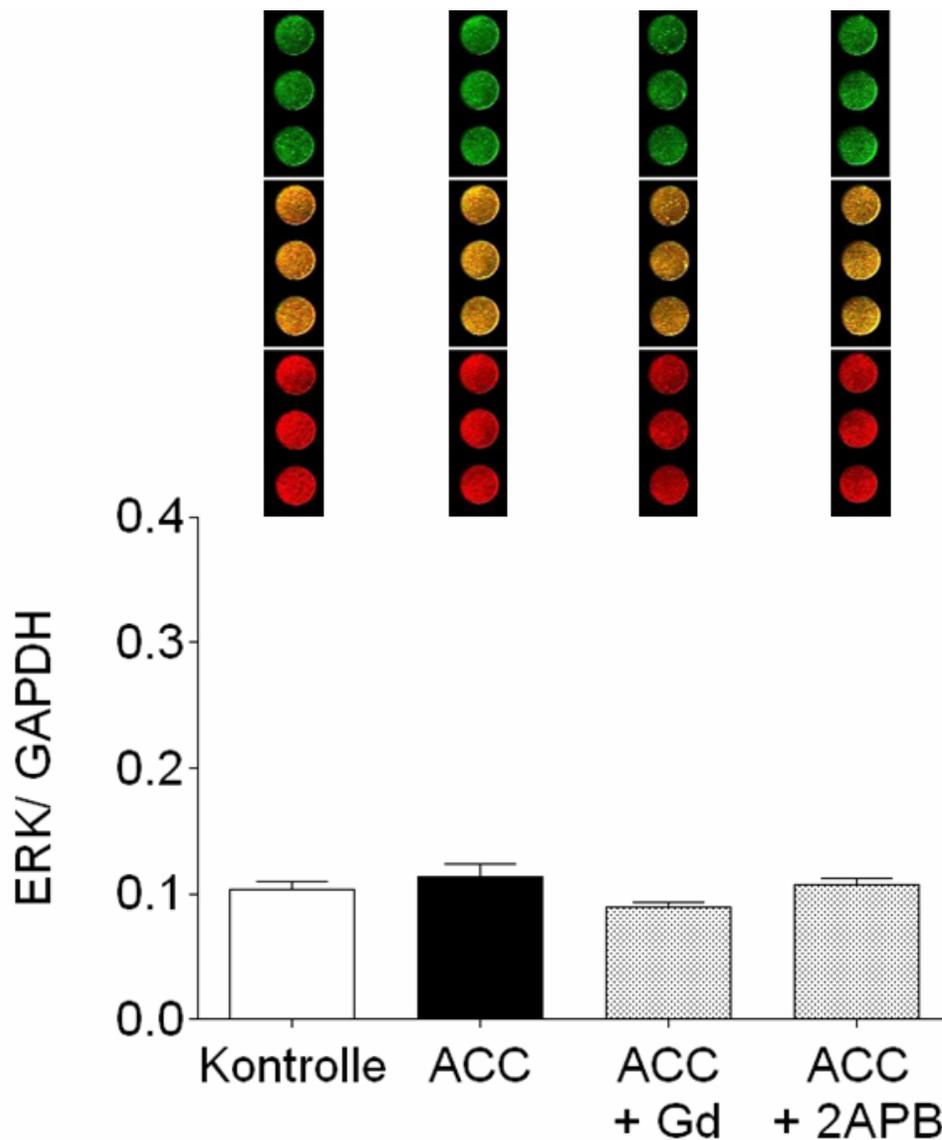


Abbildung 15: Kein Effekt von Acetylcystein (ACC) auf Extracellular- signal Regulated Kinase. Nachweis mittels quantitativen In- Cell Western Assay und spezifischen primären und fluoreszierenden sekundären Antikörpern. Inkubation für 4 Stunden in Abwesenheit aller Substanzen oder mit 500µg/ml ACC, ACC und 10mM Gd oder ACC und 10mM 2APB. Oben ist der Scan eines repräsentativen Experiments dargestellt. Nachweis von ERK im grünen Kanal, des Referenzproteins Glycerinaldehyd- 3- Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) im roten Kanal sowie Darstellung beider Kanäle als Overlay. Die Belegung der Wells entspricht den darunter abgebildeten Säulen des Blockdiagramms. Unten Darstellung der Daten im Blockdiagramm als Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Versuchen. Die TRPC6 Expression wurde auf die Expression von GAPDH normalisiert.

Abbildung 14 zeigt den Scan eines repräsentativen Experiments eines In- Cell- Western zum Nachweis von pERK sowie die zusammengefassten Ergebnisse von 3 unabhängigen Versuchen als Blockdiagramm. Hier ist im grünen Kanal pERK und im roten Kanal GAPDH dargestellt sowie beide als Overlay. Entsprechend stellt Abbildung 15 Scan und Blockdiagramm für ERK dar. Während die Fluoreszenzintensitäten für ERK in allen 4 Ansätzen annähernd gleich sind, zeigt sich für pERK nach ACC-Inkubation eine Steigerung der Intensität.

Bei keinem der genannten Ansätze kam es zu einer signifikanten Erhöhung von ERK. Bei pERK hingegen zeigte sich eine hoch signifikante Erhöhung nach Inkubation mit ACC von $0,1251 \pm 0,0149$ auf $0,2831 \pm 0,0209$ ($n = 3$; $p < 0,001$). Dieser Effekt ist durch die gleichzeitige Inkubation mit Gadolinium oder 2APB umkehrbar. Die Erhöhung von pERK scheint durch die Wirkung von ACC ausgelöst zu sein und kann durch eine Blockierung der TRPC6- Kanäle antagonisiert werden. Der vermehrte Nachweis der phosphorylierten und damit aktivierten Form pERK belegt eine verstärkte Aktivität dieses Signalwegs.

4.3 Einfluss von ACC auf die Calcium- Konzentration

Mittels des fluoreszierenden Calciumchelators Fura- 2/AM wurde die intrazelluläre Calciumkonzentration von Monozyten gemessen (s. a. Kap. 3.5). Hierbei wurde ein Ansatz vorher für 60 Minuten mit $500\mu\text{g/ml}$ ACC inkubiert, ein zweiter Ansatz ohne Stimulanz wurde als Kontrolle verwendet. Nach Messung der Baseline wurde Hyperforin in der Konzentration $10\mu\text{mol/l}$ in die Wells gegeben, welches durch die spezifische Aktivierung von TRPC6- Kanälen eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt (Leuner *et al.*, 2007).

