Analyse des Phänotyps von Clp36 und Cystathionin-γ-Lyase Knockout-Modellen der Maus

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt am Fachbereich 14
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Yvette Köhler
aus Hanau

Frankfurt am Main im Jahre 2019
(D30)

vom Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie der

Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. C. Glaubnitz

Gutachter: Prof. Dr. R. Fürst
Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Datum der Disputation:

meiner alten und neuen Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

1.1 Der Gasotransmitter H_2S . . . 1

1.1.1 Die Synthese von H_2S . . . 2

1.1.2 H_2S produzierende Enzyme . . . 3

1.1.2.1 Cystathionin-β-Synthase (CBS) . . . 3

1.1.2.2 Cystathionin-γ-Lyase (CSE) . . . 4

1.1.2.3 3-Mercaptopyruvat-Sulfurtransferase (3-MST) . . . 4

1.2 Clp36 . . . 5

1.3 Die Niere . . . 6

1.3.1 Das Glomerulum . . . 8

1.3.2 Die Glomerulonephritis . . . 9

1.3.3 CSE und Clp36 in der Glomerulonephritis . . . 9

1.4 Das Gehirn . . . 10

1.4.1 Die Blutversorgung des Gehirns . . . 11

1.4.2 Der ischämische Schlaganfall . . . 12

1.4.3 CSE und Clp36 im ischämischen Schlaganfall . . . 12

1.5 Die Haut . . . 14

1.5.1 Aufbau der Haut . . . 14

1.5.1.1 Epidermis . . . 15

1.5.1.2 Dermis und Subkutis . . . 16

1.5.2 Die kutane Wundheilung . . . 17

1.5.2.1 Die Hämostase . . . 18

1.5.2.2 Die inflammatorische Phase . . . 18

1.5.2.3 Die Granulationsphase . . . 19

1.5.2.4 Die Remodellierungsphase . . . 20

1.5.3 CSE und Clp36 in der kutanen Wundheilung . . . 21

1.6 Zielsetzung . . . 22

2 Material **23**

2.1 Chemikalien . . . 23

2.2 Verbrauchsmaterialien . . . 23

2.3 Puffer und Lösungen . . . 24

2.4 Kits . . . 26
2.5 Enzyme . . . 27
2.6 Antikörper . . . 28
2.6.1 Primärantikörper . . . 28
2.6.2 Zweitantikörper . . . 28
2.7 Plasmide . . . 29
2.8 Oligonukleotide . . . 29
2.8.1 Oligonukleotide für Klonierungen . . . 29
2.8.2 Oligonukleotide für Genotypisierungen . . . 30
2.8.3 Taqman-Sonden . . . 31
2.9 Mausstämme . . . 31
2.10 Zelllinien . . . 31
2.11 Zellkulturmedien . . . 32
2.11.1 Medien für die Kultur von Säugerzellen . . . 32
2.11.2 Kultur von Bakterienzellen . . . 33
2.12 Geräte . . . 34

3 Methoden **36**

3.1 Molekularbiologische Methoden . . . 36
3.1.1 Isolierung von RNA . . . 36
3.1.1.1 Isolierung von RNA aus Gewebeproben . . . 36
3.1.1.2 Isolierung von RNA aus Zellen . . . 36
3.1.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren . . . 37
3.1.3 Reverse Transkription . . . 37
3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . 38
3.1.5 Nested-PCR . . . 40
3.1.6 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) . . . 41
3.1.7 Agarosegelelektrophorese . . . 42
3.1.8 Isolierung von DNA aus Agarosegelen . . . 43
3.1.9 Restriktionsverdau . . . 43
3.1.10 Fällung von RNA und DNA . . . 44
3.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten . . . 44
3.1.12 Transformation bakterieller Zellen . . . 44
3.1.13 TOPO-Klonierung . . . 45
3.1.14 Klonierung des Plasmids pMCVhs-CSE-Flag . . . 45

3.1.15 Klonierung des Plasmids pGL3hsK10P244XH 46
3.1.16 Klonierung des Plasmids pGL3hsK10P550XH 46
3.1.17 Klonierung des Plasmids pGL3hsK10P1000XH 46
3.1.18 Klonierung des Plasmids pGL3hsK10P2030XH 47
3.1.19 Kultivierung bakterieller Zellen 48
3.1.20 Isolierung von Plasmid-DNA 48
3.1.21 Genotypisierungen 48
3.2 Proteinbiochemische Methoden 50
3.2.1 Isolierung von Proteinen aus Zellen 50
3.2.1.1 Isolierung des Gesamtproteins 50
3.2.1.2 Isolierung nukleärer und zytosolischer Proteine nach Smith 50
3.2.1.3 Isolierung nukleärer und zytosolischer Proteine mittels ReadyPrep Protein Extraction Kit 51
3.2.2 Quantifizierung von Proteinen 51
3.2.3 Western Blot-Analyse 52
3.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 52
3.2.3.2 Proteintransfer 53
3.2.3.3 Detektion von Proteinen 53
3.2.4 2D-Gelelektrophorese 54
3.2.5 Silberfärbung von Proteinen 55
3.2.6 Immunpräzipitation (IP) 55
3.3 Immunhistochemische Methoden 56
3.3.1 Herstellung von Paraffinschnitten 56
3.3.2 Azanfärbung 56
3.3.3 Hämatoxylin-Färbung 57
3.3.4 Immunhistochemische Färbung 57
3.4 Zellbiologische Methoden 58
3.4.1 Isolierung muriner Mesangiumzellen 58
3.4.1.1 Kultivierung muriner Mesangiumzellen 58
3.4.2 Stimulation muriner Mesangiumzellen 59
3.4.3 Kryokonservierung muriner Mesangiumzellen 59
3.4.4 Auftauen muriner Mesangiumzellen 59
3.4.4.1 Kultivierung humaner Keratinozyten 59
3.4.5 Stimulation von HaCaT-Zellen 60

3.4.6 Kryokonservierung von HaCaT-Zellen 60
3.4.7 Auftauen von HaCaT-Zellen 61
3.4.8 Transiente Transfektion von HaCaT-Zellen 61
3.4.8.1 Transiente Transfektion mit Lipofectamine 2000 61
3.4.8.2 Transiente Transfektion mit Amaxa 62
3.4.9 Stabile Transfektion von HaCaT-Zellen 62
3.4.10 Bestimmung der Zellmigration 63
3.4.11 Bestimmung der Zelladhäsion 63
3.4.12 Proliferationsanalysen 64
3.4.13 Bestimmung der Luciferase-Aktivität 65
3.4.13.1 Analyse der C/EBP-Aktivität mittels „Cignal Reporter Assay“ 65
3.4.13.2 Analyse der K10-Promotor Konstrukte 66
3.4.14 Bestimmung der Zelltoxizität 66
3.5 Tierexperimentelle Methoden 67
3.5.1 Haltung und Zucht 67
3.5.2 MCAO-Modell 67
3.5.2.1 Operativer Verschluss der *Arteria cerebri media* 67
3.5.2.2 Einleitung der Reperfusion 69
3.5.2.3 Postoperative Beurteilung neurologischer Defizite 70
3.5.2.4 Perfusion des Blutkreislaufs und Anfertigung von Gehirnschnitten 71
3.5.2.5 TTC-Färbung 71
3.5.2.6 Bestimmung des Infarktvolumens 71
3.5.3 Wundheilungsmodell 72

4 Ergebnisse **74**

4.1 Analyse der Effekte von Clp36 in murinen Mesangiumzellen 74
4.1.1 Untersuchung der Proteinexpression in Clp36$^{-/-}$-Mesangiumzellen 74
4.1.2 Fluoreszenzfärbung zur Lokalisierung von Clp36 in Mesangiumzellen 77
4.1.3 Adhäsions-, Migrations- und Proliferationsanalysen von Clp36- und CSE-Knockout-Zellen 78
4.1.3.1 Adhäsionsanalysen 78
4.1.3.2 Migrationsanalysen 80
4.1.3.3 Proliferationsanalysen 82

4.2 Rolle von Clp36- und CSE im Kontext der zerebralen Ischämie 83
4.2.1 Bestimmung des Infarktvolumens bei WT-, Clp36$^{-/-}$- und CSE$^{-/-}$-Mäusen nach dem Verschluss der *Arteria cerebri meadia* 84
4.2.2 Proteinanalyse der ipsilateralen und kontralateralen Hirnhälfte . . 86
4.3 Analyse von Clp36, CSE und CBS im Kontext der kutanen Wundheilung . 87
4.3.1 Analyse der Genexpression H_2S generierender Enzyme in Wunden 87
4.3.1.1 Analyse der mRNA-Expression in Wunden von Wildtyp-Mäusen. 87
4.3.1.2 Analyse der Proteinexpression in Wunden von Wildtyp-Mäusen 88
4.3.1.3 *In-vivo*-Analyse des CSE-Knockouts 90
4.3.1.4 Protein- und RNA-Analyse der Wunden von Tag 11, 13 und 15 90
4.3.1.5 Vergleichende RNA-Analyse von Haut und Wunde . . . 92
4.3.1.6 Azan-Übersichtsfärbung von Wunden aus Wildtyp- und CSE$^{-/-}$-Tieren 94
4.3.1.7 Immunhistochemische Analyse von Wunden aus Wildtyp- und CSE$^{-/-}$-Tieren 95
4.3.2 Analyse der CBS und CSE Expression in humanen Keratinozyten . 97
4.3.2.1 RNA-Analyse von HaCaT-Zellen hinsichtlich der Expression von Differenzierungsmarkern sowie CBS und CSE . 97
4.3.2.2 Proteinanalyse von HaCaT-Zellen 99
4.3.2.3 mRNA-Analyse GYY4137-stimulierter HaCaT-Zellen . . 102
4.3.2.4 Proteinanalyse GYY4137 stimulierter HaCaT-Zellen . . . 104
4.3.2.5 Zytotoxizitätsanalyse 106
4.3.2.6 mRNA-Analyse Na_2S_4-behandelter HaCaT-Zellen 107
4.3.2.7 Überexpression der Cystathionin-γ-Lyase in HaCaT-Zellen 109
4.3.2.8 Einfluss von H_2S auf die Proliferation von HaCaT-Zellen 110
4.3.2.9 mRNA-Analyse der CSE-überexprimierenden Zelllinie . 112
4.3.2.10 Mögliche Mechanismen der H_2S-Regulierung 114

5 Diskussion **118**

5.1 Analyse muriner Mesangiumzellen 118
5.1.1 Der Knockout von Clp36 könnte die Expression anderer zytoskelettaler Proteine beeinflussen. 118

5.1.2 Clp36 ist an fokalen Adhäsionen und im Zellkern lokalisiert 119
5.1.3 Clp36 beeinflusst die Migration und Proliferation muriner Mesangiumzellen 120
5.1.4 CSE beeinflusst die Migration, Adhäsion und Proliferation muriner Mesangiumzellen 121
5.2 Die Deletionen von Clp36 und CSE haben keinen Einfluss auf das Ausmaß einer zerebralen Ischämie 122
5.3 Analyse von Clp36 und CSE im Kontext der kutanen Wundheilung 124
5.3.1 Clp36 spielt keine Rolle im Verlauf der kutanen Wundheilung . . . 124
5.3.2 Die Protein- und mRNA-Expression von CSE und CBS ist im Verlauf der Wundheilung reguliert. 124
5.3.2.1 Die Protein- und mRNA-Expression von CSE und CBS nimmt im Verlauf der Keratinozytendifferenzierung ab. . 125
5.3.2.2 Die H_2S-Donoren GYY4137 und Na_2S_4 beeinflussen die Differenzierung von HaCaT-Zellen. 126
5.3.2.3 Eine Überexpression der CSE führt zu Herrunterregulierung der Proliferationsrate. 127
5.3.2.4 $p21^{Cip/WAF-1}$ und C/EBP sind mögliche Regulatoren der H_2S-vermittelten HaCaT-Differenzierung 128
5.4 Zusammenfassung 130

6 Abbildungsverzeichnis **132**

7 Tabellenverzeichnis **134**

8 Abkürzungsverzeichnis **135**

9 Literaturverzeichnis **140**

10 Anhang **156**
10.1 Publikationen 156

1 Einleitung

1.1 Der Gasotransmitter H_2S

Bis vor wenigen Jahrzehnten war Schwefelwasserstoff (H_2S) lediglich als übelriechendes und giftiges Gas bekannt, bis im Jahr 1988 erstmals eine physiologische Rolle von H_2S im Gehirn beschrieben wurde [Kombian et al., 1988]. aufgrung seiner chemischen Struktur und seiner vielfältigen Funktionen im gesamten Organismus zählt H_2S, neben Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenmonoxid (CO), zur Gruppe der Gasotransmitter. Als Gasotransmitter werden kleine, im Organismus gebildete Gasmoleküle bezeichnet, die wichtige physiologische Funktionen erfüllen und deren Produktion über eine abgestimmte Regulation der synthetisierenden Enzyme erfolgt. Ein weiteres Charakteristikum von Gasotransmittern ist ihre Membranpermeabilität, wodurch sie ihre Wirkungen unabhängig von Rezeptoren an Zielstrukturen im Zytosol entfalten können [Wang, 2003].
Welche Aufgaben Schwefelwasserstoff genau im Organismus übernimmt wird seit einer Dekade intensiv erforscht. Je nach Organ oder Gewebe kann H_2S unterschiedliche Prozesse modulieren. So kann H_2S beispielsweise in Entzündungsprozessen sowohl anti- als auch pro-inflammatorisch wirken. Seine anti-inflammatorische Wirkung bei der Leukozytenadhäsion am vaskulären Epithelium [Zanardo et al., 2006]. Durch H_2S findet eine K_{ATP}-Kanal-vermittelte Hemmung der Leukozytenadhäsion statt. Auch in der Sepsis zeigt H_2S über eine Inhibierung von CHOP (C/EBP *homologous protein* 10) anti-inflammatorische Eigenschaften [Ferlito et al., 2014].
Auf der anderen Seite ist H_2S jedoch bei Brandwunden oder rheumatischen Erkrankungen ein pro-inflammatorischer Mediator [Muniraj et al., 2014] [Zhang et al., 2010].
Im Bereich der Onkologie kommt H_2S ebenfalls eine bivalente Rolle zu. Einerseits kann durch H_2S eine Unterdrückung des Krebswachstums durch einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase und die Förderung des Zelluntergangs durch Apoptose erzielt werden, andererseits kommt es bei Darm-und Eierstockkrebs zu einem vermehrten Wachstum und einer Steigerung der Migrationsrate von Krebszellen [Chattopadhyay et al., 2012], [Szabo et al., 2013].
Eindeutig positive Effekte hat Schwefelwasserstoff im Kreislaufsystem. In Zellen der glatten Muskulatur hat H_2S blutdrucksenkende Eigenschaften, indem es über die Aktivierung von K_{ATP}-Kanälen eine Vasorelaxation hervorruft [Zhao et al., 2001].
Aufgrung dieser Eigenschaften von H_2S werden H_2S-Donoren wie GYY4137 oder NaSH

seit einiger Zeit in klinischen Studien zur Therapie entzündlicher und kardiovaskulärer Erkrankungen untersucht [Caliendo et al., 2010].

Neueste Untersuchungen zeigen jedoch, dass einige dem H_2S zugeschriebenen Effekte möglicherweise auf Polysulfide (H_2S_n) zurückzuführen sind [Kimura et al., 2015] [Kimura, 2016]. aufgrung der höheren Oxidationsstufe des in Polysulfiden gebundenen Schwefels sind Polysulfid-Donoren wie beispielsweise Na_2S_4 deutlich potenter als NaSH oder GYY4137, wenn es um die Ausbildung von Persulfiden (R-S-SH) geht [Longen et al., 2016]. Persulfide werden im Laufe einer Sulfhydrierung an Cysteinresten von Proteinen gebildet. Diese Modifikation wird als ein wesentlicher molekularer Mechanismus betrachtet, über den die zelluläre Funktion von H_2S vermittelt wird [Greiner et al., 2013] [Kimura et al., 2015].

1.1.1 Die Synthese von H_2S

Die enzymatische Produktion von Schwefelwasserstoff beruht auf der Aktivität von drei Enzymen, der Cystathionin-γ-Lyase (CSE), der Cystathionin-β-Synthase (CBS) und der 3-Mercaptopyruvat-Sulfurtransferase (3-MST) (Abbildung 1.1).

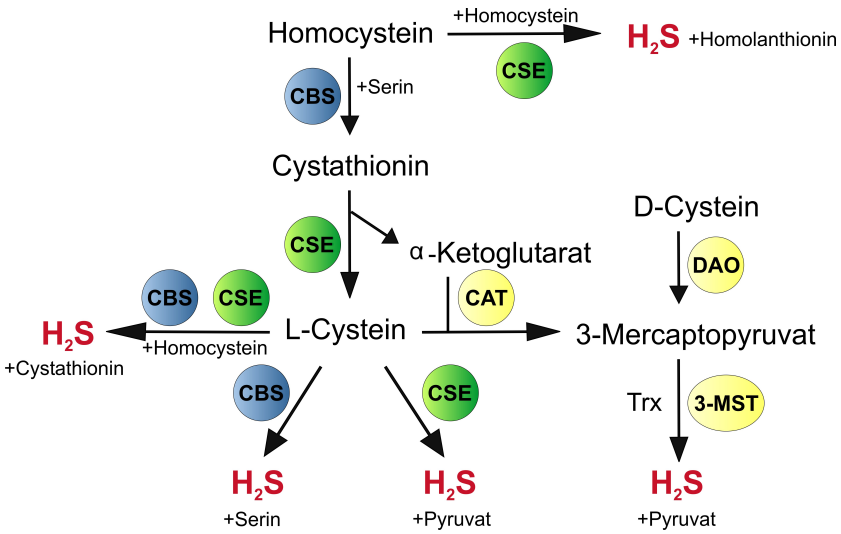

Abbildung 1.1: Enzymatische Produktion von H_2S:

CBS: Cystathionin-β-Synthase, CSE: Cystathionin-γ-Lyase, 3-MST: 3-Mercaptopyruvat-Sulfurtransferase, CAT: Cystein-Aminotransferase, DAO: D-Aminosäureoxidase

Die Synthese von H_2S durch die CSE und die CBS weißt einige Parallelen auf. Beide Enzyme sind Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP)-abhängig und im Zytosol der Zelle lokalisiert

[Stipanuk and Beck, 1982]. Darüber hinaus nutzen sowohl CSE als auch CBS Homocystein und Cystein als Substrat. Die 3-MST-abhängige Produktion von H_2S findet hingegen nicht im Zytosol, sondern vorwiegend in den Mitochondrien statt [Griffith, 1999]. Für die Herstellung von Schwefelwasserstoff benötigt die 3-MST ein weiteres Enzym. Je nach Substrat (L-Cystein oder D-Cystein) wird zunächst 3-Mercaptopyruvat durch CAT (Chloramphenicol-Acetyltransferase) oder DAO (Diaminoxidase) generiert, welches durch die 3-MST weiter zu H_2S umgesetzt wird [Kuo et al., 1983] [Shibuya et al., 2013]. Der über die 3-MST synthetisierte Schwefelwasserstoff wird anders als bei den anderen Synthesewegen zunächst als Sulfan-Sulfur gespeichert, bevor er durch Thioredoxin oder DTT reduziert und als H_2S freigesetzt wird [Nagahara et al., 2007].

1.1.2 H_2S produzierende Enzyme

1.1.2.1 Cystathionin-β-Synthase (CBS)

Die CBS wurde erstmals 1982 als H_2S-produzierendes Enzym in der Leber und der Niere von Ratten beschrieben [Stipanuk and Beck, 1982]. 1996 konnte darüber hinaus eine Lokalisierung im Gehirn gezeigt werden [Abe and Kimura, 1996]. CBS ist dort in hippocampalen Neuronen, Bergmann-Gliazellen, Astrozyten und Purkinje-Zellen exprimiert [Enokido et al., 2005] [Ichinohe et al., 2005] [Robert et al., 2003]. Eine Regulierung der CBS findet u.a. durch S-Adenosylmethionin (SAM) statt. Eine Bindung von CBS an SAM, welches später zu Homocystein hydrolysiert wird, führt zu einer Steigerung der CBS-Aktivität [Finkelstein et al., 1975]. Auch die Glutathionylierung des Cysteins 346 führt zu einer Verdopplung der CBS-Aktivität [Niu et al., 2015]. Im Gegensatz dazu führt eine Bindung von NO und CO am Aminoterminus der CBS zu einer Hemmung der Enzymaktivität [Taoka and Banerjee, 2001].
Experimente mit CBS-Knockout-Mäusen zeigten unter anderem, dass der Verlust der CBS zu Veränderungen im Lipid-Metabolismus der Leber führt [Enokido et al., 2005]. Außerdem kann eine CBS-Deletion morphologische Auffälligkeiten des Gehirns hervorrufen und Homocysteinämien auslösen [Namekata et al., 2004]. Beim Menschen führt der Verlust oder die verminderte Aktivität der CBS zur Homocysteinämie. Die Wahrscheinlichkeit eine der autosomal-rezessiven Mutationen im CBS-Gen zu tragen beträgt etwa 1:300.000. Typische Symptome sind u.a. ein Augenlinsenvorfall und eine psychomotorische Retardierung im Kindesalter. Früh erkannt, kann die Behandlung mit Pyridoxalphosphat und durch eine geeignete Diät erfolgreich sein [Yap and Naughten, 1998].

1.1.2.2 Cystathionin-γ-Lyase (CSE)

Die CSE wurde wie auch die CBS erstmals 1982 als H_2S-produzierendes Enzym in der Leber und der Niere von Ratten beschrieben. Darüber hinaus wird die CSE in Blutgefäßen, Darm, Pankreas und Gehirn exprimiert [Kimura, 2011] [Paul et al., 2014]. Während die CBS eher als konstitutiv exprimiertes Protein angesehen wird, wurde gezeigt, dass die CSE auf der Transkriptionsebene durch Entzündungsmediatoren wie TNF-α und LPS [Sen et al., 2012] [Zhu et al., 2010] sowie durch Wachstumsfaktoren wie PDGF-BB [Hassan et al., 2012] induziert werden kann. Experimente mit CSE-Knockout-Mäusen zeigen unter anderem eine verzögerte Wundheilung [Papapetropoulos et al., 2009]. Diese Beobachtung konnte auf eine verminderte Angiogenese zurückgeführt werden. Ist die CSE vorhanden,tt führt die Stimulation von Endothelzellen mit VEGF (*vascular endothelial growth factor*) zu einer vermehrten Freisetzung von H_2S. Wird die CSE jedoch deletiert oder die Aktivität pharmakologisch inhibiert, fällt die Bildung neuer Blutgefäße als Antwort auf eine VEGF-Stimulation deutlich geringer aus. Am Beispiel der H_2S-vermittelten Blutdruckregulation ist jedoch zu sehen, dass nicht jede CSE-Knockout-Linie phänotypische Auffälligkeiten entwickelt. So führt eine Deletion der CSE in einigen Linien zu einem Blutdruckanstieg [Yang et al., 2008], wohingegen andere Linien keine Äuffälligkeiten des Blutdrucks zeigen [Ishii et al., 2010]. Ausbleibende Effekte einer CSE-Deletion lassen sich dabei wahrscheinlich auf eine kompensatorische H_2S-Produktion durch die Enzyme 3-MST und CBS zurückführen [Shibuya et al., 2009] [Olson et al., 2010].

1.1.2.3 3-Mercaptopyruvat-Sulfurtransferase (3-MST)

Ebenso wie die CBS und die CSE wurde auch die 3-MST als H_2S-produzierendes Enzym von Stipanuk und Beck entdeckt [Stipanuk and Beck, 1982]. Neben der Lokalisierung in der Leber und der Niere wird die 3-MST ebenfalls im Gehirn, insbesondere in Purkinje-Zellen, Mitralzellen, hippocampalen Zellen und Astrozyten exprimiert [Nagahara et al., 1998] [Shibuya et al., 2009]. In geringem Maße konnte eine Expression auch im Herz und der Lunge nachgewiesen werden [Cooper, 1983] [Ubuka et al., 1985]. Im Gegensatz zu CBS und CSE ist die 3-MST vorwiegend in den Mitochondrien lokalisiert [Griffith, 1999], [Tateishi et al., 1977].
Eine Deletion der 3-MST führte in *in-vivo*-Versuchen zu einem gesteigerten Angstverhalten. Dieses korrelierte mit einer gesteigerten Produktion von Serotonin im präfrontalen Cortex und dem Hippocampus der Knockout-Mäuse [Nagahara et al., 2013]. Im Gegensatz zu

den bereits gut charakterisierten Enzymen CSE und CBS sind Funktion und Aktivität der 3-MST noch relativ unbekannt. aufgrung seiner Rolle als Produzent von Polysulfiden ist die 3-MST jedoch von aktuellem Interesse [Kimura et al., 2015]. Im Vergleich zu NaHS können Polysulfide wie Na_2S_3 im Gehirn einen deutlich höheren Calciumeinstrom in Astrozyten hervorrufen [Kimura et al., 2013].

1.2 Clp36

Ein Protein, welches sowohl durch H_2S als auch durch NO beeinflussbar ist, ist Clp36, ein zytoskeletales Protein, welches auch als PDLIM1 bezeichnet wird. In einer Publikation aus dem Jahr 2016 wurde beschrieben, dass die Behandlung mit dem H_2S-Donor Na_2S_4 in HEK293-Zellen zu einer Persulfidbildung an mindestens einem Cysteinrest von Clp36 führt [Longen et al., 2016]. Welche Auswirkung diese Modifikation hat, ist bisher jedoch nicht bekannt. Bisher noch unveröffentliche Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen zudem eine Herunterregulation der Clp36 mRNA-Expression durch NO [Walpen, 2001]. Clp36 ist eines von 7 Proteinen der PDLIM-Familie. Ein charakteristisches Merkmal dieser Proteinfamilie ist der Besitz einer PDZ-Domäne am N-Terminus und einer LIM-Domäne am C-Terminus, die durch einen Aminosäure-*Linker* verbunden sind. Die PDZ-Domäne ist ein aus 80-90 Aminosäuren bestehendes Motiv, welches an den C-Terminus anderer Proteine bindet und als Adapter zur Rekrutierung von Signalmolekülen ans Zytoskelett fungiert [Kennedy, 1995]. Die LIM-Domäne des Proteins besteht aus zwei Cystein-reichen Zinkfingermotiven, die eine wichtige Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts spielen können [Kadrmas and Beckerle, 2004]. Die LIM-Domäne von Clp36 interagiert mit α-Actinin 2 und der Kinase Click1 [Kotaka et al., 2000] [Vallenius and Makela, 2002]. Die PDZ-Domäne bindet an α-Actinin 4 und der Aminosäure-*Linker* an α-Actinin 1 [Vallenius et al., 2000][Bauer et al., 2000]. Über die Bindung an α-Actinin ist Clp36 am Aktinzytoskelett der Zelle lokalisiert. Dabei handelt es sich um ein komplexes Protein-Netzwerk, dass der Zelle ihre Struktur gibt und unerlässlich für dynamische Vorgänge wie Strukturänderungen, Migration und Kontraktion ist. Im Jahr 2000 konnte eine Assoziation von Clp36 an Aktinfilamente und Stressfasern in aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen festgestellt werden [Bauer et al., 2000]. Stressfasern sind kontraktile Strukturen in nicht-Muskelzellen, die eine ähnliche Struktur und Funktion wie die Myofibrillen der Skelettmuskultur haben [Wong et al., 1983]. Bevor es zu einer Aktivierung von Thrombozyten und einer damit zusammenhängenden Reorganisation des Zytoskeletts kommt, findet eine

Bindung von Clp36 an α-Actinin 1 statt. Durch den Aktivierungsprozess kommt es zu einer Translokation dieses Komplexes an das Zytoskelett der Thrombozyten. Es konnte gezeigt werden, dass Clp36 die Bindungsstelle von α-Actinin am Filament variieren kann und dadurch Einfluss auf dessen Funktion hat [Bauer et al., 2000] [Siess et al., 1982]. Darüber hinaus hat Clp36 eine wichtige Funktion bei der Formation von Stressfasern und fokalen Adhäsionen. Eine Depletion von Clp36 führt in humanen Plazentazellen zu einem Verlust dieser beiden Strukturen und einer veränderten Zellmorphologie [Tamura et al., 2007]. 2012 konnte Clp36 als negativer Regulator des Glykoprotein VI (GPVI) identifiziert werden. Die Regulation dieses Proteins ist von großer Bedeutung, um einer unkontrollierten Aktivierung von Thrombozyten vorzubeugen. Der Verlust der LIM-Domäne von Clp36 führt zu einer Erhöhung der PLCγ-2 Aktivität, ein Zielprotein von GPVI, dessen Hochregulierung den Ca^{2+} Ein- und Austritt verbessert und so über eine schnellere Aktivierung von Integrinen zu einer erhöhten Thrombenbildung beiträgt. Clp36 könnte somit eine wichtige Funktion bei der Entstehung ischämischer Krankheiten wie myokardialen oder zerebralen Infarkten haben [Gupta et al., 2012].
Als ein weiterer Bindungspartner von Clp36 wurde Palladin, ein wichtiges Strukturelement des Aktinzytoskeletts, identifiziert [Maeda et al., 2009]. Diese Interaktion findet über die PDZ-Domäne von Clp36 und dem C-Terminus von Palladin statt. Es konnte gezeigt werden, dass ohne Palladin eine Lokalisierung von Clp36 an Stressfasern nicht möglich ist und auch im umgekehrten Fall eine Lokalisierung von Palladin von Clp36 abhängt.
Geeignete Knockout-Modelle für CSE und Clp36 standen am Institut bereits zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Effekte dieser Deletionen im Kontext von Krankheitsmodellen der Niere, des Gehirns und der Haut untersucht werden.

1.3 Die Niere

Die Niere ist ein paarig angelegtes Organ, dessen primäre Funktion die Filtration des Blutes ist. So werden für den Körper schädliche Stoffe wie beispielsweise Abbauprodukte des Eiweißstoffwechsels, in Form von Urin aus dem Körper ausgeschieden. Durch Sekretions- und Resorptionsvorgänge ist die Niere außerdem für den Wasser-und Elektrolythaushalt des Körpers sowie für die Regulation des Säure-Basen-Gleichgewichts verantwortlich. Durch die Produktion von Hormonen wie Renin und Erythropoetin ist sie als endokrines Organ zu einem großen Teil an der Regulation des Blutdrucks und der Bildung roter Blutkörperchen beteiligt [Silbernagl et al., 2003]. Die beim Menschen etwa 10 cm langen

und 5 cm breiten Nieren befinden sich unterhalb des Zwerchfells im Retroperitonialraum. Die Niere besteht aus der äußeren Nierenrinde und dem innen liegenden Nierenmark und wird von der Nierenkapsel umgeben, welche für den mechanischen Schutz des Organs sorgt (Abbildung 1.2). Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron. Ein Nephron setzt sich aus Nierenkörperchen (Glomeruli) und Nierenkanälchen (Tubulus) zusammen.

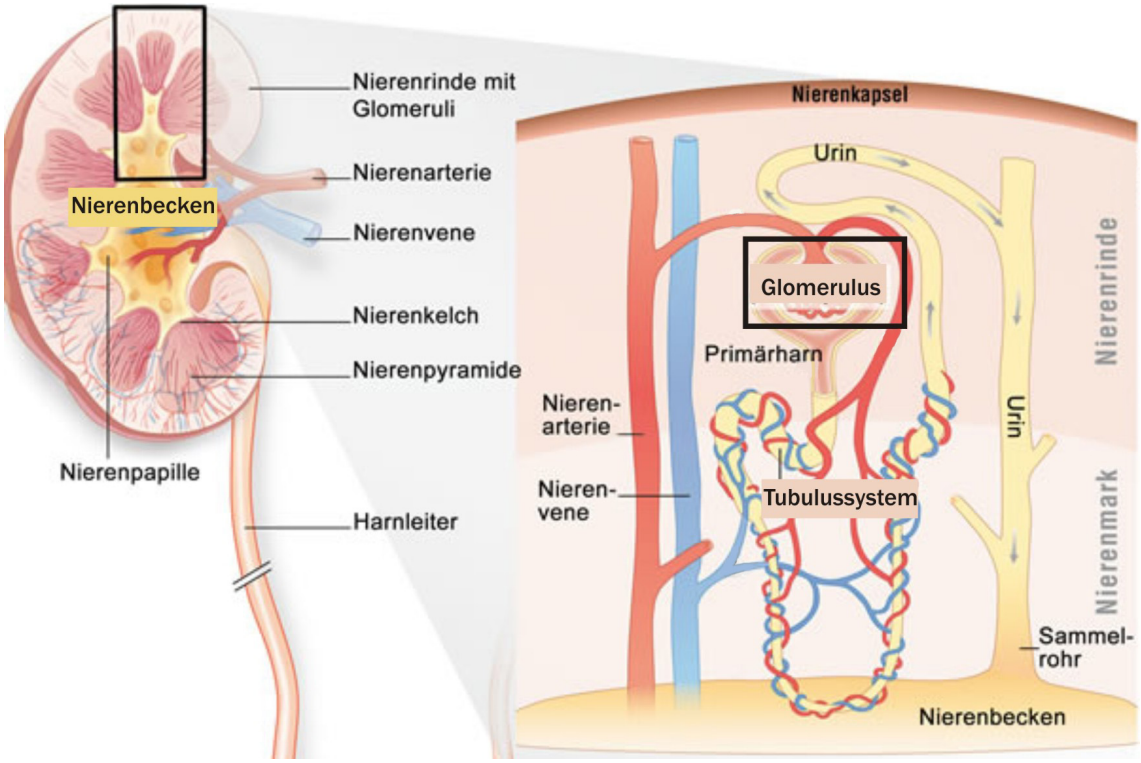

Abbildung 1.2: Aufbau der Niere

Modifiziert nach www.apotheken-umschau.de/multimedia/19/176/234/6298918929.jpg

Die Nierenkörperchen sind in der Nierenrinde lokalisiert, während der Großteil des Tubulussystems im Nierenmark zu finden ist. Im Tubulussystem findet die Resorption von Aminosäuren, Elektrolyten, Zucker und Wasser statt. Darüber hinaus werden dem Primärharn große Mengen an Wasser entzogen, die dem Körper so weiterhin zur Verfügung stehen. Der auf diesem Weg gebildete Urin wird im Anschluss in die Nierenkelche, das Nierenbecken und letztendlich in die Harnwege geleitet. Pro Tag werden so etwa 180 Liter Primärharn und knapp 2 Liter Endharn produziert [Wehner et al., 1995].

1.3.1 Das Glomerulum

Das Glomerulum ist ein etwa 0,2 mm großes Kapillarknäuel. Es wird von der Bowman-Kapsel umschlossen, die in ein äußeres und ein inneres Blatt unterteilt ist. Das innere (viszerale) Blatt liegt den Kapillaren auf. Zellen dieses Blattes werden als Podozyten bezeichnet. Die Blutversorgung des Glomerulus findet über die *Arteriola glomerularis afferens* (*Vas afferens*) statt. Das eingeleitete Blut wird durch eine mehrschichtige Filtrationsbarriere, bestehend aus fenestrierten Endothelzellen, glomerulärer Basalmembran und Podozyten, gefiltert. Die im Laufe dieses Prozesses zurückgehaltenen Blutbestandteile werden anschließend über efferente Arteriolen (*Vas efferens*) wieder in den Körperkreislauf zurückgeführt. Neben den bereits erwähnten Zellen sind im Glomerulum Mesangiumzellenlokalisiert. Man unterscheidet hierbei die extraglomerulären und intraglomerulären Mesangiumzellen. Die extraglomerulären Zellen befinden sich am distalen Tubulus und sind Teil des juxtaglomerulären Apparates, in welchem die für die Blutdruckregulation wichtige Produktion von Renin stattfindet.

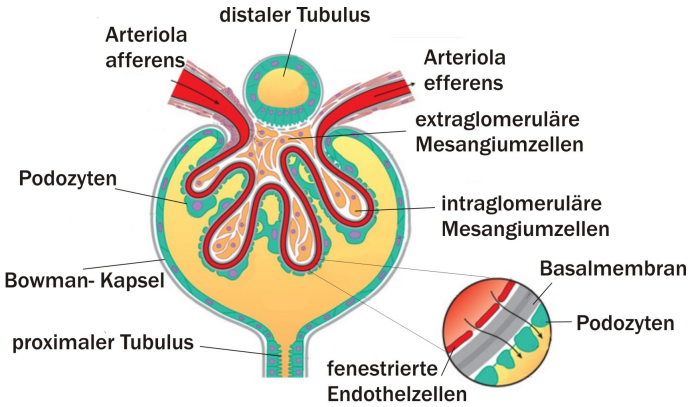

Abbildung 1.3: Aufbau des Glomerulums

Modifiziert nach Welsch: Sobotta Lehrbuch Histologie, 2.A.

Die internen Mesangiumzellen sind zwischen den Kapillaren lokalisiert.

Mesangiumzellen sind kontraktile Zellen, welche große Ähnlichkeit zu glatten Muskelzellen aufweisen. Neben ihrer Stützfunktion für die Kapillaren, erfüllen sie Aufgaben als Phagozyten und produzieren Wachstumsfaktoren sowie Matrixbestandteile [Ghayur et al., 2008]. Die von den Mesangiumzellen produzierte extrazelluläre Matrix (EZM) beinhaltet u.a. Kollagene, Laminin A und B, Fibronektin und Proteoglykane [Couchman et al., 1994]. Die Zusammensetzung ist dabei streng kontrolliert und ist beispielsweise im Verlauf der diabetischen Nephropathie deutlich verändert [Mason and Wahab, 2003]. Die autokrine PDGF-, IL-1/6- und TNF-α-Sekretion von Mesangiumzellen führt neben deren Fähigkeit T-Zellen zu rekrutieren dazu, dass Mesangiumzellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Autoimmunreaktionen und akuten oder chronischen Entzündungen wie beispielsweise der mesangioproliferativen Glomerulonephritis spielen [Ruef et al., 1992], [Radeke and Resch, 1992].

1.3.2 Die Glomerulonephritis

Die Glomerulonephritis ist ein Sammelbegriff für entzündliche Erkrankungen der Glomeruli. Aus pathologischer Sicht unterscheidet man eine primäre und eine sekundäre Form. Bei der primären Glomerulonephritis handelt es sich um eine Autoimmunreaktion innerhalb der Niere. Liegt jedoch zunächst eine Erkrankung eines anderen Organs vor, welche in Folge eine Entzündung der Nierenkörperchen hervorruft, spricht man von einer sekundären Glomerulonephritis. Krankheiten die eine sekundäre Glomerulonephritis zur Folge haben können, sind unter anderem Diabetes mellitus, Bluthochdruck und Immunkrankheiten wie Hepatitis und HIV.
Die IgA-Nephritis, eine Form der mesangioproliferativen Glomerulonephritis, ist die häufigste aller Glomerulonephriden beim Menschen [D'Amico, 1987]. Es handelt sich dabei um eine Immun-Komplex-vermittelte Glomerulonephritis, die durch die Präsenz von IgA-Ablagerungen im Glomerulum gekennzeichnet ist.
In Patienten ist eine verminderte Galaktosylierung der IgA1-Moleküle feststellbar, was auf eine verringerte β1,3-Galaktosyltransferase-Aktivität zurückgeführt werden kann [Allen et al., 1997]. Es wird vermutet, dass die IgA-Rezeptoren der Mesangiumzellen eine höhere Präferenz zu den weniger galaktosylierten IgA-Molekülen haben [Mestecky et al., 1995]. IgG-Autoantikörper binden an die veränderten IgA-Moleküle und lagern sich als Komplex im Mesangium ab. Dadurch kommt es u.a. zu einer Lektin-vermittelten Interleukin-6 Sekretion der Mesangiumzellen, was deren Proliferation und die Synthese extrazellulärer Matrix-Bestandteile begünstigt [Ruef et al., 1990]. Die zusätzliche Sekretion von IL-6R, PDGF und TNF-α führt darüber hinaus zu entzündlichen Schädigungen der Nierenkörperchen [Taniguchi et al., 1996]. Neben den in erster Linie betroffenen Mesangiumzellen werden auch Podozyten und Zellen des Tubulussystems durch die Entzündungsreaktion geschädigt [Menon et al., 2013] [Donadio and Grande, 2002].

1.3.3 CSE und Clp36 in der Glomerulonephritis

Insbesondere bei Glomerulonephriden, die auf Diabetes-Erkrankungen zurückzuführen sind, spielt Schwefelwasserstoff eine wichtige Rolle. Eine Glukose-vermittelte Expressionserhöhung von Matrixproteinen wie Collagen IV und Laminin löst renale Hypertrophien und Fibrosen aus. H_2S inhibiert dabei die Translation dieser für die Zellproliferation und Migration wichtigen Proteine. Diese Inhibierung erfolgt über eine Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) und einer Inhibierung des mTOR Kom-

plexes 1 [Lee et al., 2012]. In Mäusen mit Diabetes Typ 1 und 2 ist die Expression der H_2S-produzierenden Enzyme CSE und CBS geringer als in gesunden Mäusen, was zu verhältnismäßig niedrigen H_2S-Konzentrationen in den Tieren führt [Jain et al., 2010] [Yuan et al., 2011]. Die geringen Mengen H_2S haben einen erhöhten Glukosespiegel zur Folge, wodurch die Proteinsynthese der Zelle aktiviert und so u.a. renale Hypertrophien begünstigt werden. In Mäusen mit Nierenarterienstenose konnte der H_2S-Donor NaHS zu einer Senkung des Blutdruckes beitragen. NaHS inhibiert die Aktivität des blutdrucksteigernden Renins, indem es dessen Expression auf mRNA- und Proteinebene hemmt und damit die Sekretionsrate von Renin verringert [Lu et al., 2010].
In vielen Formen der Glomerulonephritis einschließlich der Fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) und der IgA-Nephritis kommt es aufgrund einer Störung im Zytoskelett von Podozyten zu Fehlfunktionen der Filtrationsbarriere. Gekennzeichnet ist diese Störung durch geringe Mengen α-Actinin 4 (ACTN4) [Kos et al., 2003]. Es wurde gezeigt, dass der Verlust des ACTN4 mit einer verminderten Abundanz des Proteins Clp36 einhergeht. In gesunden Podozyten bilden ACTN4 und Clp36 einen Komplex. Der Verlust von Clp36 oder die Störung des ACTN4-Clp36-Komplexes führen zu einer Hemmung der RhoA-Kinase-Aktivität, welche u.a. die Organisation des Zytoskeletts und die Kontraktion der Zellen reguliert [Liu et al., 2011].
Neben ihrer Existenz in der Niere und ihrer Beteiligung im Verlauf glomerulärer Erkrankungen, sind sowohl CSE als auch Clp36 im Gehirn lokalisiert und nehmen Einfluss auf neurologische Vorgänge.

1.4 Das Gehirn

Das Gehirn bildet zusammen mit dem Rückenmark das zentrale Nervensystem (ZNS) der Wirbeltiere. Im ZNS werden periphere Reize der Sinnesorgane verarbeitet (Integration), willkürliche Motorik ermöglicht (Koordination) und Vorgänge innerhalb des Organismus abgestimmt (Regulation). Während das Rückenmark hauptsächlich für die Kommunikation zwischen Gehirn und Skelettmuskulatur, Sinnesorganen und den inneren Organen zuständig ist, findet im Gehirn die gesamte Verarbeitung und Koordination der eingehenden Informationen statt. Aufgrund dieser enormen Leistung ist der Sauerstoffverbrauch des Gehirns sehr hoch und eine kontinuierliche Blutversorgung von größter Bedeutung.

1.4.1 Die Blutversorgung des Gehirns

Um das Gehirn mit ausreichenden Mengen an Sauerstoff und Glukose zu versorgen sowie den Abtransport von Stoffwechselprodukten zu gewährleisten, werden im Durchschnitt 45 ml Blut pro 100 g Gewebe pro Minute benötigt. Eine Reduktion der Durchblutungsrate auf 50 % kann kompensiert werden, eine stärkere Reduktion auf etwa 10 ml/100 g/min statt, führt jedoch bereits nach wenigen Minuten zu einem Zelluntergang [Edvinsson et al., 1993].

Die Blutversorgung des Gehirns erfolgt über vier große Schlagadern. Zwei Arterien verlaufen auf der Vorderseite des Halses und werden als Karotiden (*Arteriae carotides internae*) bezeichnet. Zwei weitere Arterien, die Wirbelarterien (*Arteriae vertebrales*), verlaufen entlang der Querfortsätze der Wirbelkörper. Die Karotiden verlaufen als paarig angelegte Gefäße links und rechts der Trachea.

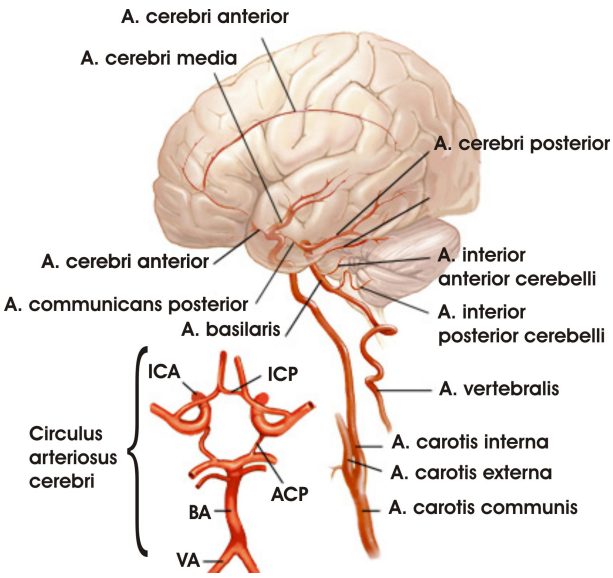

Abbildung 1.4: Blutversorgung des Gehirns

Modifiziert nach www.mayfieldclinic.com/PE-AneurUn.htm. ICA: A. carotis interna, ICP: A. communicans interior, ACP: A. communicans posterior, BA: A. basillaris, VA: A. vertebralis

An der Karotisgabelung (*Bifurcatio carotidis*) teilt sich die *Arteria carotis communis* in die *Arteria carotis interna* und die *Arteria carotis externa*. Die *Arteria carotis interna* verläuft über den *Canalis caroticus* ins Gehirn. Nach Abzweigung kleinerer Nebenäste kommt es zu einer Unterteilung in die mittlere Hirnarterie (*Arteria cerebri media*) und die vordere Hirnarterie (*Arteria cerebri anterior*). Die *Arteria cerebri media* versorgt größtenteils die lateralen Bereiche der jeweiligen Großhirnhemisphäre, während der mediale Teil über die *Arteria cerebri anterior* mit Blut versorgt wird. Der hintere Kreislauf entsteht aus der Schlüsselbein-Schlagader (*Arteria subclavia*). Diese teilt sich in die rechte und linke Wirbelarterie und tritt durch das *Foramen magnum* in die Schädelhöhle ein. Beide Arterien schließen sich zur *Arteria basilaris* zusammen. Die Verbindung beider Kreisläufe erfolgt durch das Anastomosensystem (*Circulus arteriosus cerebri*).

1.4.2 Der ischämische Schlaganfall

Der ischämische Schlaganfall ist in Deutschland nach dem Herzinfarkt und malignen Tumoren die dritt häufigste Todesursache und die häufigste Ursache für die Pflegebedürftigkeit im Alter [Hacke and Poeck, 2010]. Er entsteht als Folge eines transienten oder permanenten Verschlusses einer der blutzuführenden Hirnarterien. Durch die Minderdurchblutung werden die betroffenen Bereiche nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Glukose versorgt. Eine Folge dessen ist die Störung des zellulären Membranpotentials. Es kommt zu einer Freisetzung großer Mengen Ca^{2+} und der exzitatorischen Aminosäure Glutamat [Silver and Erecinska, 1990] [Benveniste et al., 1984]. Das freigesetzte Glutamat trägt dazu bei, dass NMDA-Rezeptoren und metabotrope Glutamatrezeptoren aktiviert werden, was die Calciumkonzentration in der Zelle weiter erhöht. Eine Folge des immensen Calcium-Anstieges ist beispielsweise die Aktivierung proteolytischer Enzyme, die zytoskelettäre Proteine wie Aktin und Spektrin und Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Laminin degradieren [Dirnagl et al., 1999]. Eine Ca^{2+}-abhängige Aktivierung der Phospholipase A_2 und der Cyclooxygenase führt zur Bildung freier Radikale welche zur Schädigung des Gewebes beitragen.
Die auftretenden Symptome variieren dabei, je nachdem welches Gefäß die Durchblutungsstörung verursacht. Häufig auftretende Symptome sind unter anderem: Hemiparese (Halbseitenlähmung), Aphasie (Sprachstörung) und binokuläre Gesichtsfeldausfälle (z.B. homonyme Hemianopsie oder Quadrantenanopsie). Als häufige Ursachen sind atherothrombotische Embolien von Gefäßplaques der großen zuführenden Gefäße, kardiale Embolien bei Vorhofflimmern oder lokale Mikrothrombosen der kleinen perforierenden Arterien des Gehirns zu nennen. [Kumar and Clark, 2009] [Hacke and Poeck, 2010].