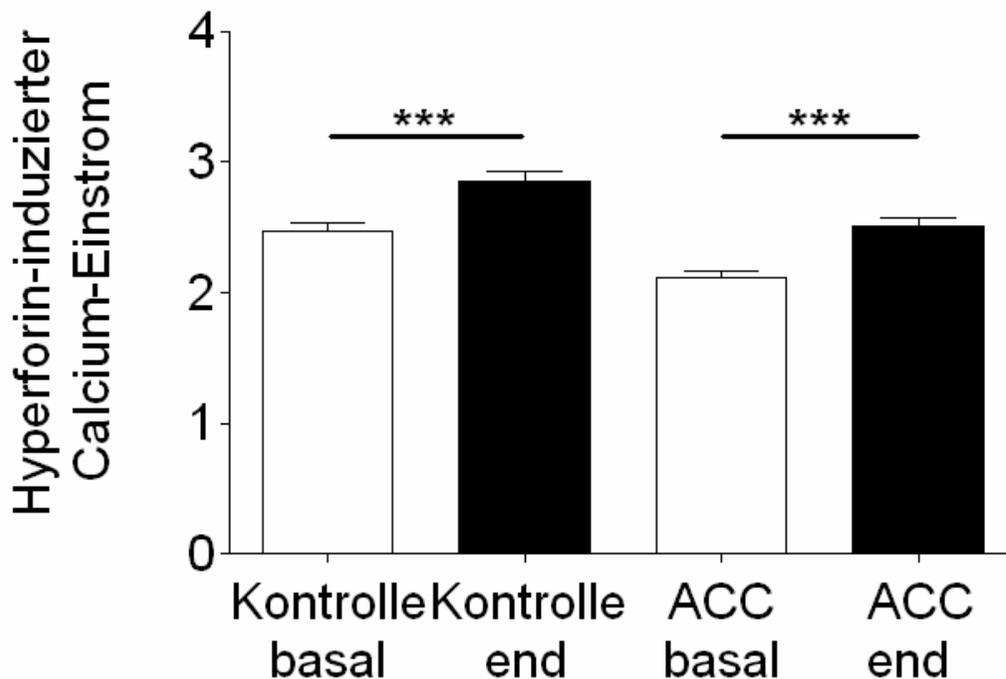


Abbildung 16: Steigerung des Calcium- Einstrom durch Hyperforin-Gabe sowohl in der Kontrollgruppe als auch nach Inkubation mit Acetylcystein (ACC). Fluoreszenzphotometrische Darstellung mittels Calciumchelator Fura 2 im Fluorocan Ascent FL. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm SEM des Quotienten aus calciumgebundener und calciumungebundener Form aus 3 unabhängigen Experimenten. *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

Die Hyperforin- Zugabe bewirkt sowohl in der Kontrollgruppe als auch bei den mit ACC inkubierten Zellen einen hoch signifikanten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Abbildung 16), nämlich in der Kontrollgruppe von $2,47 \pm 0,08$ auf $2,86 \pm 0,07$ ($n = 3$; $p < 0,001$); und bei ACC- Inkubation von $2,12 \pm 0,05$ auf $2,51 \pm 0,06$ ($n = 3$; $p < 0,001$).

Dabei liegt das Niveau der Calciumkonzentration bei den mit ACC inkubierten Zellen unterhalb des Niveaus der Zellen der Kontrollgruppe. In Abbildung 17 ist der Hyperforin-induzierte Anstieg der Calciumkonzentration der Kontrollgruppe gegen den der ACC-Gruppe aufgetragen. Dabei zeigt sich keinerlei Unterschied.

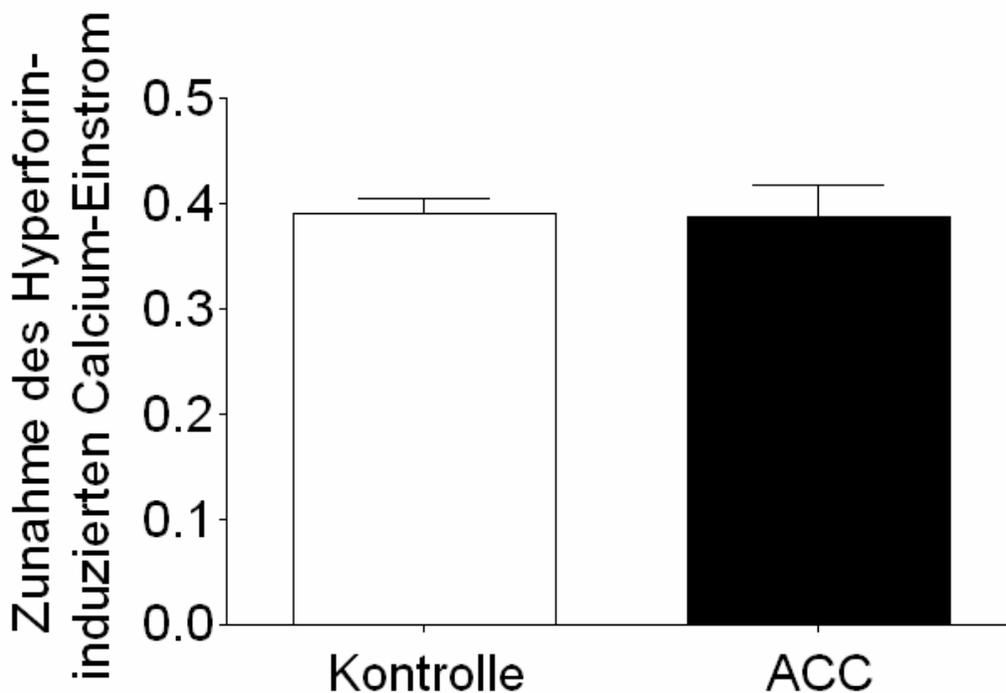


Abbildung 17: Kein Unterschied der Zunahme des Hyperforin- induzierten Calciumeinstrom zwischen Kontroll- und Acetylcystein (ACC)- Gruppe. Fluoreszenzphotometrische Darstellung mittels Calciumchelator Fura 2 im Fluorocan Ascent FL. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm SEM des Quotienten aus calciumgebundener und calciumungebundener Form aus 3 unabhängigen Experimenten.