1.4.3 CSE und Clp36 im ischämischen Schlaganfall

Da bei einem Schlaganfall die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zu einem erhöhten Calciumeinstrom in die Zelle führt und es damit einhergehend zu einer Schädigung des neuronalen Gewebes kommt, sind NMDA-Rezeptoren-Antagonisten in der Schlaganfallforschung von großem Interesse. Schwefelwasserstoff ist ein bekannter NMDA-Rezeptor-Agonist und hat als solcher Auswirkungen auf das Infarktvolumen bei Nagetieren [Qu et al., 2006]. Die Effekte, welche durch eine Behandlung mit NaHS erzielt wurden, sind jedoch widersprüchlich. Entsprechend der Vermutung, dass ein NMDA-Rezeptor-Agonist zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels beiträgt wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit

dem H_2S-Donor NaHS zu einer Vergrößerung des Infarktvolumens beiträgt. Dass es sich dabei um einen NMDA-Rezeptor-vermittelten Effekt des Schwefelwasserstoffs handelt, wurde durch die Gabe eines NMDA-Rezeptor-Antagonisten gezeigt, der den Anstieg der Infarktgröße durch die NaSH-Gabe verhindern konnte. Nachweislich korrelieren große Mengen der Aminosäure Cystein bei einem akuten Infarkt mit einer schlechten Langzeitprognose. Da Cystein den Enzymen CSE und CBS als Substrat für die Produktion von H_2S dient, liegt die Vermutung nahe, dass eine Erhöhung des Cysteinspiegels zu einer gesteigerten Produktion von H_2S führt [Wong et al., 2006]. Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass hohe Cysteinspiegel, durch die Blockade der NMDA-Rezeptoren verhindert werden konnten. Da Cystein selbst nicht mit NMDA-Rezeptoren interagiert, spricht vieles dafür, dass die negative Langzeitprognose für Schlaganfallpatienten auf gesteigerte H_2S-Mengen zurückzuführen ist.

Im Gegensatz zu diesen Studien gibt es jedoch auch Berichte, welche einen H_2S-vermittelten anti-inflammatorischen Effekt beim Schlaganfall beschreiben. Dabei führte eine Aktivierung der iNOS zu einer Verkleinerung des Infarktvolumens [Issa et al., 2013]. Ebenfalls eine Verringerung des Infarktvolumens durch H_2S konnte in Zusammenhang mit einer Aktivierung der PKC (Proteinkinase C) und einer damit einhergehenden Reduzierung von Aquaporin4 (AQP4) beschrieben werden [Wei et al., 2015]. Trotz vieler Studien, in denen der Einfluss von H_2S auf neurologische Prozesse untersucht wurde, weiß man nicht viel über die Rolle der CSE im Gehirn. Die Bedeutung der CSE im Verlauf des ischämischen Infarkts soll in dieser Arbeit genauer betrachtet werden.

Eine Möglichkeit die Entstehung einer zerebralen Ischämie zu verhindern, ist eine unkontrollierte Aggregation von Blutplättchen zu unterbinden. Diese kann als Folge einer vaskulären Verletzung und der damit zusammenhängenden Aktivierung der Blutplättchen während der Hämostase einsetzen. Dabei kommt es zu einer Kollagen-induzierten Aktivierung des Glykoprotein VI auf der Oberfläche der Blutplättchen und in Folge dessen zu einer Komplexbildung mit der Fc-Rezeptor γ-Kette. Eine Phosphorylierungskaskade führt zu einer Aktivierung der Phospholyase Cγ2, was mit einem Anstieg der Calciumkonzentration und dadurch mit der Aktivierung von Blutplättchen einhergeht [Jarvis et al., 2004]. In dieser Aktivierungskaskade könnte Clp36 eine entscheidende Rolle spielen, da ein Verlust von Clp36 zu einer erhöhten Plättchen-Aktivierung und einem prothrombotischen Phänotyp führt. Die genaue Funktion von Clp36 ist noch nicht bekannt, jedoch scheint es eine Funktion in der negativen Rückkopplungsschleife des Glykoprotein VI zu haben [Gupta et al., 2012].

Neben der Niere und dem Gehirn, stellt die Haut ein weiteres interessantes Organ dar, bei dessen Funktion und Struktur die Proteine CSE und Clp36 eine wichtige Rolle spielen.

1.5 Die Haut

1.5.1 Aufbau der Haut

Die Haut ist mit einer Oberfläche von etwa 2 m^2 das größte Organ des menschlichen Körpers. Sie hat äußerst vielseitige Funktionen, ist jedoch in erster Linie eine Barriere, die den Körper u.a. vor eindringenden Mikroorganismen und vor einem unkontrollierten Austritt von Wasser und Elektrolyten schützt. Durch ihre Melanineinlagerungen ist sie in der Lage UV-Strahlen zu absorbieren. Die Haut übernimmt stoffwechselrelevante Aufgaben und ist Teil des körpereigenen Immunsystems. In ihrer Rolle als Sinnesorgan übermittelt sie über diverse Rezeptoren Temperatur, Druck- und Schmerzreize.
Gegliedert ist die Haut in folgende Schichten: Epidermis, Dermis und Subkutis (Abbildung 1.5).

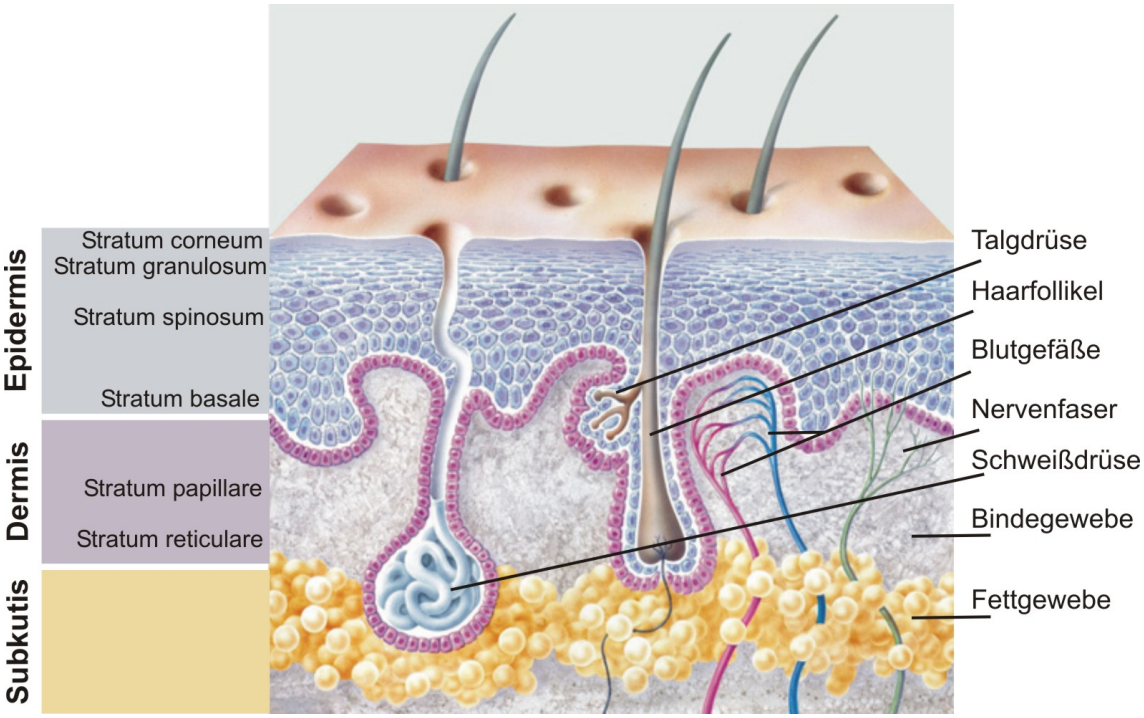

Abbildung 1.5: Aufbau der Haut

Modifiziert nach http://www.juzo.com/fileadmin/Bilddatenbank/Bilder/Hautschichten.jpg

1.5.1.1 Epidermis

Die Epidermis ist ein verhorntes Plattenepithel, welches die äußere Schicht der Haut bildet und vorwiegend als mechanische Barriere dient. 90 % der epidermalen Zellen sind Keratinozyten. Diese entstehen aus epidermalen Stammzellen der inneren Basalschicht (*Stratum basale*) oder der Stammzellnische von Haarfollikeln [Mackenzie, 1997] [Ghazizadeh and Taichman, 2001]. Diese Stammzellen können entweder zu neuen epidermalen Stammzellen oder zu *transient amplifying cells* (TAC) werden. Die epidermalen Stammzellen verleihen der Haut ihre hohe Regenerationsfähigkeit, in dem sie abgestoßene Zellen an der Oberfläche ersetzen und bei einer Verletzung das Epithel neu aufbauen können. Bei TAC handelt es sich im Gegenteil um determinierte Keratinozyten, die nur ein geringes Potential zur Proliferation haben. Der Differenzierungsprozess dieser Zellen wird durch das Ablösen der Zellen im *Stratum basale* und das Einwandern in die Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*) initiiert. Im *Stratum spinosum* durchlaufen die Keratinozyten eine Vielzahl morphologischer und biochemischer Veränderungen (Abbildung 1.6). Unter anderem kommt es zu einer Veränderung der Keratinsynthese [Sun et al., 1983]. Werden im *Stratum basale* noch vorwiegend die Keratine K5 und K14 synthetisiert, überwiegt im *Stratum spinosum* die Synthese der Keratine K1 und K10 [Roop et al., 1983][Schweizer and Winter, 1983]. Die Keratine der jeweiligen Schichten verbinden sich zu Intermediärfilamenten, die sich widerum zu Tonofibrillen bündeln und der Zelle eine hohe Stabilität verleihen. Die Anzahl der Tonofibrillen nimmt im *Stratum spinosum* und im *Stratum granulosum* im Vergleich zum *Stratum basale* deutlich zu. Im *Stratum granulosum* werden ausgelöst durch eine steigende Calcium-Konzentration innerhalb der Zelle u.a. Involucrin und Loricrin durch Transglutaminasen vernetzt, was den Verhornungsprozess der Zelle einleitet [Eckert et al., 2005]. Der Verlust von Zellorganellen wird dabei von einer Anreicherung von Keratohyalingranula begleitet. In der anschießenden Glanzschicht (*Stratum ludicum*) sind die Zellen bereits vollkommen verhornt, es sind keine Zellkerne und Organellen mehr erkennbar. Neben den Keratinfilamenten ist nur noch die fett- und proteinreiche Substanz Eleidin in den Zellen vorhanden. Eleidin wird aus dem Keratohyalin der Granula gebildet und letztendlich zu Keratin umgewandelt. Den Abschluss der Epidermis bildet die Hornschicht, das *Stratum corneum*, dessen vollständig verhornte und abgestorbene Zellen als Korneozyten bezeichnet werden. Umgeben sind die Koreozyten von freien Fettsäuren, Cholesterolen und Ceramiden. Insbesondere die heterogene Gruppe der Ceramide spielt eine wichtige Rolle bei der Wasserregulation der Haut und dem Zusammenhalt der Korneozyten [Coderch et al., 2003].

Neben Keratinozyten befinden sich pigmentbildende Melanozyten und die berührungssensitiven Merkel-Zellen in der Epidermis. Auch Haarfollikel und Drüsen werden zur Epidermis gezählt, obwohl sie bis in die Subkutis hineinreichen.

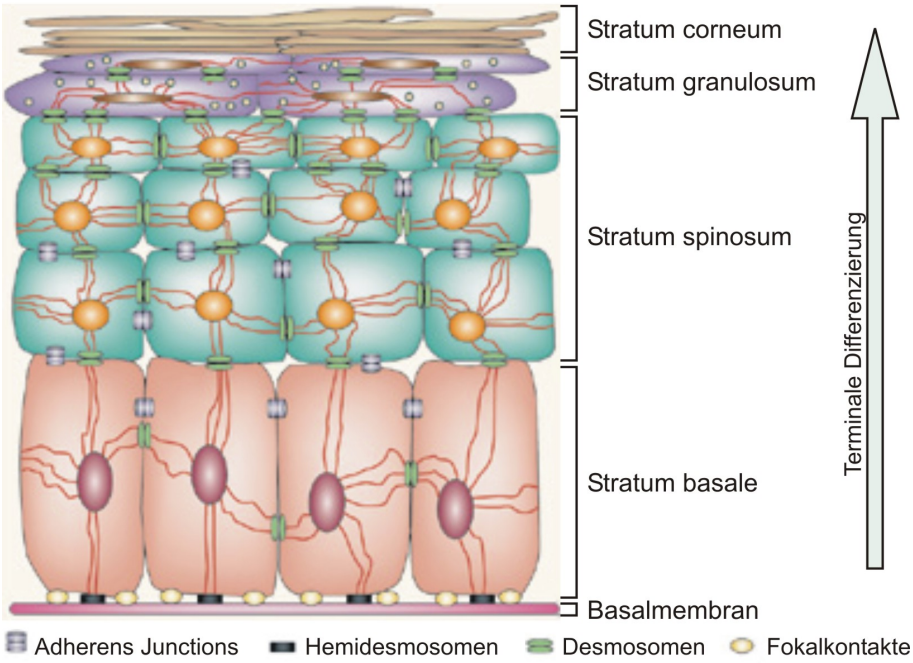

Abbildung 1.6: Aufbau der Epidermis

Modifiziert nach Fuchs und Raghhavan 2002

Den Übergang von Epidermis und Dermis bildet die Basalmembran, mit der die Keratinozyten über Hemidesmosomen verbunden sind [Green and Jones, 1996]. Die Basalmembran setzt sich unter anderem aus Proteoglykanen, Kollagen IV und Laminin zusammen. Neben der Funktion als Haftstruktur der Epidermis hat sie isolierende Eigenschaften [Yurchenco and Schittny, 1990].

1.5.1.2 Dermis und Subkutis

Die Aufgabe der Dermis ist die Verankerung und Nährstoffversorgung der darüber liegenden Epidermis. Histologisch kann sie in zwei Schichten unterteilt werden, die Papillarschicht (*Stratum papillare*) und die Netzschicht (*Stratum reticulare*). Das *Stratum papillare* ist hauptsächlich aus Fibroblasten aufgebaut und durch eine Vielzahl an Blut- und Lymphgefäßen charakterisiert. Die Fibroblasten tragen durch die Produktion von Elastinen und Kollagenen zur Elastizität der Haut bei und sind für die Synthese von Substanzen der

Extrazellulärmatrix zuständig. Zur Regulation physiologischer und pathophysiologischer Prozesse stehen sie in engem Kontakt mit Keratinozyten [Werner et al., 2007]. Das *Stratum reticulare* besteht wie auch das *Stratum papillare* aus einem Kollagennetz. Die Anordnung und Zusammensetzung der Kollagene ist jedoch unterschiedlich, so dass im *Stratum reticulare* deutlich dickere und unelastischere Kollagenfaserbündel vorzufinden sind [Ventre et al., 2009].
Unter der Dermis schließt sich die Subkutis an, die überwiegend aus Bindegewebe und Fettgewebe aufgebaut ist. Durch sie ziehen sich die Haut versorgenden Blut-und Nervenbahnen. Die Subkutis hat eine wichtige Funktion als Wärmeisolator, verteilt den von außen einwirkenden Druck auf das Gewebe und verbindet die Haut mit den darunterliegenden Knochen.

1.5.2 Die kutane Wundheilung

Bei einer Verletzung der Haut ist eine schnellst mögliche Widerherstellung der Hautintegrität von großer Bedeutung. Dabei wird die Wunde zunächst vorübergehend durch einen Fibrinthrombus geschlossen. Der Aufbau des ursprünglichen Gewebes wird durch proliferierende und migrierende Zelle des Wundrandes sowie durch den Aufbau einer neuen extrazellulären Matrix bewerkstelligt. Die Regulation dieser Prozesse erfolgt über das Zusammenspiel von Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren. Zur genauen Differenzierung der unterschiedlichen Wundheilungsphasen werden in der Regel vier zeitlich überlappende Phasen unterschieden: Hämostase, Inflammation, Granulation und Remodellierung [Falanga, 2005] (Abbildung 1.7).

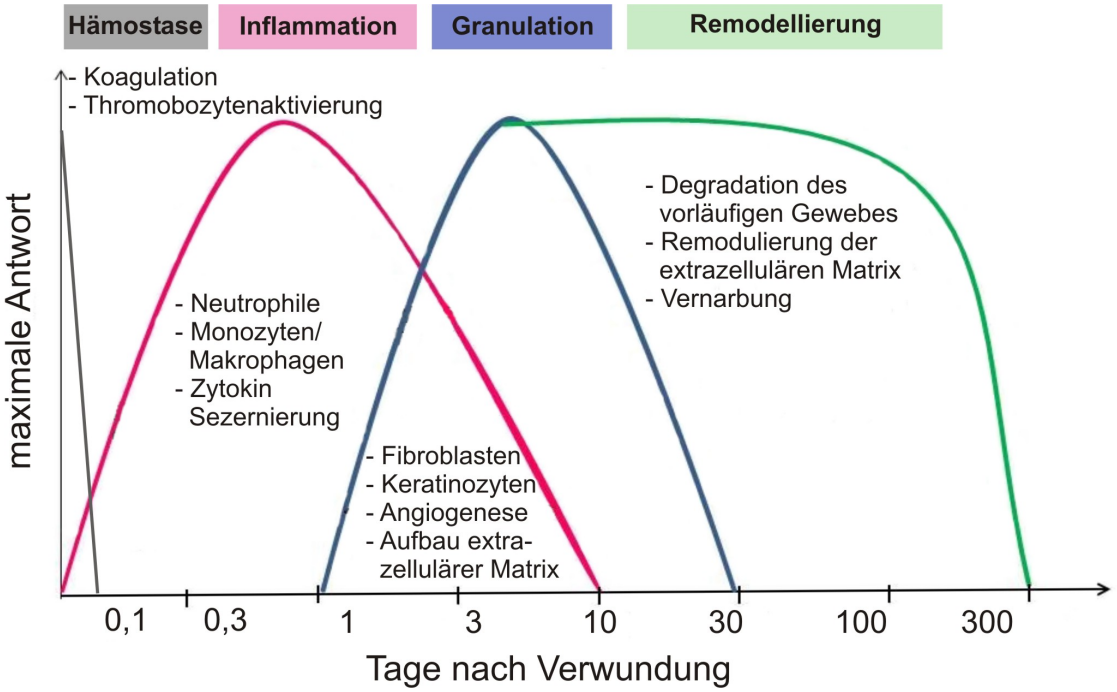

Abbildung 1.7: Phasen der kutanen Wundheilung

Modifiziert nach http://www.fastbleep.com/medical-notes/surgery/8/278

1.5.2.1 Die Hämostase

Im Anschluss an eine Verletzung, bei der es zur Beschädigung von Blutgefäßen gekommen ist, setzt die Hämostase ein. Verletzte Blutgefäße werden verengt, um den Blutstrom zu verlangsamen und das Anhaften von Thrombozyten am Gefäßendothel zu erleichtern und einen ersten Wundverschluss zu erzielen [Grinnell and Feld, 1981]. Es bildet sich ein Geflecht aus Thrombozyten, quervernetzten Fibrinfasern, Fibronektin, Vitronektin und Thrombospondin [Clark et al., 1982] [Martin, 1997]. Diese extrazelluläre Matrix wird im Verlauf der Wundheilung als Gerüst für immigrierende Immunzellen, Fibroblasten und Keratinozyten genutzt [Clark et al., 1982]. Durch Thrombozyten freigesetzte Zytokine und Wachstumsfaktoren sorgen unter anderem für eine Rekrutierung von Immunzellen [Singer and Clark, 1999].

1.5.2.2 Die inflammatorische Phase

Parallel zum Einsetzen der Hämostase kommt es in der Wunde zu akuten Entzündungsreaktionen. Neben der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten (Neutrophile) und

Monozyten, kommt es durch Proteolyseprodukte von Matrixkomponenten, beispielsweise Fibrin, zur Rekrutierung von Zellen des Immunsystems [Engelhardt et al., 1998] [Martin, 1997] [Falanga, 2005]. Neutrophile sind die ersten einwandernden Immunzellen und bereits wenige Minuten nach der Verletzung im Wundareal zu finden. Ihre Aufgabe ist es, Bakterien aus der Wunde zu eliminieren und pro-inflammatorische Zytokine wie TNF-α (*tumour necrosis factor*), IL-1α und IL-1β (Interleukin) zu sezernieren, die zur Aktivierung von Fibroblasten und Keratinozyten führen [Leibovich and Ross, 1975] [Hubner et al., 1996]. Neben Neutrophilen wandern zwei bis drei Tage nach der Verwundung Monozyten in das Wundgewebe ein, die zu Makrophagen differenzieren. Diese Makrophagen sezernieren wichtige Zytokine wie IL-1β, IL-6 und IL-10 und produzieren Fibronektin, welches die Migration von Fibroblasten und Endothelzellen in das Wundgewebe begünstigt [Brown et al., 1993] [Dipietro, 1995] [Martin, 1997]. Des Weiteren eliminieren sie Zelltrümmer, Pathogene, und verbliebene Leukozyten aus der Wunde [Singer and Clark, 1999].

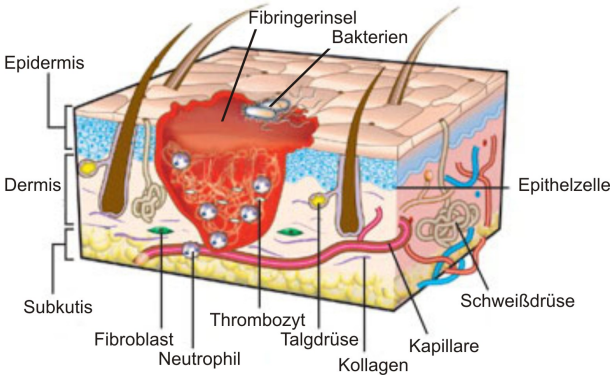

Abbildung 1.8: Inflammatorische Phase

Modifiziert nach Gurtner 2008

1.5.2.3 Die Granulationsphase

Wenige Tage nach der Verwundung beginnt der Aufbau des Granulationsgewebes. Das Granulationsgewebe ist ein im Rahmen der Wundheilung aufgebautes, vorrübergehendes Gewebe. Es dient dazu die heilende Wunde zu schließen und stellt die Grundlage für die Epithelialisierung der neu gebildeten Haut dar. Granulationsgewebe besteht aus Fibroblasten, der von Fibroblasten produzierten Extrazellulärmatrix und neu gebildeten Blutgefäßen [Singer and Clark, 1999] [Werner and Smola, 2001]. In dieser Phase spielen Makropha-

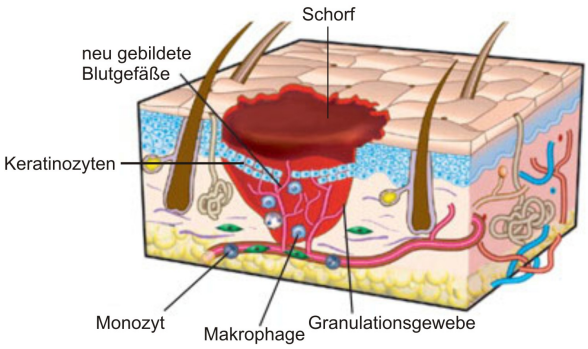

Abbildung 1.9: Granulationsphase

Modifiziert nach Gurtner 2008

gen eine entscheidende Rolle, da sie Wachstumsfaktoren wie TNF-α, PDGF (*platelet derived growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*) und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) sezernieren und dadurch den Matrixaufbau durch Fibroblasten, die Neovaskularisierung durch Endothelzellen und die Migration und Proliferation von Keratinozyten aus dem Wundrand vorantreiben [Martin, 1997]. Die Keratinozytenmigration und die damit einhergehende Reepithelialisierung wird ausgelöst durch die Auflösung bestehender Zell-Zell und Zell-Matrix-Kontakte [Goliger and Paul, 1995] [Ortonne et al., 1981]. Begünstigt wird die Reepithelialisierung duch die Expression von Wachstumsfaktoren wie KGF 1 und 2 (*keratinocyte growth factor*) und EGF (*epidermal growth factor*), pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 und IL-6 sowie durch Keratine und Chemokine [Werner and Grose, 2003] [Barrientos et al., 2008]. Die Neovaskularisierung des neu gebildeten Gewebes wird durch eine lokale Hypoxie begünstigt. Der Hypoxie-induzierte Transkriptionsfaktor HIF-1 induziert im Folgenden die Expression des proangiogenetisch wirkenden Faktors VEGF (*vascular endothelial growth factor*) [Lin et al., 2004]. Neben Migrations- und Proliferationsprozessen spielt auch die Kontraktion der Wunde eine wichtige Rolle bei deren Verschluss, indem die gegenüberliegenden Wundränder einander angenähert werden. Die einzigen in der Wunde befindlichen Zellen, die zur Kontraktion fähig sind, sind Myofibroblasten. Diese Aktin- und Myosin-haltigen Filamente gehen zu einem großen Teil aus Fibroblasten hervor, die u.a. durch das Zusammenspiel vonTGF-β, Fibronektin und dem Vorhandensein mechanischer Spannung zur Differenzierung angeregt werden [Desmoulière et al., 2005].

1.5.2.4 Die Remodellierungsphase

Die Remodellierung stellt die letzte Phase der Wundheilung dar. Sie beinhaltet den Umbau der in der Granulationsphase aufgebauten extrazellulären Matrix und kann viele Monate dauern [Levenson et al., 1965]. In dieser Phase wird die übermäßig hohe Kapillar- und Zelldichte aus der Granulationsphase apoptotisch abgebaut. Durch die Umbildung der extrazellulären Matrix wir die Kontraktilität und die mechanische Belastbarkeit der Haut erhöht [Desmouliere et al., 1995]. Eine Verletzung resultiert im adulten Organismus in der Regel in einer Vernarbung. Narbengewebe zeichnet sich durch die parallele Anordnung von Kollagenfasern

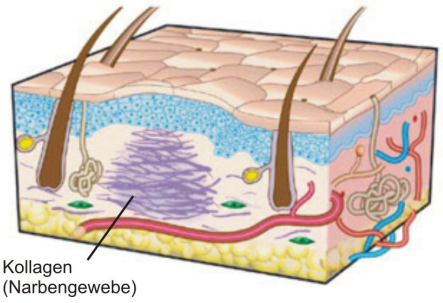

Abbildung 1.10: Remodellierungsphase

Modifiziert nach Gurtner 2008

des Typ I aus. Im Gegensatz dazu besteht intaktes Gewebe aus netzartig aufgebauten Kollagen III-Fasern. Neben der unterschiedlichen Kollagene und deren Anordnung ist Narbengewebe charakterisiert durch das Fehlen epidermaler Strukturen wie Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen [Martin, 1997] [Lovvorn et al., 1999] [Gurtner et al., 2008].

1.5.3 CSE und Clp36 in der kutanen Wundheilung

Um eine schnelle und problemlose Heilung einer Wunde zu gewährleisten, ist die Neovaskularisierung von großer Bedeutung. In einigen Studien, welche sich mit der Wundheilung bei Nagetieren auseinandersetzen, konnte durch die Behandlung mit H_2S-Donoren die Wundheilung in den Versuchstieren verbessert werden. Erste positive Effekte auf die Angiogenese von Endothelzellen wurden 2007 publiziert. In dieser Studie führte die Behandlung von Endothelzellen mit NaHS zu einer Verbesserung der Proliferation, der Adhäsion und der Migration. Vermittelt wurden diese Effekte durch eine Phosphorylierung der Kinase Akt [Cai et al., 2007]. Auch die Phosphorylierung der MAP-Kinasen Erk und p38, welche durch die Aktivierung von K_{ATP}-Kanälen unterstützt wird, führt in Endothelzellen zu einer beschleunigten Proliferation und Migration und darüber hinaus zu einer besseren Neovaskularisierung [Papapetropoulos et al., 2009]. In diabetischen Ratten, in deren Wunden eine Reduktion der Angiogeneserate und einer geringeren Menge von endogen gebildeten protektiven Proteinen zu beobachten ist, führte eine Behandlung mit H_2S zu einer Verbesserung der Wundheilung. Dabei kam es zu einer vermehrten Thrombin, einer Erhöhung der HO-1 Proteinspiegel und über eine gesteigerte VEGF-Expression zu einer Verbesserung der Angiogenese [Wang et al., 2015]. Ob die CSE neben der Angiogenese weitere Mechanismen der Wundheilung beeinflusst und ob das in der Arbeitsgruppe vorhandene CSE-Knockout-Modell einen Phänotyp im Verlauf der Wundheilung entwickelt, sollte in dieser Arbeit geklärt werden.

Neben der Angiogenese ist auch die Migration von Zellen aus dem Wundrand in das Wundareal entscheidend für eine schnelle Wundheilung. Die Expression von Palladin, einem Bindungspartner von Clp36, der eine entscheidende Rolle bei Migrationsvorgängen von Fibroblasten und Zellen der glatten Muskulatur einnimmt, ist in den Fibroblasten rund um das Wundareal hochreguliert. Eine Deletion von Palladin hat deutlich negative Auswirkungen auf die Migration von Zellen des Wundrandes [Chang et al., 2015]. Neben Palladin könnte somit auch sein Bindungspartner Clp36 Auswirkungen auf die kutane Wundheilung haben.

1.6 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte mit hierfür geeigneten Knockout-Modellen der Maus der Einfluss von CSE und Clp36 im Kontext unterschiedlicher Krankheiten untersucht werden. Krankheiten, bei deren Entstehung oder Verlauf CSE und Clp36 eine Rolle spielen könnten, sind die zerebrale Ischämie, die kutane Wundheilung und die Glomerulonephritis.
Als Vorversuche zu *in vivo* Experimenten in einem Modell der glomerulären Nephritis, sollten zunächst auf Zellkulturebene unter Verwendung kultivierter Wildtyp- und Knockout-Mesangiumzellen die Wirkung von CSE und Clp36 auf die Signaltransduktion entzündlicher Prozesse, sowie aufgrunglegende zelluläre Vorgänge wie Migration, Adhäsion und Proliferation untersucht werden. Anhand der resultierenden Daten sollte eine mögliche Beteiligung von CSE und Clp36 bei entzündlichen Erkrankungen der Niere herausgearbeitet werden.
Im Fall der zerebralen Ischämie sollte der Einfluss der beiden Proteine CSE und Clp36 direkt im Tiermodell (MCAO-Modell) untersucht werden. Insbesondere der Einfluss auf die Infarktgröße und die ischämische Reperfusion sollten dabei genauer betrachtet werden. In mehreren Publikationen wurde bereits der Einfluss von H_2S beim Schlaganfall beschrieben, weshalb in dieser Arbeit der Fokus auf der Rolle der CSE liegen sollte. Im Fall von Clp36 ist in Zusammenhang mit der zerebralen Ischmämie nur eine mögliche Beteiligung bei der Entstehung, insbesondere bei der Thrombozytenaktivierung bekannt. Ob Clp36 eine Rolle im Laufe eines künstlich induzierten Schlaganfalls spielt, ist noch vollkommen ungeklärt und sollte im Laufe dieser Arbeit untersucht werden.
Aufgrund der Vermutung, dass die Proteine CSE und Clp36 Einfluss auf entzündliche Prozesse haben, sollten beide Deletionslinien auch im Entzündungsmodell der kutanen Wundheilung untersucht werden. Auch mögliche Effekte einer Deletion von CSE und Clp36 auf die Zellmigration, könnte Auswirkung auf den von Migrationsvorgängen geprägten Wundheilungsprozess haben. Um den Prozess der Wundheilung auch auf Zellkulturebene untersuchen zu können, sollen in dieser Arbeit HaCaT-Zellen verwendet werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Applichem (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland) und Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.1: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Produkt	**Hersteller**
Bepanthen „Augen- und Nasensalbe“	Bayer, Leverkusen
Blotpapier „675“	Macherey-Nagel, Düren
Deckgläser (24mm x 60mm)	Roth, Karlsruhe
Einbettkassetten	Sanowa, Leimen
Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gel-*Beads* „ANTI-FLAG M2 Affinity Gel Freezer-Safe“	Sigma-Aldrich, München
Handschuhe „Peha-soft nitrile“	HARTMANN, Heidenheim
Kryoröhrchen „CRYO.S“	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mikrotiterplatten 96-Loch	Greiner Bio-One, Frickenhasuen
Nahtmaterial „Vicryl Plus 3-0“	Ethicon, Somerville (USA)
Nahtmaterial „SEIDE 7-0“ und „SEIDE 4-0“	Feuerstein SUPRAMA, Berlin
Nitrozellulose Membran „Amersham Protran“	GE Healthcare, München
Okklusionsfaden „6-0 medium MCAO suture L910“	Doccol, Sharon (USA)
Objektträger „SuperFrost Plus“	Menzel, Braunschweig
PAP pen	Dako, Jena
Pipetten „costar Stripette“ (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning, New York
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1 ml)	Sarsted, Nümbrecht
PVDF Membran „immobilon p“	Millipore GmbH, Schwalbach
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg

Röntgenfilme „Hyperfilm MP“	GE Healthcare; München
Sterilfilter	Millipore GmbH, Schwalbach
Zellschaber	Sarsted, Nümbrecht
Szintillationsmix „IRGA-SAFE PLUS“	PerkinElmer, Waltham (USA)
Szintillationsröhrchen „miniature 6 ml PE Vials“	PerkinElmer, Waltham (USA)
Zellkulturflaschen „CELLSTAR“ (75 cm^2, 175cm^2)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte „CELLSTAR“ (6-, 12-, 24-, 96-Loch)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen „CELLSTAR“ (6 cm, 10 cm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.3 Puffer und Lösungen

Alle im Folgenden beschriebenen Puffer und Stammlösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und wenn nötig autoklaviert.

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Stammlösungen

Bezeichnung	**Zusammensetzung**
Anilinblau-Orange G-Lösung	0,5 % Anilinblau 2 % Goldorange G 97,5 % Essigsäure kochen, abkühlen, filtern
Azokarmin-Lösung	0,1 % Azokarmin G 99,9 % DDW kochen, abkühlen, filtern
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris 50 mM EDTA 5,7 % Essigsäure (v/v) pH 8
TBE-Puffer (10x)	1 M Tris 830 mM Borsäure 10 mM EDTA
TBS-Puffer (10x)	0,1 M Tris/HCl pH 8,8 1,5 M NaCl
TBST-Puffer (1x)	10 % TBS (10x)

	89,9 % DDW 0,1 % Tween20 (v/v)
Homogenisierungspuffer (Totalprotein)	20 mM Tris/HCl pH 8 2 mM EDTA pH 8 137 mM NaCl 10 % Glycerin (v/v) 1 % Triton X-100
Trenngel-Puffer (*lower* Tris)	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
Sammelgel-Puffer (*upper* Tris)	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
Lämmli-Puffer (4x)	62,5 mM Tris/HCL pH 6,8 5 % SDS (w/v) 20 % Glycerin (v/v) 25 mM DTT 0,005 % Bromphenolblau (w/v)
SDS-Laufpuffer (10x)	1 % SDS (w/v) 0,25 M Tris/HCl 1,92 M Glycin pH 8
Towbin Transferpuffer (10x)	25 mM Tris 192 mM Glycin pH 8,3 20 % Isopropanol (v/v)
Lysispuffer (Genotypisierung)	100 mM Tris/HCl pH 8,5 5 mM EDTA 0,2 % SDS (w/v) 200 mM NaCl
PBS (Histologie)	139 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM $Na_2HPO_4xH_2O$ 1,5 mM KH_2PO_4
PBS-Tween (PBST)	0,2 % Tween (v/v) PBS
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5

	1 mM EDTA
basisches Phenol	22,5 ml saures Phenol 22,5 ml Chloroform 5 ml Tris/HCl pH 9,5
GSCN-Puffer	50 % Guanidiniumthiocyanat (w/v) 0,5 % Natriumlaurylsarcosyl (35 %) (w/v) 15 mM Natriumcitrat pH7 0,7 % β-Mercaptoethanol (v/v) auf 50 ml mit DEPC Wasser
DEPC Wasser	DDW 0,1 % DEPC (v/v)
Rehydrationspuffer IEF	8 M Harnstoff 2 % CHAPS (w/v) 0,002 % Bromphenolblau (w/v)
SDS-Äquilibrierungspuffer	50 mM Tris/HCl pH 8,8 6 M Harnstoff 30 % Glycerin (v/v) 2 % SDS (w/v) 0,002 % Bromphenolblau (w/v)
Plasmidpräparation Puffer 1	50 mM Glucose 50 mM Tris/HCl pH 8 10 mM EDTA 100 µg/ml RNAse
Plasmidpräparation Puffer 2	0,2 N NaOH 1 % SDS (w/v)
Plasmidpräparation Puffer 3	60 ml Kaliumacetat (5 M) 11,5 ml Essigsäure 28,5 ml Wasser

2.4 Kits

Alle verwendeten Kits sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Kits

Produkt	Hersteller
ABC Staining Kit Goat	Santa-Cruz, Santa Cruz (USA)
Amaxa Cell Line Nucleofactor Kit V	Lonza, Basel (Schweiz)
Cignal C/EBP Reporter Kit	Qiagen, Hilden
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Madison (USA)
DAB Substrat Kit	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München
Enhanced Chemoluminiscence Detection Kit	Amersham, Braunschweig
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher, Dreieich
Plasmid DNA Purification	Macherey-Nagel, Düren
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies,Waldbronn
ReadyPrep Protein Extraction Kit (Cytoplasmic/Nuclear)	Bio-Rad, Dreieich
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad (USA)

2.5 Enzyme

Tabelle 2.4: Enzyme

Produkt	Hersteller
BamHI	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
BglII	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
BstEII	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
HindIII	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
M-MuLV Reverse Transkriptase	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
NheI	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
XhoI	New England BioLabs, Frankfurt a.M.

2.6 Antikörper

2.6.1 Primärantikörper

In Tabelle 2.5 sind alle verwendeten Primärantikörper mit entsprechender Spezies, Verdünnung und der Bezugsquelle aufgelistet.

Tabelle 2.5: Primärantikörper

Spezifität	Spezies	Verdünnung	Hersteller
α-Tubulin	Kaninchen (pk)	1:2000 (WB)	Rockland, Limerick (USA)
β-Actin	Kaninchen (pk)	1:10000 (WB)	Rockland, Limerick (USA)
CBS	Kaninchen (pk)	1:1000 (WB)	Proteintech, Chicago (USA)
CBS	Ziege (pk)	1:150 (IHC)	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)
Clp36	Kaninchen (pk)	1:2000 (WB)	generiert von Eurogentech, Köln
CSE (CTH)	Kaninchen (pk)	1:2000 (WB)	Proteintech,Chicago (USA)
CSE (CTH)	Kaninchen (pk)	1:150 (IHC)	Proteintech,Chicago (USA)
Cytokeratin 10	Maus (mk)	1:500 (WB)	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)
FHL-1	Kaninchen (pk)	1:1000 (WB)	Sigma-Aldrich, München
FHL-3 (H-120)	Kaninchen (pk)	1:1000 (WB)	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)
Flag	Maus (mk)	1:500	Sigma-Aldrich, München
GAPDH	Kaninchen (pk)	1:1000 (WB)	Rockland, Limerick (USA)
GAPDH	Maus (mk)	1:500 (WB)	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)
Gelsolin	Kaninchen (pk)	1:1000 (WB)	Thermo Fisher, Dreieich
HO-1 (Hsp32)	Kaninchen (pk)	1:2000 (WB)	Enzo, New York (USA)
Involucrin	Maus (mk)	1:20000 (WB)	Abcam, Cambridge (UK)
3-MST	Kaninchen (pk)	1:1000 (WB)	Sigma-Aldrich, München
p21	Kaninchen (pk)	1:1000 (WB)	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)
Zyxin	Kaninchen (pk)	1:500 (WB)	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)

pk: polyklonal, mk: monoklonal, WB: Western Blot, IHC: Immunhistochemie

2.6.2 Zweitantikörper

In Tabelle 2.6 sind alle verwendeten Zweitantikörper mit entsprechender Spezies, Konjugat, Verdünnung und dem Hersteller aufgelistet.

Tabelle 2.6: Zweitantikörper

Spezifität	Spezies/ Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen IgG	Ziege/ HRP	1:10000 (WB)	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)
Maus IgG	Ziege/ HRP	1:10000 (WB)	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)

2.7 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind Tabelle 2.7 zu entnehmen.

Tabelle 2.7: Plasmide

Plasmid	Ursprung	Verwendungszweck	Referenz
pCMVhsCSE-B Flag(1)	pCMV Flag N3	Zwischenklonierung CSE-Überexpression	Bachmann, et al. 2004
pCMVhsCSE Flag(1)	pCMVhsCSE-B Flag	CSE-Überexpression	diese Arbeit
pCR4-TOPO		Zwischenklonierung K10-Promotor	Invitrogen
pGL3hsK10P244XH(1)	pGL3 Basic	Luciferase-Analysen K10-Promotor	Promega
pGL3 control		Luciferase-Analysen K10-Promotor	Promega
pRL-RT		Luciferase-Analysen K10-Promotor	Promega

2.8 Oligonukleotide

2.8.1 Oligonukleotide für Klonierungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide für Klonierungen sind Tabelle 2.8 zu entnehmen.

Tabelle 2.8: Oligonukleotide für Klonierungen

Klonierung	Bezeichnung	Sequenz 5′-3′
CSE Überexpression	hsCSE-NIf	GCATGCTAGCCACAGTGATGTTGTAATGG
CSE Überexpression	hsCSE-BHIr	CGATGGATCCGCTGTGACTTCCACTTGGAG
CSE Überexpression	hsCSE-BsIIr	CTTTTAGAGTCGTACGACTTCTC
CSE Überexpression	hsCSEv1rG	GGCTGTGACTTCCACTTGGAG
K10 Reporterstudien	K10XhoIf	GCATCTCGAGACCCATTTTCAATTTCAAC
K10 Reporterstudien	K10HdIIIr	GCATAAGCTTGGTGATGCTGTTTAGCCC
K10 Reporterstudien	hsK10-X05f	GCATCTCGAGTGTGCAACTATTG
K10 Reporterstudien	hsK10-X10f	GCATCTCGAGAACACATGTGCACAGTCTAG
K10 Reporterstudien	hsK10-X20f	GCATCTCGAGTTGGAAGAGTTGCAATCTGC
K10 Reporterstudien	hsK10-X05r	CTAGCATCAATAGTTGCCACAC
K10 Reporterstudien	Extfwk10	CTTTTAACTACTGCCCCATTTGCATGTGCT
K10 Reporterstudien	Intfwk10	AGTTGGAAGAGTTGCAATCTGCTGGGTAG
K10 Reporterstudien	Extrvk10	CTGCTAGAAATTCTTAGGGATGACACTC
K10 Reporterstudien	Intrvk10	ATGGTGATGCTGTTTAGCCCAGGGAGTGC
Flag-Nachweis	CSEFlagf1	CATGACTCATGCATCAGTTCT
Flag Nachweis	Flagr1	CTACAAATGTGGTATGGCTGA

2.8.2 Oligonukleotide für Genotypisierungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide für Genotypisierungen sind Tabelle 2.9 zu entnehmen.

Tabelle 2.9: Primer für Genotypisierungen

Linie	Bezeichnung	Sequenz 5′-3′
PDLIM1-flox	60539flp-KFB1	AGGCCAAAGACAGTTTTCTTTCTGCG
PDLIM1-flox	60540flp-KFB1	CCAGGACTTTCTATTGCTTCCGATTAGC
PDLIM1-cre	60531bct-KFB1	ATGAATGGGAACCAGGAAAACCACG
PDLIM1-cre	60532bct-KFB1	TCCAGGACTTTCTATTGCTTCCGATTAGC
CSE-flox	63131flp-KFB2	ATCCATGTTTGTATAACCCAGGGCTTACC
CSE-flox	63132flp-KFB2	AGACACAATCACCTTCCAGAACCAAGTGTAC
CSE-cre	63127cre-KFB2	AGTTAGCGTACTCTACACCACGGAACCTCC

CSE-cre	63128cre-KFB2	CAGTTTGAACACTTGAGACCTTAGTTCAGGC

2.8.3 Taqman-Sonden

Alle verwendeten Sonden wurden von Applied Biosystems (Foster City, US) bezogen.

Tabelle 2.10: Taqman-Sonden

Gen	Markierung	Zugangsnummer
CBS (human)	FAM	Hs00163925_m2
CBS (murin)	FAM	Mm00460654_m1
CSE (human)	FAM	Hs00542276_m1
CSE (murin)	FAM	Mm00461247_m1
GAPDH (murin)	VIC	Mm99999915_g1
Involucrin (human)	FAM	Hs00846307_s1
K10 (human)	FAM	Hs01043114_g1
3-MST (murin)	FAM	Mm00460389_m1
RPLP0 (human)	VIC	Hs99999902_m1
p21Waf1/Cip1 (human)	FAM	Hs00355782_m1

2.9 Mausstämme

Alle in dieser Arbeit analysierten Tiere haben einen C57BL/6 Hintergrund. Neben Wildtyp-Mäusen dieses Stamms wurden zwei von der Firma GenOway (Lyon, Frankreich) generierte Knockout-Linien verwendet. Untersucht wurden die Linien PDLIM1-KO und CSE-KO.

2.10 Zelllinien

In Tabelle 2.11 sind alle verwendeten Zelllinien vermerkt.

Tabelle 2.11: Zelllinien

Zelllinie	histologischer Ursprung	Quelle
mMC WT	murine Mesangiumzellen	AG Beck
mMC PDLIM1-KO	murine Mesangiumzellen	AG Beck
mMC CSE-KO	murine Mesangiumzellen	diese Arbeit
HaCaT	humane Epithelzellen	[Boukamp, 1988]

2.11 Zellkulturmedien

2.11.1 Medien für die Kultur von Säugerzellen

In Tabelle 2.12 sind alle Medien und Substanzen aufgelistet, die für die Kultur von Säugerzellen genutzt wurden.

Tabelle 2.12: Medien für die Kultur von Säugerzellen

Produkt	Hersteller
BSA	Applichem, Darmstadt
$CaCl_2$-Solution	PromoCell, Heidelberg
DMEM + Glutamax	Invitrogen, Darmstadt
FCS	Biochrom, Berlin
HEPES-Puffer 1 M	Sigma-Aldrich, München
Insulin-Transferrin-Selenium (ITS)	Roche, Mannheim
Opti-MEM	Invitrogen, Darmstadt
PBS	Invitrogen, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin-Mix	Invitrogen, Darmstadt
RPMI-1640 + Glutamax	Invitrogen, Darmstadt
Trypsin-EDTA-Mix (0,05 %)	Invitrogen, Darmstadt

Die Medien wurden Zelllinien spezifisch wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 2.13: Zusammensetzung der Säugerzell-Medien

Medium	**Zusammensetzung**
Vollmedium Maus Mesangiumzellen	RPMI-Medium 10 % FCS (v/v) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10 mM HEPES
Hungermedium Maus Mesangiumzellen	DMEM-Medium 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10 mM HEPES 100 µg/ml BSA
Vollmedium HaCaT	DMEM-Medium 10 % FCS (v/v) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Einfriermedium HaCaT (2x)	20 % DMSO (v/v) 40 % DMEM ohne Zusätze (v/v) 40 % FCS (v/v)

2.11.2 Kultur von Bakterienzellen

Zu Klonierungszwecken wurde der *E.coli*-Stamm $DH_5\alpha$ verwendet. Kultiviert wurden die Bakterien in LB-Medium, dem je nach Resistenz des verwendeten Plasmids das entsprechende Antibiotikum zugesetzt wurde.

Tabelle 2.14: Zusammensetzung der Säugerzell-Medien

Medium	**Zusammensetzung**
LB-Medium	10 g/l Pepton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl ad. H_2O bidest.

Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium 1,5 % Agar (w/v) zugegeben.

Zur Selektion wurden nach dem Autoklavieren Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (30 µg/ml) zugesetzt.

2.12 Geräte

Die im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2.15 aufgelistet.