4.4 Effekte von Acetylcystein und Homocystein auf reaktive Sauerstoffspezies

Zur Messung der reaktiven Sauerstoffspezies in humanen Monozyten wurde die DCF-Fluoreszenzmessung angewandt, bei der es durch die Oxidation des Farbstoffes 2', 7'Dichlorodihydrofluorescein (H_2DCF) zu Dichlorofluorescein (DCF) durch ROS zu einer Fluoreszenzwirkung kommt. Zur Erzeugung oxidativen Stresses wurde Phorbol- 12-myristat- 13- acetat (PMA) zu den Ansätzen gegeben. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur Menge reaktiver Sauerstoffspezies in den Zellen.

Die mit 2', 7'Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (H_2DCF - DA) versehenen Monozyten der drei Ansätze (Kontrolle, ACC sowie HC) wurden auf eine 96- Well- Platte (Nalge nunc international, Rochester) pipettiert und im Fluorocan wurde die Baseline gemessen. Zur Induktion reaktiver Sauerstoffspezies wurde danach HBSS mit PMA, als

Kontrolle jeweils nur HBSS zugegeben. Es wurden 90 Messungen im Abstand von je einer Minute durchgeführt. Die Inkubationszeit für ACC und HC betrug eine Stunde.

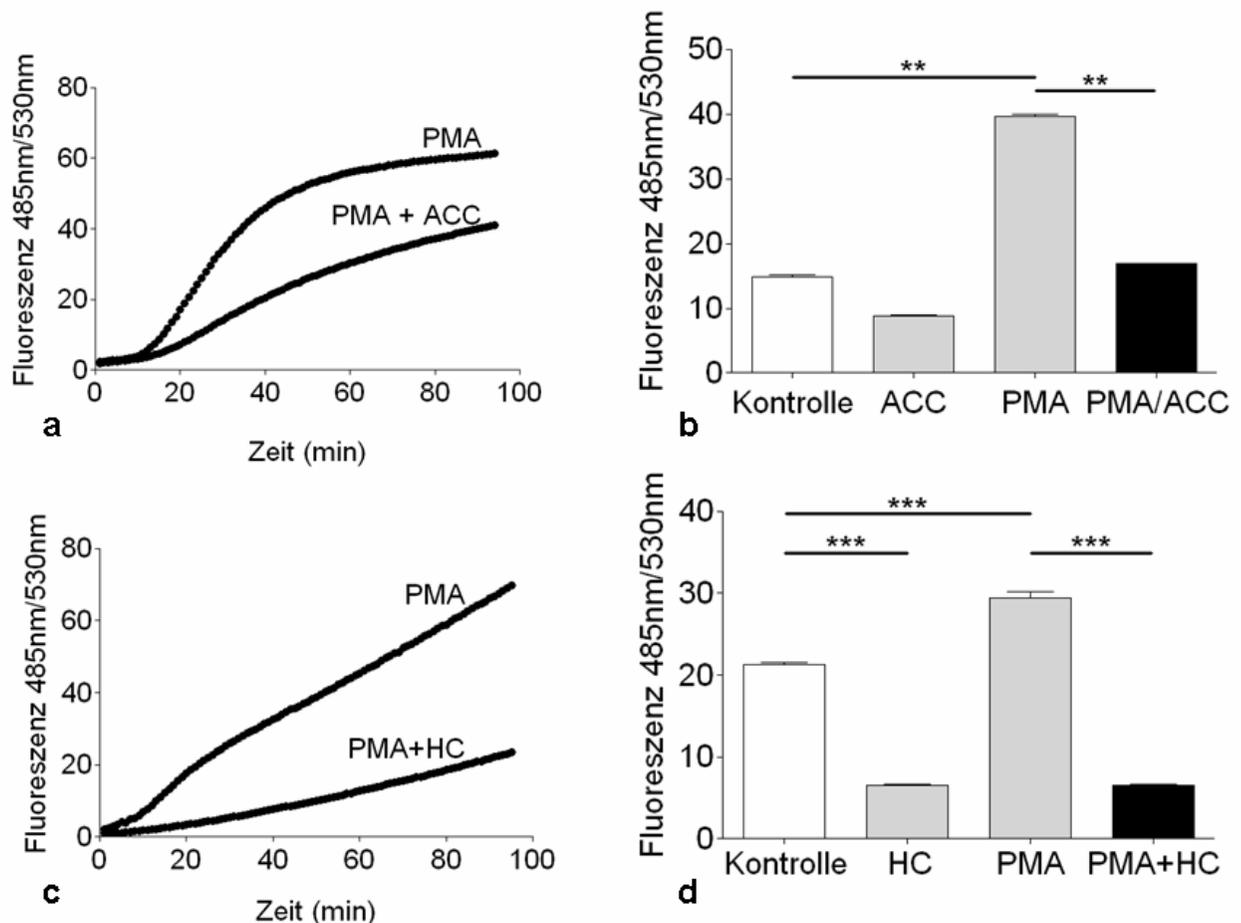


Abbildung 18: Verminderung der intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies durch Inkubation mit Acetylcystein (ACC) und Homocystein (HC). Dichlorofluorescein (DCF)- Fluoreszenzmessung durch Phorbol-12- myristat- 13- acetat (PMA) induzierter reaktiver Sauerstoffspezies nach einstündiger Inkubation mit ACC und HC. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenzintensität (a und c) sowie der Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten im Blockdiagramm nach 30 Minuten (b und d). ** p < 0,01; *** p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle.

In Abbildung 18 a und c ist jeweils die Menge ROS zum zeitlichen Verlauf eines repräsentativen Experiments dargestellt, während Abbildung 18 b und d die verschiedenen Ansätze als Blockdiagramm nach 30 Minuten Versuchsdauer wiedergibt. Es zeigt sich, dass die Zugabe von PMA zu HBSS zu einer signifikanten Steigerung des oxidativen Stresses innerhalb der Zellen führt. PMA führt über eine Aktivierung der

Proteinkinase C (PKC) zu einer Aktivierung der Nicotinamid- Adenin- Dinukleotid- Phosphat (NADPH)- Oxidase, was in einer verstärkten Entstehung von Superoxidanionen resultiert (Karlsson *et al.*, 2000).

Sowohl in den mit ACC als auch mit HC präinkubierten Zellen sank das Niveau der ROS sehr bis hoch signifikant. ACC senkte die durch PMA induzierten reaktiven Sauerstoffspezies von $39,64 \pm 0,26$ auf $16,89 \pm 0,005$ ($n = 3$; $p < 0,01$), HC von $29,37 \pm 0,93$ auf $6,56 \pm 0,24$ ($n = 3$; $p < 0,001$).