Tabelle 2.15: Geräte

Gerät	Hersteller
Amaxa Elektroporator „Nucleofaktor II“	Lonza, Basel (Schweiz)
Dispergiergerät „Ultra Turrax T10 basic“	IKA, Staufen
Durchlichtmikroskop „Axiovert25“	Zeiss, Jena
Elektrophoresekammer „Hoefer SE400“	Hoefer, Holliston (USA)
Elektrophoresekammer „Mini Protean“	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer „Wide Mini-Sub Cell“	Bio-Rad, München
Entwicklermaschine „AGFA CP1000“	Agfa, Mortsel (BEL)
Entwässerungsmaschine	Leica Microsystems, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop „BZ-8000K“	Kyence, Neu-Isenburg
Hirn-Matrix „RBM 2000C“	ASI Instruments, Warren (USA)
Inkubationsschrank „BBD6220“	Thermo Fisher, Dreieich
Inkubationsschrank „IP20 Function Line“	Heraeus, Hanau
Inkubationsschüttler „Unitron“	Inforns, Bottmingen (CH)
Isoelektrische-Fokussierungskammer „IPGPhor IEF-Unit“	Pharmacia Biotech, Freiburg
Isoflurane Vapor „19.3“	BelaMed, Wuppertal
Kippschüttler „Mini Rocker-Shaker MR-1“	Peqlab, Erlangen
Konfokalmikroskop „LSM510“	Zeiss, Jena
Luminometer „GLOMAX“	Promega, Fitchburg (USA)
Magnetheizrührer „PeQMix Plus“	Peqlab, Erlangen
MCAO-Clip „Micro Serrefines“	FST, Foster City (USA)
Mikrotom „Leica RM2235“	Leica, Nussbach
Mikroplatten-Leser „Sunrise“	Tecan Trading, Männedorf (CH)
Mikroplatten-Leser „Spectramax M5“	Molecular Devices, Sunnyvale (USA)
Nadelhalter „Aesculap BMO 12R“	B-Braun, Melsungen

Operationsmikroskop „MC120 HD“	Leica, Wetzlar
Pinzette „Delicate Suture Tying Forceps“	FST, Foster City (USA)
Real-Time PCR Gerät „7500 Fast“	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Schere „Vannas Spring Scissors - 3mm“	FST, Foster City (USA)
Schüttler „MS2 Minishaker“	IKA, Staufen
Semidry Blotter „Trans-Blot Turbo“	Bio-Rad, München
Spektrophotometer „Nanodrop“	Thermo Fisher, Dreieich
Sterilbank „HERAsafe KS18“	Thermo Fisher, Dreieich
Stromgeber „Power Pac 3000“	Bio-Rad, München
Szintillationszähler „TRI-CARB 3100TR“	PerkinElmer, Waltham (USA)
Thermocycler „GeneAmp 2400“	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Thermocycler „T3000“	Biometra, Göttingen
Thermomixer „5436“	Eppendorf, Hamburg
Ultraschall Sonifizierer „Sonifier 450“	Branson, Carouge (CH)
UV-Flächenstrahler „N90M“	Konrad Benda, Wiesloch
UV-Transilluminator „Gel Doc 1000“	Bio-Rad, München
Zentrifuge „Megafuge 1.0“	Heraeus, Hanau
Zentrifuge „Biofuge pico“	Heraeus, Hanau
Zentrifuge „Biofuge fresco“	Heraeus, Hanau

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung von RNA

3.1.1.1 Isolierung von RNA aus Gewebeproben

Die Isolierung von RNA aus murinen Wunden fand durch die Behandlung eines GSCN-Puffers und einer späteren Phenol-Chloroform-Extraktion statt. Dazu wurden zunächst die tiefgefrorenen Proben mit 500 µl kaltem GSCN-Puffer versetzt und mit dem Ultraturrax homogenisiert. Im Folgenden wurden in einem Volumen von 1/1 saures Phenol, 1/10 NaOAc (pH 4) und 3/10 Chloroform hinzugegeben und 1 min gevortext. Nach einem 30-minütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm und 4 °C wurde die RNA-haltige, obere Phase der Proben abgenommen und in ein Gefäß überführt, in dem Ethanol (Volumen 2,5/1) vorgelegt wurde. Die Probe wurde gründlich durchmischt und 60 min bei -20 °C präzipitiert. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C. Das Pellet wurde in 400 µl DEPC-DDW aufgenommen und mit dem gleichen Volumen basischem Phenol versetzt. Nach erneutem gründlichen vortexen folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (13.000 rpm, 4 °C, 10 min). Die wässrige Phase wurde in ein Gefäß mit 2,5/1 Ethanol und 1/10 3 M NaOAC (pH 5,2) überführt. Nach einer 60-minütigen Präzipitation bei -20 °C und einer 15-minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm, 4 °C wurde das Pellet je nach Größe in 100-200 µl DEPC-Wasser aufgenommen und 5 min bei 65 °C gelöst.

3.1.1.2 Isolierung von RNA aus Zellen

Die Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen erfolgte durch Trizol-Chloroform-Extraktion. Für die RNA-Extraktion einer 60 mm Platte wurden 500 µl Trizol auf die Platte gegeben und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Platte gelöst. 100 µl Chloroform wurde zu dem Zell-Trizol-Gemisch hinzugegeben und der Ansatz für eine Minute gevortext. Im Anschluss erfolgte ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm. Während der Zentrifugation wurde in neue autoklavierte Reaktionsgefäße 250 µl Isopropanol vorgelegt, in die im Anschluss an die Zentrifugation die obere, wässrige Phase überführt wurde. Der Ansatz wurde gut gevortext und erneut für 15 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde vorsichtig abgesaugt

und das Pellet zwei Mal mit 250 µl 70 % Ethanol (in DEPC-DDW) gewaschen. Das Pellet wurde im Anschluss bei 37 °C getrocknet. Entsprechend der Größe wurde das Pellet in einer angemessenen Menge DEPC-DDW resuspendiert. Zur besseren Löslichkeit wurde das Reaktionsgefäß 5 min bei 65 °C erwärmt.

3.1.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen von DNA- und RNA-Proben erfolgte in einem NanoDrop-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Das Verhältnis der gemessenen Absorption bei 260/280 nm wurde zur Reinheitskontrolle herangezogen. Ein Wert zwischen 1,6 und 2,0 indiziert einen hohen Reinheitswert der Probe.

3.1.3 Reverse Transkription

Das Umschreiben der isolierten mRNA in eine komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mit der RNA-abhängigen DNA-Polymerase MuLV. Dazu wurde zunächst 1 µg RNA mit DEPC-DDW auf ein Volumen von 7 µl gebracht. Die genaue Zusammensetzung ist Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Tabelle 3.1: Pipettierschema reverse Transkription

Substanz	Volumen
RNA	7 µl
Oligo (dT) (0,5 µg/µl)	1 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	4 µl
RT-Puffer	2 µl
RNasin	0,5 µl
dNTPs (2,5 mM)	4 µl
MuLV	1 µl
DDW	0,5 µl

Die Reaktion erfolgte für 45 min bei 42 °C und abschließend 5 min bei 95 °C.
Die synthetisierte cDNA wurde anschließend 1:6 mit DDW verdünnt und bis zur weiteren Nutzung bei 4 °C gelagert.

3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine *In-vitro*-Methode zur exponentiellen Amplifikation einer gewünschten Nukleinsäure-Sequenz [Mullis et al., 1992]. Diese Sequenz wird durch die Wahl von Oligonukleotiden (*Primer*) bestimmt, welche den DNA-Abschnitt gegenläufig flankieren. Die *Primer* dienen bei der Replikation als Startpunkt. Eine PCR besteht aus drei Schritten, der Denaturierung der doppelsträngigen DNA, der Hybridisierung der Oligodesoxyribonukleotide an die zuvor getrennten Einzelstränge und der Elongation der Oligodesoxyribonukleotide in 5'-3'-Richtung. Diese drei Schritte laufen zyklisch ab und werden in der Regel etwa 30 Mal wiederholt. Die neu synthetisierten DNA-Moleküle dienen in den folgenden Runden als Vorlage, was zu einer exponentiellen Vervielfältigung führt. Die Temperatur und Dauer der jeweiligen Phase steht in Abhängigkeit zu den eingesetzten Oligodesoxyribonukleotiden und der Polymerase. Die Temperatur der Denaturierungs- und Elongationsschritte ist von der eingesetzten Polymerase abhängig, wobei die Dauer der Elongation abhängig von der gewünschten Fragmentgröße ist. Die Geschwindigkeit einer Taq-Polymerase liegt bei 0,5-1 min/ kb, die einer Pfu-Polymerase bei 2 min/kb. Die Hybridisierungstemperatur muss auf die eingesetzten Oligodesoxyribonukleotide abgestimmt werden und kann mit Hilfe der folgenden Formel berechnet werden:

Tm = 4 x (Anzahl G bzw. C) + 2 x (Anzahl A bzw. T)

Für Klonierungen wurde die Pfu-DNA-Polymerase von Promega verwendet (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Pipettierschema Pfu-Polymerase

Substanz	Volumen
DNA	1 µl
Pfu-Puffer (10x)	2,5 µl
Pfu-Polymerase	1 µl
Primer 1 (10 pmol)	1 µl
Primer 2 (10 pmol)	1 µl
dNTPs (2,5 mM)	2 µl
DDW	16,5 µl

Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen (Tabelle 3.3):

Tabelle 3.3: PCR-Bedingungen Pfu-Polymerase

Temperatur	Zeit	Reaktion	
94 °C	2 min	initiale Denaturierung	
94 °C	30 sec	Denaturierung	x34
55 °C	45 sec	*Primer*-Hybridisierung	
72 °C	45 sec	Elongation	
72 °C	5 min	finale Elongation	

Wurde mit genomischer DNA gearbeitet, wurden dem Mix 0,5 µl DMSO beigesetzt. PCR-Fragmente welche für eine TOPO-Klonierung eingesetzt wurden, wurden durch den Einsatz einer Taq-Polymerase generiert (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Pipettierschema Taq-Polymerase

Substanz	Volumen
DNA	1 µl
Taq-Puffer (10x)	2,5 µl
Taq-Polymerase	1 µl
Primer 1 (10 pmol)	1 µl
Primer 2 (10 pmol)	1 µl
dNTPs (2,5 mM)	2 µl
DDW	16,5 µl

Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen (Tabelle 3.5):

Tabelle 3.5: PCR-Bedingungen Taq-Polymerase

Temperatur	Zeit	Reaktion	
95 °C	3 min	initiale Denaturierung	
95 °C	45 sec	Denaturierung	x30
65 °C	45 sec	*Primer*-Hybridisierung	
72 °C	45 sec	Elongation	
72 °C	5 min	finale Elongation	

3.1.5 Nested-PCR

Mit Hilfe der *Nested*-PCR kann die Spezifität einer gewöhnlichen PCR erhöht werden. Können Oligonukleotide beispielsweise nicht optimal oder an mehreren Stellen der DNA binden, entstehen keine oder unspezifische PCR-Produkte. Um dies zu verhindern, werden zunächst Oligonukleotide gewählt, die außerhalb des gewünschten Bereichs liegen. Mit diesen *Primern* wird zunächst eine PCR mit 25 Zyklen durchgeführt. 3 µl des Amplifikationsprodukts werden für eine zweite PCR mit Oligonukleotiden verwendet, die an dem eigentlich zu amplifizierenden DNA-Bereich binden.
Die in dieser Arbeit durchgeführten *Nested*-PCRs wurden mit einer Taq-Polymerase durchgeführt, da die Produkte später für eine TOPO-Klonierung eingesetzt wurden (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Pipettierschema *Nested*-PCR

Substanz	Volumen
DNA	2 µl
Taq-Puffer (10x)	5 µl
Taq-Polymerase	1 µl
Primer 1 (10 pmol)	2 µl
Primer 2 (10 pmol)	2 µl
dNTPs (2,5 mM)	8 µl
DDW	32 µl

Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen (Tabelle 3.7):

Tabelle 3.7: PCR-Bedingungen *Nested*-PCR

Temperatur	Zeit	Reaktion	
94 °C	2 min	initiale Denaturierung	
94 °C	25 sec	Denaturierung	x25
67 °C	5 min	Hybridisierung und Elongation	
67 °C	7 min	finale Elongation	

3.1.6 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion ist eine Weiterentwicklung einer gewöhnlichen PCR, die jedoch eine Quantifizierung der generierten Produkte erlaubt [Heid et al., 1996]. Die Quantifizierung wird durch die Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes ermöglicht, dessen Intensität proportional mit der Menge des PCR-Produkts zunimmt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt dabei in Echtzeit und kann am Ende für die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR herangezogen werden. Für diese Art der PCR werden spezielle Sonden benötigt, welche an die zu amplifizierende DNA binden und am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (FAM oder VIC) und am 3'-Ende mit einem Quencher (TAMRA) versehen sind. Durch die räumliche Nähe von Reporter und Quencher wird die Fluoreszenz des Reporters zunächst durch den Quencher unterdrückt. In der Elongationsphase der PCR wird die Sonde jedoch von der Taq-Polymerase verdrängt und es kommt zu einer Änderung in der Sekundärstruktur was die Aktivierung der 5´-3´-Exonuklease der Taq-Polymerase zur Folge hat. Diese schneidet im Folgenden die Sonde, wodurch Reporter und Quencher nicht mehr in unmittelbarer Nähe sind und die vom Reporter ausgehende Fluoreszenz nicht mehr gequencht werden kann und somit messbar wird. Eine Normalisierung der Expression erfolgte bei muriner cDNA gegen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und bei humaner cDNA gegen *Large Ribosomal Protein* (RPLP0). Eine spezifische Sonde für diese Gene wurde in den gleichen Ansatz pipettiert wie die Sonde, welche gegen das zu analysierende Gen gerichtet ist. Um beide Signale unterscheiden zu können, waren die Referenzsonden (GAPDH und RPLP0) mit dem Reporterfarbstoff VIC und die jeweils andere Sonde mit FAM markiert. Die qPCR-Ansätze wurden wie folgt pipettiert (Tabelle 3.8):

Tabelle 3.8: Pipettierschema qPCR

Substanz	Volumen
cDNA (1:6 Verdünnung)	3 µl
Referenzsonde	0,5 µl
Sonde	0,5 µl
qPCR Master Mix	5 µl
DDW	1 µl

Für die qPCRs wurden zwei unterschiedliche Puffer verwendet, der TaqMan® Fast

Advanced Master Mix von Thermo Fisher (Tabelle 3.9) und der qPCRBIO Probe Mix Lo-ROX von NIPPON Genetics (Tabelle 3.10).

Tabelle 3.9: PCR-Bedingungen Fast Advanced Master Mix

Temperatur	Zeit	Reaktion	
50 °C	2 min	UNG-Inkubation	
95 °C	20 sec	Polymerase-Aktivierung	
95 °C	3 sec	Denaturierung	x40
60 °C	30 sec	Elongation	

Tabelle 3.10: PCR-Bedingungen qPCRBIO Probe Mix Lo-ROX

Temperatur	Zeit	Reaktion	
50 °C	2 min	UNG-Inkubation	
95 °C	2 min	Polymerase-Aktivierung	
95 °C	5 sec	Denaturierung	x40
62 °C	30 sec	Elongation	

Die Messung der Amplifikation erfolgte durch die Sequence Detector Software.

3.1.7 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht eine Größenauftrennung von DNA-Fragmenten zur anschließenden Identifizierung und Extraktion. Die Auftrennung der zu analysierenden Probe erfolgte dabei durch größenabhängiges Passieren der Gelmatrix. Ein angelegtes elektrisches Feld sorgte dafür, dass die DNA aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrades in Richtung der Anode läuft. Das Gel wurde aus einem Prozent Agarose (w/v), gelöst in TAE-Puffer (für Klonierungen) bzw. TBE (für Genotypisierungen) hergestellt. Die Agarose wurde in der Mikrowelle so lange erhitzt bis sie vollständig gelöst war. Anschließend wurde im Verhältnis von 1:10.000 GelRed hinzugegeben. Bei GelRed handelt es sich um eine Substanz, die strukturell Ethidiumbromid sehr ähnlich ist und genau wie dieses in Nukleinsäuren interkaliert. GelRed ist jedoch als weniger gesundheitsschädlich einzustufen, da es im Gegensatz zu Ethidiumbromid Zellmembranen impermeabel ist. Die noch flüssige Agarose wurde dann in ein eingespanntes Gelwanne

mit einem Kamm gewünschter Taschenzahl gegossen. Nach dem Aushärten wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt, mit TAE-Puffer bzw. TBE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. In die vorgeformten Taschen wurden die mit Ladepuffer versehenen Proben aufgetragen. Zum Größenvergleich wurde ein Marker (100 bp, 100 bp plus, 1 kb) der Firma Thermo Fischer neben den Proben aufgetragen. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 100 Volt bis die gewünschte Auftrennung erreicht war. Die Detektion der Banden fand in einem Geldokumentationsgerät statt.

3.1.8 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung elektrophoretisch aufgetrennter DNA aus einem Agarosegel wurden die Banden in einem UV-Flächenstrahler sichtbar gemacht. Die gewünschten Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und das Gewicht bestimmt. Im Anschluss wurde die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Gel extrahiert. Die DNA wurde mit 50 µl des mitgelieferten Puffers eluiert (2-mal 25 µl).

3.1.9 Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau ist eine molekularbiologische Methode zum Schneiden spezifischer DNA-Sequenzen. Diese Sequenz besteht in der Regel aus 6 Basenpaaren und wird von einem Enzym, der Restriktionsendonuklease erkannt und durch Hydrolyse der Phosphodiester-Bindungen gespalten. Die Restriktionen wurden je nach Enzym mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer angesetzt. Bei einigen Enzymen musste dem Mix 1/10 BSA zugesetzt werden. Die gewünschten Plasmide oder PCR-Fragmente wurden vor der Restriktion aus einem Agarosegel aufgereinigt und in 50 µl Puffer eluiert (Tabelle 3.11).

Tabelle 3.11: Pipettierschema Restriktionsverdau

Substanz	Volumen
DNA	48 µl
Enzym-Puffer	8 µl
Enzym	2 µl
DDW	22 µl

3.1.10 Fällung von RNA und DNA

Zur Reinigung von RNA und DNA wurde 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 5,2) und 2,5 Volumen EtOH (100 %) zu den Proben gegeben. Der Ansatz wurde gut durchmischt und mindestens 30 min bei -20 °C gefällt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 15 min bei 4 °C um die RNA/DNA zu pelletieren.

3.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei einer Ligation wird eine mit Restriktionsenzymen verdaute Plasmid-DNA mit einem identisch verdauten DNA-Fragment mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase verbunden. Die Ligationen wurden in einem Volumen von 10 µl angesetzt (Tabelle 3.12):

Tabelle 3.12: Pipettierschema Ligation

Substanz	Volumen
DNA-Fragment	7,5 µl
Vektor	0,5 µl
T4-Ligase-Puffer (10x)	1 µl
T4-Ligase	1µl

Als Negativkontrolle diente ein Ligationsansatz, bei dem anstelle des DNA-Fragments Wasser verwendet wurde. Die Reaktion erfolgte 3 Stunden bei Raumtemperatur.

3.1.12 Transformation bakterieller Zellen

Das Einbringen eines zuvor generierten Plasmids in Bakterien erfolgte durch Hitzeschock. Dazu wurden 100 µl chemisch kompetenter Zellen mit dem Ligationsansatz vermischt. Der Ansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert, gemischt und anschließend 2 min auf 42 °C erhitzt. Der plötzliche Temperaturanstieg führt zur Porenbildung in der bakteriellen Zellmembran, was ein Eindringen des Plasmids in die Zelle ermöglicht. Es folgte eine weitere 10-minütige Inkubation auf Eis bevor 1 ml LB-Medium zu den Zellen gegeben wurde und diese für 40 min bei 37 °C leicht geschüttelt wurden. Die transformierten Zellen wurden auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C wachsen lassen.

3.1.13 TOPO-Klonierung

Ein TOPO-Plasmid ist ein linearisiertes Plasmid, an das eine Topoisomerase aus dem Vacciniavirus gekoppelt ist. In dieses Plasmid können PCR-Fragmente ohne Restriktionsverdau und Ligation eingebracht werden. Die Isomerase ligiert das PCR-Produkt mit dem linearisierten Plasmid. Die Ligation erfolgt dabei über ein Adensoin, das während der PCR mit einer Taq-Polymerase an das Fragment angehängt wird. Diese Sequenz hybridisiert an Thymidin-Überhänge am Vektor.
Für die Reaktion wurden 4 µl des ungereinigten PCR-Produktes mit 1 µl *Salt Solution* und 1 µl TOPO-Vektor gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte eine Transformation in TOP10-Zellen.

3.1.14 Klonierung des Plasmids pMCVhs-CSE-Flag

Bei dieser Klonierung wurde zunächst ein Teilfragment mit den Oligonukleotiden „hsCSE-Nif“und „hsCSE-BHIr“aus HaCaT cDNA amplifiziert, das Produkt gefällt und aus einem Agarosegel gereinigt. Sowohl das PCR-Produkt als auch der Vektor pCMV Flag N3 wurden erst mit NheI und nach einer erneuten Ethanol-Fällung mit BamHI verdaut. Der Vektor und das PCR-Produkt wurden mit Hilfe des PCR-Aufreinigungskit der Firma Macherey-Nagel gereinigt und anschließend ligiert. Die Transformation in DH5α-Zellen fand durch Hitzeschock statt. Die ausplattierten Zellen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und vereinzelte Klone in 10 µl Wasser resuspendiert. Die Hälfte des Wassers wurde für einen Testverdau genutzt. Dazu wurden zusätzlich zu den 5 µl des Klons 0,5 µl BstEII, 1 µl Puffer 3, 1 µl BSA und 2,5 µl Wasser hinzugegeben und 60 min bei 60 °C inkubiert. Flüsigkulturen von Klonen, bei denen das gewünschte Plasmid durch eine PCR bestätigt werden konnte wurden angesetzt, die Plasmide isoliert und sequenziert.
Die Amplifikation des zweiten Fragments erfolgte mit den Oligonukleotiden „hsCSEv1rG“und „ hsCSE-BsIIr“. Die amplifizierte DNA wurde gefällt und mit Hilfe eines Agarosegels gereinigt. Dieses Fragment und das aus der ersten Klonierung isolierte Plasmid pCMVhs-CSE-B Flag wurden mit dem Restriktionsenzym NheI verdaut, gefällt und mit BstEII geschnitten. Es folgte eine Fällung und eine Aufreinigung über ein Agarosegel, bevor es zur Ligation des zweiten Fragments mit dem Vektor pCMVhsCSE-B-Flag kam. Das ligierte Plasmid wurden DH5α-Zellen transformiert und auf LB-Agarplatten ausplattiert. Flüssigkulturen von Einzelklonen wurden angesetzt und die Plasmide einem Kontrollverdau mit BamHI unterzogen. Eine Sequenzierung verifizierte die Klonierung

des Vektors pCMVhs-CSE-Flag.

3.1.15 Klonierung des Plasmids pGL3hsK10P244XH

Die Klonierung des 250 bp langen K10-Promotorfragmentes erfolgte mit den Oligonukleotiden „K10XhoIf“ und „K10HdIIIr“ und einer HEK293-cDNA als Matrize. Das PCR-Produkt wurde gefällt und anschließend über ein Agarosegel gereinigt. Sowohl der Vektor pGL3 Basic als auch das PCR-Produkt wurden mit den Restriktionsenzymen XhoI und HindIII verdaut. Im Anschluss erfolgte eine Fällung und eine Gelaufreinigung. Die gereinigten Produkte wurden ligiert, in DH5α-Zellen transformiert und auf LB-Platten ausgebracht. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Flüssigkulturen wurden angesetzt, die Plasmide isoliert und einem Testverdau mit XhoI und HindIII unterzogen. Eine Sequenzierung mit dem Oligonukleotid „pGL3 sense“ verifizierte die Klonierung.

3.1.16 Klonierung des Plasmids pGL3hsK10P550XH

Für die Klonierung des Plasmids pGL3hsK10P550XH wurde das 500 bp große PCR-Fragments des K10-Promotors (Oligonukleotide: „hsK10-X05f“ und „K10HdIIIr“) zunächst in einen TOPO-Vektor kloniert und in TOP10-Zellen transformiert. Diese wurden auf einer LB-Platte mit Ampicillin ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es wurden Flüssigkulturen hergestellt, die Plasmide isoliert und zur Kontrolle mit den Enzymen HindIII und XhoI verdaut. Eine Sequenzierung mit den Oligonukleotiden M13 und M13revverifizierte die Klonierung. Das durch HindIII und XhoI aus dem TOPO-Vektor geschnittene Fragment wurde über ein Agarosegel gereinigt und anschließend für eine Ligation mit dem Vektor pGL3 Basic verwendet. Die Transformation erfolgte in DH5α-Zellen. Es folgte eine Selektion auf LB-Agarplatten mit Ampicillin über Nacht bei 37 °C. Flüssigkulturen wurden angeimpft, Plasmide isoliert und zur Kontrolle mit den Enzymen XhoI und HindIII geschnitten. Eine Sequenzierung mit dem Oligonukleotid „pGl3 sense“ verifizierte die Klonierung.

3.1.17 Klonierung des Plasmids pGL3hsK10P1000XH

Für die Klonierung des 1.000 bp großen K10-Promotorfragments wurde zunächst nach dem Prinzip einer *Nested*-PCR eine längere DNA-Sequenz in einen pCR4-TOPO-Vektor kloniert. Als Grundlage diente eine genomische HEK293-DNA die mit den Oligonukleotiden

„Extfwk10“und „Extrvk10“ amplifiziert wurde. 4 µl des PCR-Produkts wurden für eine weitere PCR mit den Oligonukleotiden „Intfwk10“ und „ Intrvk10“ verwendet. 4 µl dieser PCR wurden dann für eine Klonierung in einen pCR4-TOPO-Vektor genutzt. Die Transformation erfolgte in Top10-Zellen, welche anschließend über Nacht auf einer LB-Agarplatte (mit Ampicillin) inkubiert wurden. Flüssigkulturen der Klone wurden hergestellt, die Plasmide isoliert und ein Testverdau mit den Enzymen EcoRI und HindIII durchgeführt. Eine Sequenzierung mit den Oligonukleotiden M13 und M13rev verifizierte die Klonierung. Auf Grundlage dieses Vektors wurde im Folgenden eine PCR mit den Oligonukleotiden „hsK10-X10f“ und „K10HdIIIr“ durchgeführt. Das resultierende Produkt wurde über ein Agarosegel gereinigt und anschließend mit den Enzymen XhoI und HindIII verdaut. Nach einer weiteren Reinigung über ein Agarosegel wurde das Fragment in den Vektor pGL3 Basic kloniert. Eine Transformation erfolgte in DH5α-Zellen. Diese wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin über Nacht bei 37 °C inkubiert. Flüssigkulturen wurden angfertigt, die Plasmide isoliert und einem Testverdau mit XhoI und HindIII unterzogen. Eine Sequenzierung mit den Oligonukleotiden „pGl3 sense“ und „pGL3 antisense“ verifizierte die Klonierung.

3.1.18 Klonierung des Plasmids pGL3hsK10P2030XH

Für die Amplifikation des 2.000 bp großen K10-Promotorfragments wurde das in Abschnitt 3.1.17 generierte TOPO-Plasmid und die Oligonukleotide „hsK10-X20f“ und „hsK10-X05r“ verwendet. Da eine Klonierung über die Restriktionsenzyme XhoI und HindIII aufgrund einer HindIII-Schnittstelle innerhalb der Sequenz bei diesem Fragment nicht möglich war, wurde ein Oligonukleotid benutzt, welches zunächst nur ein 1.500 bp Fragment anstelle des gewünschten 2.000 bp großen Fragments amplifiziert, welches durch die Ligation in den Vektor pGL3hsK10P1000XH durch die fehlenden 500 bp ergänzt wird. Eine Restriktion des PCR-Produktes und des Vektors erfolgte mit den Enzymen XhoI und BglII. Nach dem Verdau erfolgte in beiden Fällen eine Reinigung über ein Agarosegel. Die gereinigten Konstrukte wurden ligiert und in DH5α-Zellen transformiert. Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelklone wurden zum Animpfen einer Flüssigkultur verwendet. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA isoliert und ein Testverdau mit HindIII durchgeführt. Eine Sequenzierung mit den Oligonukleotiden „pGl3 sense“ und „pGL3 antisense“ verifizierte die Klonierung.

3.1.19 Kultivierung bakterieller Zellen

Die Kultivierung bakterieller Zellen erfolgte in LB-Medium. Diesem wurde entsprechend der Selektivität des bakteriellen Plasmids nach dem Autoklavieren das jeweilige Antibiotikum beigesetzt. Ampicillin wurde dabei in einer Endkonzentration von 100 µg/ml verwendet. *E.coli*-Zellen wurden in 10 ml Reagenzgläsern, oder im größeren Maßstab in 1 l Erlenmeyerkolben unter ständigem Schütteln (130 rpm) bei 37 °C angezogen.
Das Vereinzeln von Klonen erfolgte auf selektiven Agarplatten. Dazu wurde die Bakteriensuspensionen mit einem Drigalskispatel auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.20 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte entweder mit Hilfe des Plasmid DNA Purification Kits der Firma Macherey-Nagel oder nach folgendem Protokoll.
1,5 ml einer Bakterienkultur wurden für eine Minute bei 13.000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Puffer 1 (Resuspensionspuffer) gelöst. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis, wurden 200 µl Puffer 2 (Lysepuffer) hinzugegeben und die Reaktionsgefäße 6 x invertiert. Es folgte eine weitere Inkubation auf Eis (5 min), bevor 150 µl Puffer 3 hinzugegeben wurden. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß mit 800 µl Isopropanol überführt. Nach gründlichem Durchmischen folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 13.000 rpm. Die Überstände wurden abgenommen und das Pellet mit 100 µl Ethanol (70 %) gewaschen. Das Pellet wurde im Anschluss getrocknet und in 20-30 µl Wasser aufgenommen.
Zur Isolation größerer Mengen des Plasmids wurde das Plasmid Midi Kit von Qiagen verwendet. Dazu wurden 100 ml LB-Medium mit ca. 100 µl einer Flüssigkultur angeimpft. Die Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.1.21 Genotypisierungen

Mit Hilfe von Genotypisierungen wurde die DNA der für die Versuche eingesetzten Tiere analysiert. Dabei wurde untersucht, ob es sich bei den Tieren um Wildtypen, homozygote *Knockouts* oder heterozygote *Knockouts* handelt. Darüber hinaus konnte mit dieser Methode festgestellt werden, ob die Tiere der flox-Linien die für die Generierung

eines *Knockouts* benötigten Sequenzen besitzen. Für die Analyse wurden Schwanzbiopsien in 500 µl Lyse-Puffer (+ 1/100 Proteinase K) aufgenommen und über Nacht bei 55 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die lysierten Proben 5 min bei Raumtemperatur und 13.000 rpm zentrifugiert und der resultierende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in das 500 µl Isopropanol vorgelegt wurden. Durch mehrfaches Invertieren wurde die genomische DNA präzipitiert und durch 10-minütiges zentrifugieren bei RT und 13.0000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und der Überstand nach dem Zentrifugieren restlos entfernt. Das getrocknete Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer 10/1 aufgenommen und 30 min bei 55 °C gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei 4 °C im Kühlschrank aufgehoben.
Die PCR-Reaktionen zur Genotypisierung wurden mit dem KAPA HiFi HotStart ReadyMix oder dem 2x KAPA2G Fast ReadyMix+ dye von Peqlab durchgeführt. Die Analyse der Clp36-Mauslinie erfolgte mit den *Primern* „60531bct-KFB1“ und „60532bct-KFB1“. Für die Clp36-flox Mäuse wurden die *Primer* „60539flp-KFB1“ und „60540flp-KFB1“ verwendet. Die CSE-Linie wurde zunächst mit den *Primern* „63127cre-KFB2“ und „63128-KFB“ und im folgenden mit den *Primern* „63131flp-KFB2“ und „63132flp-KFB2“ analysiert. Proben von CSE-flox Tiere wurden mit den Oligonukleotiden „63131flp-KFB2“ und „63132flp-KFB2“ untersucht (Tabelle 3.13).

Tabelle 3.13: Pipettierschema Genotypisierung

Substanz	Volumen
KAPA Mix	12,5 µl
Primer 1 (10 pmol)	0,75 µl
Primer 2 (10 pmol)	0,75 µl
DNA	2 µl
DDW	9 µl

Die Amplifikation erfolgte wie in Tabelle 3.14 beschrieben.

Tabelle 3.14: PCR-Bedingungen Genotypisierung

Temperatur	Zeit	Reaktion	
95 °C	3 min	initiale Denaturierung	
98 °C	20 sec	Denaturierung	x37
65 °C	30 sec	Primer Hybridisierung	
72 °C	7 min	Elongation	
72 °C	7 min	finale Elongation	

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Isolierung von Proteinen aus Zellen

3.2.1.1 Isolierung des Gesamtproteins

Für die Isolierung des Gesamtproteins wurde ein Triton-X-haltiger Homogenisierungspuffer verwendet. Diesem wurden kurz vor Verwendung DTT und ein Protease-Inhibitorcocktail hinzugefügt. Das Kulturmedium der Zellen wurde abgesaugt und die Schalen mit kaltem PBS gewaschen. Bei 6 cm Schalen wurden etwa 100 µl Homogenisierungspuffer auf die Zellen gegeben, die mit Hilfe eines Zellschabers von der Schale gelöst wurden. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zum besseren Zellaufschluss 3-mal für 10 Sekunden sonifiziert. Die zerstörten Zellen wurden für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit dem gelösten Protein wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

3.2.1.2 Isolierung nukleärer und zytosolischer Proteine nach Smith

Um nukleäre und zytosolische Proteine voneinander zu trennen, wurde eine abgewandelte Methode nach Smith verwendet [Smith et al., 1988]. Die Zellen einer 10 cm Schale wurden zunächst mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 300 µl PBS/EDTA (0,1 mM) unter Zuhilfenahme eines Zellschabers von der Schale gelöst. Die Zellsuspension wurde für 2 min bei 2.500 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 300 µl Puffer A resuspendiert und 15 sec gevortext. Nach einer 10-minütigen Inkubation wurden 20 µl NP-40 hinzugefügt und 5 sec gevortext. Nach einer Minute

wurde erneut kurz gevortext. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C. Der resultierende Überstand enthielt die zytosolische Proteinfraktion, die in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert wurde. Das Pellet wurde in 100 µl Puffer C resuspendiert, 15 sec gevortext und anschließend 40 min schüttelnd bei 4 °C inkubiert. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C. Der Überstand enthielt die nukleären Proteine und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

3.2.1.3 Isolierung nukleärer und zytosolischer Proteine mittels ReadyPrep Protein Extraction Kit

Die Isolation nukleärer und zytosolischer Proteine für eine anschließende 2D-Gelelektrophorese erfolgte mit Hilfe des ReadyPrep Protein Extraction Kits von Bio-Rad. Die Zellen einer 10 cm Schale wurden zunächst mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 300 µl PBS unter Zuhilfenahme eines Zellschabers von der Schale gelöst. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Pro 50 µl Zellen wurden 500 ml CPEB addiert, die Suspension gevortext und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit einer 20 G Kanüle 20-ml resuspendiert. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 1.000 rpm und 4 °C. Der resultierende Überstand enthielt die zytosolische Proteinfraktion, die in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert wurde. Das Pellet wurde vorsichtig in 250 µl CPEB gewaschen und anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 1.000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl PSB resuspendiert. Die Suspension wurde 5-mal für 60 sec gevortext, bevor sie 20 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert wurde. Der Überstand enthielt die nukleären Proteine und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.2.2 Quantifizierung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen aus Zellextrakten fand nach Bradford statt [Bradford, 1976]. Bei dieser Methode wird photometrisch die Menge an Protein in einer Lösung bestimmt. Diese Messung beruht auf der Reaktion des Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) mit Proteinen. Bindet der Farbstoff an Proteine wechselt er von einer kationischen in eine anionische Zustandsform. Die ungebundene, kationische Form hat ein Absorptionsmaximum bei 470 nm und erscheint somit rot. Die gebundene,

anionische Form hingegen ist mit einem Absorptionsmaximum bei 595 nm blau. Mit der Wellenlängenverschiebung kommt es zur einer Erhöhung des Extinktionskoeffizienten, der photometrisch gemessen werden kann. Diese Verschiebung ist über einen großen Bereich proportional zur Proteinkonzentration. Das Bradfordreagenz wurde vor dem Einsatz nach Herstellerangaben 1:5 verdünnt. Die Messung der Proteinkonzentration fand in 96-Loch Mikrotiterplatten statt. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung angesetzt. Pro Ansatz wurden 200 µl des verdünnten Bradfordreagenz und 50 µl der je nach Proteingehalt 1:100 oder 1:200 verdünnten Probe zusammen pipettiert. Zur Kalibrierung wurde eine BSA-Standardreihe (0, 20, 30, 40, 50, 60, 80 und 100 µg/ml) verwendet, die wie die Proben zusammen mit dem Bradfordreagenz in die Platte pipettiert wurden. Die Messung der Proteinkonzentrationen fand bei einer Wellenlänge von 595 nm statt.

3.2.3 Western Blot-Analyse

3.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse von Proteinen wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Bei SDS handelt es sich um ein anionisches Detergens, welches die Eigenladung von Proteinen überdeckt. Pro Gramm Protein binden etwa 1,4 g SDS, wodurch eine negative Ladung proportional zur Proteingröße entsteht. Die sich abstoßenden negativen Ladungen des gebundenen SDS und das Aufkochen der Proben führen dazu, dass die Proteine denaturieren und so eine Auftrennung ausschließlich nach Kettenlänge gewährleistet ist. Legt man eine elektrische Spannung an, erfolgt eine Auftrennung der negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode. Die Auftrennung erfolgt dabei nach der Größe, da längere Proteine in der Gelmatrix stärker zurückgehalten werden als kürzere. Eine Identifikation der aufgetrennten Proteine erfolgt durch das parallele Auftragen eines Größenmarkers. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE setzt sich das Gel aus zwei Bestandteilen zusammen, dem Sammel-und dem Trenngel. Das Sammelgel hat einen größeren Porendurchmesser und einen neutralen pH-Wert von 6,8. In diesem Teil des Gels werden die aufgetragenen Proben zu einer Lauffront konzentriert, damit sie gesammelt ins Trenngel eintreten können. Das Trenngel ist im Vergleich zum Sammelgel engmaschiger und hat einen basischen pH von 8,8. In diesem Teil des Gels findet die eigentliche Größenauftrennung der Proteine statt.
Für die Herstellung eines solchen Gels wird zunächst das Trenngel in eine entsprechende Vorrichtung gegossen und mit Isopropanol beschichtet, um eine einheitliche Front zu

erzeugen. Nach dem Aushärten des Gels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Ein Kamm mit gewünschter Taschenzahl wurde zum Formen der Probentaschen in das noch flüssige Gel eingesetzt.
Die gewünschte Menge des jeweiligen Proteins wurde mit 4x reduzierendem Lämmlipuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C erhitzt.
Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer mit einem SDS-Laufpuffer gestellt. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei einer Spannung von 100 V. Sobald die Proben in das Trenngel eingetreten waren, wurde die Spannung auf 160 V erhöht. Die Dauer der Auftrennung richtete sich nach dem gewünschten Trennungsgrad der Proteine.

3.2.3.2 Proteintransfer

Im Anschluss an die SDS-PAGE fand der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-oder Nitrozellulose-Membran statt. Der Transfer erfolgte dabei mit Hilfe der „Semi-Dry-Methode“. Dazu wurden 6 Filterpapiere, eine Membran und das Gel in Transferpuffer inkubiert. PVDF-Membranen wurden zunächst in Methanol oder Isopropanol aktiviert. Dem Transferpuffer wurde in einem Verhältnis 1:500 SDS (10%) zugesetzt. Auf die Anode der Transferkammer wurden zunächst 3 Filterpapiere gelegt, es folgten die Membran und das Gel und abschließend erneut 3 Filterpapiere. Die Stromstärke des Proteintransfers wurde an die Größe des Gels angepasst. Die Übertragung von Proteinen eines kleinen Gels (ca. 6 x 8 cm) erfolgte bei 70 mA für 75 min. Bei einem großen oder zwei kleinen Gelen wurde die Stromstärke verdoppelt.
Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau-S gefärbt, um die Effizienz und Gleichmäßigkeit des Transfers zu überprüfen.

3.2.3.3 Detektion von Proteinen

Vor der Inkubation der Membran mit einem Primärantikörper, wurden zunächst die freien Bindestellen der Membran blockiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Dazu wurde die Membran mit 2 % BSA in TBST eine Stunde lang inkubiert. Die Primärantikörper wurden entsprechend verdünnt (Tabelle 2.5) und bei 4 °C über Nacht mit der Membran inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran 3x 10 min mit TBST gewaschen und anschließend mit einem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren drei 10-minütigen Waschschritten wurde

die Membran mit einer ECL-Lösung beschichtet und in eine lichtgeschützte Kassette gelegt. Die an den Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase oxidierte das in der ECL-Lösung befindliche Luminol, welches anschließend detektiert werden konnte. Dazu wurde in einer Dunkelkammer ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und mit einer Entwicklermaschine entwickelt.

3.2.4 2D-Gelelektrophorese

Eine 2D-Gelelektrophorese setzt sich aus zwei unterschiedlichen Trennmethoden zusammen, einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) und einer SDS-PAGE [O'Farrell, 1975]. Zunächst findet eine Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt statt. Dieser Punkt beschreibt einen pH-Wert, an dem ein Protein aufgrund ausgeglichener positiver-und negativer Ladungen neutral vorliegt. Bei einer Isoelektrischen Fokussierung werden die Proteine in einem pH-Gradienten entlang eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Je nach pH-Wert besitzen die Aminosäuren der Proteine einen anderen Protonierungsgrad. An einem für jedes Protein charakteristischen Punkt, heben sich negative und positive Ladungen auf, sodass die Nettoladung des Proteins neutral ist und sich das Protein im elektrischen Feld nicht mehr bewegt. Für die zweidimensionale Auftrennung wurden zunächst 160 µg Protein in der 3-fachen Menge Aceton über Nacht gefällt. Das resultierende Pellet wurde anschließend mit 250 µl Rehydrationspuffer (+ 2,8 mg DTT/ml) und 1 µl IPG des entsprechenden pH-Bereichs versetzt. Der Ansatz wurde gleichmäßig in eine dafür vorgesehene Kammer gegeben und mit einem Gelstreifen bedeckt (Anode in Richtung der spitzen Kammerseite). Vor dem Start der Fokussierung wurde der Gelstreifen mit einer „Dry Strip Cover Solution"beschichtet. Die Fokussierung im IPGPhor dauerte 24 h, in denen in 7 Schritten die Spannung auf 8000 Volt anstieg (12 h: 30 V, 2 h: 100 V, 30 min: 500 V, 30 min: 1000 V, 30 min: 4000 V, 30 min: 8000 V, 8 h: 8000 V). Im Anschluss wurde der Gelstreifen mit 5 ml SDS-Äquilibirierungspuffer (+ 50 mg DTT) für 30 min äquilibriert. Es folgte eine weitere 30-minütige Inkubation in 5 ml Äquilibrierungspuffer und 125 mg Iodacetamid. Für die Auftrennung in zweiter Dimension wurde der Gelstreifen auf ein SDS-Trenngel (1,5 mm dick) gelegt. Der Proteinmarker für einen späteren Größenabgleich wurde auf ein kleinen Streifen Filterpapier pipettiert und vor den Gelstreifen auf das Trenngel platziert. Um die ganze Konstruktion zu fixieren, wurden der Gelstreifen und das Filterpapier mit in PAGE-Puffer angesetzter Agarose (0,5 %) überschichtet. Um eine sichtbare Lauffront zu erzeugen wurde dem Gel Bromphenolblau zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 50 V.

3.2.5 Silberfärbung von Proteinen

In dieser Arbeit wurde eine Silberfärbung nach Rais verwendet, die eine spätere massenspektrometrische Analyse der Proteine ermöglicht. Die Silberfärbung der Proteine beruht darauf, dass Silberionen an die negativ geladenen Seitenketten von Proteinen binden und durch die Zugabe von alkalischem Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert werden [Rais et al., 2004]. Die Färbung wurde durch eine 30-minütige Fixierung (50 % Methanol, 10 % Essigsäure, 40 % Wasser) eingeleitet. Es folgten zwei 30-minütige Waschschritte mit Wasser. Im Anschluss daran wurde das Gel 30 min in 0,1 % Silbernitratlösung gefärbt und folgend 30 min in einer 0,005 % Natriumthiosulfat-Lösung inkubiert. Nach der Färbung wurde das Gel kurz in Wasser gewaschen, bevor eine Entwicklerlösung (20 % Na_2CO_3 + 1 ml/l Formalin (36,5 %)) auf das Gel gegeben wurde. Die Inkubationszeit betrug zwischen einer und zwei Minuten. Gestoppt wurde die Reaktion durch das Abkippen der Entwicklerlösung und das Hinzufügen einer Stopplösung (50 mM EDTA, pH 8,5). Nach 15 min wurde die Stopplösung entfernt und das Gel bis zur weiteren Verwendung in Wasser gelagert.

3.2.6 Immunpräzipitation (IP)

ANTI-FLAG M2 Agarose-*Beads* wurden vorsichtig mit einer 1 ml Pipette mit abgeschnittener Spitze resuspendiert. Für jeden IP-Ansatz wurden 40 µl der Gelsuspension in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 5.000 rpm 45 sec zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße 1-2 min ruhen gelassen, bis sich das Gel vollständig abgesetzt hatte. Der Überstand wurde abgenommen und die Gelkügelchen 2-mal mit 0,5 ml TBS gewaschen. Für die Immunpräzipitation wurden von jeder Probe 300 µg Protein mit Homogenisierungspuffer auf 250 µl aufgefüllt und zu den Agarose-*Beads* gegeben. Es folgte eine rotierende Inkubation über Nacht bei 4 °C. Die Proben wurden bei 5.000 rpm für 45 sec zentrifugiert und so lange stehen gelassen, bis sich das Gel gesetzt hatte. Es folgten 3 Waschschritte mit 500 µl TBS. Für die folgende Western Blot-Analyse wurden die *Beads* mit jeweils 20 µl 2x Lämmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen.

3.3 Immunhistochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden Proben aus dem Wundheilungsmodell (Abschnitt 3.5.3) über Nacht bei 4 °C in 4 % Formalin fixiert und anschließend maschinell entwässert. Die Proben konnten dann in einer dafür vorgesehenen Form in Paraffin eingebettet werden. Von den ausgehärteten Paraffinblöcken wurden am Mikrotom Gewebeschnitte von 3 µm Dicke angefertigt und auf einen Objektträger aufgebracht. Die Schnitte mussten vor der weiteren Verwendung bei 37 °C getrocknet werden.

3.3.2 Azanfärbung

Die Azanfärbung nach Heidenhain ist eine Übersichtsfärbung histologischer Präparate [Heidenhain, 1915]. Unter Verwendung der Farbstoffe Azokarmin und Anilinblau-Orange-G wird eine Differenzierung von extrazellulärem Bindegewebe, Gewebe und Zellbestandteilen ermöglicht. Für die Azan-Färbung wurden in Paraffin fixierte Schnitte verwendet, welche zunächst entparaffiniert werden mussten. Dazu wurden die Proben zunächst 4-mal 10 min in Xylol inkubiert. Es folgten zwei 5-minütige Inkubationsschritte in Isopropanol, zwei 5-minütige Schritte in Ethanol (99 %) und 5 min in Ethanol (70 %). Anschließend wurden die Proben 2-mal 10 min hydratisiert. Zur Färbung wurden die Proben etwa 10 min in eine Azokarmin-Lösung gegeben und in 96 % EtOH differenziert. Das Abstoppen der Differenzierung erfolgte für 1 min in 1 % Essigsäure-Alkohol. Nach einem Waschschritt mit DDW wurde das Bindegewebe 20 min in 5 % Phosphorwolframsäure entfärbt. Es folgte ein Waschritt mit DDW und eine 3-4 minütige Gegenfärbung mit Anilinblau und Orange G. Nach einem weiteren Waschschritt folgte eine 1-minütige Inkubation in 96 % Ethanol. Anschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (5 min 70 % EtOH, 5 min 100 % EtOH, 5 min Isopropanol, 5 min Xylol) entwässert, um eine Eindeckung mit Entellan zu ermöglichen.
Unter dem Mikroskop konnten folgende Strukturen unterschieden werden: Zellkerne: rot, Zytoplasma: rosa, Bindegewebsfasern (kollagene und retikuläre): blau, Bindegewebsfasern (elastisch): ungefärbt-rötlich, Muskelgewebe: rot-violett.

3.3.3 Hämatoxylin-Färbung

Die Hämatoxylin-Färbung nach Ehrlich ist eine histologische Übersichtsfärbung zur Differenzierung von Zellkernen und zytoplasmatischen Bestandteilen. Vor der eigentlichen Färbung mussten die in Paraffin fixierten Proben zunächst Entparaffiniert werden (Abschnitt 3.3.2). Es folgte eine 1-minütige Färbung in einer Hämatoxylin-Lösung. Anschließend wurden die Proben 10 min unter fließendem Wasser gewaschen und der pH-Wert durch die Zugabe von 100 µl Ammoniak erhöht, um eine Blaufärbung des Gewebes zu erreichen. Wie bei der Azan-Färbung wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend mit Entellan eingedecket.

3.3.4 Immunhistochemische Färbung

Mit Hilfe der Immunhistochemie können Proteine durch die Bindung eines spezifischen Antikörpers detektiert werden. Dadurch ist eine Lokalisierung des Proteins in unterschiedlichen Geweben möglich. Für diese Färbung wurden Paraffinschnitte verwendet. Vor der eigentlichen Färbung mussten die zu analysierenden Gewebeschnitte zunächst deparaffiniert werden (Abschnitt 3.3.2). Anschließend folgte die Antigendemaskierung. Dazu wurden die Objektträger mit den Gewebeproben mit Citrat- oder TRS-Puffer in einem 100 °C Wasserbad 20 min erhitzt. Die Proben wurden anschließend abkühlen gelassen, bis die Lösungen vollständig klar waren. Die Proben wurden 5 min mit PBS gewaschen und 15 min mit 3 % H_2O_2 (in PBS) behandelt. Es folgte eine 5-minütige Inkubation in DDW, eine 4-minütige Inkubation in 0,1 % Triton x100 (in PBS) und abschließend 5 min in PBS. Anschließend folgte die Blockierung der Proben mit dem „Protein block serumfree“. Nachdem die Blockierungslösung abgesaugt wurde, wurden die unterschiedlich verdünnten Antikörper auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation des Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer. Am nächsten Tag wurden die Proben 3 x 5 min mit PBS gewaschen, eine Stunde mit dem Sekundärantikörper inkubiert und erneut 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Es folgte eine 45-minütige Inkubation mit dem AB-Komplex des Santa Cruz ABC Systems (20 µl A + 20 µl B/ml PBS). Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS erfolgte die Chromogen-Reaktion durch die Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochlorid (DAB). Dabei handelt es sich um ein Substrat der Meerrettichperoxidase (HRP) welches nach der Oxidation mit Wasserstoffperoxid einen braunen, wasserunlöslichen Farbstoff bildet. Diese Reaktion wurde unter dem Mikroskop beobachtet und durch Eintauchen in destilliertes Wasser gestoppt, sobald die gewünschte Färbung des Gewebes

erreicht war. Es folgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Die Reaktion wurde durch ein gründliches auswaschen mit Wasser gestoppt. Zur besseren Darstellung der durch Hämatoxylin-bedingten Blaufärbung wurde dem Wasser Ammoniak zugesetzt. Zum Eindecken der Proben wurde Entellan verwendet, was eine Entwässerung der Proben bedingte (5 min 70 % EtOH, 5 min 100 % EtOH, 5 min 100 % Isopropanol, 5 min 100 % Xylol). Mit einer Pipettenspitze wurde ein wenig Entellan auf den Objektträger gegeben und die Proben mit einem Glasblättchen abgedeckt.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Isolierung muriner Mesangiumzellen

Für die Isolierung muriner Mesangiumzellen wurden die Nieren von drei Mäusen entnommen und von der Nierenkapsel befreit [Norgaard, 1983]. Die Nieren wurden auf das obere (180 µm) von insgesamt drei Sieben gelegt, mit PBS befeuchtet und mit dem Daumen durch die Poren gedrückt. Die nun auf dem zweiten Sieb befindlichen Nierenstücke wurden erneut mit dem Daumen durch die Poren (106 µm) in diesem Sieb gedrückt. Durch diese Größenselektion befanden sich nun die Glomeruli der Nieren auf dem dritten und letzten Sieb (53 µm). Dieses wurde über eine 150 mm Schale gehalten und die Glomeruli mit PBS vom Sieb in die Schale gespült. Das PBS mit den Glomeruli wurde in ein Falkon überführt und 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml RPMI-Vollmedium (15 % FCS) resuspendiert und anschließend auf vier T75-Zellkulturflaschen aufgeteilt. In die Flaschen wurde zuvor 20 ml RPMI-Vollmedium vorgelegt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Hierbei war zu beachten, dass die Flaschen innerhalb der ersten drei Wochen nicht bewegt werden durften. Nach drei Wochen wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet. Zunächst waren eckige Epithelzellen zu sehen, die um die Glomeruli angeordnet waren. Diese wurden nach und nach von spindelförmigen Mesangiumzellen verdrängt.