4.5 Effekte von Acetylcystein und Homocystein auf das chemotaktische Verhalten der Monozyten

Das Migrationsverhalten der mit ACC bzw. HC stimulierten Monozyten wurde durch das Zweikammersystem nach Boyden untersucht. Die Zellen wurden mit Fura-2/AM bzw. Calcein markiert und für 20 Stunden im Brutschrank (...) inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl migrierter Zellen mit dem Fluoroscan quantitativ bestimmt. Zur Auswertung wurden die unter ACC- und HC- Einfluss migrierten Zellen rechnerisch zur Kontrollgruppe normalisiert.

In Abbildung 19 ist die Migration von mit ACC und HC inkubierten Monozyten im Vergleich zu einem Kontrollansatz dargestellt. Bei den mit ACC inkubierten Monozyten zeigt sich eine signifikante Verminderung der Migrationstendenz von 100 auf $81,8 \pm 7$ ($n = 5$; $p < 0,05$). Dieser Effekt scheint tendenziell bei HC ebenfalls gegeben zu sein, aufgrund der großen Streuung und der geringen Fallzahl ($n = 5$) wird allerdings kein Signifikanzniveau erreicht. HC erzielt eine Verminderung der Migrationstendenz auf $86 \pm 12,4$ ($n = 5$; $p = n. s.$). Um verlässliche Ergebnisse zu erzielen werden weitere Untersuchungen diesbezüglich notwendig sein.

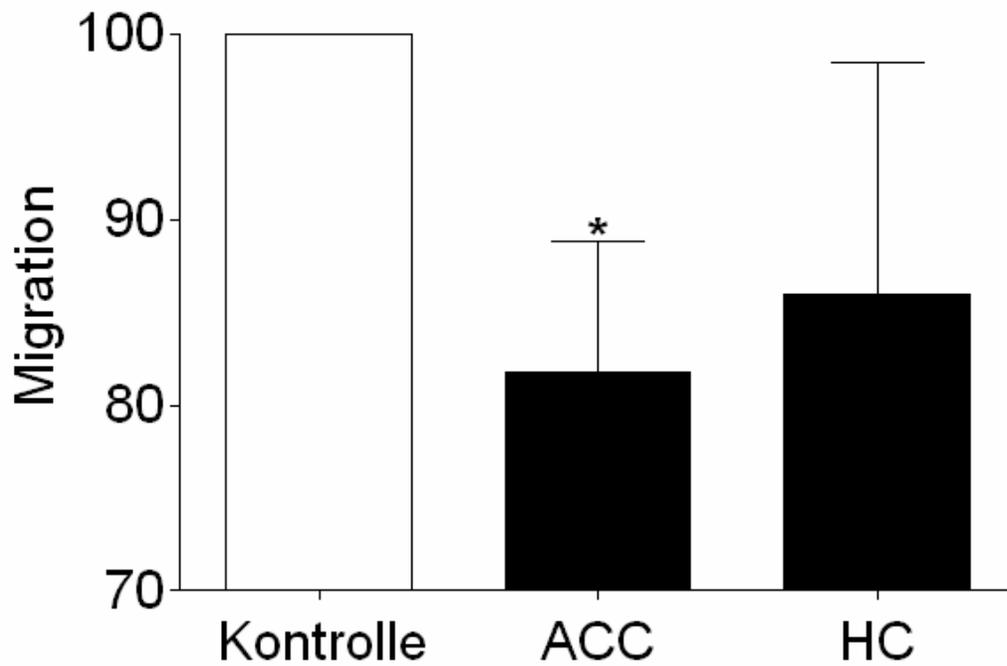


Abbildung 19: Signifikant vermindertes Migrationsverhalten humaner Monozyten nach Inkubation mit Acetylcystein (ACC), nicht aber nach Inkubation mit Homocystein (HC). Fluoreszenzphotometrischer Nachweis mittels Fura 2 oder Calcein. Die Migration der mit ACC oder HC inkubierten Monozyten wurde auf die Migration der Monozyten der Kontrollgruppe normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 5 unabhängigen Experimenten. * $< 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss von Acetylcystein (ACC) auf die Transient Rezeptor Potential Canonical Subtyp 6 (TRPC6)- Kanal- Expression. Andere Studien haben sich bereits mit Auswirkungen von verschiedenen Erkrankungen auf die Expression von TRPC- Kanälen befasst, wobei bisher intensiver mit TRPC3 gearbeitet wurde, wodurch für diesen Subtyp z. Z. eher verlässliche Ergebnisse vorliegen als für TRPC6. Untersuchungen an humanen Monozyten von Diabetikern haben ergeben, dass es unter hyperglykämischen Bedingungen zu einer Erhöhung der TRPC3- und TRPC6- Expression kommt. Gleichzeitig lag ein erhöhter Calciuminflux vor, der auf die vermehrte TRPC- Expression zurückgeführt wurde (Wuensch *et al.*, 2010). Liu *et al.* konnten bei Patienten mit essentieller Hypertonie eine vermehrte Expression von TRPC3 und TRPC5, aber keinen signifikanten Unterschied in der Expression von TRPC6 im Vergleich zur Kontrollgruppe ermitteln. Infolge der erhöhten Anzahl an Kationenkanälen ließ sich eine Steigerung der intrazellulären Calcium- Konzentration feststellen. Wurde die Kanalexpression mittels siRNA knockdown (small interference Ribonukleinsäure) down- reguliert, ließ sich bei geringerer Anzahl von TRPC3 und TRPC5 ein verminderter Calciuminflux feststellen. Hingegen änderte sich nach spezifischem TRPC6 knockdown die intrazelluläre Calcium- Konzentration nicht signifikant (Liu *et al.*, 2007).

In beiden Fällen handelt es sich um pathologische Zustände, die mit einer verstärkten Aktivität von TRP- Kanälen einhergehen. Durch die bei Diabetikern vorliegende Hyperglykämie kommt es zur vermehrten Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die ihrerseits über die Up- Regulation von TRPC3 und TRPC6 zu vermehrtem Calciumeinstrom in die Zelle führen. In den durch verstärkten Calciumeinstrom aktivierten Monozyten ließ sich vermehrt Interleukin 1 β (IL- 1 β) und Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) nachweisen (Thilo *et al.*, 2008). Die Aktivität von Monozyten ist wiederum bei Arteriosklerose von Relevanz, die sowohl von Diabetes mellitus als auch von Hypertonie Folgeerkrankung ist.

ACC hingegen ist hinreichend bekannt als Radikalfänger und Therapieansätze mit ACC als Antioxidanz befinden sich in Erprobung. In den eigenen Versuchen konnte durch Inkubation von Monozyten mit ACC die Menge ROS gesenkt werden, ein verstärkter Calciumeinstrom fand nicht statt und die Migrationsbereitschaft der Monozyten war vermindert. Die Reduktion der ROS belegt die Wirkung von ACC als Radikalfänger.

Eine verstärkte Aktivierung der Monozyten und damit auch verstärkte Migration wurde im Zusammenhang mit erhöhtem Calciumeinstrom beschrieben (Thilo *et al.*, 2008). Insgesamt ließe dies eine verminderte Expression von TRPC6- Kanälen unter ACC-Einfluss erwarten. Im Gegensatz dazu führt ACC aber in der vorliegenden Untersuchung zu einer Expressionssteigerung von TRPC6. Die Inkubation mit Homocystein (HC) führt ebenfalls zu einem Anstieg wohingegen durch Glutathion (GSH) kein Effekt zu verzeichnen ist. Während also HC und Glucose als Prooxidantien eine TRPC6- Steigerung erzielen, geschieht dies gleichfalls durch das Antioxidant ACC. Da durch GSH keine Veränderung der Kanalexpression erzielt werden konnte, scheint die Wirkung von ACC nicht auf einer verstärkten Bildung von GSH zu beruhen. Die Ursache der gleichgerichteten Wirkung von ACC und HC ist vermutlich in der Strukturähnlichkeit beider Verbindungen zu finden. Offensichtliche Gemeinsamkeit ist das Vorliegen der Aminosäure Cystein. Als alleiniger Grund kann dies aber nicht herangeführt werden, da Cystein in Glutathion ebenfalls enthalten ist.

Bei Patienten mit Niereninsuffizienz fällt die Wirkung von ACC und HC stärker aus als in der Kontrollgruppe. Zudem sind diese Patienten durch einen erhöhten Plasma-homocysteinspiegel vorbelastet. Daher weisen Monozyten dieser Patientengruppe möglicherweise eine verstärkte Sensibilität gegenüber HC auf. Andererseits konnte der Plasmahomocysteinspiegel durch ACC- Gabe gesenkt werden (Scholze *et al.*, 2004). Dies verdeutlicht den Konflikt zwischen der einerseits gegen- und andererseits gleichsinnigen Wirkung von ACC und HC.

Entzündliche Erkrankungen wie z. B. Arteriosklerose, rheumatoide Arthritis oder multiple Sklerose gehen mit einer erhöhten Nuklear Faktor κ B (NF- κ B)- Aktivierung einher (Wang *et al.*, 2000). ACC gilt als Inhibitor des Transkriptionsfaktor NF- κ B (Staal *et al.*, 1990). Daraus resultiert eine verminderte Expression von Zytokinen. Demzufolge würde die Inkubation mit ACC eine Aktivierung von Monozyten vermindern und könnte somit einen protektiven Effekt auf arteriosklerotische Erkrankungen haben.

Dem gegenüber steht jedoch die hier auftretende verstärkte Extracellular- signal Regulated Kinase (ERK)- Aktivität. ERK phosphoryliert zahlreiche Substrate in allen Zellkompartimenten, darunter Membranproteine, Transkriptionsfaktoren, Teile des Zytoskeletts sowie MAPK activated protein kinase (MK's) (Roux and Blenis, 2004). Die durch die ERK- Signalkaskade veränderte Transkription führt zu einer Aktivierung der Zelle hin zu vermehrter Proliferation und Differenzierung, verbunden mit der Produktion

von Zytokinen und anderen Substanzen. Gleichzeitig ist ERK durch seinen Einfluss auf Bestandteile des Zytoskeletts an der Zellmigration beteiligt. Dies ist bei der Rekrutierung von Monozyten in Entzündungsgebiete oder bei der Metastasierung von Tumorzellen entscheidend. Die Beeinflussung diverser Substrate bedingt vielfältige Effekte innerhalb einer Zelle. Allerdings stehen Reaktionen wie die Produktion von Zytokinen oder die Aktivierung zu verstärkter Migration eher im Rahmen einer Stressantwort. Die Inkubation mit ACC als Antioxidanz ließe folglich einen vermehrten Nachweis von pERK nicht erwarten, insbesondere wenn man die hier ebenfalls nachgewiesene verminderte Migrationsbereitschaft der Monozyten bedenkt. Dennoch wurde in der vorliegenden Untersuchung ein verstärktes Auftreten von pERK verzeichnet. Hier werden weitere Untersuchungen nötig sein, um den zugrunde liegenden Effekt von ACC auf ERK und die mögliche klinische Relevanz zu erforschen.