3.4.1.1 Kultivierung muriner Mesangiumzellen

Die Zellen wurden in einem RPMI-Vollmedium bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert. 2-mal wöchentlich wurden die konfluenten Zellen subkultiviert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit vorgewärmten PBS gewaschen, bevor sie mit Trypsin-EDTA einige Minuten bei 37 °C von der Oberfläche der Zellkulturflasche gelöst wurden.

Um den Trypsinierungsvorgang zu stoppen wurde RPMI-Vollmedium zur Zellsuspension gegeben. Die Zellsuspension wurde anschließend in 15 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 800 rpm 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in RPMI-Medium resuspendiert und in gewünschter Verdünnung in neue Zellkulturfalschen mit vorgelegtem Medium überführt.

3.4.2 Stimulation muriner Mesangiumzellen

Für die Stimulation muriner Mesangiumzellen wurde ca. 1/12 der Zellsuspension einer T175-Zellkulturflasche auf 10 cm große Kulturschalen ausgelegt. In die Schalen wurden 7 ml RPMI-Vollmedium vorgelegt. Nachdem die Zellen einen konfluenten Zustand erreicht hatten, wurden sie mit PBS gewaschen und anschließend über Nacht mit serumfreiem DMEM-Medium inkubiert. Die Inkubation mit dem gewünschten Stimulus erfolgte ebenfalls in serumfreien DMEM-Medium.

3.4.3 Kryokonservierung muriner Mesangiumzellen

Für die Kryokonservierung muriner Mesangiumzellen wurden die Zellen zunächst wie in Abschnitt 3.4.1.1 gewaschen, trypsiniert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml kaltem Einfriermedium aufgenommen und auf zwei Kryoröhrchen aufgeteilt. Die Zellen wurden zunächst auf -20 °C gekühlt, anschließend wurden sie in einer Styroporbox über Nacht bei -80 °C eingefroren. Für die langfristige Lagerung wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

3.4.4 Auftauen muriner Mesangiumzellen

Zum Auftauen wurden die gefrorenen Zellen in warmes RPMI-Vollmedium aufgenommen, dem zusätzlich 10 % FCS zugesetzt wurden. Um das DMSO zu entfernen, wurden die Zellen pelletiert und anschließend in FCS-angereichertem Vollmedium auf eine Zellkulturflasche ausgelegt.

3.4.4.1 Kultivierung humaner Keratinozyten

Bei HaCaT-Zellen (engl. *Human adult low Calcium and Temperature*) handelt es sich um adulte, immortalisierte Keratinozyten, die aus dem Randgebiet eines humanen Melanoms isoliert wurden [Boukamp, 1988]. Die Kultivierung dieser Zellen fand unter standardisierten

Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO_2 in einem Inkubationsschrank statt. Für die Kultivierung wurde DMEM-Medium mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Ein mal pro Woche wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Um die stark adhärierenden Zellen besser ablösen zu können, wurden die Zellen zunächst 10-20 min bei Raumtemperatur mit PBS inkubiert, bevor sie mit Trypsin-EDTA bei 37 °C behandelt wurden. Die Zellen wurden anschließend mit Vollmedium abgeschwemmt, für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert und das entstandene Pellet in Vollmedium aufgenommen. Ca. 1/12 der Zellen wurden in eine neue Zellkulturflasche mit vorgelegtem DMEM-Vollmedium gegeben.
Eine Differenzierung der HaCaT-Zellen konnte durch die Zugabe von Calcium erzielt werden. Dazu wurden die Zellen in Schalen ausgelegt und so lange kultiviert bis ein konfluenter Zustand erreicht war. Zu den konfluenten Zellen wurden zusätzlich zum bereits vorhanden Calcium (1,8 mM) weitere 2 mM $CaCl_2$ ins Medium gegeben.

3.4.5 Stimulation von HaCaT-Zellen

Die Stimulation von HaCaT-Zellen erfolgte auf 6 cm Zellkulturschalen. Dazu wurden die Zellen zunächst aus den T175-Flaschen gelöst, zentrifugiert, in RPMI-Vollmedium resuspendiert und gezählt. 1 Mio. Zellen wurden auf die Schalen gegeben, in die zuvor 3 ml Vollmedium vorgelegt wurden. Für Versuche zur Differenzierung wurden die Zellen bis zum Erreichen eines konfluenter Zustands wachsen gelassen und anschließend das Medium durch ein mit Calcium-angereichertes Medium (3,8 mM $CaCl_2$) ersetzt.
Für Untersuchungen zur Auswirkung von GYY4137 (Cayman Chemical, Ann Arbor) und Na_2S_4 (Alfa Aesar, Karlsruhe) auf die Zellen wurden GYY4137 (400 µM) und Na_2S_4(50 µM) in RPMI-Vollmedium (vor Erreichen der Konfluenz) bzw. Calcium-angereicherten RPMI-Vollmedium (nach Erreichen der Konfluenz) gelöst und auf die Zellen gegeben. Die Isolation der Proteine und RNA aus den stimulierten Zellen fand 4 Stunden nach der GYY4137- bzw. 30 min nach der Na_2S_4-Behandlung statt.

3.4.6 Kryokonservierung von HaCaT-Zellen

Zur Kryokonservierung von HaCaT-Zellen wurden die Zellen zunächst wie bei der Passagierung gewaschen, trypsiniert und zentrifugiert. Das Zellpellet einer T75-Zellkulturflasche wurde in 1,5 ml zusatzfreiem DMEM-Medium resuspendiert und anschließend tröpfchenweise 1,5 ml 2x-Einfriermedium hinzugegeben. Jeweils 1,5 ml wurden in ein Kryoröhrchen

überführt. Die Röhrchen wurden in einen mit Isopropanol befüllten Gefrierbehälter gestellt und zunächst einen Tag bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen für eine dauerhafte Konservierung in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.4.7 Auftauen von HaCaT-Zellen

Zum Auftauen wurden die HaCaT-Zellen in DMEM-Vollmedium aufgenommen und 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde im gleichen Medium resuspendiert und die Suspension in eine Zellkulturflasche mit vorgelegtem Medium überführt.

3.4.8 Transiente Transfektion von HaCaT-Zellen

3.4.8.1 Transiente Transfektion mit Lipofectamine 2000

Für die transiente Transfektion von HaCaT-Zellen wurden 105.000 Zellen pro Vertiefung einer 24-Loch Mikrotiterplatte ausplattiert und über Nacht in DMEM-Vollmedium inkubiert. Für die Transfektion wurde zunächst pro Vertiefung 0,5 µg/ml DNA mit Opti-MEM-Medium auf 25 µl aufgefüllt. In einem weiteren Ansatz wurde eine Mischung aus 2 µl Lipofectamine 2000 und 23 µl Opti-MEM angesetzt. Die Proben wurden zunächst getrennt voneinander durchmischt und anschließend zusammengeführt. Zusätzlich wurden 0,6 µl *Enhancer* dazugegeben. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Tröpfchenweise wurden 50 µl des Transfektionsansatzes auf die Zellen in das vorgelegte Opti-MEM-Medium (200 µl) gegeben. Die Ansätze wurden 15 min auf eine Magnetplatte gestellt und anschließend 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der 4-stündigen Inkubation wurde das Transfektionsmedium gegen das DMEM-Vollmedium ausgetauscht.
Transfektionen für Luciferase-Assays wurden in 12-Loch-Platten mit 400.000 Zellen durchgeführt. Die benötigten Mengen aller Substanzen pro Ansatz wurden dazu verdoppelt. Außerdem wurden zusätzlich zur Vektor-DNA 100 ng eines Renilla-Plasmids zum Ansatz gegeben.
Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde die β-Galaktosidaseaktivität anhand einer X-Galfärbung ermittelt. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 5 min bei 4 °C fixiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurde 1 ml der Färbelösung auf die Zellen gegeben und nach einer Stunde bei 37 °C unter dem Mikroskop betrachtet. Erfolgreich transfizierte Zellen zeigten eine Blaufärbung und wurden manuell gezählt.

3.4.8.2 Transiente Transfektion mit Amaxa

Für die Untersuchungen der K10-Promotorkonstrukte wurden pro Transfektionsansatz 2,5 Mio. HaCaT-Zellen in 100 µl Nucleofactor R aufgenommen. Jeweils 3 µg des zu untersuchenden Plasmids und 150 ng des konstitutiv exprimierenden Renilla-Plasmids (pRL-RT) wurden zu dem Gemisch aus Zellen und Nukleofaktor R gegeben. Der gesamte Ansatz wurde in eine Glasküvette überführt und durch Elektroporation (Amaxa NucleofectorII, Programm U-20) transfiziert. Anschließend wurden 500 µl DMEM-Vollmedium zur Zellsuspension gegeben und der Ansatz in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. In jede Vertiefung einer 12-Loch Zellkulturplatte wurden 500 µl des Vollmediums vorgelegt und je 200 µl der transfizierten Zellen dazugegeben. Es folgte eine 48-stündige Inkubation bei 37 °C.

3.4.9 Stabile Transfektion von HaCaT-Zellen

Zur Generierung einer stabilen CSE-überexprimierenden Zelllinie wurden 2 Mio. HaCaT-Zellen auf eine 10 cm Schale ausgelegt und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag mit PBS gewaschen und 2 ml Opti-MEM-Medium hinzugegeben. In einem Reaktionsgefäß wurden 16 µg des Plasmids pCMVhsCSE-Flag mit Opti-MEM-Medium auf ein Volumen von 400 µl gebracht. In einem zweiten Ansatz wurden 30 µl Lipofectamine 2000 und 370 µl Opti-MEM-Medium vermischt. Die Ansätze wurden nach gründlichem Mischen zusammengefügt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise, unter ständigem Schwenken, auf die Zellen gegeben. Nach 4 stündiger Inkubation bei 37 °C wurde das Transfektionsmedium gegen DMEM-Vollmedium ausgetauscht. Nach 2 Tagen wurde G418 (1:50) zugegeben, um erfolgreich transfizierte Zellen zu selektieren. Unter dem Mikroskop wurden nach etwa 2 Wochen einzelne Kolonien isoliert. Dazu wurden Schrauben-Muttern mit Vaseline beschichtet und um einen Klon herum platziert. In die Schrauben-Mutter wurde Trypsin gegeben, um so ausschließlich diesen Klon zu isolieren. Jeder isolierte Klon wurde in eine Vertiefung einer 96-Loch Zellkulturplatte überführt und kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in Vollmedium mit G418 als Selektionsmarker. Sobald die Fläche der 96-Loch Mikrotiterplatte konfluent bewachsen war, wurden die Zellen mit Trypsin gelöst und in eine 12-Loch-Zellkulturplatte überführt. Die nächste Passagierung erfolgte in einer T75-Zellkulturflasche. Sobald eine konfluente Zelldichte erreicht war wurden die Zellen eingefroren.

3.4.10 Bestimmung der Zellmigration

Um die Migrationsrate muriner Mesangiumzellen zu bestimmen, wurden *Transwell*-Migrationsanalysen durchgeführt. Zur Beschichtung der 8 µm *Transwell*-Membranen wurden jeweils 75 µl Fibronektin (0,5 µg/ml in PBS) verwendet. Dazu wurden die Kunststoffeinsätze mit der Membran auf den Fibronektin-Tropfen gestellt. Die Beschichtung der Membran erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am folgenden Tag wurde die Fibronektin-Lösung abgesaugt und die Membran mit 300 µl PBST gewaschen. Im Anschluss fand die Blockierung der Membran mit 5 % Milchpulver in PBST statt. Während des Blockierungsvorgangs wurden die Mesangiumzellen zunächst gewaschen und von den Schalen gelöst, bevor sie in serumfreien RPMI-Medium mit 1 % BSA aufgenommen und zentrifugiert wurden (5 min, 800 rpm). Das Pellet wurde in serumfreiem RPMI-Medium aufgenommen und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden pro Ansatz auf 8.000 Zellen pro 100 µl verdünnt. Nach einstündigem Blockieren wurde die Membran 3-mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden je 600 µl Medium vorgelegt und die Einsätze darauf gestellt. Für Versuche ohne Stimulation wurde serumfreies RPMI-Medium verwendet. Für Migrationsanalysen mit bFGF-Stimulation wurde serumfreies RPMI-Medium mit 50 ng/ml bFGF versetzt. Die Zellen wurden ausgesät und 5 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit jeweils 400 µl Methanol bei Raumtemperatur für 20 min fixiert. 400 µl gefiltertes Kristallviolett wurden vorgelegt und die Einsätze für 20 min bei Raumtemperatur hineingestellt. Anschließend wurden die Membranen so lange mit Wasser gewaschen werden bis keine Blaufärbung des Wassers mehr festgestellt werden konnte. Mit einem Wattestäbchen konnte die obere Seite der Membran vorsichtig gereinigt werden. Die Membran wurde mit einem Skalpell aus dem Einsatz heraus getrennt und auf einem Objektträger mit Eindeckmedium gelegt. Ein weiterer Tropfen Eindeckmedium wurde auf die Membran gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Bilder der Membranen wurden mit dem Keyence Mikroskop BZ-8000K aufgenommen und die migrierten Zellen am Computer gezählt.

3.4.11 Bestimmung der Zelladhäsion

Für die Quantifizierung adhärierender Mesangiumzellen wurde eine modifizierte Methode nach Goodwin angewandt [Goodwin and Pauli, 1995]. Hierzu wurde eine 96-Loch Zellkulturplatte über Nacht bei 4 °C mit jeweils 50 µl Fibronektin (0,25 µg/ml in PBS) beschichtet. Als Negativkontrolle wurde PBS verwendet. Am nächsten Tag wurde das

Fibronektin abgesaugt und mit 200 µl 5 % Milchpulver in PBS für 2 Stunden bei 37 °C blockiert. Während dem Blockieren wurden über Nacht gehungerte Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin gelöst und in serumfreies RPMI-Medium mit 1 % BSA aufgenommen. Die Suspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in BSA-haltigem Medium aufgenommen und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Pro Ansatz wurden 3.000 Zellen mit serumfreien Medium auf 100 µl aufgefüllt. Nach 2 Stunden wurde das Blockierungsmedium abgesaugt und die Platte 2-mal mit 200 µl PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 20 min bei 37 °C auf die Platte gegeben. Um adhärente von nicht adhärenten Zellen zu trennen, wurde im Anschluss mit einer Mehrkanalpipette 80 %iges Flotationsmedium zu den Zellen gegeben. Zunächst wurden 75 µl des Mediums vorsichtig auf einer Seite, etwa 1 mm unter der Oberfläche, zu den Zellen pipettiert. Die Applikation des Flotationsmediums wurde auf der gegenüberliegenden Seite wiederholt. Die Platte wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Fixieren der adhärenten Zellen erfolgte im Anschluss durch die Zugabe von 50 µl 10 % Formalin-Lösung. Die Inkubationszeit betrug 20 min bei RT. Im Anschluss wurde 2-mal mit 200 µl PBS gewaschen und die Zellen 2 min mit 0,05 % Triton X-100 bei RT permeabilisiert. Die Zellen wurden anschließend 2-mal mit PBS gewaschen und im Folgenden mit 50 µl DAPI 20 min im Dunkeln gefärbt. Die Zellen wurden 2-mal mit PBS gewaschen und die adhärierenden Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop gezählt.

3.4.12 Proliferationsanalysen

Versuche zur Analyse der Zellproliferation wurden durch den Einbau von Thymidin [Methyl-3H] in die chromosomale DNA durchgeführt. Mit Hilfe eines Szintillationszählers wurde die radioaktive Strahlung gemessen, um Unterschiede bezüglich der eingebauten [Methyl-^{3}H]-Thymidin-Menge zu detektieren. In 24-Loch Zellkulturplatten wurden 2x10^4 murine Mesangiumzellen bzw. 4x10^4 HaCaT-Zellen ausgesät und über Nacht im jeweiligen Vollmedium adhärieren lassen. Im Fall der murinen Mesangiumzellen wurden die Zellen 24 h in DMEM-Hungermedium behandelt, um das Wachstum der Zellen zu synchronisieren, bevor sie erneut über Nacht in DMEM-Vollmedium kultiviert wurden. Am nächsten Tag wurden 500 µl 0,2 µCi/ml [Methyl-^{3}H]-Thymidin (Amersham) in DMEM-Vollmedium auf die Zellen gegeben und 6 h bei 37 °C inkubiert.
Die HaCaT-Zellen wurden am Folgetag 24 h in Calcium-angereicherten DMEM-Vollmedium (3,8 mM) inkubiert. Am nächsten Tag folgte eine vier-stündige Inkubation mit 500 µl 0,2 µCi/ml [Methyl-^{3}H]-Thymidin bei 37 °C. Für die Analysen mit GYY4137 wurden

dem mit Calcium angereicherten Medium die entsprechenden GYY4137-Konzentrationen hinzugefügt. GYY4137 wurde sowohl in das DMEM-Vollmedium als auch in das DMEM-Vollmedium mit [Methyl-^{3}H]-Thymidin gegeben. Bei beiden Zelltypen wurde das radioaktive Medium abgesaugt und die Zellen 2-mal mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml eiskalte Trichloressigsäure (5 %) für 30 min bei 4 °C zu den Zellen gegeben. Es folgten zwei Waschschritte mit 5 % Trichloressigsäure. Um die Zellen von der Zellkulturplatte zu lösen, wurden 500 µl 1 M NaOH in die Vertiefungen gegeben und für mindestens 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden in Szintillationsröhrchen überführt, mit 250 µl Eisessig und 3 ml Szintillationsmix versetzt und gründlich durchmischt. Die Messung erfolgte in einem Szintillationszähler.

3.4.13 Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Luciferasen sind Enzyme, die Luciferine in Kombination mit Sauerstoff zu instabilen Dioxetanen oder Dioxetanonen oxidieren. Der Zerfall dieser Substanzen führt zu einer messbaren Biolumineszenz. Es werden unter anderem die Luciferasen des Glühwürmchens (*Firefly*-Luciferase) und der Seefeder (Renilla-Luciferase) unterschieden. *Firefly*-Luciferasen benötigen neben Luciferol und Sauerstoff ATP, um eine Biolumineszenz zu erzeugen. Renilla-Luciferasen hingegen sind für diese Reaktion nicht auf ATP angewiesen.

3.4.13.1 Analyse der C/EBP-Aktivität mittels „Cignal Reporter Assay“

Um den Einfluss von GYY4137 auf die Bindung von C/EBP zu untersuchen, wurden Konstruke aus dem C/EBP-Reporter-Kit in HaCaT-Zellen transfiziert. Dazu wurden wie in Abschnitt 3.4.8.1 beschrieben HaCaT-Zellen transfiziert. Als Negativkontrolle diente eine Mischung aus einer nicht-induzierbaren *Firefly*-Luciferase und einer konstitutiv exprimierenden Renilla-Luciferase. In der Positivkontrolle wurden beide Luciferasen konstitutiv exprimiert. Das zu untersuchende C/EBP-Konstrukt besaß induzierbare Promotorelemente (TATA-Box, TRE (*transcriptional response elements*)) für die Expression der *Firefly*-Luciferase und einen konstitutiv exprimierenden Renilla-Promotor.
An Tag 1 und 2 nach der Transfektion wurden die entsprechenden Zellen jeweils für 24 h mit 400 µM GYY4137 stimuliert. Am dritten Tag erfolgte eine 4-stündige Stimulation mit GYY4137, bevor die Messung der Luciferaseaktivität mit Hilfe des Luciferase-Kits von Promega durchgeführt wurde. Die Zellen wurden nach einem Waschschritt mit PBS mit jeweils 100 µl Lysepuffer für 30 min auf einem Kippschüttler inkubiert. Die Zellen

wurden mit einem Zellschaber gelöst, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 30 sec bei 13.000 rpm zentrifugiert. Jeweils 20 µl des Überstandes wurden in eine lichtundurchlässige 96-Loch-Platte überführt. Das Hinzufügen einer Substratlösung und einer „Stop und Glo“-Lösung sowie die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte automatisiert in einem Luminometer. Da die Renilla-Luciferase in allen Konstrukten konstitutiv exprimiert wurde, diente diese bei der späteren Auswertung als Referenz.

3.4.13.2 Analyse der K10-Promotor Konstrukte

Um zu untersuchen welcher K10 Promotorabschnitt auf die Behandlung mit GYY4137 reagiert, wurden die zuvor in einen pGL3-Vektor klonierten Promotorvariaten (250 bp, 500 bp, 1.000 bp und 2.000 bp) in HaCaT-Zellen transfiziert (Abschnitt 3.4.8.2). Die transfizierten Zellen wurden so lange in DMEM-Vollmedium inkubiert, bis ein konfluenter Zustand der Zellen erreicht war. Konfluente Zellen wurden entweder nur mit Calcium-angereicherten Medium oder mit Calcium-angereicherten Medium mit GYY4137 (400 µM) behandelt. Als Negativkontrolle diente eine Mischung aus einer nicht-induzierbaren *Firefly*-Luciferase und einer konstitutiv exprimierenden Renilla-Luciferase. In der Positivkontrolle wurden beide Luciferasen konstitutiv exprimiert.
Am dritten Tag der Stimulation wurde nach 4 Stunden mit der Messung der Luciferaseaktivität begonnen. Die Zellen wurden nach einem Waschschritt mit PBS mit jeweils 200 µl Lysepuffer für 30 min auf einem Kippschüttler inkubiert. Folgend wurden die Proben wie in Abschnitt 3.4.13.1 behandelt.

3.4.14 Bestimmung der Zelltoxizität

Mit Hilfe dieser Methode wurde die Toxizität von GYY4137 in HaCaT-Zellen ermittelt. Die Zellen wurden dafür über einen Zeitraum von 10 Tagen mit 400 µM GYY4137 behandelt. Der Farbstoff MTT (3-(4,5-DiMethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wurde an Tag 10 in PBS gelöst (5 mg/ml) und in einem Verhältnis von 1:10 in die Kulturschalen gegeben. Der Nachweis der Vitalität beruht auf der Reduktion von MTT zu einem violetten, wasserunlöslichen Formazan. Die Reaktion fand für 15 min bei 37 °C statt. Das Medium wurde abgesaugt und die violetten Kristalle wurden in 1 ml Isopropanol durch 10-minütiges Schütteln gelöst. 200 µl dieser Isopropanol-Lösung wurden in eine 96-Loch Mikrotiterplatte überführt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm im Mikroplattenleser gemessen. Aus dem Verhältnis von unbehandelten zu behandelten

Zellen konnte eine prozentuale Aussage über die Vitalität der Zellen getroffen werden.

3.5 Tierexperimentelle Methoden

3.5.1 Haltung und Zucht

In dieser Arbeit wurden Mäuse des Stamms C57BL/6 vewendet. Die Tiere waren in einer offenen Käfighaltung in der zentralen Forschungseinrichtung des Fachbreichs Medizin der Goethe Universität (ZFE) untergebracht. Die Haltung erfolgte unter definierten Bedingungen (12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus, 2-6 Tiere pro Käfig, 22 ± 2 °C, 50-70 % Luftfeuchtigkeit, *ad libitum* Futter und Wasser, Einstreu und Nistbaumaterial im Käfig). Sowohl die Tierhaltung als auch sämtliche tierexperimentellen Versuche wurden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und durch das Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt.

3.5.2 MCAO-Modell

Für die Schlaganfall-Versuche mittels Faden-Okklusion wurden ausschließlich männliche Mäuse im Alter von 8 bis 11 Wochen verwendet. Untersucht wurden neben dem C57BL/6J Wildtyp die Linien „PDLIM1-KO“und „CSE-KO“. Die Versuche liefen unter der Genehmigungsnummer "FU/1013".

3.5.2.1 Operativer Verschluss der *Arteria cerebri media*

Der Verschluss der *Arteria cerebri media* und die dadurch hervorgerufene fokale zerebrale Ischämie stellt ein gutes Modell dar, um einen ischämischen Hirninfarkt des Menschen nachzustellen. Die Operationen erfolgten nach einer modifizierten Methode von Longa [Longa et al., 1989]. Vor Beginn des Eingriffs wurden die Tiere gewogen. Entsprechend ihrem Gewicht wurde zur Schmerzausschaltung intraperitoneal Buprenorphin (1:10 verdünnt mit 0,9 % NaCl) verabreicht. Die Narkose wurde durch Gabe eines Isofluran-Sauerstoff-Gemisches (5 % Isofluran, 1 l/min Sauerstoff und 7 l/min Druckluft versehen) eingeleitet. Zur Kontrolle einer suffizienten Narkose wurden Atmung und Zwischenkrallenreflex überprüft, bevor die Tiere in Rückenlage in einer speziell präparierten Narkosemaske positioniert und die Zusammensetzung des Narkosegases auf 1,5 % Isofluran, 0,4 l/min Sauerstoff und 1 l/min Druckluft eingestellt wurde. Die Extremitäten wurden mit einem

Klebeband fixiert und das Operationsfeld desinfiziert. Die Eröffnung der Haut oberhalb der Karotisloge erfolgte durch einen etwa 1 cm langen Schnitt rechts der Mittellinie des Jugulums. Es folgte eine stumpfe Präparation der beiden Schilddrüsenlappen, die von der Mitte aus links und rechts zur Seite verlagert wurden, bis rechts der Trachea die *Arteria carotis communis*, die *Vena jugularis interna* und der *Nervus vagus* zu sehen waren. Die *Arteria carotis communis* wurde so weit kaudal wie es der Schnitt zuließ und kranial bis zur Karotisbifurkation freigelegt und mit einem 7-0 Faden so weit kaudal wie möglich abgebunden, um eine Blutung aus der *A. carotis communis* nach Setzen der Inzision zu verhindern. Im Weiteren erfolgte das Abbinden der *Arteria carotis externa* möglichst nah der Bifurkation, um eine Blutung in diesem Bereich zu verhindern. Ein 4-0 Faden zur Fixierung des Okklusionsfadens wurde nahe der Bifurkation zunächst locker um die *A. carotis communis* geschlungen.Mit einem Gefäßclip wurden die *Ateria carotis interna* und die *Arteria pterygopalatina* kurzfristig verschlossen, um eine Blutung nach der Inzision der *A. carotis communis* zu verhindern. Mit Hilfe einer Mikrofederschere wurde ein 1-2 mm großer Schnitt in der *A. carotis communis* proximal des Fixierungsfadens gesetzt. Der Okklusionsfaden wurde in die Inzision eingeführt und zunächst bis zum Clip vorgeschoben. Der Gefäßclip wurde entfernt und der Faden so weit in die *A. carotis interna* geschoben, bis die Spitze des Okklusionsfadens den Abgang der *A. cerebri media* verschloss (federnder Widerstand, das Ende des Silikonfadens lag auf Höhe der Bifurkation). Durch das Festziehen des Fixierungsfadens wurde der Okklusionsfaden in seiner Position gesichert. Anschließend konnte die Wunde mit vier Einzelknopfnähten verschlossen werden. Die operierten Tiere wurden nach dem Eingriff in Einzelkäfigen überwacht.

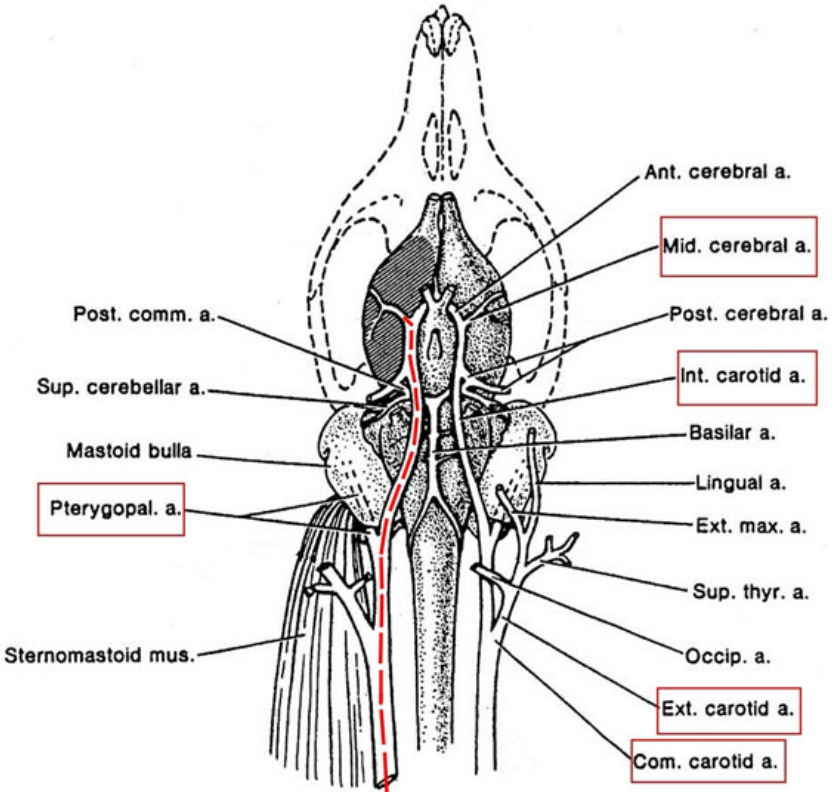

Abbildung 3.1: Darstellung des zerebrovaskulären Systems

Schematische Darstellung des zerebrovaskuläre System einer Ratte [Longa et al., 1989]. Roter Kasten: Alle für den Verschluss der *Arteria cerebri media* relevanten Gefäße. Rote Linie: Weg des Okklusionsfilaments.

3.5.2.2 Einleitung der Reperfusion

Zur Darstellung einer Reperfusion wurde eine Stunde nach Verschluss der *Arteria cerebri media* der Okklusionsfaden entfernt. Dazu wurden die Tiere erneut narkotisiert und in der Atemmaske fixiert. Nach dem Öffnen der Nähte wurde die *Arteria carotis communis* erneut freigelegt, der Fixierungsfaden gelockert und der Okklusionsfaden langsam herausgezogen. Dabei war zu beachten, dass ein stetiger Blutstrom dem Faden folgte, um eine gute Reperfusion zu gewährleisten. Nachdem das Filament vollständig entfernt und die Reperfusion beobachtet werden konnte, wurde der Fixierungsfaden festgezogen, um einen Blutverlust aus der Gefäßinzision zu verhindern. Die Wunde wurde erneut mit vier Einzelknopfnähten verschlossen, bevor die Mäuse für 24 Stunden in ihre Käfige gesetzt wurden.

3.5.2.3 Postoperative Beurteilung neurologischer Defizite

Nach 24-stündiger Beobachtungszeit wurden die Tiere erneut gewogen und auf neurologische Defizite untersucht.

Test	Punkte
Motorischer Funktionstest	
Maus am Schwanz halten (max. 3 Punkte)	
• Flexion Vorderbein	1
• Flexion Hinterbein	1
• Bewegung des Kopfes > 10 ° zur vertikalen Achse	1
Maus auf den Tisch setzen (normal=0; max. Einschränkung=3)	
• Uneingeschränkte Bewegung	0
• Kein gerader Gang möglich	1
• Kreisende Bewegung	2
• Fallneigung	3
Balancetest	
Maus auf einen Holzstab setzen (normal=0; max. Einschränkung=6)	
• balanciert mit stabiler Körperhaltung	0
• hält sich mit vier Pfoten fest, keine Vorwärtsbewegung	1
• hält sich fest, eine Extremität rutscht ab	2
• hält sich fest, zwei Extremitäten rutschen ab	3
• fällt innerhalb von 40 sec herunter	4
• fällt innerhalb von 20 sec herunter	5
• fällt direkt herunter	6
Reflextests	
• Ohrmuschelreflex nicht auslösbar	1
• Kornealreflex nicht auslösbar	1

3.5.2.4 Perfusion des Blutkreislaufs und Anfertigung von Gehirnschnitten

Um den Kreislauf der Tiere von Blut zu befreien, dass bei späteren Analysen stören könnte, wurde eine transkardiale Perfusion mit PBS vorgenommen. Dazu wurde zunächst durch die Gabe von von 5 % Isofluran, 1 l/min Sauerstoff und 7 l/min Druckluft der Atemstillstand der Mäuse herbeigeführt. Diese wurden anschließend in Rückenlage fixiert und der Thorax geöffnet. Eine Flügelkanüle wurde in den linken Ventrikel der Maus eingeführt und mit einer Schere das rechte Atrium geöffnet. Die Kanüle war mit einer Infusionspritze verbunden, mit der pro Tier 10 ml PBS in den Blutkreislauf geleitet wurden. Das vom PBS verdrängte Blut konnte durch den Schnitt am Atrium austreten. Nach der Perfusion wurde der Kopf des Tieres abgetrennt und die Haut nach vorne über den Kopf gezogen. Der so freigelegte Schädelknochen wurde mit einer Pinzette vorsichtig aufgebrochen und das Gehirn mit Hilfe eines Spatels entnommen. Um bei jedem Tier gleichmäßige Schnitte des Gehirns von 1 mm Dicke anfertigen zu können, wurde das Gehirn in eine dafür vorgesehene Matrix gelegt und Rasierklingen in die entsprechenden Vertiefungen geführt.

3.5.2.5 TTC-Färbung

Die mit Hilfe der Matrix angefertigten Gehirnscheiben wurden in eine 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung (TTC) gelegt. Bei TTC handelt es sich um einen wasserlöslichen Stoff, der im reduzierten Zustand eine rote Farbe hat. Da eine Reduktion des TTC zu 1,3,5-Triphenylformazan (TPF) nur durch die Dehydrogenaseaktivität in Mitochondrien vitaler Zellen stattfinden kann, kann eine Rotfärbung nur in unbeschädigtem Gewebe beobachtet werden. Gewebe, welches durch den Infarkt beschädigt wurde, bleibt hingegen weiß [Altman, 1976]. Die Färbung erfolgte in einer 2 %igen TTC-Lösung (in PBS) für etwa 3 min in einer lichtundurchlässigen Box. Die gefärbten Schnitte wurden anschließend unter standardisierten Bedingungen eingescannt.

3.5.2.6 Bestimmung des Infarktvolumens

Die Bestimmung des Infarktvolumens erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ. Die Auswertung wurde verblindet durchgeführt. Zu Beginn der Analyse musste zunächst die Skalierung eingestellt werden. Mit Hilfe des Freihandtools wurde anschließend zunächst das vom Infarkt betroffene Gewebe in allen Schnitten umrandet. Nachfolgend wurden die

ipsilaterale und zum Schluss die kontralaterale Hemisphäre nachgezogen.

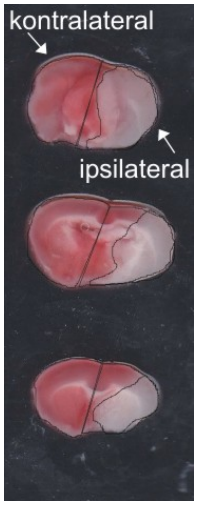

Abbildung 3.2: Messung des Infarktvolumens in ImageJ

Umrandung des ischämischen Areals, der ipsilateralen Hemisphäre und der kontralateralen Hemisphäre mit Hilfe des Freihandtools.

Alle Markierungen wurden im "ROI manager"gespeichert. Die Messungen wurden von beiden Seiten der Schnitte angefertigt. Die Berechnung der Infarktgröße erfolgte mit Hilfe der Formel:

$$\text{Infarktvolumen} = \text{Infarktfläche } x \frac{\text{Hemisphärenfläche kontralateral}}{\text{Hemisphärenfläche ipsilateral}}$$

3.5.3 Wundheilungsmodell

Für Untersuchungen der kutanen Wundheilung wurden adulte, weibliche Mäuse im Alter zwischen 13 und 16 Wochen verwendet. Neben Wildtyp-Mäusen des Stamms C57BL/6J wurde die *Knockout*-Linie „CSE-KO“ analysiert. Die Versuche liefen unter der Genehmigungsnummer V54-19c20/15-FU 1055

Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn mit Ketamin (80 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert und der Rückenbereich vollständig rasiert. Zur Desinfektion und zum Beseitigen der abrasierten Haare wurde der Rücken der Tiere mit 70 % Ethanol besprüht. Anschließend wurden mit einer Schere links und rechts der Wirbelsäule je 3 Vollhautexisionswunden mit einem Durchmesser von etwa 5 mm gesetzt. Der Abstand zwischen den Wunden betrug dabei etwa 4 mm. Die Tiere wurden anschließend einzeln in Käfige gesetzt, die mit Papiertüchern ausgelegt waren. Einige

Stunden nach dem Eingriff wurde der Gesundheitszustand der Tiere überprüft. Nach 11, 13 bzw. 15 Tagen wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Im Anschluss wurden die Wunden einschließlich der Wundränder und des Granulationsgewebes ausgeschnitten. Von jedem Tier wurde eine Hälfte der Wunden zur späteren Isolation von Protein und RNA in flüssigem Stickstoff gefroren. Die andere Hälfte der Wunden, die für die Anfertigung histologischer Präparate genutzt wurde, wurde auf eine PVDF-Membran gelegt die sich in einer Einbettkassette befand. Diese Kassette wurde anschließend in 4 % Formalin fixiert.

4 Ergebnisse

Clp36 ist ein zytoskelletäres Protein aus der Familie der PDLIM-Proteine und unterliegt nach bisher erhobenen Daten unserer Arbeitsgruppe, einer Redoxregulation. Eine Behandlung mit dem H_2S-Donor Na_2S_4 führte in HEK293-Zellen zu einer Persulfidbildung an mindestens einem Cysteinrest von Clp36 [Longen et al., 2016]. Die Konsequenz dieser Modifikation ist jedoch bisher nicht bekannt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NO die mRNA-Expression von Clp36 in Rattenmesangiumzellen inhibiert [Walpen, 2001]. Dies führt jedoch, wahrscheinlich aufgrund der Stabilität des Clp36 Proteins, nicht zu einer Verminderung der Proteinexpression. In früheren Versuchen der Arbeitsgruppe wurde zudem gezeigt, dass durch eine Calpain-abhängige Spaltung ein kürzeres Clp36 Fragment entsteht [Eisel, 2013]. Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass es sich bei dem kürzeren Spaltprodukt um die LIM-Domäne des Proteins handelt, welche sich durch die Spaltung das 24 kDa große Restprodukt vom Zytoskelett löst und in den Zellkern transloziert. Die beobachtete Degradierung durch Calpain wurde zeitgleich von Gupta *et al.* publiziert, wobei dort jedoch kein diskretes Spaltprodukt beschrieben wurde [Gupta et al., 2012].
In dieser Arbeit sollte zunächst die Funktion von Clp36 in murinen Mesangiumzellen genauer untersucht werden.

4.1 Analyse der Effekte von Clp36 in murinen Mesangiumzellen

4.1.1 Untersuchung der Proteinexpression in Clp36$^{-/-}$-Mesangiumzellen

Für die Charakterisierung von Clp36 in murinen Mesangiumzellen wurden Expressionsstudien auf Proteinebene durchgeführt. Mit Hilfe einer 2D-Gelelektrophorese wurde das Proteinexpressionsmuster von Wildtyp- und Clp36$^{-/-}$-Zellen verglichen, um mögliche Effekte der Clp36-Deletion zu analysieren. Da uns vor allem interessierte, ob das nach Calpainspaltung in den Zellkern translozierte Clp36-Fragment die Proteinexpression beeinflusst, wurden für diese Untersuchungen Kernfraktionen herangezogen. Für diese Analysen wurden die Kernproteine zunächst nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. In einem zweiten Schritt folgte eine Größenauftrennung der bereits in der ersten Dimension aufgetrennten Proteine. Anschließend wurde eine Silberfärbung des Gels gemacht. Das Experiment wurde zwei Mal wiederholt und Proteine, welche in beiden Experimenten eine unterschiedliche Expression zwischen Wildtyp und Knockout zeigten, wurden aus

dem Gel extrahiert und massenspektrometrisch untersucht (Abbildung 4.1).

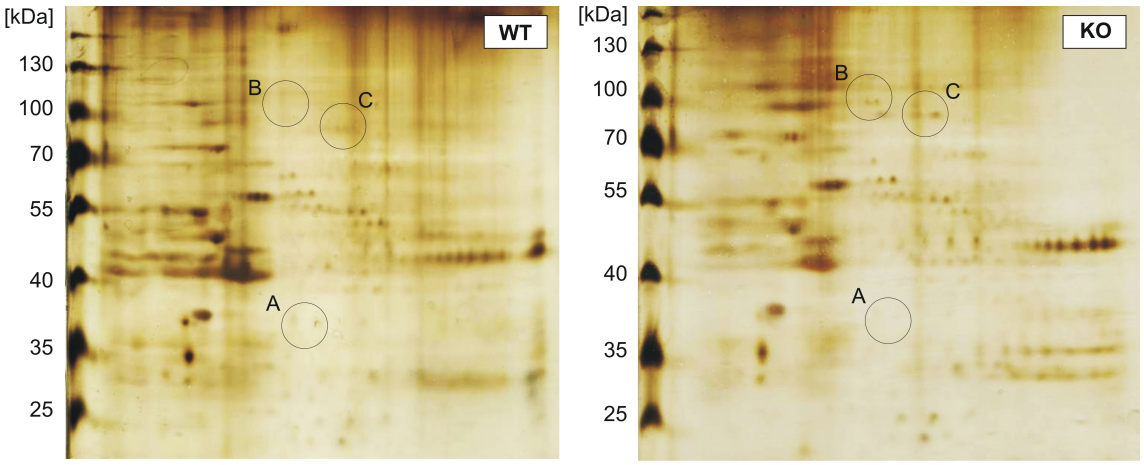

Abbildung 4.1: Silberfärbung einer 2D-PAGE.

2D-Gelelektrophorese der Kernproteine von WT- und Clp36$^{-/-}$-Mesangiumzellen. Kreise: massenspektrometrisch identifizierte Proteine. A) FHL3, B) Gelsolin, C) Zyxin

Neben den markierten Proteinen *Four and a Half Lim domain Protein 3* FHL3, Gelsolin und Zyxin wurden weitere regulierte Proteine gefunden, welche ebenfalls untersucht wurden. Zu diesen Proteinen zählten diverse Hitzeschockproteine und Keratine. Dabei handelte es sich um Proteine, welche bekanntermaßen häufig als Kontaminationen in massenspektrometrischen Analysen identifiziert werden. Auf eine weitere Analyse dieser Proteine wurde deshalb verzichtet. In den folgenden Untersuchungen wurde der Fokus auf Proteine gelegt, welche in Zusammenhang mit dem Zytoskelett stehen. Gelsolin ist einer der wichtigsten Regulatoren beim Auf- und Abbau des Zytoskeletts und zeigte in beiden Analysen eine stärkere Expression in der nukleären Fraktion von Clp36$^{-/-}$-Zellen. Ebenso wurde Zyxin in den KO-Zellen vermehrt exprimiert. Zyxin ist ein zytoskelettales Protein, das vorwiegend an fokalen Adhäsionen lokalisiert ist und vermutlich bei der Signalübertragung von Adhäsions-stimulierten Veränderungen auf die Genexpression eine Rolle spielt. Außerdem scheint es bei der Organisation von Aktinfilamenten beteiligt zu sein. Bei FHL3, welches in Wildtyp-Mesangiumzellen erhöht exprimiert wurde, handelt es sich um ein Mitglied der *Four and a Half Lim domain*-Familie. Proteinen dieser Familie werden Funktionen als transkriptionale Koaktivatoren und zytoskelettale Regulatoren zugeschrieben.

Um eine Regulation der mit Hilfe einer 2D-Gelelektrophorese identifizierten Proteine zu bestätigen, wurden Western Blot-Analysen der zytosolischen und nukleären Fraktion von

Wildtyp- und Knockout-Zellen durchgeführt (Abbilung 4.2). Neben der Expression der durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine wurde zusätzlich die Expression von FHL1 betrachtet. Dieses Protein gehört zur gleichen Familie wie FHL3 und wurde bereits in einer anderen Studie als Bindungspartner von Clp36 identifiziert [Sharma et al., 2011].

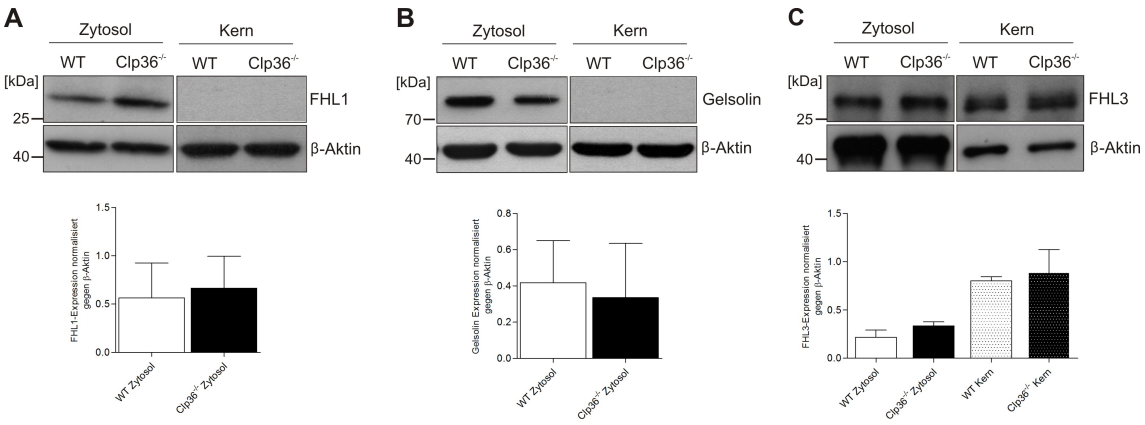

Abbildung 4.2: Western Blot Analyse der durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine.

Western Blot von FHL1, FHL3 und Gelsolin in zytosolischen und nukleären Proteinen von WT- und Clp36$^{-/-}$-Zellen. Repräsentativer Western Blot und quantitative Auswertung von FHL1 ***(A)****, Gelsolin* ***(B)*** *und FHL3* ***(C)****. In allen Fällen wurden 3 unabhängige Experimenten analysiert. Eine Normalisierung fand gegen β-Aktin statt.*

Die dargestellten Western Blots von FHL1, Gelsolin und FHL3 in WT- und Clp36$^{-/-}$-Zellen zeigen exemplarisch jeweils einen von mindestens 3 durchgeführten Versuchen. Die aus den Western Blot Analysen erhaltenen Ergebnisse waren für alle drei Proteine nicht immer eindeutig, so dass die quantitative Auswertung bei keinem der Proteine signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockout ergab. Auffällig war jedoch, dass FHL1 und Gelsolin die ursprünglich in der nukleären Proteinfraktion von Mesangiumzellen gefunden wurden, im Western Blot lediglich im Zytosol detektierbar waren. Auf die Untersuchung von Zyxin wurde verzichtet, da kein geeigneter Antikörper für unsere Zwecke zur Verfügung stand.

Auch wenn mit Hilfe der Western Blot-Analysen die Befunde aus der 2D-Gelelektrophorese nicht bestätigt werden konnten, konnte ein Zusammenhang zwischen den in der 2D-PAGE regulierten Proteine gefunden werden. Alle identifizierten Proteine sind am Zytoskelett der Zelle lokalisiert und spielen eine Rolle in Migrations- oder Adhäsionsvorgängen.

Um die Assoziation von Clp36 am Zytoskelett genauer zu analysieren wurden im Folgen-

den Fluoreszenzfärbungen durchgeführt.

4.1.2 Fluoreszenzfärbung zur Lokalisierung von Clp36 in Mesangiumzellen

Um die Lokalisierung von Clp36 in unseren Mesangiumzellen zu untersuchen und auf diesem Weg weitere Anhaltspunkte über die Funktion von Clp36 zu bekommen, wurden Fluoreszenzfärbungen von WT- und Clp36$^{-/-}$-Zellen durchgeführt (Abbildung 4.3).