Ebenso wie bei ACC wurde auch bei Inkubation mit HC eine vermehrte TRPC6 Expression verbunden mit einer Verminderung der ROS sowie einer tendenziell verminderten Migration festgestellt. Dies ist insofern verwunderlich, als dass HC seinerseits reaktive Sauerstoffspezies induziert die via Aktivierung von NF- κ B zu Zytokin- und TNF α -Produktion führt (Wang *et al.*, 2000). Wenn also aufgrund dieser Ergebnisse auf einen positiven Effekt von ACC auf arteriosklerotische Erkrankungen geschlossen werden soll, müsste dies auch bei HC erwogen werden. Nun ist HC aber nachweislich ein Risikofaktor für Arteriosklerose (Karolczak and Olas, 2009; Maron and Loscalzo, 2009; Wang *et al.*, 2000). Es gibt nur wenige Studien, die HC zumindest teilweise keine prooxidative Wirkung nachweisen konnten. So verzeichneten Kitakoa *et al.* keinen Effekt von HC auf ROS, die durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) induziert wurden. Waren ROS durch andere Substanzen induziert, bewirkte HC eine zusätzliche Zunahme (Kitaoka *et al.*, 2005). Zappacosta *et al.* stellten die atherogene Wirkung von HC in den im Plasma vorkommenden Konzentrationen in Frage und untersuchten einen möglichen antioxidativen Effekt von HC in mikromolaren Konzentrationen. Anhand der momentan vorhandenen Datenlage können die mit HC erzielten Ergebnisse nicht schlüssig erklärt werden. Auch auf welchem Mechanismus die Effekte von HC auf TRPC6 beruhen, kann so nicht geklärt werden und muss Gegenstand künftiger Forschung sein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ACC entgegen der Erwartungen zu einer Steigerung der TRPC6 Expression führt, obwohl gleichzeitig verminderte ROS, gleich bleibender Calciumeinstrom und verminderte Migration vorliegen. Unbestritten übt ACC antioxidative Effekte auf Monozyten aus, hat aber gleichzeitig einen ähnlichen, wenn auch schwächer ausgeprägten, Einfluss wie HC auf die TRPC6- Expression. Die Ursache hierfür wird vermutlich in der Strukturähnlichkeit der beiden Substanzen liegen. Möglicherweise spielen TRPC6- Kanäle eine geringere Rolle in der Calciumhomöostase als TRPC3- Kanäle, so dass eine verstärkte TRPC6- Expression nicht in einer vermehrten Aktivierung der Zelle resultiert. Inwiefern die einerseits hier nachgewiesene antioxidative Wirkung von ACC andererseits mit der TRPC6 Steigerung in Zusammenhang gebracht werden kann, muss in weiteren Studien näher untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Transient Rezeptor Potential Canonical Kanäle Subtyp 6 (TRPC6 Kanäle) sind sog. nicht- selektive Ionenkanäle, die in einer Reihe von Geweben und peripheren Blutzellen nachgewiesen werden konnten. Nach Aktivierung der TRPC6 Kanäle kommt es u. A. zu einem transmembranösen Calcium- Einstrom.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen von oxidativen Stress und der antioxidativ wirksamen Substanz Acetylcystein (ACC) auf die Expression und die Funktion von TRPC6- Kanälen in humanen Monozyten untersucht.

Die Expression von TRPC6 Kanälen, phosphoryliertem Extracellular signal- Regulated Kinase (pERK, aktivierte Form) und ERK (nicht- aktivierte Form) in den Monozyten wurde mittels quantitativen In- Cell Western Assay bestimmt. Der Calcium- Einstrom in die Zellen wurde Fluoreszenz- spektrophotometrisch mit dem Farbstoff Fura 2 bestimmt. Reaktive Sauerstoffradikale wurden mit dem Farbstoff 2', 7'Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (H₂DCF- DA) gemessen. Die Monozyten- Chemotaxis wurde in einer Boyden Chamber (Migrations Assay) untersucht.

Die Inkubation von Monozyten mit ACC führte zu einem signifikanten Anstieg der TRPC6 Protein Expression von $0,0431 \pm 0,0015$ auf $0,0549 \pm 0,0024$ ($n = 12$, Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes SEM; $p < 0.001$). Der Effekt von ACC war zeit- und dosisabhängig. Die Inkubation der Monozyten mit Homocystein führte ebenfalls zu einem Anstieg der TRPC6 Expression auf $0,0688 \pm 0,0017$ ($p < 0,001$). Glutathion hatte keinen Effekt auf die TRPC6 Expression ($0,0436 \pm 0,0018$; $p = n. s.$).

ACC führte zu einem signifikanten Anstieg von aktiviertem pERK ($0,1251 \pm 0,0149$ vs. $0,2831 \pm 0,0209$; $n = 3$; $p < 0,001$), nicht aber von nicht- aktiviertem ERK. Dieser Anstieg von pERK konnte durch die Vorgabe von TRPC6 Kanal- Blockern wie 2-Aminoethoxydiphenyl- boran (2APB) oder Gadolinium verhindert werden. ACC führte zu einer signifikanten Verminderung der Phorbol- 12- myristate-13- acetate (PMA)- induzierten Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen von $39,64 \pm 0,26$ auf $16,89 \pm 0,005$ ($n = 3$, $p < 0,001$).

Weiterhin führte ACC zu einer signifikanten Verminderung der spontanen Monozyten- Migration. Im Gegensatz zeigte Homocystein (HC) keinen signifikanten Effekt auf die Migration. Die Untersuchungen zeigen, dass das antioxidativ wirkende Acetylcystein

durch die Verminderung von reaktiven Sauerstoffradikalen die Expression von TRPC6 Kanälen und die Migration von Monozyten beeinflussen.

Schlüsselwörter: Transient Receptor Potential Canonical Kanäle, Acetylcystein, Monozyten, reactive Sauerstoffspezies

7 Summary

Transient receptor potential canonical channels subtype 6 (TRPC6 channels) are non-selective cation channels which have been found in several different tissues and peripheral blood cells. Activation of TRPC6 channels leads to a transmembranous calcium influx. In the present study effects of oxidative stress and the antioxidant acetylcysteine (ACC) on TRPC6 channel expression and function in human monocytes have been investigated.

TRPC6 protein expression and expression of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) were investigated using quantitative in-cell western assay. Calcium influx was detected using fluorescence spectrophotometry with Fura-2. Reactive oxygen species were assessed by DCFDA fluorescence. Chemotaxis has been determined by the Boyden chamber assay (migration assay).

Monocytes incubated with ACC showed a significant increase of TRPC6 expression from $0,0431 \pm 0,0015$ to $0,0549 \pm 0,0024$ ($n = 12$, mean \pm standard error of the mean SEM; $p < 0.001$). This effect was time- and dose- dependent. Incubation with homocysteine showed as well a significant increase of TRPC6 to $0,0688 \pm 0,0017$ ($p < 0,001$) while glutathione (GSH) had no effect on TRPC6 expression ($0,0436 \pm 0,0018$; $p = n. s.$).

Additionally, there was a significant increase of pERK after ACC incubation ($0,1251 \pm 0,0149$ vs. $0,2831 \pm 0,0209$; $n = 3$; $p < 0,001$) which could be blocked by TRPC6 channel blocker 2APB or Gadolinium. ACC significantly decreases reactive oxygen species induced by phorbol-12- myristate- 13- acetate from $39,64 \pm 0,26$ to $16,89 \pm 0,005$ ($n = 3$, $p < 0,001$).

Furthermore incubation with ACC results in a significant reduction of spontaneous migration of monocytes while HC had no effect on migration.

The conclusion of this study is that the antioxidant ACC affects TRPC6 expression and monocyte migration by reducing reactive oxygen species.