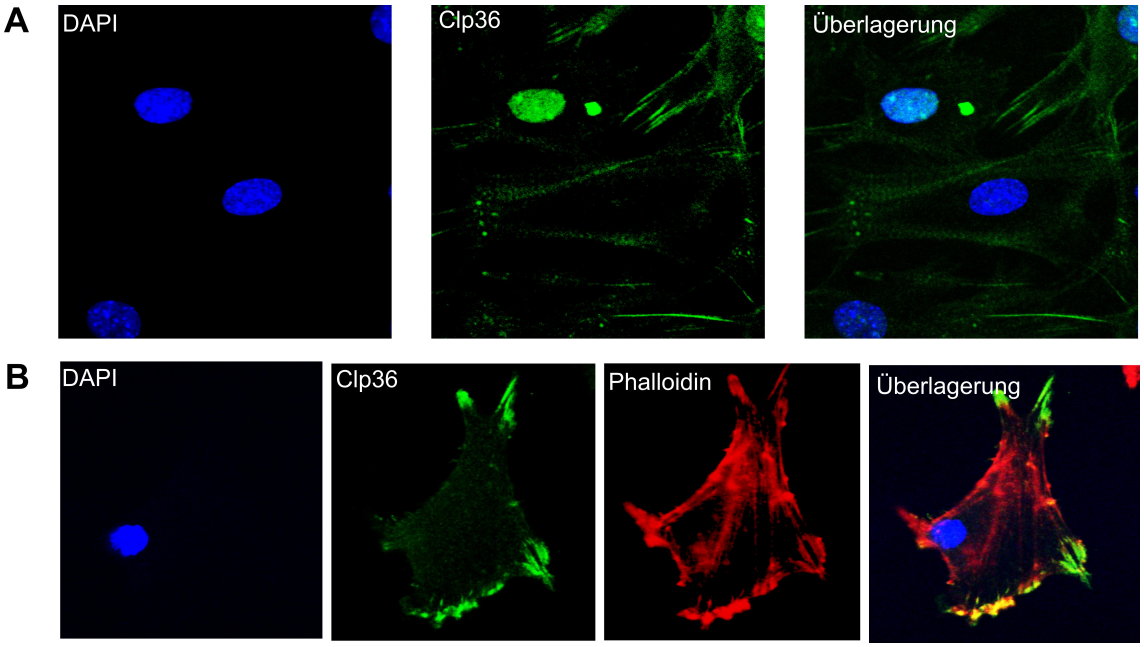

Abbildung 4.3: Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung von Clp36 in Mesangiumzellen.

Immunfluoreszenzfärbung des Zellkerns (blau), des Zytoskeletts (rot) und von Clp 36 (grün). ***(A)*** *DAPI- und Clp36-Färbung.* ***(B)*** *DAPI-, Clp36- und Phalloidin-Färbung.*

Die Clp36-Färbung zeigt eine Lokalisierung des Proteins am Zytoskelett. Insbesondere die Überlagerung der Clp36- und der Phalloidin-Färbung verdeutlicht die Assoziation an fokalen Adhäsionen der Zelle (Abbildung 4.3 B, gelb). Des Weiteren konnte Clp36 in einem Teil der Zellen im Kern detektiert werden, in anderen Zellen hingegen konnte eine Lokalisierung im Kern nicht festgestellt werden (Abbildung 4.3 A).

4.1.3 Adhäsions-, Migrations- und Proliferationsanalysen von Clp36- und CSE-Knockout-Zellen

Aufgrund seiner Lokalisierung am Zytoskelett und der möglichen Interktion mit Proteinen, die im Zusammenhang mit Adhäsions- und Migrationsprozessen stehen, stellen $Clp36^{-/-}$-Zellen ein interessantes Zellkulturmodell für Untersuchungen der Adhäsion, Migration und Proliferation dar. Für diese Vorgänge sind der dynamische Auf-und Abbau von Aktinfilamenten und fokalen Adhäsionen von großer Bedeutung. Diese Prozesse werden u.a. durch H_2S beeinflusst. H_2S kann dabei sowohl über eine Rac1-Aktivierung die Formation von Lamellipodien bewirken als auch über eine ERK-Inhibierung unabhängig von Rac1 Einfluss auf den *focal adhesion turnover* nehmen [Zhang et al., 2012].
Um den Einfluss von H_2S auf die Adhäsion, Migration und Proliferation in murinen Mesangiumzellen zu untersuchen, wurden für die folgenden Versuche neben Zellen des Clp36-Knockouts auch Zellen eines CSE-Knockouts verwendet.

4.1.3.1 Adhäsionsanalysen

Um zu untersuchen, ob einer der beiden Knockout-Modelle eine Veränderung im Adhäsionsverhalten der Zelle zeigt, wurde eine modifizierte Adhäsionsanalyse nach Goodwin durchgeführt [Goodwin and Pauli, 1995]. Dazu wurde Flotationsmedium auf die Zellen gegeben, das nicht adhärierende Zellen von der Fibronektin-beschichteten Platte löst. Die Zellen, welche nach dieser Behandlung noch immer an der Platte haften konnten, wurden gefärbt und unter einem Mikroskop betrachtet und für eine anschießende manuelle Auszählung aufgenommen (Abbildung 4.4).

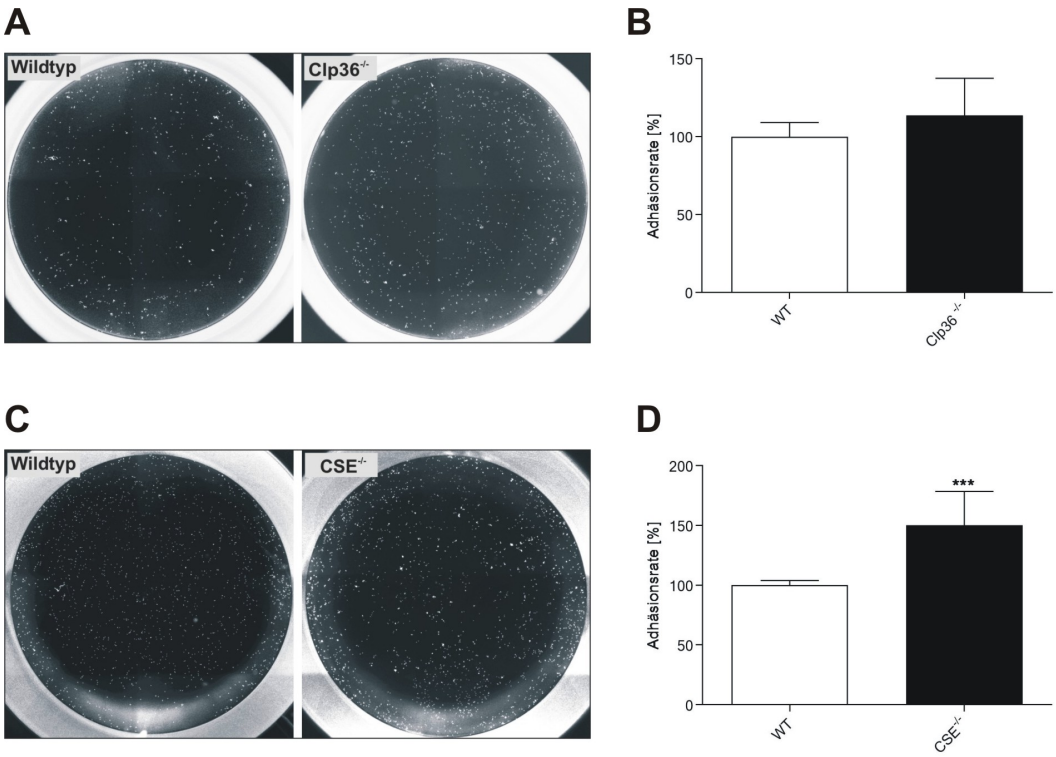

Abbildung 4.4: Adhäsionsanalyse muriner Clp36$^{-/-}$- und CSE$^{-/-}$-Mesangiumzellen.

*DAPI-Färbung adhärierender Clp36$^{-/-}$-Zellen **(A)** und CSE$^{-/-}$-Zellen **(C)**. Adhärierenden Zellen wurden gezählt und jeder Wert mit dem Mittelwert des Wildtyps (=100 %) verrechnet (p-Wert Clp36: 0,1288; p-Wert CSE: 0,0005). Statistische Auswertung der Clp36$^{-/-}$-Zellen **(B)** und CSE$^{-/-}$- Zellen **(D)**. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n=9 (Clp36) und n=8 (CSE) Experimenten ± SD. *** p<0,001 (unpaired t-Test im Vergleich zum Wildtyp).*

Die DAPI-Färbung des Clp36-Knockouts zeigt im Vergleich zum Wildtyp keine deutlichen Unterschiede (Abbildung 4.4 A). In der statistischen Auswertung der Adhäsionsanalyse von Clp36-deletierten Zellen konnte lediglich eine tendenzielle, aber keine signifikante Adhäsionssteigerung um 14 % beim KO im Vergleich zum WT beobachtet werden (Abbildung 4.4 B).

Im Gegensatz zum Clp36-Knockout zeigt der CSE-Knockout bereits in der DAPI-Färbung eine erhöhte Zahl adhärierender Zellen (Abbildung 4.4 C). Die Auswertung dieses Versuchs ergab, dass eine Deletion der CSE einen signifikanten Anstieg der Adhäsionsrate um 50 % bewirkt (Abbildung 4.4 D).

Da Adhäsions- und Migrationsvorgänge eng miteinander verbunden sind, könnte auch die Zellmigration von einer Deletion der Proteine Clp36 und CSE betroffen sein.

4.1.3.2 Migrationsanalysen

Um zu untersuchen welchen Einfluss Clp36 und CSE auf die Zellmigration haben, wurde die Migrationsfähigkeit der Zellen durch *Transwell*-Analysen bestimmt. Die Membranen der Migrationsplatten wurden dazu mit Fibronektin, einem Bestandteil der extrazellulären Matrix, beschichtet und die WT- bzw. KO-Zellen darauf ausgesät. Neben Experimenten mit unstimmulierten Zellen wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Migration der Zellen durch die Stimulation mit bFGF induziert wurde. Die durch die Membran migrierten Zellen wurden anschließend gefärbt und gezählt.

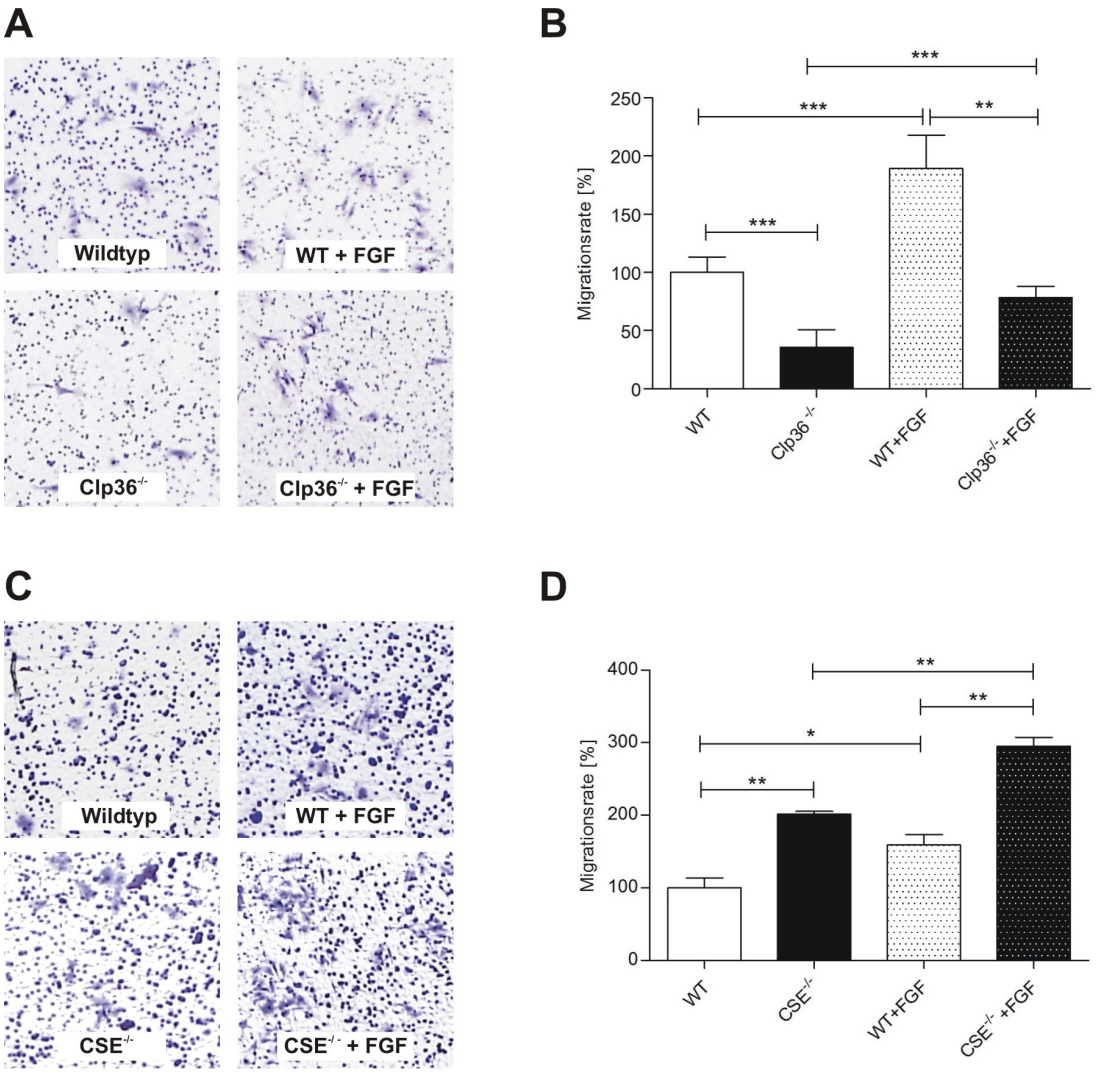

Abbildung 4.5: Migrationssanalyse muriner Clp36$^{-/-}$- und CSE$^{-/-}$-Mesangiumzellen.

Kristallviolett-Färbung von Clp36$^{-/-}$- und CSE$^{-/-}$-Zellen. Vergrößerter Bildausschnitt der Kristallviolett-Färbung von WT- und Clp36-Knockout-Zellen ***(A)*** *und CSE-Knockout-Zellen* ***(C)*** *mit und ohne FGF-Stimulation. Quantitative Analyse der Migrationsrate von Wildtyp- und Clp36$^{-/-}$-Zellen* ***(B)*** *und CSE$^{-/-}$-Zellen* ***(D)*** *mit und ohne FGF Stimulation. Die Mittelwerte aller Auszählungen wurden mit dem Mittelwert des unstimulierten Wildtyps (=100 %) verrechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n=12 (Clp36$^{-/-}$ und WT -FGF), n=7 (Clp36$^{-/-}$ und WT + FGF)* ***(B)*** *und n=3 (CSE$^{-/-}$ und WT -/+ FGF)* ***(D)****. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (unpaired t-Test).*

Bereits in den Bildausschnitten der Kristallviolett-Färbungen ist im Fall der Clp36-Deletion eine etwas geringere Zellzahl zu sehen (Abbildung 4.5 A). Deutlich wird diese Beobachtung nach der statistischen Auswertung. Hier kommt es im Vergleich zum WT zu einer signifikanten Reduktion der Migrationsrate von Clp36$^{-/-}$-Zellen auf 36 %. Eine Stimula-

tion mit bFGF führte wie erwartet zu einem Anstieg der Migrationsrate. Diese stieg in WT-Zellen auf 189 % und in KO-Zellen auf 78 %. Die Differenz zwischen Wildtyp-Zellen und KO-Zellen wurde aber durch die Stimulation nicht erhöht, sondern tendenziell eher reduziert (Abbildung 4.5 B).
Die Migrationsanalye von CSE-Knockout-Zellen zeigt bereits in der Kristallviolett-Färbung eine leichte Erhöhung der Zellzahl (Abbildung 4.5 C). Die statistische Auswertung dieser Versuche zeigt eine signifikante Steigerung der Migrationsrate auf 202 % in $CSE^{-/-}$-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen. Auch in diesem Fall konnte bFGF zwar eine Erhöhung der Migration im Allgemeinen bewirken, änderte aber nichts bezüglich des Unterschiedes zwischen WT und KO. bFGF bewirkte in WT-Zellen einen Anstieg der Migrationsrate auf 159 % und einen Anstieg in KO-Zellen auf 295 % im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen (Abbildung 4.5 D).
Die Organisation des Zytoskeletts und der Auf-und Abbau von Fokalen Adhäsionen sind nicht nur in Adhäsions- und Migrationsvorgängen sondern auch in Proliferationsvorgängen von großer Relevanz, weshalb diese in folgenden Experimenten genauer untersucht wurden.

4.1.3.3 Proliferationsanalysen

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Proliferationsverhalten von Mesangiumzellen beruhen auf dem Prinzip der [Methyl-^{3}H]-Thymidin Inkorporation. Angegeben wurden die detektierten Mengen des radioaktiven Thymidins in *counts per minute* (CPM).

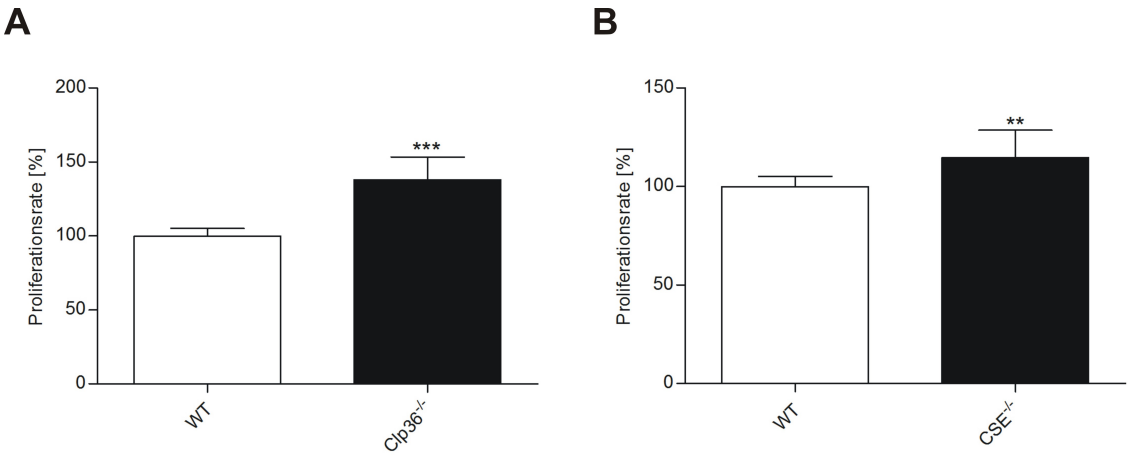

Abbildung 4.6: Proliferationsanalyse muriner Clp36$^{-/-}$- und CSE$^{-/-}$-Mesangiumzellen.

Analyse der [Methyl-^{3}H]-Thymidin-Inkorporation in Clp36$^{-/-}$-Zellen ***(A)*** *und CSE$^{-/-}$-Zellen* ***(B)****. Die ermittelten counts per minute wurden mit dem Mittelwert des Wildtyps (=100 %) verrechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n=12 (Clp36) und n=9 (CSE) unabhängigen Experimenten. ** p<0,01; *** p<0,001 (unpaired t-Test im Vergleich zum Wildtyp).*

In beiden Knockout-Linien konnte in den Proliferationsanalysen eine signifikante Steigerung der Proliferationsrate gemessen werden. Die Deletion von Clp36 führte zu einer Steigerung der Proliferation um 38 %, die Deletion der CSE zu einer Erhöhung um 15 % im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 4.6).

4.2 Rolle von Clp36- und CSE im Kontext der zerebralen Ischämie

Aufgrund seiner Wirkung auf die Thrombozytenaktivierung könnte Clp36 ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt zur Beeinflussung der Infarktentwicklung nach zerebraler Ischämie [Gupta et al., 2012]. Die Knockout-Mauslinie von Clp36 ist somit ein äußerst interessantes Tiermodell, um die Auswirkungen eines Verschlusses der *Arteria cerebri media* (MCAO-Modell) zu untersuchen.

Auch die Knockout-Linie für die CSE bietet sich für derartige *in vivo* Untersuchungen an, da H_2S-Donoren die Größe des Infarktvolumens vermindern können [Qu et al., 2006]. Durch die Analyse von CSE$^{-/-}$-Mäusen, soll in dieser Arbeit der Einfluss von endogen gebildetem H_2S untersucht werden.

Das Prinzip der experimentell induzierten zerebralen Ischämie beruht auf dem Verschluss

der *Arteria cerebri media* mit einem Silikon-beschichteten Okklusionsfaden. Der Verschluss der Arterie erfolgte für eine Stunde und wurde anschließend durch die Entfernung des Filaments aufgehoben. Im Anschluss an eine 24 stündige Reperfusionsphase wurden die Mäuse auf neurologische Auffälligkeiten untersucht, bevor das Infarktvolumen der Mäuse bestimmt wurde.

4.2.1 Bestimmung des Infarktvolumens bei WT-, Clp36$^{-/-}$- und CSE$^{-/-}$-Mäusen nach dem Verschluss der *Arteria cerebri meadia*

Zur Bestimmung des Infarkvolumens wurden 1 mm dicke Gehirnschnitte angefertigt und in einer TTC-Lösung gefärbt. Anschließend folgte eine Analyse des Infarktvolumens (Abbildung 4.7).

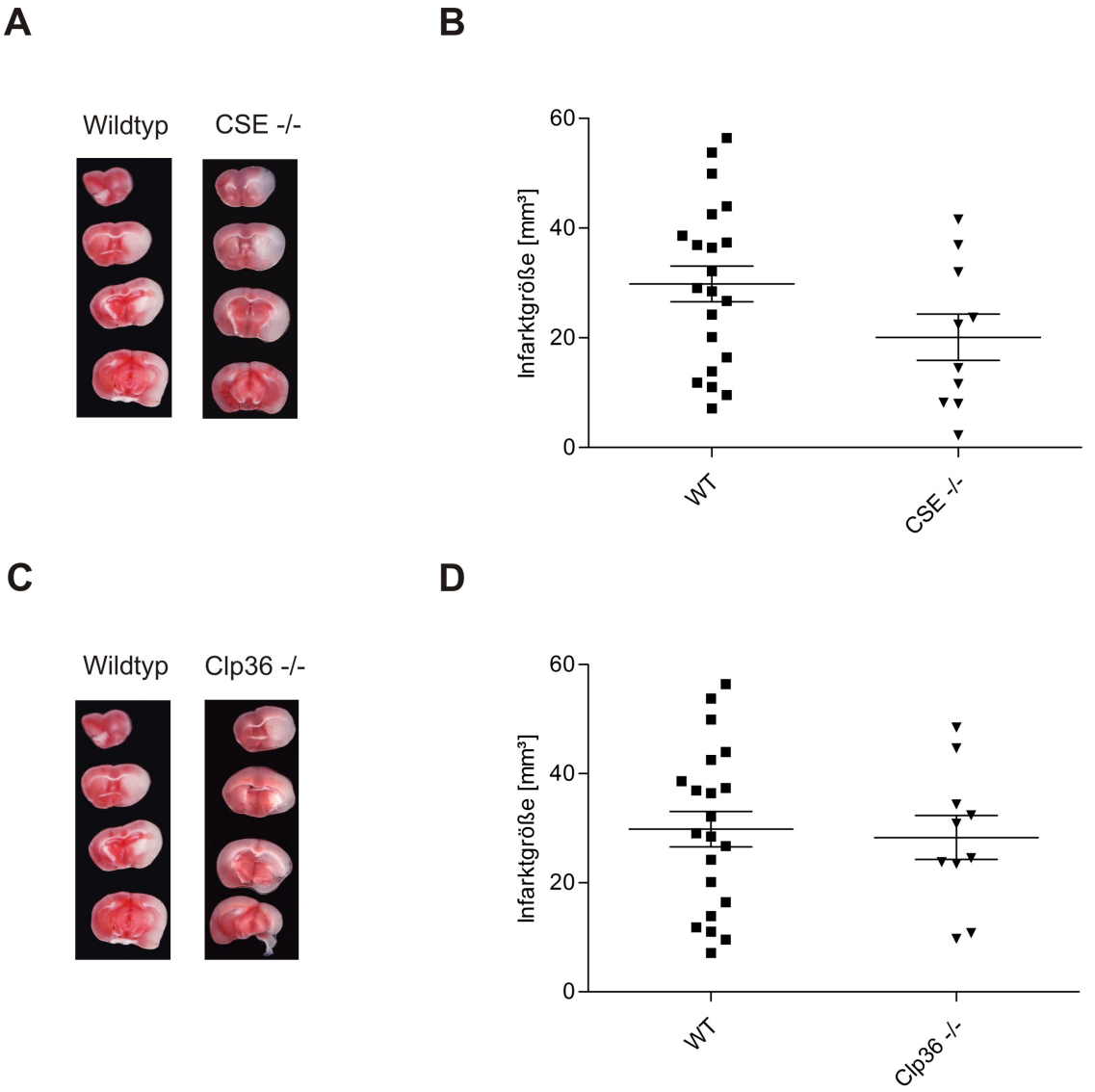

Abbildung 4.7: Auswertung des Infarktvolumens von Wildtyp-, Clp36$^{-/-}$- und CSE$^{-/-}$-Mäusen.
TTC-Färbung repräsentativer Gehirnschnitte von Wildtyp- und CSE$^{-/-}$-Mäusen ***(A)*** *und Wildtyp- und Clp36$^{-/-}$-Mäusen* ***(C)*** *24 h nach Verschluss der Arteria cerebri media. Rot: gesundes Gewebe; weiß: vom Infarkt betroffenes Gewebe. Streudiagramm ermittelter Infarktgrößen von Wildtyp- und CSE$^{-/-}$-Mäusen* ***(B)*** *und Wildtyp- und Clp36$^{-/-}$-Mäusen* ***(D)****. Ausgewertet wurden Infarkte von je n=10 CSE$^{-/-}$- und Clp36$^{-/-}$-Mäusen und n=21 Wildtyp-Mäusen).*

Die Infarktgrößen beider Knockouts unterschieden sich nicht signifikant vom Wildtyp (Abbildung 4.7). Mäuse mit einer Deletion der CSE zeigten allerdings eine tendenzielle Reduzierung des Infarktvolumens.

Die Auswertung der neurologischen Defizite, bei der 0 Punkte das Minimum (keine sichtbaren Schäden) und 14 Punkte das Maximum ist, ergab keine signifikanten Unterschiede

zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen. Die Mittelwerte lagen bei Wildtyp-Mäusen bei 3,98, bei Clp36$^{-/-}$-Mäusen bei 3,23 und bei CSE$^{-/-}$-Mäusen bei 3,92. Die Bewertung der neurologischen Defizite entsprachen somit nicht der Tendenz der Infarktgrößen. Darüber hinaus konnte keine Korrelation zwischen der erreichten Punktzahl bei der neurologischen Untersuchung und dem Infarktvolumen festgestellt werden. Um einen möglichen Einfluss des CSE- und Clp36-Knockouts im Schlaganfall auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Proteine aus der gesunden und der geschädigten Hemisphäre isoliert und analysiert.

4.2.2 Proteinanalyse der ipsilateralen und kontralateralen Hirnhälfte

Nach Bestimmung des Infarktvolumens mittels TTC-Färbung, wurden die Schnitte zur Analyse der Proteinexpression verwendet. Es wurden Proteinextrakte der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre isoliert und mit Hilfe eines Western Blots analysiert. Neben bekannten Ischämie-regulierten Genen wie HO-1 und 3-MST wurde die Expression der CSE und CBS untersucht. Um eine allgemeine Aussage über die Expression der drei Mauslinien treffen zu können, wurden Proteine von Gehirnen mehrerer Mäuse der selben Linie vereinigt (Abbildung 4.8).

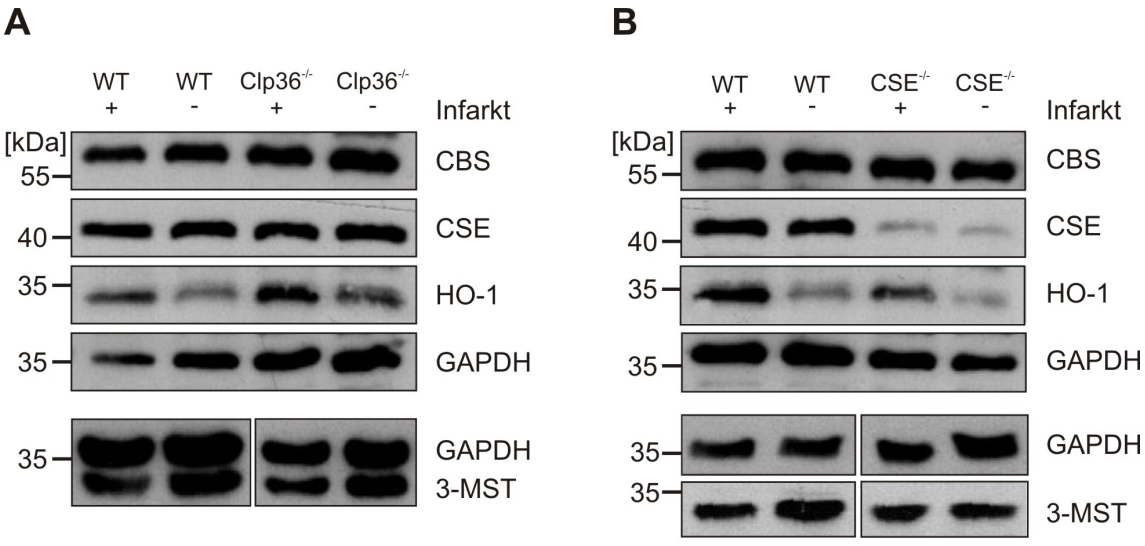

Abbildung 4.8: Proteinexpression in Wildtyp-, Clp36$^{-/-}$- und CSE$^{-/-}$-Mäusen

Western Blot-Analyse der ipsilateralen (+) und kontralateralen (-) Hemisphäre von WT- und Knockout-Tieren. Proteine von n=7 WT- und n=7 Clp36$^{-/-}$-Mäusen wurden vereinigt und die Expression der CBS, CSE, 3-MST und HO-1 analysiert ***(A)****. Proteine von n=6 WT- und n=5 CSE$^{-/-}$-Mäusen wurden vereinigt und die Expression der CBS, CSE, 3-MST und HO-1 analysiert* ***(B)****. Als Ladekontrolle diente GAPDH.*

Die Hämoxygenase 1 (HO-1), ein klassischer Ischämie-Marker, zeigt eine eindeutige Regulation im Vergleich der ipsilateralen zur kontralateralen Hemisphäre. Wie erwartet wurde eine deutlich erhöhte HO-1-Expression im ischämischen Gewebe beobachtet. Die Expression der 3-MST ist im Gegensatz zur HO-1 auf der ipsilateralen Seite herunterreguliert. Allerdings zeigte das Fehlen von Clp36 und CSE keine deutlichen Auswirkungen auf die Genexpression im gesunden und durch den Infarkt geschädigten Gewebe. Die CSE und die CBS zeigten keine durch den Schlaganfall regulierte Proteinexpression.
Da keine bedeutsamen Unterschiede der beiden Knockout-Modelle im Kontext des ischämischen Schlaganfalls beobachtet werden konnten, wurde auf weitere Analysen verzichtet. In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss beider Knockout-Linien im Verlauf der kutanen Wundheilung untersucht.

4.3 Analyse von Clp36, CSE und CBS im Kontext der kutanen Wundheilung

Um einen Eindruck zu bekommen, ob die Expression der Gene für Clp36 und CSE im Verlauf der kutanen Wundheilung reguliert wird und ob die Deletion von Clp36 oder CSE den Verlauf der Wundheilung beeinflussen, wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank zunächst Vorversuche mit in der Arbeitsgruppe bereits vorhandenen Lysaten aus Wunden von Wildtypmäusen durchgeführt. Dabei wurde der zeitliche Verlauf der Expression von Clp36 und CSE während der Wundheilung sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene analysiert. Die mRNA und die Proteine wurden aus Wunden extrahiert, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Verwundung entnommen wurden (Tag 1, 3, 5, 7 und 13 nach Verwundung). Für die Proteinanalyse wurden für jeden Zeitpunkt mehrere Wunden vereinigt um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten. Die Analyse der RNA hingegen erfolgte mit einzelnen aus den Wunden gewonnenen RNA-Extrakten. Als Kontrolle diente in beiden Fällen die an Tag 0 entnommene Haut.
Im Fall des Clp36-Knockouts wurde lediglich eine Analyse der Proteinexpression durchgeführt.

4.3.1 Analyse der Genexpression H_2S generierender Enzyme in Wunden

4.3.1.1 Analyse der mRNA-Expression in Wunden von Wildtyp-Mäusen.

Die mRNA-Analyse der CSE-Expression fand mittels qPCR statt. Diese wurde mit Hilfe einer spezifischen CSE-Sonde analysiert. Parallel zur Analyse der CSE wurde auch die

Expression der CBS betrachtet (Abbildung 4.9).

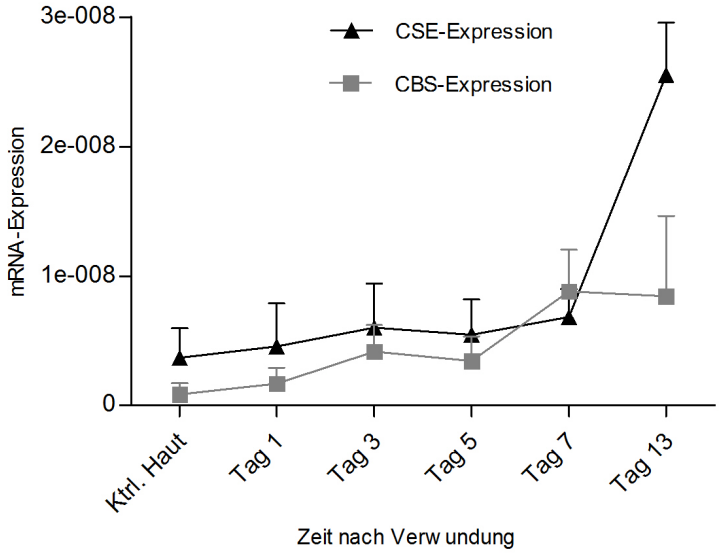

Abbildung 4.9: CSE und CBS mRNA-Expression im Verlauf der Wundheilung von Wildtyp-Mäusen

qPCR-Analyse der CSE- und CBS-mRNA-Expression. Für jeden Zeitpunkt (Kontrollhaut, Tag 1, Tag 3, Tag 5, Tag 7 und Tag 13) wurden n=3 Wunden von Wildtyp-Mäusen untersucht. Eine Normalisierung der CSE- und CBS-Expression fand gegen GAPDH statt. Daten publiziert in [Goren et al., 2019].

Die mRNA-Expression der CSE von Tag 0 (Kontrollhaut) bis Tag 7 ist nahezu konstant. An Tag 13 kommt es allerdings zu einem drastischen Anstieg der CSE Expression. Die Expression der CBS (grau) liegt konstant unter der der CSE, jedoch konnte auch hier ein Anstieg gegen Ende der Kinetik (Tag 7 und 13) beobachtet werden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass beide H_2S-produzierenden Enzyme, insbesondere im späten Verlauf der Wundheilung bei der Bildung des Epithels, von Bedeutung sein könnten.

4.3.1.2 Analyse der Proteinexpression in Wunden von Wildtyp-Mäusen

Zur Bestätigung der mRNA-Ergebnisse wurde die Expression der CSE auf Proteinebene untersucht. Dazu wurden gewonnene Proteinextrakte in einer SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen CSE und CBS.
Darüber hinaus wurde die Proteinexpression von Clp36 im Verlauf der Wundheilung untersucht (Abbildung 4.10).

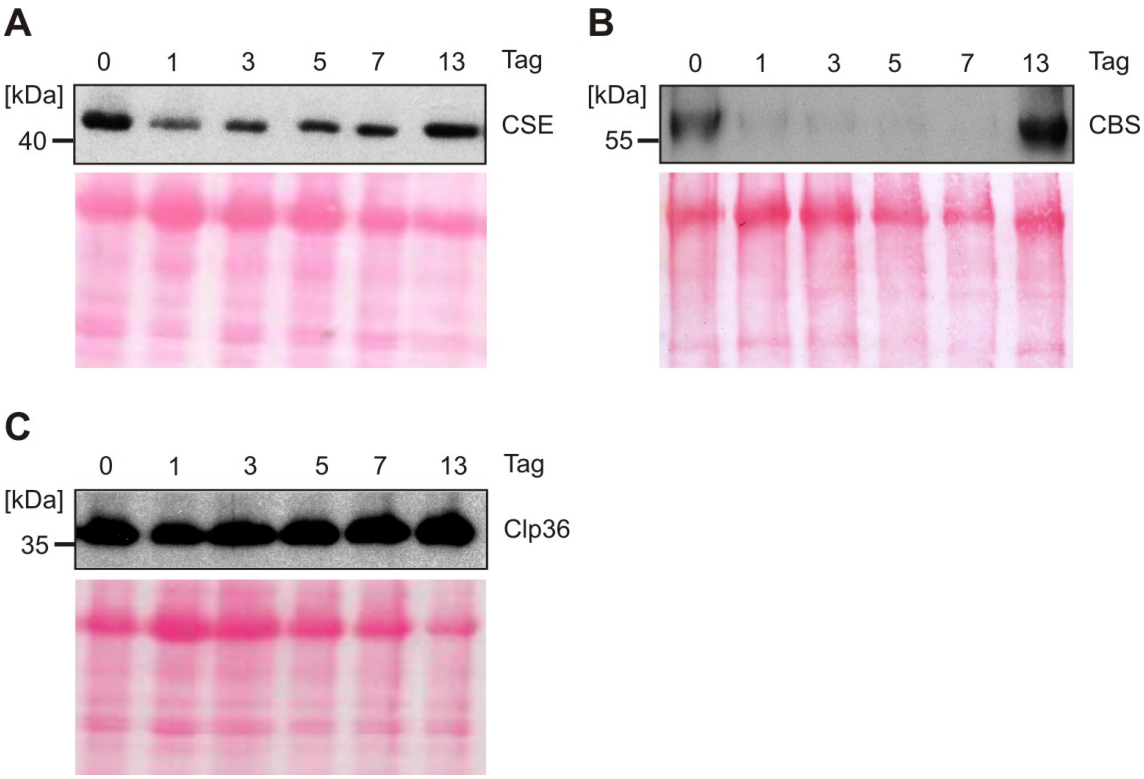

Abbildung 4.10: CSE, CBS und Clp36 Proteinexpression in Wildtyp-Wunden

*Western Blot Analyse der CSE- **(A)**, CBS- **(B)** und Clp36 **(C)**-Proteinexpression in Wildtyp-Mäusen im Verlauf der kutanen Wundheilung. Für jeden Zeitpunkt wurden Proteine von n=3 Wunden vereinigt und untersucht. Als Ladekontrolle diente eine Ponceaufärbung. Daten publiziert in [Goren et al., 2019]*

Die Ergebnisse der Proteinexpression von CSE und CBS zeigen Parallelen zu den Ergebnissen der mRNA-Analyse. Sowohl CSE als auch CBS zeigen eine starke Expression an Tag 13. Auffällig im Vergleich zu den mRNA-Daten ist jedoch die hohe Expression in der Kontrollhaut (Tag 0). Die hohe Proteinexpression der CSE und CBS ist möglicherweise durch die hohe Stabilität von Proteinen im Vergleich zur weniger stabilen mRNA zu erklären.

Die Analyse der Clp36 Proteinexpression zeigt im Gegensatz zur CSE und CBS keinerlei Regulierung im Laufe des Wundheilungsprozesses.

Aufgrund dieser ersten Analysen, wurden weitere Versuche mit $CSE^{-/-}$-Mäusen, jedoch nicht mit $Clp36^{-/-}$-Mäuse geplant.

4.3.1.3 *In-vivo*-Analyse des CSE-Knockouts

Da die Expression der CSE in Wildtyp-Mäusen an Tag 13 nach dem Setzen der Wunden am höchsten war, wurde zur Untersuchung des $CSE^{-/-}$-Modells ein Tierversuchsansatz gewählt, der die Gewinnung von Wundlysaten an Tag 11, 13 und 15 vorsah. Das Setzen der Wunde und die Entnahme der Proben wurde in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Itamar Goren aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank durchgeführt. 11, 13 und 15 Tage nach der Verwundung wurden die Tiere zunächst optisch auf Größenunterschiede des Wundareals untersucht. Dabei waren keine Unterschiede bezüglich einer beschleunigten oder verzögerten Wundheilung zusehen. Des Weiteren wurden Proben für histologische Färbungen, RNA- und Proteinanalysen entnommen. Die Probenentnahme für diese Untersuchungen erfolgte an Tieren, die zuvor durch eine Überdosis Isofluran getötet wurden. 3 Wunden wurden für histologische Untersuchungen fixiert, 3 weitere Wunden wurden halbiert und jeweils 3 Hälften für RNA- und Proteinanalysen eingefroren.

4.3.1.4 Protein- und RNA-Analyse der Wunden von Tag 11, 13 und 15

Aus den Wunden wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe einer qPCR analysiert. Die Gewinnung der Proteinextrakte fand durch Lyse in einem Homogenisierungspuffer statt. Eine Analyse erfolgte durch einen Western Blot. In allen Proben wurde die Expression der CSE, der CBS und der 3-MST untersucht (Abbildung 4.11).

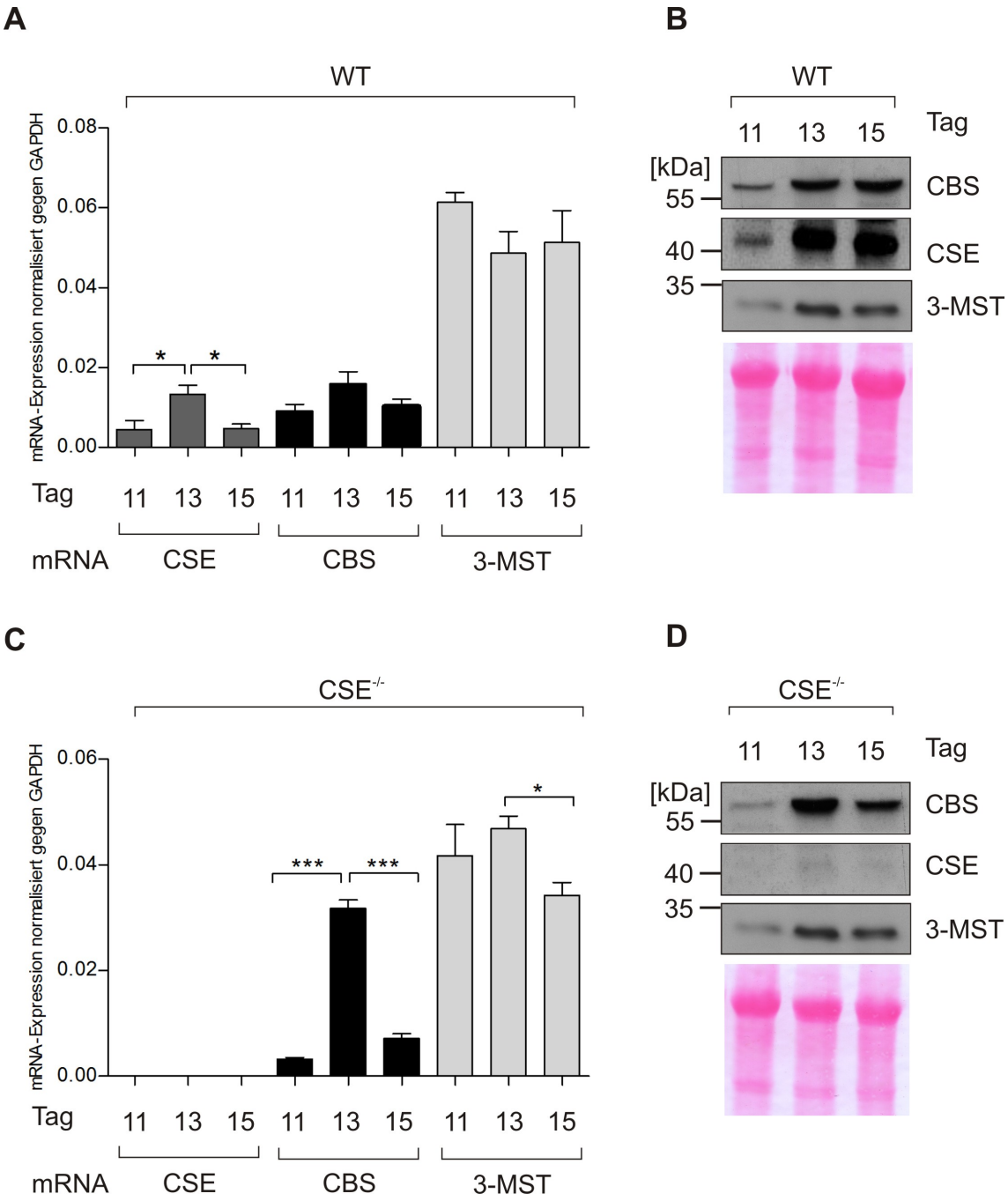

Abbildung 4.11: Protein- und mRNA-Expression an Tag 11, 13 und 15

Western Blot- und qPCR-Analyse von Wunden aus Wildtyp- und Knockout-Tieren an Tag 11, 13 und 15 nach Verwundung. mRNA-Expression von CSE, CBS und 3-MST in Wunden von WT-Tieren an Tag 11 (n=4), 13 (n=3) und 15 (n=4) ***(A)*** *und Wunden von CSE$^{-/-}$-Tieren an Tag 11 (n=4), 13 (n=3) und 15 (n=4)* ***(C)****. Die Mittelwerte ± SEM wurden gegen GAPDH normalisiert. * p<0,05 (unpaired t-Test im Vergleich zu Tag 13). Western Blot-Analyse vereinigter Wundlysate von WT-Tieren (Tag 11: n=4, Tag 13: n=3 und Tag 15: n=4)* ***(B)*** *und vereinigter Wundlysate von CSE$^{-/-}$-Tieren (Tag 11: n=4, Tag 13: n=3 und Tag 15: n=4)* ***(D)****. Als Ladekontrolle diente eine Ponceaufärbung. Daten publiziert in [Goren et al., 2019].*

Die Expression der CSE in Wunden von Wildtyp-Tieren zeigt im Vergleich zu Tag 11 und Tag 15 ein signifikantes Maximum an Tag 13 nach Verwundung (Abbildung 4.11 A). Die gleiche Tendenz wurde auch in der Analyse der CBS deutlich. Die Expression der 3-MST war im Vergleich zur CSE und CBS sehr hoch, zeigte jedoch kaum eine Regulierung im Verlauf der Wundheilung (Abbildung 4.11 A). Die Proteinexpression aller drei Enzyme ist an Tag 11 am geringsten und steigt ab Tag 13. Im Fall der 3-MST ist ein Maximum der Expression an Tag 13 zu sehen, an Tag 15 ist die Bande wieder etwas schwächer. Die Expression der Proteine CSE und CBS scheint an Tag 13 und 15 gleich stark zu sein (Abbildung 4.11 B). Die mRNA-Expression in Wunden von $CSE^{-/-}$-Tieren war wie erwartet keine CSE-Expression detektierbar. Die Auswertung der CBS ergab in den Knockout-Tieren im Gegensatz zu den Wildtypen signifikante Veränderungen. Es konnte ein deutliches Maximum an Tag 13 ermittelt werden (Abbildung 4.11 C). Der Vergleich der mRNA-Expression von Wildtyp- und Knockout-Mäusen zeigt, dass sich die CBS-Expression der Knockout-Mäuse an Tag 13 verdoppelt hat. Im Fall der 3-MST konnte lediglich eine signifikante Reduktion von Tag 13 auf Tag 15 beobachtet werden (Abbildung 4.11 C).
Die Western Blot-Analyse der Proteine von $CSE^{-/-}$-Tieren ergab wie erwartet keine messbare Expression der CSE. Die Analyse der CBS und 3-MST zeigt eine sehr schwache Bande an Tag 11, eine deutliche Steigerung der Intensität an Tag 13 und einen Rückgang der Intensität an Tag 15 (Abbildung 4.11 D).

4.3.1.5 Vergleichende RNA-Analyse von Haut und Wunde

Um den Unterschied der CSE, CBS und 3-MST mRNA-Expression von Wildtyp- und Knockout-Tieren zu vergleichen, wurde in einem anschließenden Experiment die mRNA der Kontrollen (extrahierte Haut an Tag 0) und der Wunden von Tag 13 isoliert. Die cDNA dieser Proben wurde mittels qPCR analysiert (Abbildung 4.12).

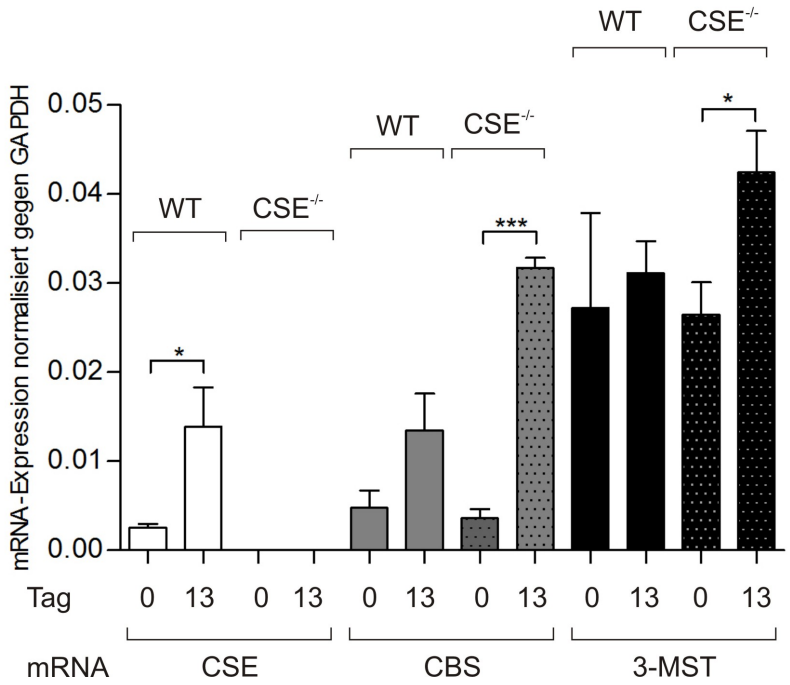

Abbildung 4.12: CSE, CBS und 3-MST mRNA-Expression in Wildtyp- und CSE$^{-/-}$-Mäusen

*qPCR-Analyse von CSE, CBS und 3-MST in Haut und Wunde. Darstellung der Mittelwerte ± SEM von n=3 WT- und n=4 KO-Tieren. Eine Normalisierung fand gegen GAPDH statt. * p<0,05; *** p<0,001 (unpaired t-Test). Daten publiziert in [Goren et al., 2019].*

Im Vergleich zur extrahierten Haut an Tag 0, ist an Tag 13 ein 4,6-facher Anstieg der mRNA-Expression der CSE zu sehen. Die mRNA-Expression der CBS ist in den Wunden der WT-Tiere tendenziell, aber nicht signifikant höher als die mRNA-Expression in der Kontrollhaut. In den Proben von Knockout-Tieren hingegen ist eine signifikante Steigung der CBS Expression um das 6,4-fache zu sehen. Die basale mRNA-Expression der 3-MST ist in WT-Tieren vergleichsweise hoch, jedoch konnte keine Regulation auf mRNA-Ebene festgestellt werden. In den Wunden von KO-Tieren hingegen steigt die mRNA-Expression um 52 % im Vergleich zur Expression in der Haut.

Diese Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass die Deletion der H_2S-produzierenden CSE zu einer kompensatorischen Hochregulierung der anderen beiden H_2S-produzierenden Enzyme, der CBS und der 3-MST führt. Anhand der Ergebnisse scheint insbesondere die CBS den Verlust der CSE zu kompensieren.

Um die Auswirkungen der Depletion der CSE auf histologischer Ebene zu untersuchen, wurden Azan-Färbungen der extrahierten Wunden aus Wildtyp- und Knockout-Mäusen miteinander verglichen.

4.3.1.6 Azan-Übersichtsfärbung von Wunden aus Wildtyp- und CSE$^{-/-}$-Tieren

Um eventuelle histologische Unterschiede in den Wunden der Tiere sehen zu können, wurden die in PFA fixierten Gewebeproben in Paraffin eingebettet und Azan-Färbungen von 3 µm dünnen Schnitten angefertigt.

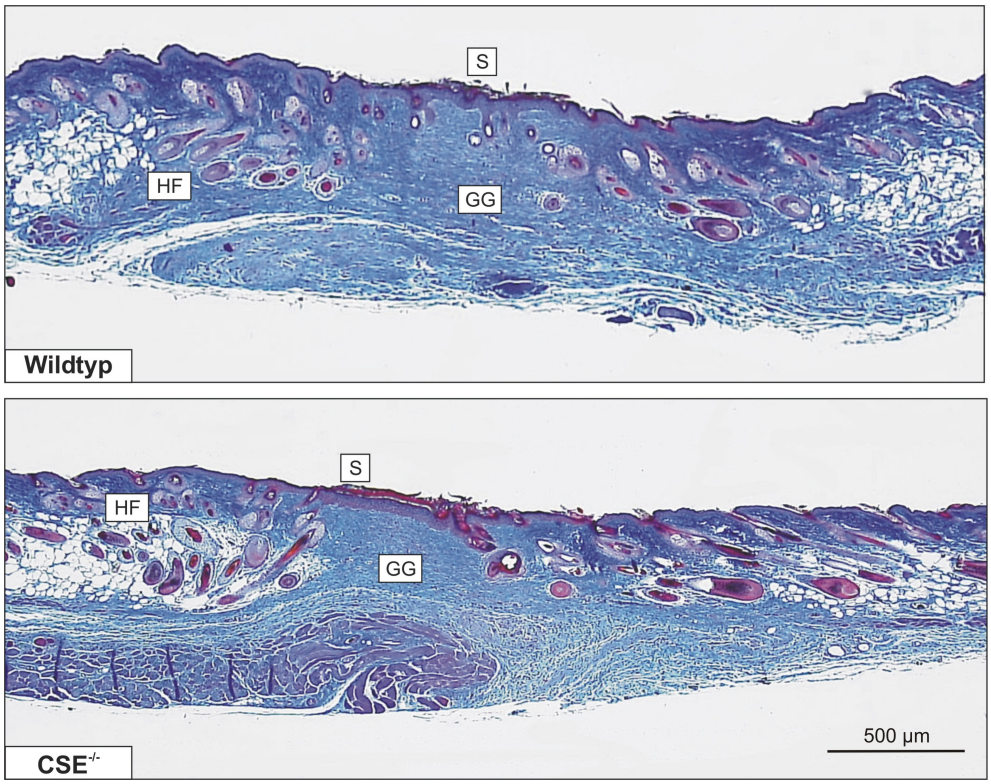

Abbildung 4.13: Azan-Färbung 13 Tage alter Wunden von Wildtyp- und CSE$^{-/-}$-Mäusen

Repräsentative Übersichtsfärbung einer 13 Tage alten Wunden von Wildtyp- und CSE$^{-/-}$-Mäusen. S: Wundschorf (rötlich-violett); GG: Granulationsgewebe (blau); HF: Haarfollikel (rötlich-violett).

Anhand der Übersichtsfärbung sind keine histologischen Unterschiede zu erkennen (Abbildung 4.13). Sowohl in WT- als auch in KO-Tieren ist lediglich noch ein dünner Wundschorf zu sehen, so dass es keinen Hinweis auf eine zeitliche Verzögerung oder Beschleunigung der Wundheilung durch die Deletion der CSE gibt.
Um die Expression der CSE im Gewebe analysieren zu können, wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt.

4.3.1.7 Immunhistochemische Analyse von Wunden aus Wildtyp- und CSE$^{-/-}$-Tieren

In einer immunhistochemischen Färbungen sollte die genaue Lokalisierung der CSE in der Wunde untersucht werden. Dazu wurden in PFA fixierte und in Paraffin eingebettete Proben verwendet. Neben Wundschnitten des Wildtyps wurden auch Proben von CSE$^{-/-}$-Tieren gefärbt. Diese Färbung diente als Negativkontrolle, um unspezifische Signale identifizieren zu können (Abbildung 4.14).

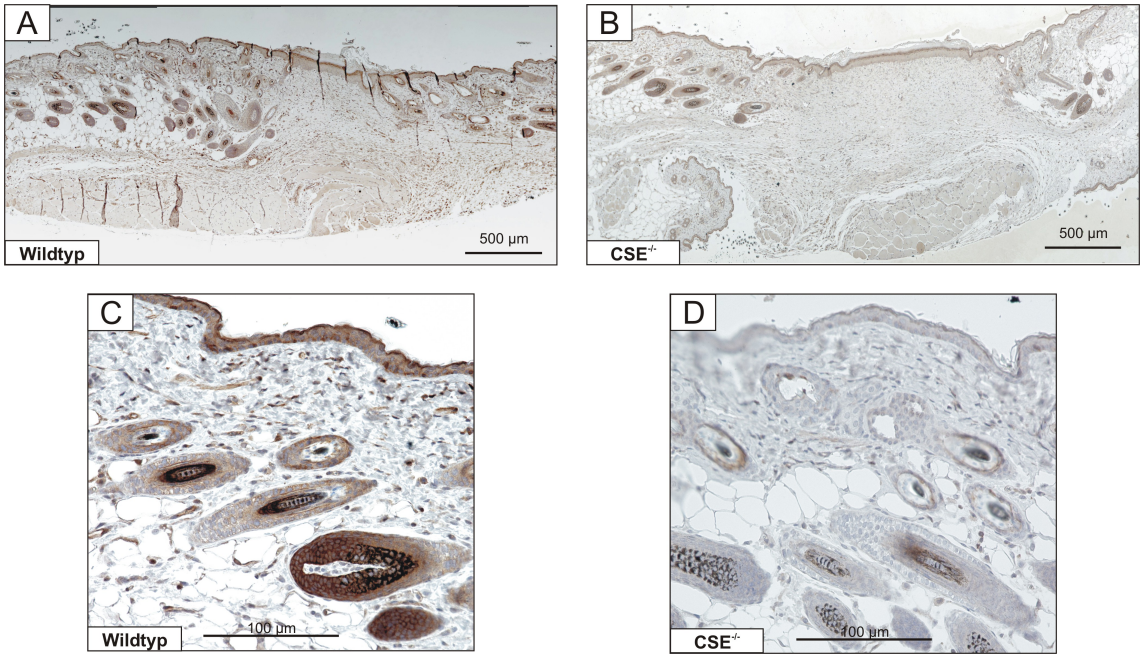

Abbildung 4.14: Immunhistochemische Färbung der CSE in Wunden von WT- und CSE$^{-/-}$-Mäusen.

Repräsentative CSE-Färbung 13 Tage alter Wunden. Wundübersicht einer WT-Maus ***(A)*** *und einer CSE$^{-/-}$-Maus* ***(B)****. Vergrößerter Bildausschnitt von Haarfollikeln und Epidermis einer WT-Maus* ***(C)*** *und einer CSE$^{-/-}$-Maus* ***(D)****.*

Die Färbung der CSE in Wunden von CSE$^{-/-}$-Tieren diente in diesem Versuch als Negativkontrolle für unspezifische Färbungen. Die Färbungen der CSE in Wunden von WT-Tieren zeigt im Vergleich zur Färbung in Wunden von KO-Tieren deutlich, dass die CSE insbesondere in der Epidermis und den Haarfollikeln exprimiert wird (Abbildung 4.14 A). Noch deutlicher wird diese Lokalisierung in der Vergrößerung (Abbildung 4.14 C).

Weitere immunhistochemische Färbungen der CBS in WT und CSE$^{-/-}$ wurden angefertigt, um einen möglichen kompensatorischen Effekt der CBS auch histologisch darzustellen

können (Abbildung 4.15).

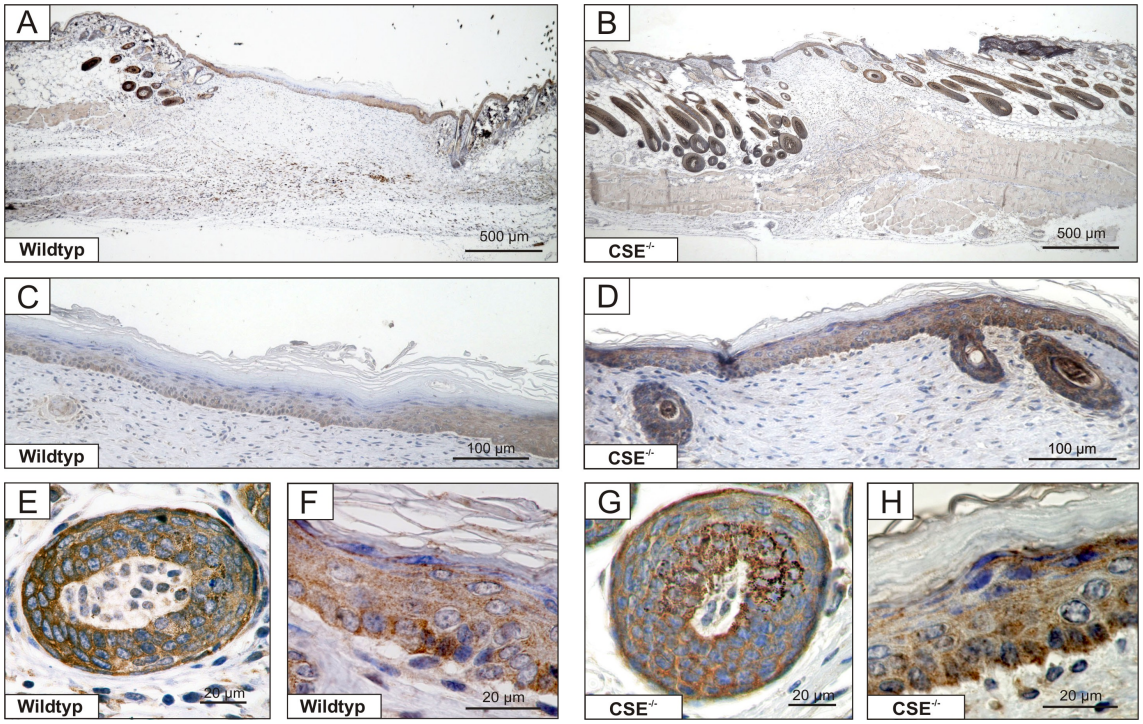

Abbildung 4.15: Immunhistochemische Färbung der CBS in Wunden von WT- und CSE$^{-/-}$-Mäusen.

Repräsentative Abbildung einer CBS-Färbung 13 Tage alter Wunden. Wundübersicht einer WT-Maus ***(A)*** *und einer CSE$^{-/-}$-Maus* ***(B)****. 20-fache Vergrößerung des neugebildeten Epithels einer WT-Maus* ***(C)*** *und einer CSE$^{-/-}$-Maus* ***(D)****. 100-fache Vergrößerung eines Haarfollikels einer WT-Maus* ***(E)*** *und einer CSE$^{-/-}$-Maus* ***(G)****. 100-fache Vergrößerung des neugebildeten Epithels einer WT-Maus* ***(F)*** *und einer CSE$^{-/-}$-Maus* ***(H)****.*

Weder in der Übersicht der Wunde (Abbildung 4.15 A+B), noch in den Vergrößerungen eines Haarfollikels (Abbildung 4.15 E+G) oder der Epidermis (Abbildung 4.15 F+H) konnten deutliche Unterschiede zwischen den Wunden von Wildtyp- und CSE$^{-/-}$-Tieren beobachtet werden. Lediglich in der Mitte des neugebildeten Epithels (Abbildung 4.15 C+D) konnte im Knockout eine intensivere Färbung der CBS beobachtet werden.

Für die folgenden Zellkulturexperimente, in denen die Funktion der CSE und CBS im Verlauf der Wundheilung genauer untersucht werden sollten, wurden HaCaT-Zellen (*Human adult low Calcium high Temperature Keratinocytes*) verwendet, da in immunhistochemischen Untersuchungen die stärkste Expression der CSE und CBS in Keratinozyten zu beobachten war.

4.3.2 Analyse der CBS und CSE Expression in humanen Keratinozyten

Um zu untersuchen, ob die Enzyme CSE und CBS in die HaCaT-Differenzierung involviert sind, wurden HaCaT-Zellen ausgelegt und über einen Zeitraum von 10 Tagen in regelmäßigen Abständen (Tag 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10) mRNA- und Proteinextrakte isoliert. HaCaT-Zellen benötigen zur vollständigen Differenzierung zum einen Kontakt zu den Nachbarzellen und zum anderen einen Anstieg der Calcium-Konzentration von 1,8 mM auf 3,8 mM.
Die unterschiedlichen Phasen der Keratinozytendifferenzierung lassen sich durch die Expression verschiedener Differenzierungsmarker darstellen. In den folgenden Experimenten wurden Cytokeratin 10 (K10) für die frühe und Involucrin (IVL) für die spätere Differenzierung als Marker gewählt. Des Weiteren wurde die Expression der CSE und CBS untersucht. Die Analyse der 3-MST wurde nicht weiter verfolgt, da ihre Rolle aufgrund der geringen Expressionsveränderungen im Verlauf der Wundheilung als vergleichsweise gering angesehen wurde.

4.3.2.1 RNA-Analyse von HaCaT-Zellen hinsichtlich der Expression von Differenzierungsmarkern sowie CBS und CSE

Die Expressionen von K10, IVL, CSE und CBS wurden durch den Einsatz spezifischer Sonden in einer qPCR analysiert und die Daten gegen RPLP0 (*Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0* normalisiert (Abbildung 4.16).

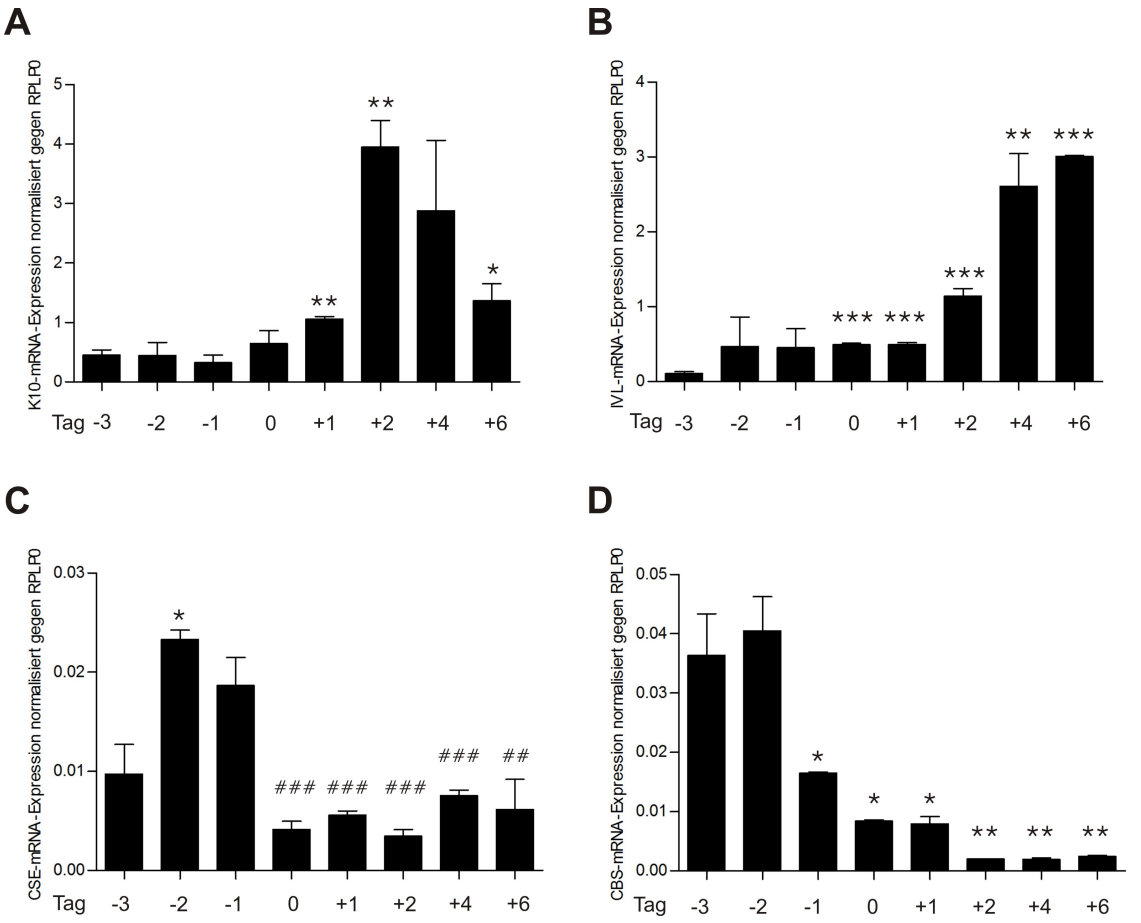

Abbildung 4.16: K10, IVL, CSE und CBS mRNA-Expression im Laufe der HaCaT-Differenzierung

Analyse der mRNA-Expression von K10 ***(A)****, IVL* ***(B)****, CSE* ***(C)*** *und CBS* ***(D)*** *in HaCaT-Zellen. Tag 0: konfluente Zelldichte, + 2 mM $CaCl_2$. Eine Normalisierung fand gegen RPLP0 statt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus 3 unabhängigen Experimenten. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (unpaired t-Test im Vergleich zu Tag -3). ## p<0,01; ### p<0,001 (unpaired t-Test im Vergleich zu Tag -2).*

Die mRNA-Expression von K10 zeigt einen ersten signifikanten Anstieg an Tag +1, dem ersten Tag an dem die Zellen durch Dichte und Calcium-Stimulation vollständig differenziert waren (Abbildung 4.16 A). Eine erneute Steigerung der mRNA-Expression kann an Tag +2 beobachtet werden. Die K10-Expression nimmt an den folgenden Tagen wieder deutlich ab, ist jedoch immer noch höher als vor der Differenzierung. Die mRNA-Expression von Involucrin zeigt eine erste signifikante Erhöhung an Tag 0 (Abbildung 4.16 B). Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen durch den vorhandenen Zell-Zell-Kontakt bereits teilweise differenziert. Vergleicht man die Expressionsmuster von K10 und Involucrin ist deutlich zu sehen, dass der Anstieg der Expression des späten Differenzierungsmarkers Involucrin zeitlich dem Anstieg des frühen Differenzierungsmarkers K10 folgt. Die CSE-mRNA-

Expression ist an Tag -3 sehr gering (Abbildung 4.16 C). Ihr Expressionsmaximum liegt an Tag -2. Mit dem eingeleiteten Differenzierungsprozess an Tag 0 nimmt die mRNA-Expression der CSE signifikant ab. Ein ähnlicher Verlauf ist auch bei der Expression der CBS zu sehen (Abbildung 4.16 D). Hier liegt das Maximum der mRNA-Expression ebenfalls an Tag -2. Bereits vor Einsetzen der Differenzierung kommt es mit zunehmender Zelldichte zu einer signifikanten Reduzierung der CBS-mRNA-Expression.
Neben Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene wurden ebenfalls Analysen auf Proteinebene durchgeführt.

4.3.2.2 Proteinanalyse von HaCaT-Zellen

Um zu untersuchen, ob eine Regulation von CSE und CBS auch auf Proteinebene erfolgt, wurden HaCaT-Zellen über einen Zeitraum von 10 Tagen kultiviert und in regelmäßigen Abständen Proteinlysate hergestellt. Die Proteine wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Abbildung 4.17).

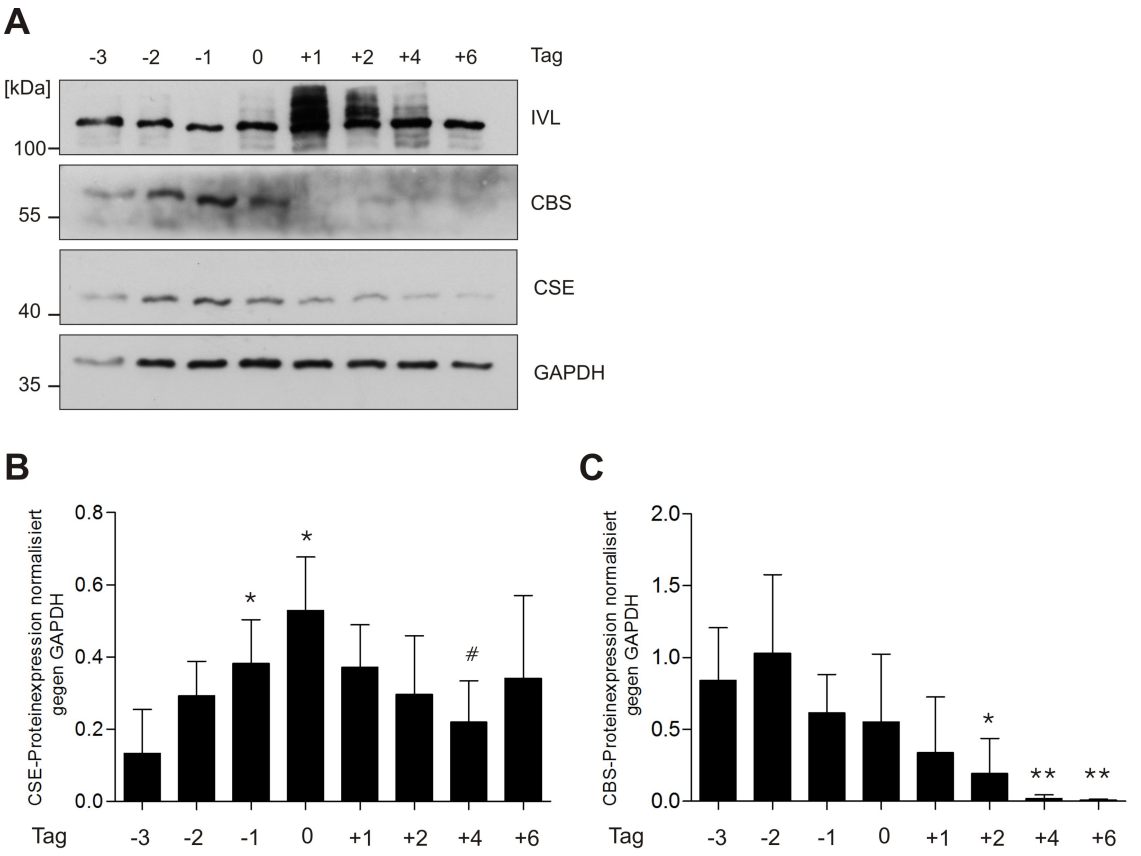

Abbildung 4.17: Proteinexpression im Laufe der HaCaT-Differenzierung

Western Blot-Analyse der Proteinexpression von IVL, CSE und CBS in HaCaT-Zellen ***(A)****. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Tag 0: konfluente Zelldichte, + 2 mM $CaCl_2$. Quantitative Auswertung der CSE-Proteinexpression (n=3)* ***(B)*** *und CBS-Proteinexpression (n=3)* ***(C)****. * p<0,05; ** p<0,01 (unpaired t-Test im Vergleich zu Tag -3); # p<0,05 (unpaired t-Test im Vergleich zu Tag 0)*

Deutlich zu sehen ist die Änderung des Expressionsmusters von IVL an Tag +1. An diesem Tag fand die erste Probenentnahme nach Calcium-Stimulation statt. Wie bei den mRNA-Daten kommt es mit Einsetzen der Differenzierung zu einer Reduktion der CSE-Proteinexpression. Noch deutlicher wird die Herunterregulierung im Fall der CBS. Mit Eintreten der Differenzierung ist keinerlei CBS-Expression mehr detektierbar. Die quantitative Auswertung der CSE-Expression zeigt zunächst einen signifikanten Anstieg der Expression bis zu Tag 0 (Abbildung 4.17 B). Ab Tag 0 sinkt die Expression der CSE zunehmend und erreicht an Tag +4 eine signifikante Reduktion. Die quantitative Analyse der CBS-Expression zeigt eine hohe Expression an den ersten Tagen, bevor der Differenzierungsprozess eingeleitet wurde. Mit Einsetzen der Differenzierung nimmt die Expression der CBS deutlich ab und ist bereits an Tag +2 deutlich reduziert (Abbildung 4.17 C).

Um zu überprüfen, dass die Beobachtungen aus den vorhergehenden Experimenten nicht auf eine Calcium-abhängige Regulation der CSE und CBS zurückzuführen sind und um den Einfluss von Calcium auf die Differenzierung von Keratinozyten zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression der CSE, CBS, K10 und IVL ohne eine zusätzliche Calcium-Stimulation analysiert (Abbildung 4.18).

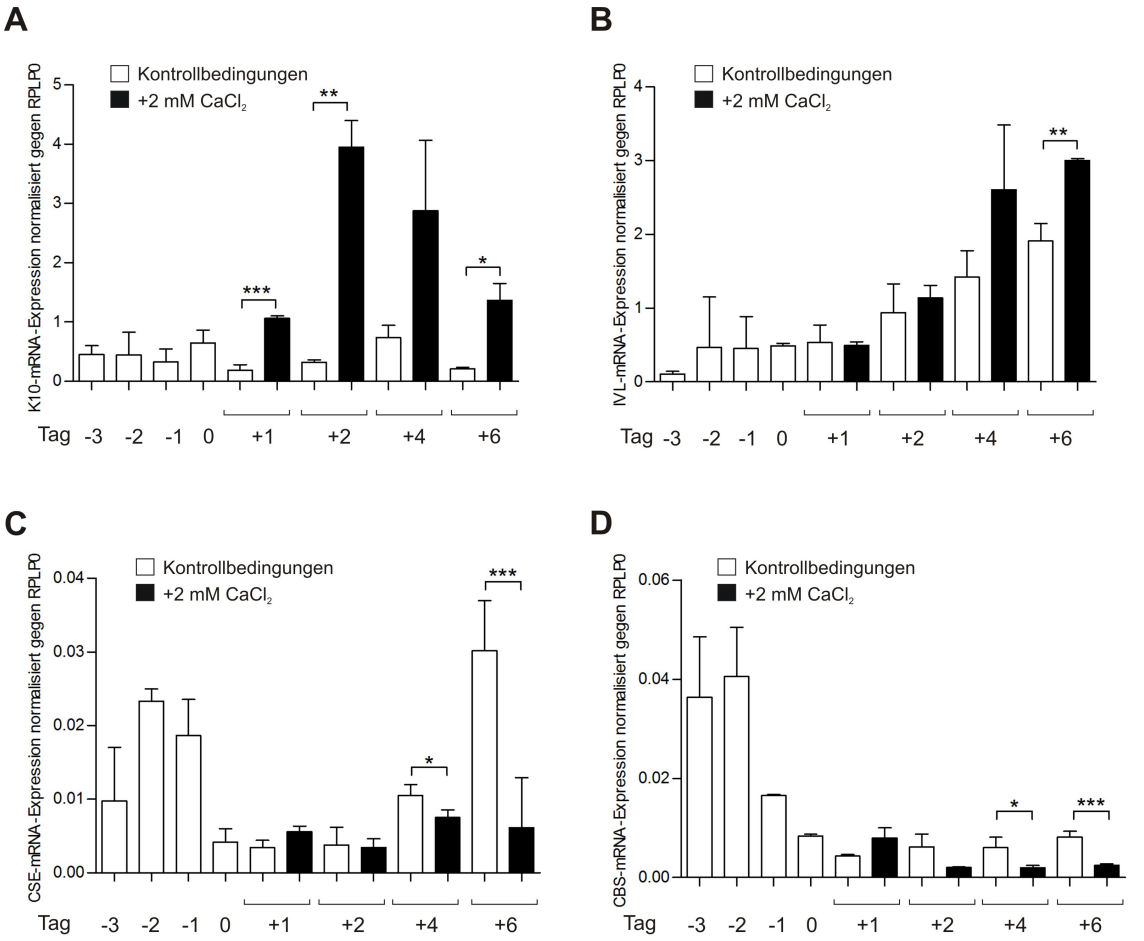

Abbildung 4.18: Einfluss von Calcium auf die mRNA-Expression von K10, Involucrin, CSE und CBS

Analyse der mRNA-Expression von K10 ***(A)****, IVL* ***(B)****, CSE* ***(C)*** *und CBS* ***(D)*** *in HaCaT-Zellen mit und ohne zusätzliche $CaCl_2$-Stimulation. Tag 0: konfluente Zelldichte, + 2 mM $CaCl_2$. Eine Normalisierung fand gegen RPLP0 statt. Dargestellt wurden die Mittelwerte ± SD aus mind. 3 unabhängigen Experimenten. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (unpaired t-Test).*

Deutlich zu sehen ist eine Calcium-abhängige Steigerung der mRNA-Expression von K10 und Involucrin. Insbesondere auf den frühen Differenzierungsmarker K10 hat Calcium einen starken Einfluss (Abbildung 4.18 A). Bei dem späten Differenzierungsmarker Involucrin ist ebenfalls eine Steigerung durch Calcium zu beobachten. Hier scheint jedoch die Expression bereits durch die Zelldichte erhöht (Abbildung 4.18 B). Die CSE-mRNA-

Expression zeigt zunächst nur eine geringe Reaktion auf die Calciumerhöhung, an Tag +6 ist jedoch eine starke Hemmung der mRNA-Expression durch die $CaCl_2$-Stimulation zu beobachten (Abbildung 4.18 C). An diesem Tag steigt die Expression der CSE ohne $CaCl_2$ deutlich an. Ein solcher Anstieg ist in $CaCl_2$-stimulierten Zellen nicht zu beobachten. Die Expression der CSE wird durch die Behandlung mit $CaCl_2$ bzw. dem Einsetzen der Differenzierung unterdrückt. Einen ähnlichen Einfluss hat Calcium auf die mRNA-Expression der CBS. Die Expression der CBS wird nur in geringem Maße durch Calcium inhibiert. Auch hier kommt es in Folge der Differenzierung zu einer Herunterregulierung der mRNA-Expression (Abbildung 4.18 D).
Da sowohl die Protein- als auch die mRNA-Expression beider H_2S-produzierenden Enzyme im Laufe des Differenzierungsprozess von Keratinozyten reguliert werden, wurde in folgenden Experimenten der Einfluss des H_2S-Donors GYY4137 auf die Differenzierung untersucht.

4.3.2.3 mRNA-Analyse GYY4137-stimulierter HaCaT-Zellen

Um den Einfluss von H_2S auf die Differenzierung von HaCaT-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem exogenen H_2S-Donor GYY4137 behandelt und die mRNA-Expression der unbehandelten und behandelten Zellen durch qPCR analysiert (Abbildung 4.19).

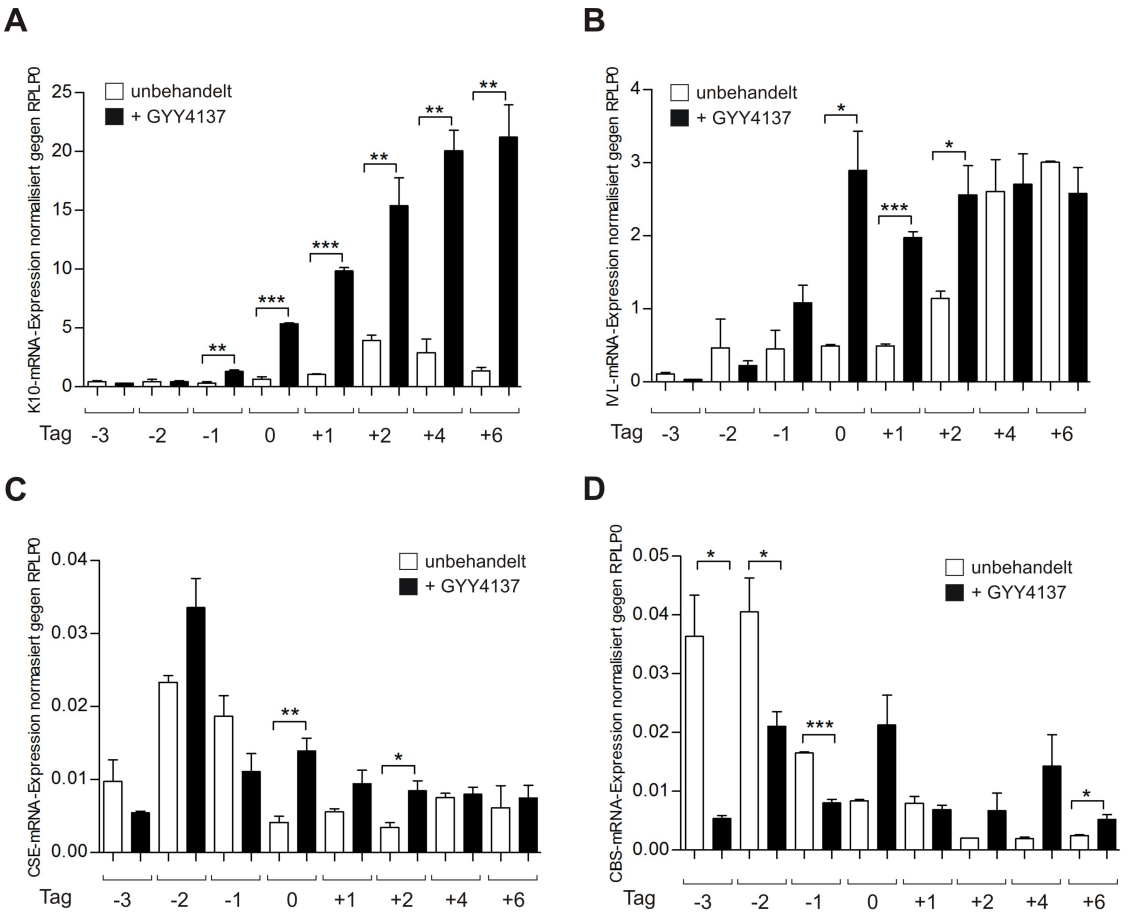

Abbildung 4.19: K10-, IVL-, CSE- und CBS-mRNA-Expression nach GYY4137-Behandlung

Analyse der mRNA-Expression von K10 ***(A)****, IVL* ***(B)****, CSE* ***(C)*** *und CBS* ***(D)*** *in HaCaT-Zellen ohne und mit täglicher GYY4137-Stimulation [400 µM]. Tag 0: konfluente Zelldichte, + 2 mM $CaCl_2$. Die Normalisierung wurde gegen RPLP0 durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus mind. 3 unabhängigen Experimenten. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (unpaired t-Test). Daten publiziert in [Goren et al., 2019].*

Abbildung 4.19 A zeigt deutlich, dass durch die Behandlung mit GYY4137 die mRNA-Expression von K10 bereits ab Tag -1, also vor der Stimulation mit Calcium, erhöht ist. In den behandelten Zellen nimmt die Menge der K10-mRNA stetig zu. Dieser Anstieg ist auch dann noch zu erkennen, wenn bei den unbehandelten Zellen bereits ein Rückgang der Expression gemessen wurde (Tag +4). Im Allgemeinen konnte durch GYY4137 eine deutliche Steigerung der K10 mRNA-Expression, bis hin zu einer 15-fachen Erhöhung an Tag +6, erreicht werden. Die Expression von Involucrin zeigt durch die Behandlung mit GYY4137 ebenfalls eine Erhöhung (Abbildung 4.19 B). Auch hier wird deutlich, dass die Expression nicht nur höher ist, sondern auch zeitlich früher einsetzt. Ab Tag +4 sind die mRNA-Spiegel von unbehandelten und behandelten Zellen gleich.

Die CSE-Expression zeigt an den ersten Tagen eine tendenzielle Beeinflussung durch

GYY4137, jedoch war diese nicht signifikant (Abbildung 4.19 C). Erst an Tag 0 konnte eine deutliche und statistisch signifikante Erhöhung der Expression der CSE beobachtet werden. Im weiteren Zeitverlauf bewirkt GYY4137 jedoch keine Änderung der CSE-Expression. Im Fall der CBS scheint GYY4137 zunächst eine Herunterregulierung der mRNA-Expression hervorzurufen, gegen Ende der Kinetik kommt es jedoch wie bei der CSE zu einer Erhöhung der Expression.
Der Einfluss von GYY4237 der in diesem Experiment auf der mRNA-Ebene gezeigt wurde, wurde ebenfalls auf Proteinebene überprüft.

4.3.2.4 Proteinanalyse GYY4137 stimulierter HaCaT-Zellen

Um den Einfluss von GYY4137 auch auf Proteinebene zu untersuchen wurden Zelllysate von unbehandelten und mit GYY4137 behandelten HaCaT-Zellen immunologisch analysiert (Abbildung 4.20).

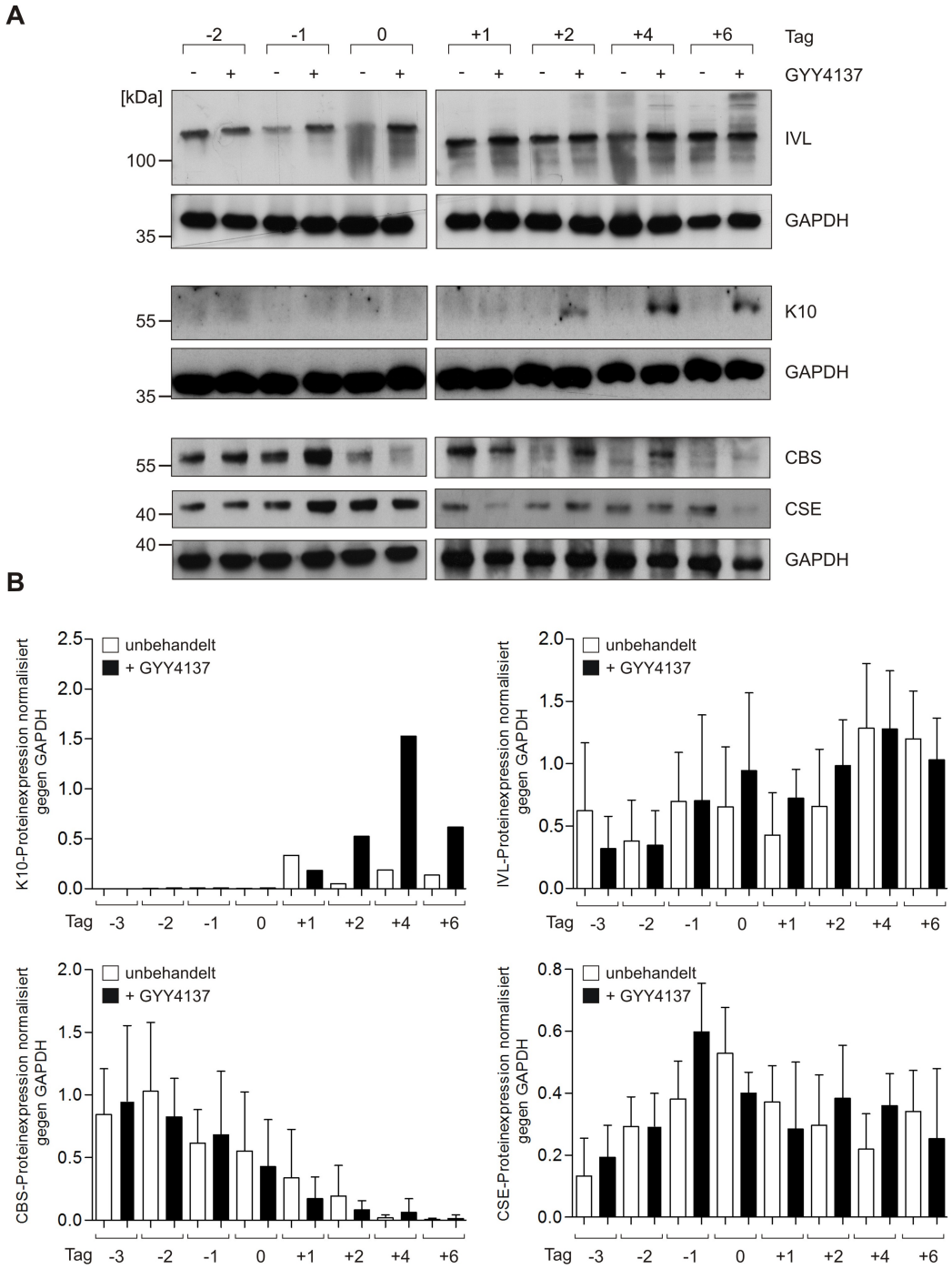

Abbildung 4.20: K10-, IVL-, CSE- und CBS-Proteinexpression nach GYY4137-Behandlung

Western Blot-Analyse der Proteinexpression von IVL, K10, CSE und CBS in HaCaT-Zellen ohne und mit täglicher GYY4137-Stimulation [400 µM]. Als Ladekontrolle diente GAPDH ***(A)****. Tag 0: konfluente Zelldichte, + 2 mM $CaCl_2$.Auswertung der Proteinexpression von IVL (n=4), K10 (n=2), CSE (n=4) und CBS (n=4)* ***(B)****. Daten publiziert in [Goren et al., 2019].*

Die Involucrin-Proteinexpression zeigt insbesondere an Tag -1 und 0 eine Veränderung durch die Behandlung mit GYY4137 (Abbildung 4.20 A). An diesen Tagen ist bei den

unbehandelten Zellen nur eine schwache Bande zu sehen, während durch GYY4137 eine Steigerung der Intensität hervorgerufen wird. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass der Differenzierungsprozess durch GYY4137 frühzeitig eingeleitet wird. An den späteren Tagen ist wie auch auf mRNA-Ebene kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zu sehen. Die Quantifizierung der IVL-Proteinexpression zeigt eine GYY4137-abhängige tendenzielle Erhöhung an den Tagen 0, +1 und +2 (Abbildung 4.20 B).
Die Analyse von K10 auf Proteinebene zeigt ab Tag +1 bei längerer Exposition eine schwache Bande bei den stimulierten Zellen (Abbildung 4.20 A). Die unbehandelten Zellen zeigen hingegen keine Expression von K10. Scheinbar liegt die Menge des Proteins in diesen Zellen unter der Detektionsgrenze des Antikörpers. Da die Proteinexpression von K10 wie auch auf mRNA-Ebene durch GYY4137 gesteigert werden konnte, ist in diesen Zellen eine Detektion des frühen Differenzierungsmarkers möglich. Die Quantifizierung der K10-Proteinexpression zeigt eine eindeutige Tendenz, dass GYY4137 eine Steigerung der K10-Expression auslöst (Abbildung 4.20 B).
Die Expression der CBS- und CSE an den ersten Tagen scheint in beiden Fällen nicht oder nur kaum durch GYY4137 beeinflusst zu werden (Abbildung 4.20 A). An Tag 0 ist die CBS-Expression der unbehandelten Zellen sehr gering. Bis auf einen Wert an Tag +1 ist in den unbehandelten Zellen ab diesem Tag kaum noch eine Expression der CBS detektierbar. Die Behandlung durch GYY4137 zeigt eine Stabilisierung der CBS, welche sich jedoch in einer quantitativen Analyse als nicht signifikant erwies (Abbildung 4.20 B). Die CSE-Proteinexpression lässt keine klare Regulation erkennen. An Tag -1 ist das Signal der stimulierten Zellen stärker, während es zu späteren Zeitpunkten tendenziell schwächer oder gleich stark ist (Abbildung 4.20 A). Auch hier zeigt die quantitative Auswertung keine GYY4137-abhängigen Veränderungen (Abbildung 4.20 B).

4.3.2.5 Zytotoxizitätsanalyse

Um die beobachtete Regulation durch GYY4137 tatsächlich auf die Freisetzung von H_2S zurückführen und toxische Effekte auszuschließen zu können, wurde ein Zytotoxizitäts-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die Zellen wie auch für die mRNA- und Proteinanalysen über einen Zeitrau von 10 Tagen mit 400 µM GYY4137 behandelt. Für die Bestimmung der Zytotoxizität wurden die Zellen an Tag 10 mit MTT gefärbt und im Anschluss deren Absorption bestimmt (Abbildung 4.21).

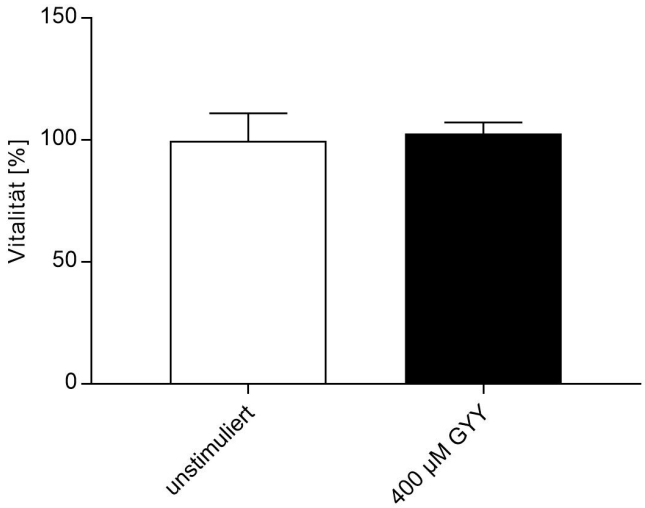

Abbildung 4.21: Untersuchung der Zytotoxizität von GYY4137

MTT-Test zur Bestimmung der Toxizität von GYY4137 [400 µM] auf HaCaT-Zellen. Als Kontrolle dienten unbehandelte HaCaT-Zellen.

Der MTT-Test zeigte eindeutig, dass GYY4137 in einer Konzentration von 400 µM keine toxischen Effekte auf die Zellen hat (Abbildung 4.21). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die zuvor beschriebenen Effekte nach der Behandlung mit GYY4137, auf toxische Effekte des H_2S-Donors zurückzuführen sind.
Neben GYY4137 wurde Na_2S_4 als weiterer H_2S-Donor für die Stimulation von HaCaT-Zellen verwendet.

4.3.2.6 mRNA-Analyse Na_2S_4-behandelter HaCaT-Zellen

Da in Versuchen innerhalb der Arbeitsgruppe der exogene Polysulfid-Donor Na_2S_4 bei der Bildung von Persulfiden effektiver war als GYY4137 [Longen et al., 2016], wurde auch die Wirkung von Na_2S_4 auf die mRNA-Expression in HaCaT-Zellen analysiert. Im Gegensatz zu GYY4137-behandelten Zellen, bei denen die mRNA-Isolation vier Stunden nach der Stimulation erfolgte, wurden die mRNA der Na_2S_4-behandelten Zellen bereits eine halbe Stunde nach der Stimulation isoliert, da es bei diesem Donor zu einer deutlich schnelleren H_2S-Freisetzung kommt. Auch in diesem Fall wurde die Expression von K10, IVL, CSE und CBS analysiert (Abbildung 4.22).