Keywords: transient receptor potential canonical channel, Acetylcysteine, monocytes, reactive oxygen species

8 Anhang

Literaturverzeichnis

- Aitio, M.L. (2006) N-acetylcysteine -- passe-partout or much ado about nothing? *Br J Clin Pharmacol* **61**: 5-15.
- Ballatori, N., Krance, S.M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., and Hammond, C.L. (2009) Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* **390**: 191-214.
- Boccalandro, F., Amhad, M., Smalling, R.W., and Sdringola, S. (2003) Oral acetylcysteine does not protect renal function from moderate to high doses of intravenous radiographic contrast. *Catheter Cardiovasc Interv* **58**: 336-341.
- Caylak, E., Aytakin, M., and Halifeoglu, I. (2008) Antioxidant effects of methionine, alpha-lipoic acid, N-acetylcysteine and homocysteine on lead-induced oxidative stress to erythrocytes in rats. *Exp Toxicol Pathol* **60**: 289-294.
- Clapham, D.E., Montell, C., Schultz, G., and Julius, D. (2003) International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* **55**: 591-596.
- Cushing, S.D., Berliner, J.A., Valente, A.J., Territo, M.C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C.J., and Fogelman, A.M. (1990) Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 5134-5138.
- Estacion, M., Li, S., Sinkins, W.G., Gosling, M., Bahra, P., Poll, C., Westwick, J., and Schilling, W.P. (2004) Activation of human TRPC6 channels by receptor stimulation. *J Biol Chem* **279**: 22047-22056.
- Hardie, R.C. (2007) TRP channels and lipids: from Drosophila to mammalian physiology. *J Physiol* **578**: 9-24.
- Heard, K.J. (2008) Acetylcysteine for acetaminophen poisoning. *N Engl J Med* **359**: 285-292.
- Hofmann, T., Obukhov, A.G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., and Schultz, G. (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* **397**: 259-263.

- Hotta, Y., and Benzer, S. (1969) Abnormal electroretinograms in visual mutants of *Drosophila*. *Nature* **222**: 354-356.
- Kannan, K., and Jain, S.K. (2000) Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* **7**: 153-163.
- Karlsson, A., Nixon, J.B., and McPhail, L.C. (2000) Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Leukoc Biol* **67**: 396-404.
- Karolczak, K., and Olas, B. (2009) Mechanism of action of homocysteine and its thiolactone in hemostasis system. *Physiol Res* **58**: 623-633.
- Kelly, G.S. (1998) Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev* **3**: 114-127.
- Kerksick, C., and Willoughby, D. (2005) The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *J Int Soc Sports Nutr* **2**: 38-44.
- Kitaoka, N., Liu, G., Masuoka, N., Yamashita, K., Manabe, M., and Kodama, H. (2005) Effect of sulfur amino acids on stimulus-induced superoxide generation and translocation of p47phox and p67phox to cell membrane in human neutrophils and the scavenging of free radical. *Clin Chim Acta* **353**: 109-116.
- Kwon, Y., Hofmann, T., and Montell, C. (2007) Integration of phosphoinositide- and calmodulin-mediated regulation of TRPC6. *Mol Cell* **25**: 491-503.
- Leuner, K., Kazanski, V., Muller, M., Essin, K., Henke, B., Gollasch, M., Harteneck, C., and Muller, W.E. (2007) Hyperforin--a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *Faseb J* **21**: 4101-4111.
- Liu, D., Maier, A., Scholze, A., Rauch, U., Boltzen, U., Zhao, Z., Zhu, Z., and Tepel, M. (2008) High glucose enhances transient receptor potential channel canonical type 6-dependent calcium influx in human platelets via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**: 746-751.
- Liu, D.Y., Thilo, F., Scholze, A., Wittstock, A., Zhao, Z.G., Harteneck, C., Zidek, W., Zhu, Z.M., and Tepel, M. (2007) Increased store-operated and 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol-induced calcium influx in monocytes is mediated by transient receptor potential canonical channels in human essential hypertension. *J Hypertens* **25**: 799-808.
- Löffler, G., and Petrides, P. (2003) *Biochemie und Pathobiochemie*. ISBN 3-540-42295-1. 7. Auflage, Springer Verlag

- Maron, B.A., and Loscalzo, J. (2009) The treatment of hyperhomocysteinemia. *Annu Rev Med* **60**: 39-54.
- Martina, V., Masha, A., Gigliardi, V.R., Brocato, L., Manzato, E., Berchio, A., Massarenti, P., Settanni, F., Della Casa, L., Bergamini, S., and Iannone, A. (2008) Long-term N-acetylcysteine and L-arginine administration reduces endothelial activation and systolic blood pressure in hypertensive patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **31**: 940-944.
- Meister, A. (1994) Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res* **54**: 1969s-1975s.
- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., and Peters, J.A. (2007) Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* **87**: 165-217.
- Poppe, J.K. (1964) Clinical Experiences with Acetylcysteine as a Mucolytic Agent. *Dis Chest* **46**: 66-69.
- Potier, M., and Trebak, M. (2008) New developments in the signaling mechanisms of the store-operated calcium entry pathway. *Pflugers Arch* **457**: 405-415.
- Pullikuth, A.K., and Catling, A.D. (2007) Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: a perspective. *Cell Signal* **19**: 1621-1632.
- Quinn, M.T., Parthasarathy, S., Fong, L.G., and Steinberg, D. (1987) Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 2995-2998.
- Raines, E.W., and Ross, R. (1995) Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role of growth factors in lesion development and the potential impact of soy. *J Nutr* **125**: 624S-630S.
- Refsum, H., Nurk, E., Smith, A.D., Ueland, P.M., Gjesdal, C.G., Bjelland, I., Tverdal, A., Tell, G.S., Nygard, O., and Vollset, S.E. (2006) The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. *J Nutr* **136**: 1731S-1740S.
- Roberts, P.J., and Der, C.J. (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26**: 3291-3310.
- Roux, P.P., and Blenis, J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 320-344.