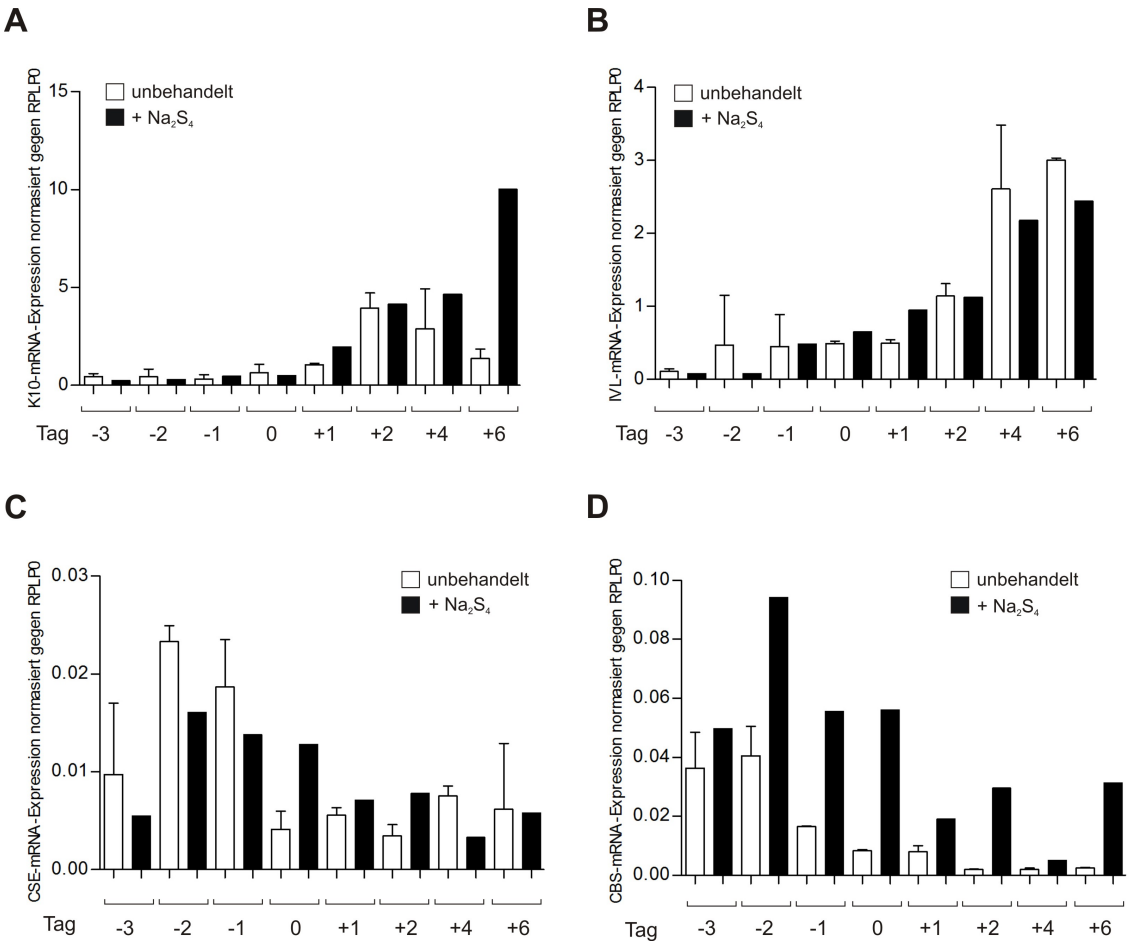

Abbildung 4.22: K10-, IVL-, CSE- und CBS-mRNA-Expression nach Na_2S_4-Behandlung

Analyse der mRNA-Expression von K10 ***(A)****, IVL* ***(B)****, CSE* ***(C)*** *und CBS* ***(D)*** *in HaCaT-Zellen ohne und mit täglicher Na_2S_4-Stimulation [50 µM]. Tag 0: konfluente Zelldichte, + 2 mM $CaCl_2$. Die Normalisierung wurde gegen RPLP0 durchgeführt. Analysiert wurden n=1 Experimente mit Na_2S_4 behandelten Zellen und $n \geq 3$ Experimente mit unbehandelten Zellen.*

Die mRNA-Analyse der beiden Differenzierungsmarker K10 und Involucrin lässt vermuten, dass die Behandlung mit Na_2S_4 lediglich eine Auswirkung auf die Expression von K10 hat (Abbildung 4.22 A). Dieser Effekt macht sich jedoch auch erst an Tag +6 in einem Anstieg der mRNA-Expression bemerkbar. Im Vergleich dazu führte eine Behandlung mit GYY4137 bereits an Tag -1 zu einer Expressionserhöhung von K10. An den übrigen Tagen war kein Unterschied zwischen unbehandelten und behandelten Zellen feststellbar. Der Effekt von Na_2S_4 auf die CSE-Expression war vergleichbar mit dem von GYY4137 (Abbildung 4.22 C). Lediglich bei der CBS-Expression konnte durch Na_2S_4 über den gesamten Zeitraum eine Erhöhung der mRNA-Expression festgestellt werden (Abbildung 4.22 D). Eine Stimulation mit GYY4137 scheint im Vergleich zur Stimulation mit Na_2S_4

deutlichere Effekte auf die Differenzierung von HaCaT-Zellen zu haben.

4.3.2.7 Überexpression der Cystathionin-γ-Lyase in HaCaT-Zellen

Alle bisherigen Versuche zur Stimulation der HaCaT-Differenzierung basierten auf einer exogenen Gabe von H_2S. Um auch den endogenen Einfluss von H_2S zu untersuchen und die bisherigen Ergebnisse zu untermauern, wurden stabile CSE-überexprimierende Zelllinien generiert. Gegenüber einer transienten Transfektion mit einem CSE-überexprimierenden Plasmid, hat eine stabile Transfektion den Vorteil, dass jede Zelle das Plasmid trägt und nicht nur ein geringer Prozentsatz. Nach erfolgreicher Klonierung des pCMVhs-CSE-Flag-Plasmides, erfolgte eine stabile Transfektion in HaCaT-Zellen. Zunächst konnten vier Zelllinien auf diese Weise generiert werden, die alle zur Kontrolle der Überexpression mit Hilfe eines Western Blots analysiert wurden. Da der Nachweis des Flag-Markierung in HaCaT-Zellen schwierig ist, wurde zunächst die Proteinexpression der CSE betrachtet. Außerdem wurde eine Immunpräzipitation mit Flag-*Beads* durchgeführt. Die Analyse der CSE-Proteinexpression erfolgte in 4 überexprimierenden Zelllinien. Für weitere Versuche standen lediglich 3 von 4 Zelllinien zur Verfügung, da eine der Zelllinien (ZL 2) im Laufe der Zeit nicht mehr passagiert werden konnte. So wurde die Flag-IP mit den Zelllinien 1, 3 und 4 durchgeführt. Zur Verifizierung dieser Daten wurde zusätzlich ein Nachweis der Flag-Sequenz auf RNA-Ebene durchgeführt (Abbildung 4.23).

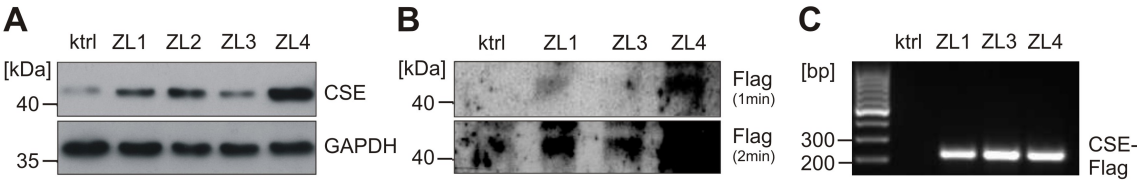

Abbildung 4.23: Überprüfung der CSE-überexprimierenden Zelllinien

Western Blot vier CSE-überexprimierender Zelllinien. Als Ladekontrolle diente GAPDH ***(A)****. Western Blot der Flag-IP von Zelllinie 1, 3 und 4. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Flag-Antikörpers* ***(B)****. PCR der CSE-Flag-PCR von Zelllinien 1, 3 und 4* ***(C)****. Als Negativkontrolle (ktrl.) diente der Vektor pCMV-Flag-N3 (ohne CSE).*

Der Western Blot zeigt eine Erhöhung der CSE-Expression in allen vier überexprimierenden Zelllinien. Bezüglich der Intensität der Überexpression kann in Zelllinie 3 lediglich eine

sehr geringe Erhöhung der CSE-Expression beobachtet werden. Zelllinie 1 und 2 zeigen eine deutliche Erhöhung der CSE-Proteinexpression. Die größte Intensitätssteigerung konnte jedoch mit Zelllinie 4 erreicht werden (Abbildung 4.23 A). Das Ergebnis der Flag-IP bestätigte die Resultate der CSE-Proteinanalyse. Auch hier ist die geringste Intensität in Zelllinie 3, eine stärkere Intensität in Zelllinie 1 und die höchste Intensität in Zelllinie 4 zu sehen (Abbildung 4.23 B). Die Analyse des CSE-Flag-Fusionsproteins zeigt auf RNA-Ebene keine Unterschiede zwischen den drei überexprimierenden Zelllinien. Dass mit den gewählten Oligonukleotiden in allen Zelllinien mRNA nachweisbar war beweist jedoch, dass im Vergleich zur Kontrolle, sowohl eine CSE- als auch eine Flag-Sequenz vorhanden ist (Abbildung 4.23 C).
Nachdem die Existenz des CSE-überexprimierenden Plasmids gezeigt werden konnte, sollte auch dessen Einfluss auf die Zelle untersucht werden.

4.3.2.8 Einfluss von H_2S auf die Proliferation von HaCaT-Zellen

Um zu untersuchen, ob H_2S die Proliferation von HaCaT-Zellen beeinflusst, wurden Proliferationsanalysen nach dem Prinzip des [Methyl-^{3}H]-Thymidin-Einbaus durchgeführt. Dazu wurden zunächst die CSE-überexprimierenden Zelllinien im Vergleich zu einer Negativkontrolle (pCMV-Flag-N3 ohne CSE) untersucht. Im Vergleich zur Negativkontrolle wiesen alle drei CSE-Flag Zelllinien eine deutlich geringere Proliferationsrate auf (Abbildung 4.24 A). Die deutlichsten Effekte konnten mit Zelllinie 1 und 4 erzielt werden, dort kam es zu einer Beeinträchtigung der Proliferation um rund 50 %.
Neben dem Einfluss von endogenem H_2S auf die Zellproliferation wurde auch der Effekt von exogenem H_2S in Form einer GYY4137-Behandlung analysiert. Dazu wurden untransfizierte HaCaT-Zellen mit steigenden GYY4137-Konzentrationen behandelt. Die Behandlung mit GYY4137 führte ab einer Konzentration von 6,25 µM zu einer signifikanten Reduzierung der Proliferationsrate um 8 %. Mit steigender GYY4137-Konzentration konnte auch eine steigende Reduktion der Proliferationsrate beobachtet werden. So führten 25 µM und 100 µM zu einer Verminderung um 10 % und 400 µM zu einer Reduktion der Proliferationsrate um 32 % im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 4.24 B).
Darüber hinaus wurde untersucht, ob eine zusätzliche Behandlung einer überexprimierenden Zelllinie mit GYY4137 einen additiven Effekt auf die Proliferation hat (Abbildung 4.24 C). Dazu wurde Zelllinie 1 ausgewählt, da bei dieser Zelllinie der Einfluss auf die Proliferationsrate am deutlichsten war (Abbildung 4.24 A). Behandelt wurden die Zellen mit 0,4 µM, 1,6 µM und 6,25 µM GYY4137. Diese GYY4137-Konzentrationen führten in

Abbildung 4.24 B zu keiner bzw. einer sehr geringen Beeinflussung der Proliferationsrate.

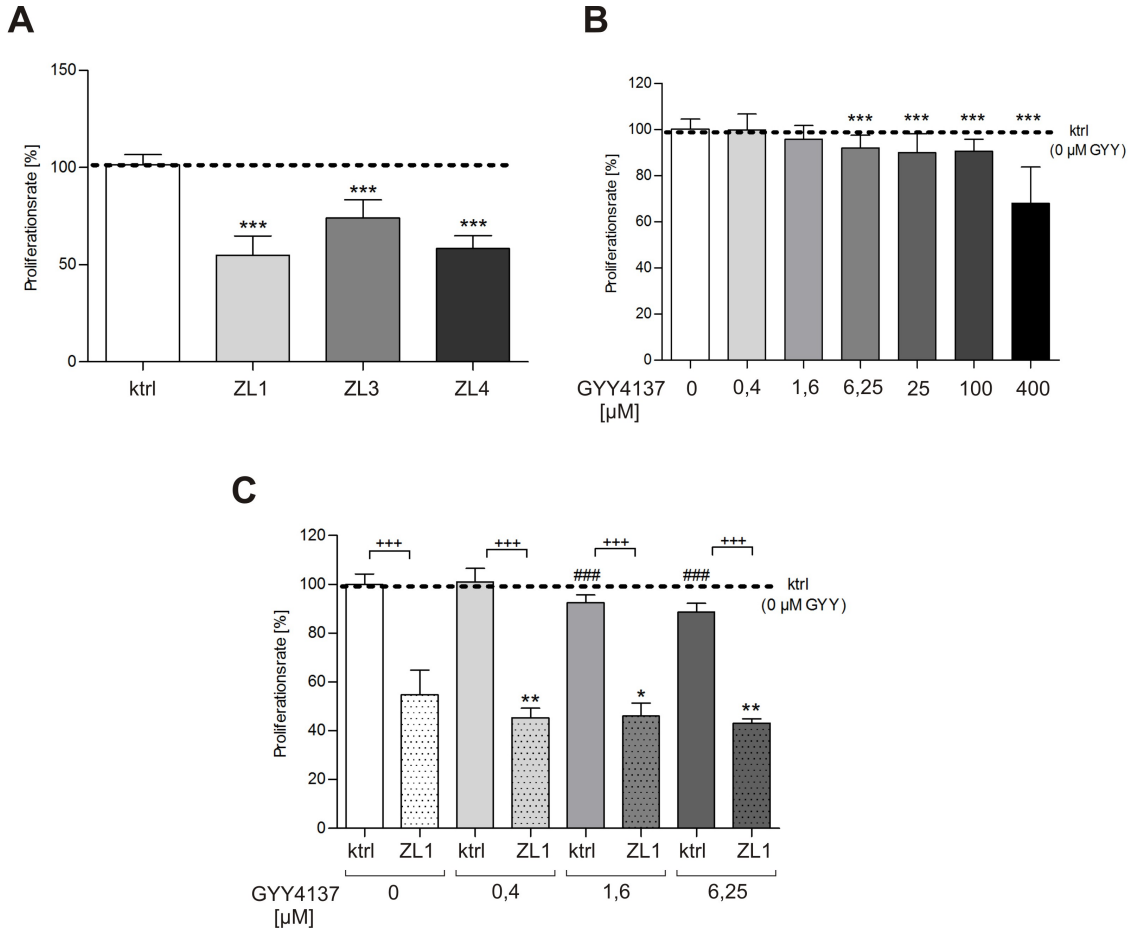

Abbildung 4.24: Analyse der HaCaT-Proliferation in Abhängigkeit von H_2S.

Untersuchung der Proliferationsrate der CSE-überexprimierenden Zelllinien 1, 3 und 4 im Vergleich zu einer Negativkontrolle (pCMV-Flag-N3 ohne CSE) ***(A)****. Proliferationsanalyse von HaCaT-Zellen behandelt mit ansteigenden GYY-Konzentrationen. Als Kontrolle dienten unbehandelte HaCaT-Zellen* ***(B)****. Untersuchung eines möglichen additiven Effekts der CSE-Überexpression und einer zusätzlichen GYY4137-Behandlung auf die Proliferation von HaCaT-Zellen. Kontrolle (ktrl.): pCMV-Flag-N3 transfizierte Zellen ohne GYY4137-Behandlung* ***(C)****. Der Einbau von [Methyl-^{3}H]-Thymidin wurde in counts per minute gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD.* ***(A+B)****: *** p<0,001 (unpaired t-Test) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle.* ***(C)****: ** p<0,01; *** p<0,001 (unpaired t-Test) Einfluss von GYY4137 auf die ZL1; ### p<0,001 (unpaired t-Test) Einfluss von GYY4137 auf die Kontrollzelllinie; +++ p<0,001 (unpaired t-Test) Einfluss des Plasmids pCMVhs-CSE-Flag.*

Eine GYY4137-Konzentration von 1,6 µM führte in diesem Versuch dazu, dass die Proliferationsrate der Kontrollzellen negativ beeinflusst wurde (Abbildung 4.24 C). Diese GYY4137-Konzentration führte in Abbildung 4.24 B zu keiner signifikanten Reduzierung der Proliferation. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass in 4.24 B untransfizierte HaCaT-Zellen und in 4.24 C transfizierte HaCaT-Zellen verwendet wurden. Darüber

hinaus ist der Effekt von GYY4137 auf die Kontrollzelllinie (Abbildung 4.24 C) vergleichbar mit dem Effekt auf untransfizierte HaCaT-Zellen (Abbildung 4.24 B). Der Effekt der CSE-Überexpression ist in Abbildung 4.24 C ebenso deutlich ausgeprägt wie in Abbildung 4.24 A. Im Vergleich zur Kontrolle ist in ZL1 ein deutlicher additiver Einfluss von GYY4137 auf die überexprimierende Zelllinie 1 zu sehen (Abbildung 4.24 C). Bei Zellen der Linie ZL1 führt bereits eine Konzentration von 0,4 µM GYY4137 zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation. Diese geringe Menge hatte in keinem anderen Versuch eine Auswirkung auf die Proliferation. Der größte additive Effekt wurde bei der höchsten GYY4137-Konzentration gemessen. Hier konnte eine Proliferationsrate von 42,4 % im Vergleich zur Kontrolle ohne GYY4137 (54,8 %) beobachtet werden.
Der Einfluss des pMCVhs-CSE-Flag-Plasmids wurde ebenfalls auf die mRNA-Expression von K10, IVL, CSE und CBS analysiert.

4.3.2.9 mRNA-Analyse der CSE-überexprimierenden Zelllinie

Um zu sehen, ob die Überexpression der CSE Veränderungen bezüglich der K10, Involucrin, CSE und CBS mRNA-Expression hervorruft, wurden diese Gene in allen drei überexprimierenden Zelllinien durch qPCR analysiert (Abbildung 4.25).

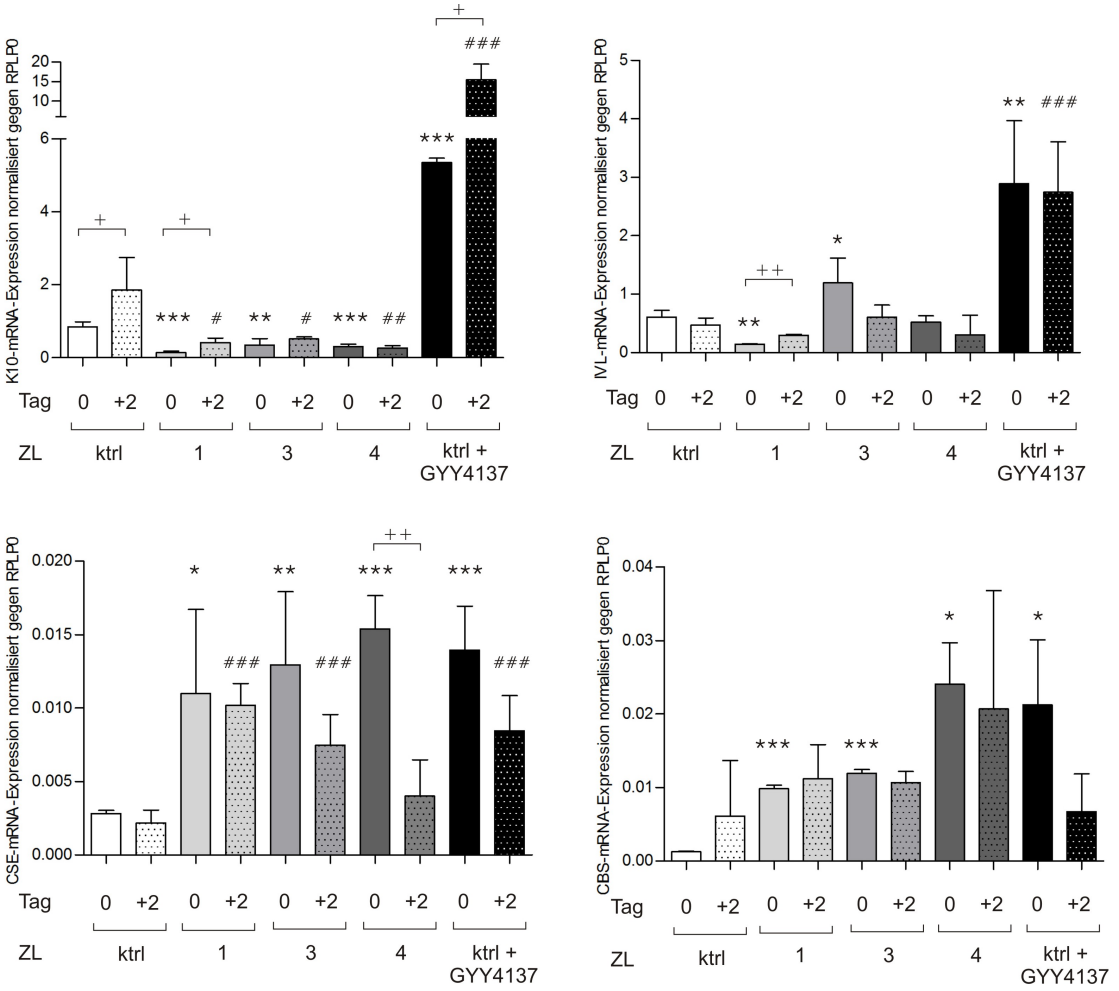

Abbildung 4.25: mRNA-Analyse der CSE-überexprimierenden Zelllinien

Analyse der mRNA-Expression von K10 ***(A)****, IVL* ***(B)****, CSE* ***(C)*** *und CBS* ***(D)*** *in den überexprimierenden Zelllinien 1, 3 und 4. Tag 0: konfluente Zelldichte, + 2 mM $CaCl_2$. Eine Normalisierung fand gegen RPLP0 statt. Dargestellt wurden die Mittelwerte ± SD aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (unpaired t-Test) Effekt der Überexpression an Tag 0 im Vergleich zur Kontrollzelllinie. # p<0,05; ## p<0,01; ### p<0,001 (unpaired t-Test) Effekt der Überexpression an Tag +2 im Vergleich zur Kontrollzelllinie. + p<0,05; ++ p<0,01 (unpaired t-Test) Effekt der Differenzierung an Tag +2 im Vergleich zu Tag 0.*

In keiner der Zelllinien kann an den Tagen 0 und +2 ein Anstieg der K10 mRNA-Expression beobachtet werden (Abbildung 4.25 A). Im Gegensatz zu dem exogenen Donor GYY4137, der eine deutliche Steigerung der Expression bewirkt, kommt es in den Zelllinien zu einer Reduktion der K10-mRNA-Expression. Im Vergleich der Tage 0 und +2, ist in den Kontrollzellen, der Zelllinie 1 und in den GYY4137-behandelten Zellen ein Anstieg der mRNA-Expression messbar. Die mRNA-Expression von Involucrin ist in allen drei Zelllinien unterschiedlich. In ZL1 findet eine Herunterregulierung der IVL-Expression statt, in ZL3 kommt es zu einer leichten Erhöhung der IVL-Expression und in ZL4 ist

keine Veränderung messbar (Abbildung 4.25 B). Die mit GYY4137 behandelten Zellen zeigen im Vergleich zu den überexprimierenden Zelllinien eine deutlich Erhöhung der Involucrin-mRNA-Expression.
Im Gegensatz zu den Expressionsmustern der Differenzierungsmarker K10 und Involucrin konnte die mRNA-Expression der CSE durch die Überexpression gesteigert werden (Abbildung 4.25 C). Alle drei Zelllinien weisen im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte CSE-mRNA-Expression auf, wie sie auch durch die Behandlung mit GYY4137 hervorgerufen wurde. Deutlich zu sehen ist jedoch, dass im Fall der Zelllinie 4 die Expression der CSE an Tag +2 deutlich niedriger ist als an Tag 0. Ein vergleichbares Expressionsmuster ist auch im Fall der CBS detektierbar (Abbildung 4.25 D). Sowohl die GYY4137-Behandlung als auch das pCMVhs-CSE-Flag-Konstrukt führen an Tag 0 zu einer signifikanten Erhöhung der Expression im Vergleich zur Kontrolle.
Große Unterschiede bezüglich der mRNA-Expressionen zwischen den Zelllinien 1, 3 und 4 konnten in diesem Versuch nicht entdeckt werden. Ein Effekt des pCMVhs-CSE-Flag-Plasmids auf die mRNA-Expression von K10 und IVL war nicht zu beobachten. Im Gegensatz zu dem exogenen H_2S-Donor GYY4137 konnte keine Zelllinie die Differenzierung von HaCaT-Zellen positiv beeinflussen.

4.3.2.10 Mögliche Mechanismen der H_2S-Regulierung

Ein Mechanismus, der die Wirkung von H_2S auf die Differenzierung von HaCaT-Zellen erklärt, ist bislang nicht bekannt. Es könnte sein, dass die Regulation dieses Effekts über $p21^{Cip/WAF-1}$ (CDK-Inhibitor 1) erfolgt. Dabei handelt es sich um einen Inhibitor Cyclin-abh ängiger Kinasen, der für die Kontrolle des Zellzyklus in Säugetieren zuständig ist. $p21^{Cip/WAF-1}$ wird eine duale Rolle während der Keratinozytendifferenzierung zugeschrieben. So initiiert es die Differenzierung der Keratinozyten, sorgt aber in einer späteren Phase für eine Inhibierung. Die Deletion von $p21^{Cip/WAF-1}$ in Mausmodellen führt zu einer Inhibierung der IGF-1 Expression (*insulin-like growth factor*) was wiederum die Aktivität der MAP-Kinasen negativ beeinflusst und darüber eine Erhöhung der Differenzierungsmarker K1 und K10 bedingt [Devgan et al., 2006]. Bei $p21^{Cip/WAF-1}$ handelt es sich um einen Regulator der Differenzierung, der bereits mit H_2S in Zusammenhang gebracht wurde [Yang et al., 2004] und somit um ein interessantes Zielprotein für weitere Untersuchungen. Um einen ersten Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von $p21^{Cip/WAF-1}$ an der Differenzierung von HaCaT-Zellen mit und ohne GYY4137-Behandlung zu bekommen, wurden die mRNA-Expression von $p21^{Cip/WAF-1}$ untersucht (Abbildung 4.26).

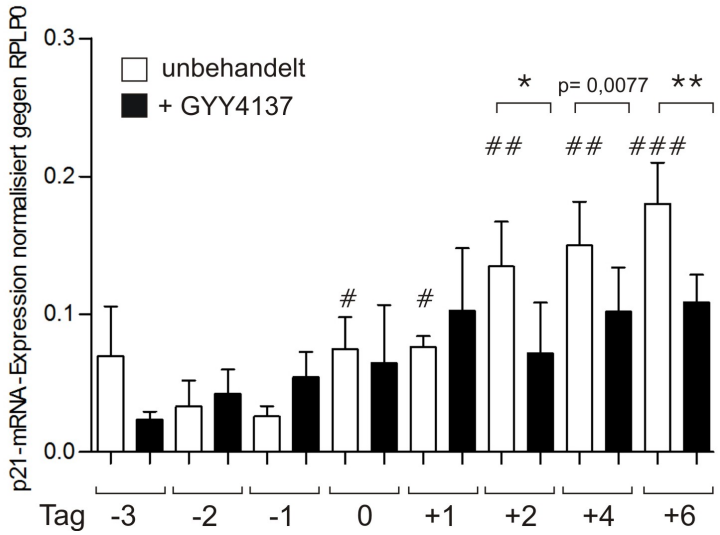

Abbildung 4.26: p21$^{Cip/WAF-1}$-mRNA-Expression in Abhängigkeit von GYY4137

*Analyse der mRNA-Expression von p21$^{Cip/WAF-1}$ in HaCaT-Zellen ohne und mit GYY4137-Stimulation [400 µM]. Tag 0: konfluente Zelldichte, + 2 mM $CaCl_2$. Eine Normalisierung wurde gegen RPLP0 durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus mind. 3 unabhängigen Experimenten. * p<0,05; ** p<0,01; (unpaired t-Test) Vergleich unstimulierter und GYY4137-stimulierter Zellen. # p<0,05; ## p<0,01; ### p<0,001 (unpaired t-Test) im Vergleich zu Tag -2).*

In den unbehandelten Zellen ist mit Einsetzen der Differenzierung ein deutlicher Anstieg der mRNA-Expression von p21$^{Cip/WAF-1}$ zu sehen (Abbildung 4.26). Der Expressionsanstieg von p21$^{Cip/WAF-1}$ bei Einsetzen der Differenzierung in GYY4137-behandelten Zellen ist hingegen vergleichsweise gering. So kommt es an Tag +2 und +6 zu einer signifikanten Reduzierung der p21$^{Cip/WAF-1}$-Expression in GYY4137-behandelten Zellen und auch an Tag +4 ist eine deutliche Verringerung der p21$^{Cip/WAF-1}$-Expression feststellbar.
Neben p21$^{Cip/WAF-1}$ wurde auch der Transkriptionsfaktor C/EBPβ als ein möglicher Regulator für die H_2S-vermittelte Differenzierungsmodulation untersucht. C/EBPβ, ein CCAAT/Enhancer-Binding-Protein, spielt eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Keratinozytendifferenzierung, dessen Deletion in Knockout-Mäusen zu einer Herunterregulierung der mRNA-Expression von K1 und K10 führt [Zhu et al., 1999]. Ein möglicher Effekt von GYY4137 auf die C/EBP-Promotorbindung wurde mit Hilfe des C/EBP-Reporter Assays von Promega nach 3-tägiger Stimulation analysiert (Abbildung 4.27).

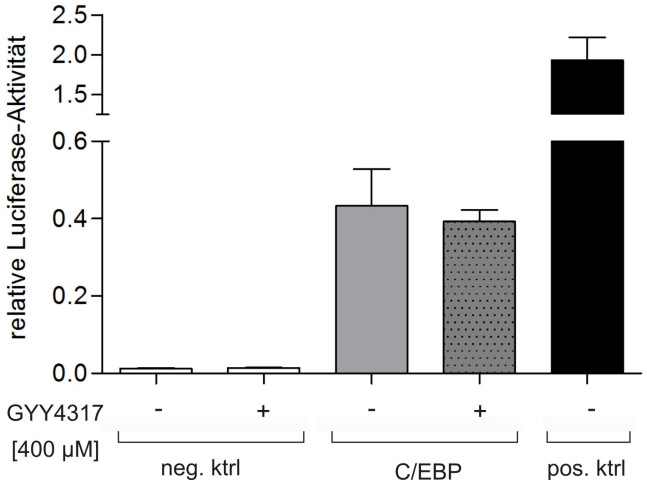

Abbildung 4.27: Luciferase-Analyse C/EBP

Die Firefly-Luciferase-Aktivität des C/EBP-Reporter-Konstrukts und der Kontrollen wurde mit der Aktivität einer konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase normalisiert (n=3). Die Behandlung mit GYY4137 erfolgte über einen Zeitraum von 4 Tagen. Negativkontrolle: Nicht-induzierbare Firefly-Luciferase und konstitutiv exprimierte Renilla-Luciferase. Positivkontrolle: Konstitutiv exprimierende Firefly- und Renilla-Luciferase-Konstrukte.

Die Analyse des C/EBP-Reporter-Konstrukts zeigt, dass eine Induktion der *Firefly*-Luciferase-Aktivität stattfindet, diese jedoch nicht durch GYY4137 regulierbar ist (Abbildung 4.27).

Um zu klären, welcher Bereich des K10-Promotors tatsächlich durch GYY4137 beeinflusst wird, wurden unterschiedlich lange Bereiche des Promotors amplifiziert und in einen pGL3-Luciferase-Vektor kloniert. Je einer dieser Vektoren wurde zusätzlich zu einem konstitutiv exprimierenden Renilla-Plasmid in HaCaT-Zellen transfiziert. Im Anschluss an eine 4-tägige GYY4137-Behandlung erfolgte die Auswertung der Luciferase-Aktivität mit Hilfe des *Dual-Luciferase Reporter Assay System* von Promega. Wie auch bei der Messung der C/EBP-Reporter-Konstrukte wurde die relative Luciferase-Aktivität bestimmt (Abbildung 4.28).

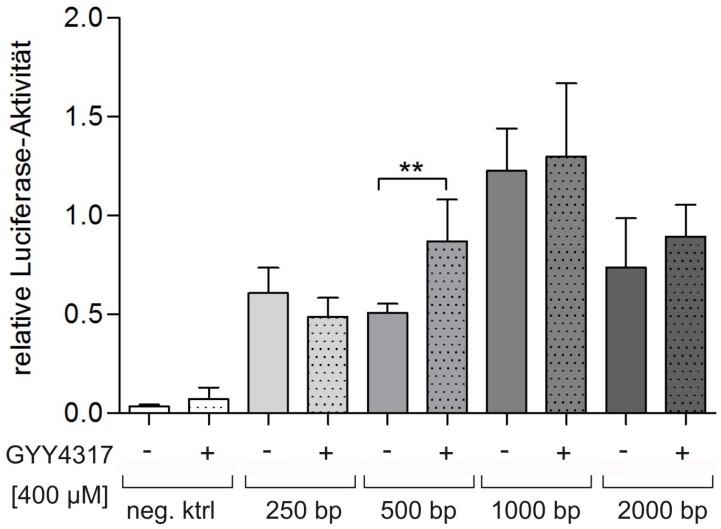

Abbildung 4.28: Luciferase-Analyse der K10-Promotorfragmente.

Die Firefly-Luciferase-Aktivität der unterschiedlich langen K10-Promotorfragmente wurde mit der Aktivität einer konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase normalisiert (mind. n=5). Die Behandlung mit GYY4137 erfolgte über einen Zeitraum von 4 Tagen. Negativkontrolle: Nicht-induzierbare Firefly-Luciferase (pGL3 Basic) und konstitutiv exprimierte Renilla-Luciferase (pRL-RT). Positivkontrolle: Konstitutiv exprimierende Firefly- und Renilla-Luciferase-Konstrukte (pGL3 control, pRL-RT).

Mit allen transfizierten K10-Promotorfragmenten war eine Induktion der *Firefly*-Luciferase-Aktivität möglich. Die Promotorfragmente mit 250, 1000 und 2000 Basenpaaren (bp) zeigten nach einer GYY4317-Behandlung keine Veränderungen bezüglich der relativen Luciferase-Aktivität. Lediglich das 500 bp umfassende Konstrukt zeigte nach Behandlung mit GYY4137 einen signifikanten Anstieg der relativen Luciferase-Aktivität.
Mit Hilfe dieses Versuchs konnte der durch GYY4137-stimulierbare Bereich des K10-Promotors eingeschränkt werden. Es ist anzunehmen, dass sich ein durch GYY4137 aktivierbares Element im Bereich zwischen 250 bp und 500 bp befindet. Im Bereich zwischen 500 bp und 1000 bp könnte sich möglicherweise eine Inhibitor-Bindestelle befinden. Das würde erklären, warum bei den längeren Fragmenten keine GYY4137 bedingte Steigerung der Luciferase-Aktivität zu sehen ist.

5 Diskussion

5.1 Analyse muriner Mesangiumzellen

Clp36 ist ein bisher wenig erforschtes Protein, welches ubiquitär im gesamten Körper exprimiert wird [Kotaka et al., 1999]. Aufgrund seiner Lokalisierung am Aktin-Zytoskelett ist Clp36 an grundlegenden zellulären Prozessen beteiligt. In Endothelzellen ist es bei Migrations- und Kontraktionsvorgängen an Aktinfilamenten und Stressfasern assoziiert, weshalb ein Einfluss von Clp36 bei diesen zellulären Prozessen anzunehmen ist. Die Lokalisierung am Zytoskelett findet über α-Aktinin 1 oder α-Aktinin 4, Interaktionspartnern von Clp36 statt [Bauer et al., 2000]. Auch Palladin ist ein wichtiger Bindungspartner, der für die Lokaliserung von Clp36 an Stressfasern benötigt wird [Maeda et al., 2009]. Über seine Funktion bei der Organisation des Zytoskeletts hinaus, ist Clp36 als negativer Regulator des Glykoproteins VI bei der Regulation der Blutplättchen-Aktivierung beteiligt [Gupta et al., 2012].
Dass Clp36 eine interessante Zielstruktur für Untersuchungen der Gasotransmitter NO und H_2S ist, konnte bereits innerhalb der Arbeitsgruppe gezeigt werden. Eine Behandlung mit dem H_2S-Donor Na_2S_4 führte dabei zu einer Persulfidbildung an mindestens einem Cysteinrest von Clp36 [Longen et al., 2016]. Außerdem konnte in einer bisher unveröffentlichten Dissertation gezeigt werden, dass NO auf mRNA-Ebene die Expression von Clp36 negativ beeinflusst [Walpen, 2001]. Über die Wirkung von NO und H_2S hinaus konnte beobachtet werden, dass Clp36 durch Calpain gespalten wird und infolgedessen in den Zellkern transloziert [Eisel, 2013].

5.1.1 Der Knockout von Clp36 könnte die Expression anderer zytoskelettaler Proteine beeinflussen.

Um Proteine zu identifizieren, die durch eine Depletion von Clp36 beeinflusst werden, wurden 2D-Gelelektrophoresen durchgeführt. Proteine, die in zwei unabhängig durchgeführten 2D-Gelelektrophoresen Unterschiede in der Proteinexpression in Zellen von Wildtyp- und Knockout-Tieren zeigten, wurden weiter massenspektrometrisch analysiert. Dabei wurden die Proteine FHL3, Gelsolin und Zyxin identifiziert. Western Blot-Analysen, welche eine Regulation der identifizierten Proteine zwischen Mesangiumzellen des Wildtyps und des Clp36-Knockouts bestätigen sollten, zeigten dagegen

widersprüchliche Resultate. Auch die Expression von FHL1, die zusätzlich zu den durch 2D-Gelelektrophorese identifizierten Proteine analysiert wurde, zeigte keine Regulation auf der Proteinebene. Darüber hinaus war auffällig, dass Proteine, die in der 2D-Analyse in der Kernfraktion gefunden wurden, im Western Blot lediglich im Zytoplasma detektierbar waren. Ein Grund dafür könnte sein, dass unterschiedliche Methoden zur Isolierung der Kernproteine angewendet wurden. Für den Einsatz in der 2D-Gelelektrophorese wurden die Kernproteine mit Hilfe des ReadyPrep Protein Extraction Kits von Bio-Rad isoliert, da bei dieser Methode keine Komponenten zum Einsatz kommen, welche die Isoelektrische Fokussierung stören. Da es sich bei den betrachteten Proteinen um zytoskelettale Proteine handelt, ist es möglich, dass die Proteine je nach Methode einmal in der zytoplasmatischen und einmal in der nukleären Fraktion gefunden wurden. Ein weiterer Grund für ein ausbleibendes Signal in der nukleären Fraktion der Western Blot-Analyse könnte eine zu geringe Proteinkonzentration sein.
Trotz der im Western Blot nicht signifikanten Regulation der Proteine FHL1, FHL3, Zyxin und Gelsolin durch den Knockout von Clp36, hat sich eine Tendenz gezeigt. Bei allen drei in der 2D-Gelelektrophorese gefundenen Spots, handelt es sich um zytoskelettale Proteine. Aus diesem Grund wurde in folgenden Versuchen zunächst die Lokalisierung von Clp36 am Zytoskelett analysiert.

5.1.2 Clp36 ist an fokalen Adhäsionen und im Zellkern lokalisiert

Um Anhand der Lokalisierung von Clp36 in der Zelle Hinweise auf dessen Funktion zu bekommen, wurden Fluoreszenzfärbungen von Wildtyp- und Clp36$^{-/-}$-Zellen angefertigt. Die Färbungen mit spezifischen Antikörpern gegen Clp36, Phalloidin als Marker für das Zytoskelett und DAPI für eine Färbung des Zellkerns, zeigten eine deutliche Lokalisierung von Clp36 an fokalen Adhäsionen. In einigen Fällen wurde Clp36 auch im Kern der Zelle nachgewiesen. Die Assoziation am Zytoskelett, insbesondere an fokalen Adhäsionen wurde auch von Bauer *et al.* beschrieben [Bauer et al., 2000]. Die Beobachtung, dass Clp36 in einigen Zellen im Kern lokalisiert ist, könnte für die Hypothese einer Translokation des von Calpain gespaltenen Clp36-Fragments in den Zellkern sprechen [Eisel, 2013]. So könnte eine verkürzte Form von Clp36 vom Zytoplasma in den Kern translozieren. Gegen diese Vermutung spricht jedoch, dass diese Funde nur in Rattenzellen gemacht werden konnten. In eigenen Versuchen mit Mäusezellen konnten weder Spaltprodukte, noch eine Translokation von Clp36 beobachtet werden. Aufgrund der Lokalisierung von Clp36 an fokalen Adhäsionen und dem Auffinden der in Clp36-Knockoutzellen

unterschiedlich exprimierten Proteine FHL3, Gelsolin und Zyxin, die alle eine Rolle in Migrations-, Adhäsions- oder Proliferationsvorgängen spielen standen Analysen der Migration, Adhäsion und Proliferation im Fokus weiterer Untersuchungen.

5.1.3 Clp36 beeinflusst die Migration und Proliferation muriner Mesangiumzellen

Die Zellmigration ist ein wichtiger Prozess, der unter anderem für die Gestaltgebung, das Wachstum und die Regeneration notwendig ist. Während der Migration kommt es in Bewegungsrichtung zu einem Aufbau von fibrillärem Aktin und der Ausbildung von Fokalkomplexen mit der extrazellulären Matrix. Diese werden im weiteren Verlauf zu stabileren fokalen Adhäsionen umgebildet. Fokale Adhäsionen bestehen hauptsächlich aus Integrinen, deren β-Untereinheit in der Zelle über Adaptermoleküle wie α-Aktinin mit dem Zytoskelett verbunden ist [Alberts, 2002]. Der Aufbau von fokalen Adhäsionen verändert sich im Laufe des Migationsprozesses stetig. Beispielsweise führt die Bindung von Zyxin an Fokalkomplexe zur Ausbildung der stabileren fokalen Adhäsionen [Zaidel-Bar et al., 2004]. Das Fehlen nur einer Komponente könnte die Effizienz dieses feinregulierten Prozess erheblich beeinträchtigen.
Der Verlust von Clp36 hatte in den durchgeführten Versuchen eine signifikante Reduzierung der Migrationsrate in murinen Mesangiumzellen zur Folge. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass es sich bei Clp36 um einen Bindungspartner von α-Aktinin handelt, der in fokalen Adhäsionen für die Verbindung der Integrine mit dem Zytoskelett verantwortlich ist [Bauer et al., 2000]. Zudem bestätigen diese Ergebnisse Funde in MDA-MB-231 Brustkrebszellen, bei denen ebenfalls ein hemmender Einfluss auf die Zellmigration in Folge einer Clp36-Deletion zu beobachten war [Liu et al., 2015]. Es wurde gezeigt, dass eine Komplexbildung von Clp36 und α-Aktinin unerlässlich für die Migration und Invasion von Brustkrebszellen ist. Dieser Komplex aus Clp36 und α-Aktinin scheint darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Rho-GTPase Cdc42 zu spielen, die eine wichtige Funktion bei zellulären Vorgängen wie Zellpolarität, Migration und Adhäsion hat.
Aufgrund der Beteiligung von Clp36 bei der Bildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionen lag die Vermutung nahe, dass ein Verlust dieses Proteins einen negativen Einfluss auf die Zelladhäsion haben könnte. Diese Hypothese konnte jedoch experimentell nicht bestätigt werden. Bei den durchgeführten Adhäsionsanalysen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Zellen des Wildtyps und des Clp36-Knockouts festgestellt. Möglicherweise kann die Tatsache, dass es keine Veränderung bezüglich der Adhäsion,

sehr wohl jedoch der Migration gibt dadurch erklärt werden, dass der Verlust von Clp36 im dynamischen Migrationsprozess schwerer wiegt, als der Verlust von Clp36 in stabil ausgebildeten fokalen Adhäsionen. Dabei könnten die Zellen die Funktion von Clp36 durch die Expression anderer Proteine kompensieren, so dass der Verlust des Proteins in den Adhäsionsversuchen keine sichtbaren Auswirkungen hat.
Die in dieser Arbeit durchgeführten Proliferationsstudien zeigten, dass die Deletion von Clp36 zu einer signifikanten Erhöhung der Proliferationsrate in Mesangiumzellen führt. Der Einfluss von Clp36 auf die Zellproliferation wurde bis zu diesem Zeitpunkt nur in Brustkrebszellen untersucht, in denen Clp36 keinen Einfluss auf die Proliferation hatte [Liu et al., 2015]. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in dieser Arbeit erstmals der Einfluss von Clp36 auf Migrations-, Adhäsions- und Proliferationsprozesse in murinen Mesangiumzellen (WT und Clp36$^{-/-}$) untersucht wurde. Laut unseren Ergebnissen spielt Clp36 eine wichtige Rolle bei der Migration von Zellen, weshalb der Verlust des Proteins in den analysierten Clp36$^{-/-}$-Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Migrationsrate führte. Im Gegensatz dazu scheint Clp36 jedoch keinen Einfluss auf die Adhäsion von Mesangiumzellen zu haben. In den durchgeführten Untersuchungen zur Zellproliferation führte die Deletion von Clp36 in Mesangiumzellen zu einer Steigerung der Proliferation. Das lässt auf einen bisher unbekannten, negativen Einfluss von Clp36 auf den Prozess der Proliferation schließen.

5.1.4 CSE beeinflusst die Migration, Adhäsion und Proliferation muriner Mesangiumzellen

Im Fall des CSE-Knockouts wurden ebenfalls Untersuchungen zur Migration, Adhäsion und Proliferation durchgeführt. Die Adhäsionsanalysen des Wildtyps und des Knockouts zeigten in dieser Arbeit eine signifikante Steigerung der Adhäsionsrate in CSE$^{-/-}$-Zellen. Ähnliche Beobachtungen wurden in Studien an Keratinozyten und glatten Muskelzellen gemacht, in denen ebenfalls eine H_2S-vermittelte Abnahme der Adhäsionsfähigkeit beobachtet wurde [Gobbi et al., 2009] [Meng et al., 2007]. In beiden Zelltypen wurde eine H_2S-vermittelte Herunterregulierung von Integrinen als Ursache für einen Verlust der Adhäsionsfähigkeit festgestellt. In Keratinozyten wurden die Integrine $\beta 4$, $\alpha 2$ und $\alpha 6$, in glatten Muskelzellen das Integrin $\alpha 5\beta 1$ und die Matrix Metalloproteinase-2 als durch H_2S regulierte Proteine identifiziert. Da Zellen der glatten Muskulatur den in dieser Arbeit untersuchten Mesangiumzellen sehr ähnlich sind, scheint die negative Regulierung dieser Proteine als Ursache der beobachteten Veränderungen im Adhäsionsverhalten sehr

wahrscheinlich.

In Untersuchungen zur Migration glatter Muskelzellen führte der Knockout der CSE im Vergleich zum Wildtyp zu einer Erhöhung der Migrationsrate [Yang et al., 2012]. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit mit murinen Mesangiumzellen zeigen eine deutliche Steigerung der Migrationsrate in $CSE^{-/-}$-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. In glatten Muskelzellen wurde gezeigt, dass in Folge des CSE-Knockouts eine Hochregulierung des Integrins $\alpha 5\beta 1$ stattfindet, welche durch die Gabe von NaHS aufgehoben wurde [Yang et al., 2012].

Bezüglich der Proliferation wurde in dieser Arbeit an murinen Mesangiumzellen gezeigt, dass der Verlust der CSE eine signifikante Erhöhung der Proliferationsrate bedingt. Ein Einfluss der CSE auf die Proliferation von Zellen wurde ebenfalls in HEK-293-Zellen gemacht. Dort führte eine Überexpression der CSE zu einer Hemmung der Zellproliferation [Yang et al., 2004]. Ein inhibitorischer Effekt von H_2S auf die Proliferation wurde ebenfalls in Mesangiumzellen beschrieben [Zhou et al., 2014]. Bei diesen Untersuchungen wurde eine Inhibierung der ERK1/2-, JNK- und p38-Phosphorylierung beobachtet. Diese MAP-Kinase-Signalwege sind an der Zellzyklusprogression beteiligt und unabdingbar in Proliferationsprozesse von Mesangiumzellen involviert.

In dieser Arbeit konnte erstmals der Einfluss eines genetischen CSE-Knockouts auf Migrations-, Adhäsions- und Proliferationsprozesse in murinen Mesangiumzellen beschrieben werden. Die Deletion der CSE führte zu einer Erhöhung der Migrations-, Adhäsions- und Proliferationsrate.

5.2 Die Deletionen von Clp36 und CSE haben keinen Einfluss auf das Ausmaß einer zerebralen Ischämie

Aufgrund der potentiellen Effekte von Clp36 auf eine infarktauslösende Thrombusbildung und des beschriebenen Einflusses von H_2S u.a. auf die Größe zerebraler Infarkte, wurden beide Knockouts in einem MCAO-Modell untersucht.