- Schaefer, M. (2005) Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. *Pflugers Arch* **451**: 35-42.
- Scharfstein, J.S., Keaney, J.F., Jr., Slivka, A., Welch, G.N., Vita, J.A., Stamler, J.S., and Loscalzo, J. (1994) In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols. *J Clin Invest* **94**: 1432-1439.
- Scholze, A., Rinder, C., Beige, J., Riezler, R., Zidek, W., and Tepel, M. (2004) Acetylcysteine reduces plasma homocysteine concentration and improves pulse pressure and endothelial function in patients with end-stage renal failure. *Circulation* **109**: 369-374.
- Staal, F.J., Roederer, M., Herzenberg, L.A., and Herzenberg, L.A. (1990) Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kappa B and transcription of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 9943-9947.
- Tepel, M., and Zidek, W. (2002) Acetylcysteine and contrast media nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **11**: 503-506.
- Tepel, M., van der Giet, M., Statz, M., Jankowski, J., and Zidek, W. (2003) The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure: a randomized, controlled trial. *Circulation* **107**: 992-995.
- Thilo, F., Scholze, A., Liu, D.Y., Zidek, W., and Tepel, M. (2008) Association of transient receptor potential canonical type 3 (TRPC3) channel transcripts with proinflammatory cytokines. *Arch Biochem Biophys* **471**: 57-62.
- Thoren, S., and Jakobsson, P.J. (2000) Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C4. *Eur J Biochem* **267**: 6428-6434.
- Ullian, M.E., Gelasco, A.K., Fitzgibbon, W.R., Beck, C.N., and Morinelli, T.A. (2005) N-acetylcysteine decreases angiotensin II receptor binding in vascular smooth muscle cells. *J Am Soc Nephrol* **16**: 2346-2353.
- Venkatachalam, K., and Montell, C. (2007) TRP channels. *Annu Rev Biochem* **76**: 387-417.
- Voets, T., and Nilius, B. (2007) Modulation of TRPs by PIPs. *J Physiol* **582**: 939-944.
- Wang, G., Siow, Y.L., and O, K. (2000) Homocysteine stimulates nuclear factor kappaB activity and monocyte chemoattractant protein-1 expression in vascular smooth-muscle cells: a possible role for protein kinase C. *Biochem J* **352 Pt 3**: 817-826.
- Williams, K.J., and Tabas, I. (1995) The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**: 551-561.

- Woollard, K.J., and Geissmann, F. (2010) Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol* **7**: 77-86.
- Wuensch, T., Thilo, F., Krueger, K., Scholze, A., Ristow, M., and Tepel, M. (2010) High glucose-induced oxidative stress increases transient receptor potential channel expression in human monocytes. *Diabetes* **59**: 844-849.
- Zappacosta, B., Mordente, A., Persichilli, S., Giardina, B., and De Sole, P. (2000) Effect of homocysteine on polymorphonuclear leukocyte activity and luminol-dependent chemiluminescence. *Luminescence* **15**: 257-260.
- Zitt, C., Halaszovich, C.R., and Luckhoff, A. (2002) The TRP family of cation channels: probing and advancing the concepts on receptor-activated calcium entry. *Prog Neurobiol* **66**: 243-264.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Phylogenetischer Stammbaum der TRP- Familie bei Säugetieren..	11
Abbildung 2	Schematische Darstellung der Struktur der TRP Kanäle.....	12
Abbildung 3:	Strukturformel Acetylcystein (Sigma Aldrich).....	17
Abbildung 4:	Strukturformel Glutathion (Sigma Aldrich).....	19
Abbildung 5:	Strukturformel Homocystein (Sigma Aldrich).....	22
Abbildung 6:	Aufbau der Boyden Chamber.....	34
Abbildung 7:	Western Blot der verwendeten Antikörper gegen TRPC6, CD11a, GAPDH.....	36
Abbildung 8:	Dosisabhängige Steigerung der Expression von TRPC6 Kanälen in Monozyten durch Acetylcystein (ACC).....	38
Abbildung 9:	Zeitabhängige Steigerung der TRPC6 Expression in Monozyten nach Inkubation mit Acetylcystein (ACC).....	39
Abbildung 10:	Steigerung der TRPC6 Expression in Monozyten durch Acetylcystein (ACC) oder Homocystein (HC), nicht aber durch Glutathion (GSH).....	40
Abbildung 11:	Steigerung der TRPC6 Expression durch Acetylcystein (ACC) oder Homocystein (HC), nicht aber durch Glutathion (GSH) bei Personen mit chronischer Niereninsuffizienz (CKF).....	41
Abbildung 12:	Steigerung der TRPC6 Expression durch Acetylcystein (ACC) oder Homocystein (HC), nicht aber durch Glutathion (GSH) bei Personen ohne chronische Niereninsuffizienz (CKF).....	42
Abbildung 13:	Western Blot der verwendeten Antikörper gegen (p)ERK und GAPDH.....	43
Abbildung 14:	Steigerung von phospho- Extracellular- signal Regulated Kinase (pERK) durch Inkubation mit Acetylcystein (ACC) und Aufhebung dieser Wirkung durch Gadolinium (Gd) oder 2- Aminoethoxy- diphenyl- Boran (2APB).....	44
Abbildung 15:	Kein Effekt von Acetylcystein (ACC) auf Extracellular- signal Regulated Kinase.....	45

Abbildung 16:	Steigerung des Calcium- Einstrom durch Hyperforin-Gabe sowohl in der Kontrollgruppe als auch nach Inkubation mit Acetylcystein (ACC).....	47
Abbildung 17:	Kein Unterschied der Zunahme des Hyperforin- induzierten Calciueinstrom zwischen Kontroll- und Acetylcystein (ACC)- Gruppe.....	48
Abbildung 18:	Verminderung der intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies durch Inkubation mit Acetylcystein (ACC) und Homocystein (HC)..	49
Abbildung 19:	Signifikant vermindertes Migrationsverhalten humaner Monozyten nach Inkubation mit Acetylcystein (ACC), nicht aber nach Inkubation mit Homocystein (HC).....	51

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Martin Tepel für die Bereitstellung von Thema und Arbeitsplatz sowie die stete Unterstützung und Ansprechbarkeit.

Besonderer Dank geht an Frau Dipl.- Ing. Katharina Krüger für die Einarbeitung in die labortechnischen Arbeitsweisen und die unermüdliche Hilfestellung bei der Versuchsdurchführung.

Ich danke meinen Eltern, Großeltern und meiner Tante, ohne deren ständige Unterstützung weder mein Studium noch diese Arbeit möglich gewesen wäre.

Meinem Freund danke ich für die großartige Unterstützung bei Formatierung und Korrektur dieser Arbeit sowie seiner immerwährenden Motivation.

Eigenständigkeitserklärung

„Ich, Nora Dorothea Förste, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema

Einfluss von Acetylcystein auf Transient Receptor Potential Canonical Typ 6 (TRPC6)-
Kanäle auf humanen Monozyten

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.