Die Auswertung der Infarktgrößen beider Deletionslinien ergab keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Wildtyp-Mäusen. Die Analyse des CSE-Knockouts führte zu tendenziell kleineren Hirninfarkten. Diese Reduktion des Infarktvolumens war jedoch nicht signifikant.

Die Ergebnisse bezüglich der Infarktgrößen von $Clp36^{-/-}$-Tieren ist jedoch nicht überraschend, da bisher beschriebene Effekte von Clp36 lediglich bei der Thromboseentstehung beobachtet werden konnten [Gupta et al., 2012]. In dieser Arbeit wurde jedoch ein MCAO-

Modell verwendet, bei dem der Verschluss der *Arteria cerebri media* künstlich herbeigeführt wurde. Die Untersuchung von Clp36 im weiteren Verlauf der zerebralen Ischämie war somit lediglich rein spekuativer Natur, denkbar wäre eine Alteration der prothrombischen Effekte der Mikrozirkulation distal des Großgefäßverschlusses gewesen.
Die in den Mäusen mit der Deletion der CSE beobachtete Tendenz zu geringeren Infarktgrößen, passt zu den Beobachtungen von von Qu et al., die einen NMDA-Rezeptor-vermittelten Einfluss von Schefelwasserstoff auf die Größe von Hirninfarkten beschrieben [Qu et al., 2006]. In dieser Studie führte die Gabe des H_2S-Donors NaSH zu einer Vergrößerung des Schlaganfallvolumens.
Eines der Probleme, weshalb in unseren Untersuchungen lediglich eine Tendenz und kein statistisch relevanter Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout zu sehen ist, ist die große Streuung der individuellen Infarktgrößen. Um hierbei eine Verbesserung zu erzielen, sollte in künftigen Versuchen eine Mehrfachnutzung des Okklusionsfadens vermieden werden, da bereits kleine und nicht direkt sichtbare Risse in der Silikonbeschichtung einen vollständigen Verschluss der *Arteria cerebri media* unmöglich machen. Außerdem sollte bei weiteren experimentellen Ansätzen erwogen werden, die Mäuse nach dem chirurgischen Eingriff in Gruppen mit vergleichbar ausgeprägter Reperfusion oder vergleichbarer OP-Dauer einzuteilen. Neben diesen technischen Verbesserungsmöglichkeiten sollte bedacht werden, dass die CSE lediglich einen geringen Anteil der H_2S-Mengen im Gehirn produziert. Auch wenn die CSE in Gefäßen stark exprimiert wird, wird im Gehirn der CBS eine dominante Rolle zugeschrieben. Aus diesem Grund sollten in folgenden Versuchen Mäuse mit einer CBS-Deletion oder Mäuse mit einem Doppel-Knockout der CSE und der CBS untersucht werden.
Neben der Auswertung der Infarktgröße wurde ebenfalls die Expression einiger Proteine in der von der Ischämie betroffenen (ipsilateralen) und der nicht betroffenen (kontralateralen) Hemisphäre analysiert. Untersucht wurde dabei die Expression der HO-1, CSE, CBS und 3-MST. Die Expression dieser Proteine in den $Clp36^{-/-}$-Mäusen war unauffällig und zeigte keine Unterschiede zum Expressionsmuster von Wildtyp-Tieren. Im Vergleich der Proteinexpression von CSE und CBS sind weder beim WT noch bei $Clp36^{-/-}$ Unterschiede zwischen der ipsilateralen und der kontralateralen Hemisphäre zu sehen. Eine Regulation der Proteinexpression wurde lediglich im Fall der HO-1 und der 3-MST beobachtet. Die Expression dieser Proteine war wie erwartet durch den Infarkt beeinflusst [Dohi et al., 2003] [Zhao et al., 2013]. Aufgrund des oxidativen Stresses war die Proteinexpression der HO-1 auf der ipsilateralen Seite erhöht, wohingegen auf dieser Seite eine Reduzierung der 3-MST

Expression beobachtet wurde.
Wie in Wildtyp- und Clp36$^{-/-}$-Mäusen, war die Proteinexpression der CBS in CSE$^{-/-}$-Tieren in beiden Hemisphären unverändert. Auch die Proteinexpression der HO-1 zeigte wie in den Proben von WT und Clp36$^{-/-}$-Mäusen in den CSE$^{-/-}$-Proben eine Erhöhung der Expression auf der ipsilateralen Seite.

5.3 Analyse von Clp36 und CSE im Kontext der kutanen Wundheilung

5.3.1 Clp36 spielt keine Rolle im Verlauf der kutanen Wundheilung

Im Verlauf der Wundheilung spielen viele Prozesse eine Rolle, unter anderem die Wundkontraktion. Dabei werden die gesunden Wundränder einander angenähert und die Wunde dadurch verkleinert. Darüber hinaus ist die Migration von Epithelzellen von großer Bedeutung. Sowohl bei der Kontraktion als auch der Migration von Zellen, erschien Clp36 aufgrund eigener Vorversuche als interessanter Kandidat für Untersuchungen der murinen Wundheilung.
Erste Versuche mit Proteinextrakten aus Wunden von Wildtyp-Mäusen sollten einen Hinweis auf eine mögliche Regulation der Clp36-Expression im Laufe der Wundheilung geben. Die Experimente in dieser Arbeit zeigten jedoch, dass die Proteinexpression von Clp36 zu keinem Zeitpunkt (Tag 0-13) reguliert wurde. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Regulation von Clp36 keine Rolle für die Migration oder die Kontraktion von Zellen im Verlauf der Wundheilung spielt. Aufgrund dieses ersten Versuches, indem keine Regulierung von Clp36 festgestellt werden konnte, wurde auf weitere Versuche mit Clp36$^{-/-}$-Mäusen verzichtet.

5.3.2 Die Protein- und mRNA-Expression von CSE und CBS ist im Verlauf der Wundheilung reguliert.

Die Neovaskularisierung nimmt im Laufe der Wundheilung eine wichtige Funktion ein. Durch die Neubildung von Blutgefäßen ist die Versorgung der umliegenden Zellen gewährleistet und die Wundheilung kann ungehindert voranschreiten. Kapillare Endothelzellen, die als Ausgangspunkt für den Aufbau neuer Blutgefäße dienen, teilen sich sind in der Regel sehr selten, können im Verlauf der Wundheilung jedoch durch Wachstumsfaktoren wie VEGF aktiviert werden. Die Stimulation von Endothelzellen durch VEGF führt zu einer vermehrten Freisetzung von H_2S. Eine Inhibierung der H_2S-Produktion führt in

diesem Prozess zu einer Abschwächung der VEGF-Wirkung und der Migration von Endothelzellen [Papapetropoulos et al., 2009]. Aufgrund dieser Arbeiten wurden umfassende Analysen mit $CSE^{-/-}$-Mäusen durchgeführt.
In dieser Arbeit konnte im Verlauf der kutanen Wundheilung von Wildtyp-Mäusen sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene eine Regulierung der CSE und der CBS beobachtet werden. Dabei kam es zu einem Anstieg der Protein- und mRNA-Expression 13 Tage nach Verwundung der Mäuse. RNA-Analysen der Wunden von WT-Mäusen zeigten dabei einen signifikantes Expressionsmaximum der CSE an Tag 13, während die Erhöhung der Expression von CBS und 3-MST lediglich eine Tendenz zeigte. In Expressionsstudien von Wunden aus $CSE^{-/-}$-Mäusen waren hingegen signifikante Maxima von CBS und 3-MST an Tag 13 zu sehen. Diese Ergebnisse sprechen eindeutig für eine kompensatorische Regulation von CBS und 3-MST, durch den Verlust der CSE. Dabei scheint insbesondere die CBS die Aufgaben der CSE zu übernehmen. Diese Kompensation erklärt wahrscheinlich auch, warum bei optischer Begutachtung und histologischen Analysen der Wunden an Tag 13 keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockout im Wundheilungsverlauf festgestellt werden konnten.

5.3.2.1 Die Protein- und mRNA-Expression von CSE und CBS nimmt im Verlauf der Keratinozytendifferenzierung ab.

Aufgrund des Expressionsmaximums aller Enzyme gegen Ende des Wundheilungsprozesses wurden Keratinozyten für weitere Untersuchungen als Zellkulturmodell verwendet. Um die Differenzierung dieser Zellen zu untersuchen, wurden für Protein- und mRNA-Analysen Cytokeratin 10 als früher und Involucrin als später Differenzierungsmarker verwendet. Die Expression von K10 und IVL nahm mit der Differenzierung der analysierten HaCaT-Zellen zu. Eingeleitet wurde die Differenzierung durch eine konfluente Zelldichte und die Erhöhung der Calcium-Konzentration im Kulturmedium. Mit Einsetzen der Differenzierung und dem Expressionsanstieg der Differenzierungsmarker K10 und IVL, zeigten die Experimente eine deutliche Abnahme der Expression von CSE und CBS. Diese Befunde zur Regulation H_2S-synthetisierender Enzyme während des Differenzierungsprozesses sprechen möglicherweise dafür, dass die Synthese von H_2S eine Rolle bei der Initiierung des Differenzierungsprozess von Keratinozyten spielt. Im späteren Verlauf der Differenzierung könnte es hingegen durch eine negative Rückkopplung zu einer Herunterregulierung von CSE und CBS kommen. Diese Herunterregulierung könnte der Terminierung des Differenzierungsprozesses dienen.

5.3.2.2 Die H_2S-Donoren GYY4137 und Na_2S_4 beeinflussen die Differenzierung von HaCaT-Zellen.

Durch die Behandlung von HaCaT-Zellen mit GYY4137, einem langsam freisetzenden H_2S-Donor, wurde der Einfluss von exogenem H_2S auf den Differenzierungsprozess von Keratinozyten analysiert. Tatsächlich führte die Behandlung der Zellen mit GYY4137 zu einer früheren Differenzierung der Zellen. Dies wurde insbesondere durch das Expressionsmuster des frühen Differenzierungsmarkers K10 deutlich[Goren et al., 2019]. Insbesondere die mRNA-Expression von K10 zeigt durch die Behandlung mit GYY4137 nicht nur eine zeitlich frühere, sondern auch eine deutlich höhere mRNA-Expression im Verlauf der Differenzierung. Eine frühere Erhöhung der mRNA-Expression nach GYY4137-Stimulation ist auch bei Involucrin zu sehen. Im Gegensatz zur K10-Expression wird die IVL-Expression jedoch gegen Ende der untersuchten Zeitreihe nicht erhöht. Die Tatsache, dass in unseren Experimenten durch GYY4137 eine frühere Differenzierung der Zellen beobachtet werden konnte und insbesondere die mRNA-Expression des frühen Differenzierungsmarkers K10 beeinflusst wurde, lässt vermuten, dass H_2S insbesondere die frühe Differenzierungsphase von Keratinozyten beeinflusst.

Dass in den Experimenten die mRNA-Expression der Differenzierungsmarker K10 und IVL durch Na_2S_4 nicht so stark beeinflusst wurden wie durch GYY4137, kann unterschiedliche Gründe haben. Zum einen könnten die gewählten Versuchsbedingungen nicht optimal gewesen sein, so dass die Konzentration von Na_2S_4 zu gering oder die Stimulationsdauer zu kurz war. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass Na_2S_4 andere zelluläre Prozesse beeinflusst als GYY4137. So wurde gezeigt, dass das Polysulfid Na_2S_4 viel effektiver Persulfide bildet als GYY4137 [Longen et al., 2016]. Aufgrund dessen lässt sich die Vermutung aufstellen, dass die Differenzierung von Keratinozyten nicht direkt oder alleine über die Bildung von Persulfiden, sondern über einen anderen H_2S-abhängigen Mechanismus reguliert wird.

Die Behandlung der Zellen mit GYY4137 und Na_2S_4 führt vor Einsetzen der Differenzierung eher zu einer Hemmung der mRNA-Expression der CSE, während die mRNA-Expression der CSE nach Einsetzen der Differenzierung tendenziell erhöht ist. Die mRNA-Expression der CBS hingegen unterscheidet sich je nachdem, ob die Zellen mit GYY4137 oder Na_2S_4 behandelt wurden. Eine Behandlung mit GYY4137 führt vor der Differenzierung zu einer Herunterregulierung und nach Einsetzen der Differenzierung tendenziell zu einer Hochregulierung der CBS mRNA-Expression. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung mit Na_2S_4 vor und nach Einsetzen der Differenzierung zu einer Erhöhung der CBS mRNA-

Expression. Unterschiede in der Wirkweise von GYY4137 und Na_2S_4 wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits früher beobachtet [Longen et al., 2016]. Diese könnten aufgrund der vergleichsweise langsamen Freisetzung von H_2S durch Na_2S_4 im Vergleich zur Freisetzung durch GYY4137 zu Stande kommen. Eine andere Erklärung für die unterschiedlichen Beobachtungen könnte sein, dass wie bereits in diesem Kapitel erwähnt, das Polysulfid Na_2S_4 effektiver Persulfide bildet als GYY4317.

5.3.2.3 Eine Überexpression der CSE führt zu Herrunterregulierung der Proliferationsrate.

Um den Einfluss einer CSE-Überexpression in HaCaT-Zellen zu analysieren, wurden CSE-überexprimierende HaCaT-Zelllinien generiert und analysiert. Die Untersuchungen der Proliferation zeigten einen deutlichen Effekt der CSE-Überexpression in allen untersuchten Zelllinien. Die Proliferationsrate der CSE-überexprimierenden Zellen war im Vergleich zur Proliferationsrate des Wildtyps um bis zu 50 % reduziert.
Im Vergleich dazu war der Effekt der exogenen H_2S-Stimulation durch GYY4137, mit einer Reudzierung der Proliferationsrate um etwa 30 % im Vergleich zu unstimulierten Zellen, verhältnismäßig gering. Die Kombination beider Stimuli hatte in den durchgeführten Experimenten den größten Einfluss auf die Proliferation von Keratinozyten.
Geht man davon aus, dass mit der Erhöhung der CSE-Expression auch eine Erhöhung der H_2S-Freisetzung einhergeht, kann man die Vermutung aufstellen, dass die Überexpression der CSE entweder größere Mengen H_2S freisetzt als 400 µM GYY4137, oder dass eine endogene Stimulation der Zellen mit H_2S einen größeren Einfluss auf die Proliferation der Zellen hat als eine exogene.
Um beurteilen zu können, ob die Hemmung der Proliferation tatsächlich auf eine erhöhte Freisetzung von H_2S zurückzuführen ist, müsste eigentlich eine H_2S-Messung durchgeführt werden. Da zu erwarten war, dass nur sehr geringe Mengen H_2S gebildet weren und es derzeit in der Fachwelt keine anerkannte Methode zur Messung kleiner Mengen H_2S in Zellkulturen gibt, konnten diese Analysen im Rahmen dieser Arbeit nciht durchgeführt werden.

Im Gegensatz zu dem starken Einfluss der CSE-Überexpression auf die Proliferation, zeigt keine der überexprimierenden Zelllinien auf mRNA-Ebene eine Erhöhung der K10- und IVL-Expression. Im Gegensatz zu den mRNA-Expressionsanalysen von HaCaT-Zellen nach GYY4137-Behandlung, bei denen die Gabe von GYY4137 zu einer Erhöhung der

K10-Expression führt, zeigen die überexprimierenden Zelllinien einen hemmenden Effekt auf die K10-mRNA-Expression. Die Involucrin-Expression blieb durch die Überexpression nahezu unverändert. Geht man erneut von der Annahme aus, dass eine Überexpression der CSE zu einer Erhöhung der H_2S-Freisetzung führt, könnten die ausbleibenden Effekte dafür sprechen, dass keine ausreichende Überexpression der CSE und somit keine ausreichende Steigerung der H_2S-Freisetzung stattgefunden hat, um die mRNA-Expression der Differenzierungsmarker K10 und IVL zu beeinflussen. Eine andere Erklärung für die Ergebnisse der mRNA-Analyse könnte sein, dass die Erhöhung der exogenen H_2S-Konzentration durch die Gabe von GYY4137 und Na_2S_4 für die mRNA-Expression effektiver ist, als eine Erhöhung der endogenen H_2S-Konzentration.
Für folgende Experimente sollten zusätzlich zu den bereits generierten CSE-überexprimierenden Zelllinien weitere Zelllinien erstellt werden. Dadurch würde sich die Wahrscheinlich erhöhen zumindest eine stark überexprimierende Zelllinie zu erhalten, deren Überexpression ausreicht, um einen Effekt auf die mRNA-Expression von K10 und IVL auslösen zu können.
Im Idealfall sollte eine Methode gefunden werden, die eine Bestimmung der tatsächlichen H_2S-Konzentration in der Zelle ermöglicht. Könnte man die Konzentration von H_2S bestimmen, würde man leichter eine Aussage darüber treffen können, ob die Ergebnisse dieser Versuche auf die Konzentration oder den Ursprung von H_2S zurückzuführen sind.

5.3.2.4 $p21^{Cip/WAF-1}$ und C/EBP sind mögliche Regulatoren der H_2S-vermittelten HaCaT-Differenzierung

Aufgrund des GYY4137-Effektes auf die frühe Differenzierung von HaCaT-Zellen wurde die Rolle von $p21^{Cip/WAF-1}$, einem Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen, analysiert. p21 spielt eine Rolle bei der Initiierung der Keratinozytendifferenzierung und eine inhibierende Wirkung in der späten Phase der Differenzierung. Eine Deletion von p21 konnte als Auslöser für eine Erhöhung der K10-Expression bestimmt werden [Devgan et al., 2006].
In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg der $p21^{Cip/WAF-1}$-mRNA-Expression wie er in unstimulierten HaCaT-Zellen im Lauf der Differenzierung zu beobachten war, durch eine Behandlung mit GYY4137 unterbunden wurde. Laut Literatur geht eine Erhöhung der K10-mRNA-Expression mit einer Deletion von $p21^{Cip/WAF-1}$ einher [Devgan et al., 2006]. Auch in dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die GYY4137-bedingte Erhöhung der K10-Expression mit einer Inhibierung der $p21^{Cip/WAF-1}$-Expression in Zusammenhang gebracht werden kann. Möglicherweise wird durch die Herunterregulierung

von $p21^{Cip/WAF-1}$ dessen inhibitorischer Effekt auf die späte Phase der Differenzierung aufgehoben, was sich in unseren Ergebnissen in der höheren K10- und IVL-Expression gegen Ende der untersuchten Zeitreihe bemerkbar macht.

Neben $p21^{Cip/WAF-1}$ wurde C/EBP als möglicher Regulator der H_2S-vermittelten HaCaT-Differenzierung analysiert. Erste Experimente mit dem Cignal C/EBP Reporter Kit von Qiagen zeigten jedoch keinen Einfluss von H_2S auf die Aktivität von C/EBPα und β.

Für weitere Versuche wurden Luciferase-Konstrukte mit unterschiedlich langen K10-Promotorfragmenten generiert und analysiert. Eines der Konstrukte, pGL3hsK10P550XH, zeigte eine signifikante Aktivitätssteigerung nach der Behandlung mit GYY4137. Da das nächst kürzere K10-Promotorfragment, welches eine um 250 bp verkürzte K10-Promotorsequenz besitzt keine Aktivitätsveränderung nach der GYY4137-Behandlung zeigte, ist anzunehmen, dass im Bereich dieser 250 Basenpaare eine durch H_2S-beeinflussbare Sequenz liegt. Innerhalb dieser Sequenz liegen die Bindestellen für C/EBPα und C/EBPγ. C/EBPα konnte neben C/EBPβ als Regulator der Keratinozytendifferenzierung identifiziert werden [Lopez et al., 2009]. C/EBPγ hingegen wurde bisher nicht mit der Differenzierung von Keratinozyten in Verbindung gebracht, jedoch spielt C/EBPγ bei Migrationsprozessen im Verlauf der Wundheilung eine Rolle [Melchionna et al., 2012].

Die Tatsache, dass H_2S die Luciferaseaktivität des Cignal-C/EBP-Reporter-Kits nicht beeinflussen konnte, spricht zunächst gegen eine C/EBPα-vermittelte Regulation. Jedoch wurden die Konstrukte des Kits durch chemische Transfektion und die in dieser Arbeit klonierten K10-Promotorkonstrukte durch Elektroporation transfiziert. Möglich ist, dass durch Elektroporation die Transfektionseffizienz erhöht wird und diese effektivere Transfektion auch bei den Konstrukten des C/EBP-Reporter-Kits zu einer höheren Stimulierbarkeit von C/EBPα führen könnte.

In folgenden Experimenten sollten die Bindestellen von C/EBPα und γ in der K10-Promotorsequenz durch gezielte Mutationen verändert werden, um die Stimulierbarkeit durch GYY4137 genauer zu analysieren.

Des Weiteren sollten Experimente geplant werden, in denen die Funktion von CSE und CBS pharmakologisch oder durch den Gebrauch von siRNA inhibiert wird. Pharmakologische Inhibitoren wie beispielsweise β-Cyanoalanin (BCA) und Propagylglycin (PAG) inhibieren die Enzymaktivität der CSE, beeinflussen jedoch in der für eine vollständige Inhibierung benötigten Konzentration auch andere Enzyme wie Beispielsweise die Aspartat β-Decarboxylase und die Alanin Aminotransferase [Asimakopoulou et al., 2013]. Ergebnisse, die durch eine Inhibierung mit BCA oder PAG erzielt werden, sind somit nicht eindeutig

auf eine Inhibierung der CSE-Aktivität zurückzuführen. Auch die Aminooxyessigsäure (AOAA), die in der Literatur oftmals als spezifischer CBS-Inhibitor beschrieben wird, ist eigentlich ein genereller Inhibitor für Aminotransferasen [Asimakopoulou et al., 2013].
Der Einsatz von siRNA ist im Vergleich zu den unspezifischen pharmakologischen Inhibitoren spezifischer. HaCaT-Zellen lassen sich jedoch nur schwierig transfizieren, weshalb eine Inhibierung der CSE- bzw. CBS- Aktivität möglicherweise nur teilweise erfolgt und diese auch nicht von Dauer ist, da lediglich die zum Zeitpunkt der Transfektion vorhandenen mRNA-Moleküle gebunden und degradiert werden. Insbesondere die Tatsache, dass eine siRNA-bedingte Inhibierung lediglich wenige Tage anhält, macht eine Untersuchung der Keratinozytendifferenzierung, die sich in unseren Experimenten über einen Zeitraum von 10 Tagen erstreckt, unmöglich. Für die Analyse einer solchen Zeitkinetik wäre ein permanenter Gen-*Knockdown* der CSE und CBS hilfreich, wie er beispielsweise durch CRISPR/Cas9 generiert werden kann [Jinek et al., 2012].

5.4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss von Clp36 auf Migrations-, Adhäsions- und Proliferationsvorgänge in murinen Mesangiumzellen untersucht. Mit Hilfe von $Clp36^{-/-}$-Mesangiumzellen konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von Clp36 zu einer Verringerung der Migrations- und einer Erhöhung der Proliferationsrate in Mesangiumzellen führt. Die Adhäsionsanalyse der $Clp36^{-/-}$-Zellen ergab keine signifikanten Unterschiede.
Des Weiteren wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal der Einfluss von Clp36 in einem MCAO-Modell analysiert. Die Untersuchungen ergaben jedoch, dass Clp36 keinen Einfluss auf die zerebrale Ischämie und die anschließende Reperfusion hat.
Phänotypische Untersuchungen der $Clp36^{-/-}$-Mäuse, welche bei PhenoPro in Auftrag gegeben wurden, ergaben lediglich einen etwas niedirgeren Blutdruck und tendenziell geringere Fibrinogen-Level nach einer AngiotensinII/Losartan-Behandlung. Diese weitgehend unauffälligen phänotypischen Untersuchungen und eigene Analysen wichtiger Signalwege wie Nrf2 und NF-κB, die keinen Unterschied zwischen WT und KO zeigten, könnten möglicherweise auf einen kompensatorischen Effekt durch ein anderes Protein, beispielsweise ein anderes PDLIM-Protein, hinweisen.
Eindeutigere Ergebnisse konnten mit dem Knockout der CSE generiert werden.
Die Untersuchungen an $CSE^{-/-}$-Mesangiumzellen zeigten zum ersten Mal den Einfluss einer CSE-Deletion auf die Migration, Adhäsion und Proliferation von Mesangiumzellen.

In diesen Analysen führte die Deletion der CSE zu einer Steigerung aller untersuchten Prozesse. In dieser Arbeit wurden außerdem erstmalig $CSE^{-/-}$-Mäuse in einem MCAO-Modell untersucht. Dabei konnte eine tendenzielle Reduktion des Infarktvolumens gezeigt werden.

Die Experimente mit Wildtyp-Mäusen im Modell der kutanen Wundheilungen zeigen in dieser Arbeit zum ersten Mal eine Regulierung der CSE im Verlauf der Wundheilung und einen kompensatorischen Effekt der CBS und 3-MST in Wundheilungsanalysen von $CSE^{-/-}$-Mäusen. Weiterhin konnte ein Einfluss des H_2S-Donors GYY4137 auf die Differenzierung von Keratinozyten beobachtet werden. Dabei konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ein frühzeitiges Einsetzen der Differenzierung beobachtet werden. Insbesondere die Expression des frühen Differenzierungsmarkers Cytokeratin 10 konnte durch eine Behandlung mit GYY4137 gesteigert werden. Einen ähnlichen, wenn auch schwächeren Einfluss auf die HaCaT-Differenzierung konnte auch mit dem H_2S-Donor Na_2S_4 gezeigt werden. Erste Experimente, zur Analyse eines molekularen Mechanismus, gaben Hinweise darauf, dass $p21^{Cip/WAF-1}$ oder C/EBP mögliche Regulatoren für die beobachteten H_2S-vermittelten Effekte sind. Neben dem Einfluss von H_2S auf die Differenzierung von Keratinozyten wurde ebenfalls der Einfluss von H_2S auf die Proliferation von Keratinozyten analysiert. Dabei führte sowohl eine Überexpression der CSE als auch eine Behandlung mit GYY4137 zu einer Beeinträchtigung der Proliferation.

6 Abbildungsverzeichnis

1.1 Enzymatische Produktion von H_2S: . . . 2
1.2 Aufbau der Niere . . . 7
1.3 Aufbau des Glomerulums . . . 8
1.4 Blutversorgung des Gehirns . . . 11
1.5 Aufbau der Haut . . . 14
1.6 Aufbau der Epidermis . . . 16
1.7 Phasen der kutanen Wundheilung . . . 18
1.8 Inflammatorische Phase . . . 19
1.9 Granulationsphase . . . 19
1.10 Remodellierungsphase . . . 20

3.1 Darstellung des zerebrovaskulären Systems . . . 69
3.2 Messung des Infarktvolumens in ImageJ . . . 72

4.1 Silberfärbung einer 2D-PAGE. . . . 75
4.2 Western Blot Analyse der durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine. 76
4.3 Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung von Clp36 in Mesangiumzellen. 77
4.4 Adhäsionsanalyse muriner Clp36$^{-/-}$- und CSE$^{-/-}$-Mesangiumzellen. . . . 79
4.5 Migrationssanalyse muriner Clp36$^{-/-}$- und CSE$^{-/-}$-Mesangiumzellen. . . . 81
4.6 Proliferationsanalyse muriner Clp36$^{-/-}$- und CSE$^{-/-}$-Mesangiumzellen. . . . 83
4.7 Auswertung des Infarktvolumens von Wildtyp-, Clp36$^{-/-}$- und CSE$^{-/-}$-Mäusen. 85
4.8 Proteinexpression in Wildtyp-, Clp36$^{-/-}$- und CSE$^{-/-}$-Mäusen . . . 86
4.9 CSE und CBS mRNA-Expression im Verlauf der Wundheilung von Wildtyp-Mäusen . . . 88
4.10 CSE, CBS und Clp36 Proteinexpression in Wildtyp-Wunden . . . 89
4.11 Protein- und mRNA-Expression an Tag 11, 13 und 15 . . . 91
4.12 CSE, CBS und 3-MST mRNA-Expression in Wildtyp- und CSE$^{-/-}$-Mäusen . 93
4.13 Azan-Färbung 13 Tage alter Wunden von Wildtyp- und CSE$^{-/-}$-Mäusen . . 94
4.14 Immunhistochemische Färbung der CSE in Wunden von WT- und CSE$^{-/-}$-Mäusen. . . . 95
4.15 Immunhistochemische Färbung der CBS in Wunden von WT- und CSE$^{-/-}$-Mäusen. . . . 96
4.16 K10, IVL, CSE und CBS mRNA-Expression im Laufe der HaCaT-Differenzierung 98

4.17 Proteinexpression im Laufe der HaCaT-Differenzierung 100
4.18 Einfluss von Calcium auf die mRNA-Expression von K10, Involucrin, CSE und CBS 101
4.19 K10-, IVL-, CSE- und CBS-mRNA-Expression nach GYY4137-Behandlung 103
4.20 K10-, IVL-, CSE- und CBS-Proteinexpression nach GYY4137-Behandlung . 105
4.21 Untersuchung der Zytotoxizität von GYY4137 107
4.22 K10-, IVL-, CSE- und CBS-mRNA-Expression nach Na_2S_4-Behandlung . . 108
4.23 Überprüfung der CSE-überexprimierenden Zelllinien 109
4.24 Analyse der HaCaT-Proliferation in Abhängigkeit von H_2S. 111
4.25 mRNA-Analyse der CSE-überexprimierenden Zelllinien 113
4.26 $p21^{Cip/WAF-1}$-mRNA-Expression in Abhängigkeit von GYY4137 115
4.27 Luciferase-Analyse C/EBP 116
4.28 Luciferase-Analyse der K10-Promotorfragmente. 117

7 Tabellenverzeichnis

2.1 Verwendete Verbrauchsmaterialien . . . 23
2.2 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Stammlösungen . . . 24
2.3 Kits . . . 27
2.4 Enzyme . . . 27
2.5 Primärantikörper . . . 28
2.6 Zweitantikörper . . . 29
2.7 Plasmide . . . 29
2.8 Oligonukleotide für Klonierungen . . . 30
2.9 Primer für Genotypisierungen . . . 30
2.10 Taqman-Sonden . . . 31
2.11 Zelllinien . . . 32
2.12 Medien für die Kultur von Säugerzellen . . . 32
2.13 Zusammensetzung der Säugerzell-Medien . . . 32
2.14 Zusammensetzung der Säugerzell-Medien . . . 33
2.15 Geräte . . . 34

3.1 Pipettierschema reverse Transkription . . . 37
3.2 Pipettierschema Pfu-Polymerase . . . 38
3.3 PCR-Bedingungen Pfu-Polymerase . . . 39
3.4 Pipettierschema Taq-Polymerase . . . 39
3.5 PCR-Bedingungen Taq-Polymerase . . . 39
3.6 Pipettierschema *Nested*-PCR . . . 40
3.7 PCR-Bedingungen *Nested*-PCR . . . 40
3.8 Pipettierschema qPCR . . . 41
3.9 PCR-Bedingungen Fast Advanced Master Mix . . . 42
3.10 PCR-Bedingungen qPCRBIO Probe Mix Lo-ROX . . . 42
3.11 Pipettierschema Restriktionsverdau . . . 43
3.12 Pipettierschema Ligation . . . 44
3.13 Pipettierschema Genotypisierung . . . 49
3.14 PCR-Bedingungen Genotypisierung . . . 50

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AOAA	Aminooxyessigsäure
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	β-Cyanoalanin
bp	Basenpaar
BSA	Rinderalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
$CaCl_2$	Calciumchlorid
Cas	*CRISPR-associated*
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
CBS	Cystathionin-beta-Synthase
cDNA	*complementary* DNA
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CRISPR	*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
CSE	Cystathionin-gamma-Lyase
C-terminal	carboxyterminal
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DAO	Diaminoxidase
DDW	doppelt destillierts Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*)

EtOH	Ethanol
ECL	Elektrochemilumineszenz
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N´,N´-tetraessigsäure
ERK	*Extracellular-signal Regulated Kinases*
EtOH	Ethanol
et. al.	und andere
FAK	*Focal Adhesion Kinase*
FCS	Fötales Kälber Serum (*fetal calf serum*)
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (*Fibroblast Growth Factor*
FHL	*Four and a half LIM domain protein*
FN	Fibronektin
g	Gramm
G	Gauge
GSCN	Guanidiumthiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GPVI	Glykoprotein VI
h	Stunde
H_2S	Schwefelwasserstoff, Hydrogensulfat
HaCaT	*Human adult low Calcium high Temperature*
HO-1	Hämoxygenase 1
HRP	Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*)
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IL-	Interleukin-
IVL	Involucrin
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
k	Kilo-
K10	Zytokeratin10
kb	Kilobase

KO	Knockout
ktrl	Kontrolle
l	Liter
LB	*lysogeny broth*
Lsg.	Lösung
LTP	Langzeitpotenzierung
M	molar (Mol/Liter)
max.	Maximum, maximal
MCAO	*Middle Cerebral Artery Occlusion*
mg	Milligramm
min	Minimum, mindestens
mk	monoklonal
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
min	Minute
MPST (3-MST)	3-Mercaptopyruvat Sulfurtransferase
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Molekulargewicht
µ	Mikro-
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
Na_2CO_3	Natriumcarbonat
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
N-terminal	aminoterminal
p-	phospho-
PAG	Propagylglycin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	*Platelet-derived growth factor*
PDLIM	*PDZ and Lim domain protein*
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration
pI	Isoelektrischer Punkt
pk	polyklonal
PLP	Pyridoxal-5′-Phosphat
RPLP0	*Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0*
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*)
RT	Raumtemperatur
PBS	*phosphate buffered saline*
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Echtzeit-PCR (*Real Time Quantitative PCR*
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
siRNA	*small interfering* RNA
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS(T)	*Tris-buffered saline* (mit Tween20)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethyl-aminomethan
TGF	*transforming growth factor*
TNF	Tumornekrosefaktor
Trx	Thioredoxin
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
TPF	1,3,5-Triphenylformazan
U	unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht

UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	*vascular endothelial growth factor*
WB	Western Blot
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

9 Literaturverzeichnis

[Abe and Kimura, 1996] Abe, K. and Kimura, H. (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(3):1066–1071.

[Alberts, 2002] Alberts, B. (2002). *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York NY u.a., 4. ed., 2. print edition.

[Allen et al., 1997] Allen, A. C., Topham, P. S., Harper, S. J., and Feehally, J. (1997). Leucocyte beta 1,3 galactosyltransferase activity in iga nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 12(4):701–706.

[Altman, 1976] Altman, F. P. (1976). Tetrazolium salts and formazans. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 9(3):1–56.

[Asimakopoulou et al., 2013] Asimakopoulou, A., Panopoulos, P., Chasapis, C. T., Coletta, C., Zhou, Z., Cirino, G., Giannis, A., Szabo, C., Spyroulias, G. A., and Papapetropoulos, A. (2013). Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine beta synthase (cbs) and cystathionine gamma lyase (cse). *British journal of pharmacology*, 169(4):922–932.

[Barrientos et al., 2008] Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 16(5):585–601.

[Bauer et al., 2000] Bauer, K., Kratzer, M., Otte, M., de Quintana, K. L., Hagmann, J., Arnold, G. J., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., and Siess, W. (2000). Human clp36, a pdz-domain and lim-domain protein, binds to alpha-actinin-1 and associates with actin filaments and stress fibers in activated platelets and endothelial cells. *Blood*, 96(13):4236–4245.

[Benveniste et al., 1984] Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A., and Diemer, N. H. (1984). Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *Journal of neurochemistry*, 43(5):1369–1374.

[Boukamp, 1988] Boukamp, P. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*, 106(3):761–771.

[Bradford, 1976] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72:248–254.

[Brown et al., 1993] Brown, L. F., Dubin, D., Lavigne, L., Logan, B., Dvorak, H. F., and van de Water, L. (1993). Macrophages and fibroblasts express embryonic fibronectins during cutaneous wound healing. *The American journal of pathology*, 142(3):793–801.

[Cai et al., 2007] Cai, W.-J., Wang, M.-J., Moore, P. K., Jin, H.-M., Yao, T., and Zhu, Y.-C. (2007). The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on akt phosphorylation. *Cardiovascular research*, 76(1):29–40.

[Caliendo et al., 2010] Caliendo, G., Cirino, G., Santagada, V., and Wallace, J. L. (2010). Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (h2s): development of h2s-releasing drugs as pharmaceuticals. *Journal of medicinal chemistry*, 53(17):6275–6286.

[Chang et al., 2015] Chang, E. H., Gasim, A. H., Kerber, M. L., Patel, J. B., Glaubiger, S. A., Falk, R. J., Jennette, J. C., and Otey, C. A. (2015). Palladin is upregulated in kidney disease and contributes to epithelial cell migration after injury. *Scientific reports*, 5:7695.

[Chattopadhyay et al., 2012] Chattopadhyay, M., Kodela, R., Nath, N., Barsegian, A., Boring, D., and Kashfi, K. (2012). Hydrogen sulfide-releasing aspirin suppresses nf-kappab signaling in estrogen receptor negative breast cancer cells in vitro and in vivo. *Biochemical pharmacology*, 83(6):723–732.

[Clark et al., 1982] Clark, R. A., Lanigan, J. M., DellaPelle, P., Manseau, E., Dvorak, H. F., and Colvin, R. B. (1982). Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *The Journal of investigative dermatology*, 79(5):264–269.

[Coderch et al., 2003] Coderch, L., López, O., de La Maza, A., and Parra, J. L. (2003). Ceramides and skin function. *American journal of clinical dermatology*, 4(2):107–129.

[Cooper, 1983] Cooper, A. J. (1983). Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annual review of biochemistry*, 52:187–222.

[Couchman et al., 1994] Couchman, J. R., Beavan, L. A., and McCarthy, K. J. (1994). Glome-

rular matrix: synthesis, turnover and role in mesangial expansion. *Kidney international*, 45(2):328–335.

[D'Amico, 1987] D'Amico, G. (1987). The commonest glomerulonephritis in the world: Iga nephropathy. *The Quarterly journal of medicine*, 64(245):709–727.

[Desmoulière et al., 2005] Desmoulière, A., Chaponnier, C., and Gabbiani, G. (2005). Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 13(1):7–12.

[Desmouliere et al., 1995] Desmouliere, A., Redard, M., Darby, I., and Gabbiani, G. (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *The American journal of pathology*, 146(1):56–66.

[Devgan et al., 2006] Devgan, V., Nguyen, B.-C., Oh, H., and Dotto, G. P. (2006). p21waf1/cip1 suppresses keratinocyte differentiation independently of the cell cycle through transcriptional up-regulation of the igf-i gene. *The Journal of biological chemistry*, 281(41):30463–30470.

[Dipietro, 1995] Dipietro, L. A. (1995). Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock (Augusta, Ga.)*, 4(4):233–240.

[Dirnagl et al., 1999] Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences*, 22(9):391–397.

[Dohi et al., 2003] Dohi, K., Mochizuki, Y., Satoh, K., Jimbo, H., Hayashi, M., Toyoda, I., Ikeda, Y., Abe, T., and Aruga, T. (2003). Transient elevation of serum bilirubin (a heme oxygenase-1 metabolite) level in hemorrhagic stroke: bilirubin is a marker of oxidant stress. *Acta neurochirurgica. Supplement*, 86:247–249.

[Donadio and Grande, 2002] Donadio, J. V. and Grande, J. P. (2002). Iga nephropathy. *The New England journal of medicine*, 347(10):738–748.

[Eckert et al., 2005] Eckert, R. L., Sturniolo, M. T., Broome, A.-M., Ruse, M., and Rorke, E. A. (2005). Transglutaminase function in epidermis. *The Journal of investigative dermatology*, 124(3):481–492.

[Edvinsson et al., 1993] Edvinsson, L., MacKenzie, E. T., and MacCulloch, J. (1993). *Cerebral blood flow and metabolism*. Raven Pr, New York.

[Eisel, 2013] Eisel, F. (2013). Dissertation.

[Engelhardt et al., 1998] Engelhardt, E., Toksoy, A., Goebeler, M., Debus, S., Brocker, E. B., and Gillitzer, R. (1998). Chemokines il-8, groalpha, mcp-1, ip-10, and mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *The American journal of pathology*, 153(6):1849–1860.

[Enokido et al., 2005] Enokido, Y., Suzuki, E., Iwasawa, K., Namekata, K., Okazawa, H., and Kimura, H. (2005). Cystathionine beta-synthase, a key enzyme for homocysteine metabolism, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage of developing mouse cns. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(13):1854–1856.

[Falanga, 2005] Falanga, V. (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet (London, England)*, 366(9498):1736–1743.

[Ferlito et al., 2014] Ferlito, M., Wang, Q., Fulton, W. B., Colombani, P. M., Marchionni, L., Fox-Talbot, K., Paolocci, N., and Steenbergen, C. (2014). H2s increases survival during sepsis: Protective effect of chop inhibition. *The Journal of Immunology*, 192(4):1806–1814.

[Finkelstein et al., 1975] Finkelstein, J. D., Kyle, W. E., Martin, J. L., and Pick, A. M. (1975). Activation of cystathionine synthase by adenosylmethionine and adenosylethionine. *Biochemical and biophysical research communications*, 66(1):81–87.

[Ghayur et al., 2008] Ghayur, M. N., Krepinsky, J. C., and Janssen, L. J. (2008). Contractility of the renal glomerulus and mesangial cells: Lingering doubts and strategies for the future. *Medical hypotheses and research : MHR*, 4(1):1–9.

[Ghazizadeh and Taichman, 2001] Ghazizadeh, S. and Taichman, L. B. (2001). Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *The EMBO journal*, 20(6):1215–1222.

[Gobbi et al., 2009] Gobbi, G., Ricci, F., Malinverno, C., Carubbi, C., Pambianco, M., Panfilis, G. d., Vitale, M., and Mirandola, P. (2009). Hydrogen sulfide impairs keratinocyte cell growth and adhesion inhibiting mitogen-activated protein kinase signaling. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 89(9):994–1006.

[Goliger and Paul, 1995] Goliger, J. A. and Paul, D. L. (1995). Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. *Molecular biology of the cell*, 6(11):1491–1501.

[Goodwin and Pauli, 1995] Goodwin, A. E. and Pauli, B. U. (1995). A new adhesion

assay using buoyancy to remove non-adherent cells. *Journal of immunological methods*, 187(2):213–219.

[Goren et al., 2019] Goren, I., Köhler, Y., Aglan, A., Pfeilschifter, J., Beck, K.-F., and Frank, S. (2019). Increase of cystathionine-gamma-lyase (cse) during late wound repair: Hydrogen sulfide triggers cytokeratin 10 expression in keratinocytes. *Nitric oxide : biology and chemistry*, 87:31–42.

[Green and Jones, 1996] Green, K. J. and Jones, J. C. (1996). Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(8):871–881.

[Greiner et al., 2013] Greiner, R., Palinkas, Z., Basell, K., Becher, D., Antelmann, H., Nagy, P., and Dick, T. P. (2013). Polysulfides link h2s to protein thiol oxidation. *Antioxidants & redox signaling*, 19(15):1749–1765.

[Griffith, 1999] Griffith, O. W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free radical biology & medicine*, 27(9-10):922–935.

[Grinnell and Feld, 1981] Grinnell, F. and Feld, M. K. (1981). Distribution of fibronectin on peripheral blood cells in freshly clotted blood. *Thrombosis research*, 24(5-6):397–404.

[Gupta et al., 2012] Gupta, S., Braun, A., Morowski, M., Premsler, T., Bender, M., Nagy, Z., Sickmann, A., Hermanns, H. M., Bösl, M., and Nieswandt, B. (2012). Clp36 is a negative regulator of glycoprotein vi signaling in platelets. *Circulation research*, 111(11):1410–1420.

[Gurtner et al., 2008] Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., and Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193):314–321.

[Hacke and Poeck, 2010] Hacke, W. and Poeck, K. (2010). *Neurologie: Mit 83 Tabellen*. Springer-Lehrbuch. Springer Medizin Verl., Heidelberg, 13., vollst. überarb. aufl. edition.

[Hassan et al., 2012] Hassan, M. I., Boosen, M., Schaefer, L., Kozlowska, J., Eisel, F., von Knethen, A., Beck, M., Hemeida, R. A. M., El-Moselhy, M. A. M., Hamada, F. M. A., Beck, K.-F., and Pfeilschifter, J. (2012). Platelet-derived growth factor-bb induces cystathionine gamma-lyase expression in rat mesangial cells via a redox-dependent mechanism. *British journal of pharmacology*, 166(8):2231–2242.

[Heid et al., 1996] Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., and Williams, P. M. (1996). Real time quantitative pcr. *Genome research*, 6(10):986–994.

[Heidenhain, 1915] Heidenhain (1915). Über die mallorysche bindegewebsfärbung mit karmin und azokarmin als vorfarben.

[Hubner et al., 1996] Hubner, G., Brauchle, M., Smola, H., Madlener, M., Fassler, R., and Werner, S. (1996). Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine*, 8(7):548–556.

[Ichinohe et al., 2005] Ichinohe, A., Kanaumi, T., Takashima, S., Enokido, Y., Nagai, Y., and Kimura, H. (2005). Cystathionine beta-synthase is enriched in the brains of down's patients. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(3):1547–1550.

[Ishii et al., 2010] Ishii, I., Akahoshi, N., Yamada, H., Nakano, S., Izumi, T., and Suematsu, M. (2010). Cystathionine gamma-lyase-deficient mice require dietary cysteine to protect against acute lethal myopathy and oxidative injury. *The Journal of biological chemistry*, 285(34):26358–26368.

[Issa et al., 2013] Issa, K., Kimmoun, A., Collin, S., Ganster, F., Fremont-Orlowski, S., Asfar, P., Mertes, P.-M., and Levy, B. (2013). Compared effects of inhibition and exogenous administration of hydrogen sulphide in ischaemia-reperfusion injury. *Critical care (London, England)*, 17(4):R129.

[Jain et al., 2010] Jain, S. K., Bull, R., Rains, J. L., Bass, P. F., Levine, S. N., Reddy, S., McVie, R., and Bocchini, J. A. (2010). Low levels of hydrogen sulfide in the blood of diabetes patients and streptozotocin-treated rats causes vascular inflammation? *Antioxidants & redox signaling*, 12(11):1333–1337.

[Jarvis et al., 2004] Jarvis, G. E., Best, D., and Watson, S. P. (2004). Glycoprotein vi/fc receptor gamma chain-independent tyrosine phosphorylation and activation of murine platelets by collagen. *The Biochemical journal*, 383(Pt. 3):581–588.

[Jinek et al., 2012] Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-rna-guided dna endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096):816–821.

[Kadrmas and Beckerle, 2004] Kadrmas, J. L. and Beckerle, M. C. (2004). The lim domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(11):920–931.

[Kennedy, 1995] Kennedy, M. B. (1995). Origin of pdz (dhr, glgf) domains. *Trends in biochemical sciences*, 20(9):350.

[Kimura, 2011] Kimura, H. (2011). Hydrogen sulfide: its production, release and functions. *Amino acids*, 41(1):113–121.

[Kimura, 2016] Kimura, H. (2016). Physiological roles of hydrogen sulfide and polysulfides. *Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica*, 147(1):23–29.

[Kimura et al., 2013] Kimura, Y., Mikami, Y., Osumi, K., Tsugane, M., Oka, J.-i., and Kimura, H. (2013). Polysulfides are possible h2s-derived signaling molecules in rat brain. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(6):2451–2457.

[Kimura et al., 2015] Kimura, Y., Toyofuku, Y., Koike, S., Shibuya, N., Nagahara, N., Lefer, D., Ogasawara, Y., and Kimura, H. (2015). Identification of h2s3 and h2s produced by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the brain. *Scientific reports*, 5:14774.

[Kombian et al., 1988] Kombian, S. B., Warenycia, M. W., Mele, F. G., and Reiffenstein, R. J. (1988). Effects of acute intoxication with hydrogen sulfide on central amino acid transmitter systems. *Neurotoxicology*, 9(4):587–595.

[Kos et al., 2003] Kos, C. H., Le, T. C., Sinha, S., Henderson, J. M., Kim, S. H., Sugimoto, H., Kalluri, R., Gerszten, R. E., and Pollak, M. R. (2003). Mice deficient in alpha-actinin-4 have severe glomerular disease. *The Journal of clinical investigation*, 111(11):1683–1690.

[Kotaka et al., 2000] Kotaka, M., Kostin, S., Ngai, S., Chan, K., Lau, Y., Lee, S. M., Li, H. y., Ng, E. K., Schaper, J., Tsui, S. K., Fung, K. p., Lee, C. y., and Waye, M. M. (2000). Interaction of hclim1, an enigma family protein, with alpha-actinin 2. *Journal of cellular biochemistry*, 78(4):558–565.

[Kotaka et al., 1999] Kotaka, M., Ngai, S. M., Garcia-Barcelo, M., Tsui, S. K., Fung, K. p., Lee, C. y., and Waye, M. M. (1999). Characterization of the human 36-kda carboxyl terminal lim domain protein (hclim1). *Journal of cellular biochemistry*, 72(2):279–285.

[Kumar and Clark, 2009] Kumar, P. and Clark, M. L. (2009). *Kumar and Clark's Clinical Medicine*. Elsevier Health Sciences, St. Louis, 7th ed. edition.

[Kuo et al., 1983] Kuo, S. M., Lea, T. C., and Stipanuk, M. H. (1983). Developmental pattern, tissue distribution, and subcellular distribution of cysteine: alpha-ketoglutarate aminotransferase and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase activities in the rat. *Biology of the neonate*, 43(1-2):23–32.

[Lee et al., 2012] Lee, H. J., Mariappan, M. M., Feliers, D., Cavaglieri, R. C., Sataranatarajan,

K., Abboud, H. E., Choudhury, G. G., and Kasinath, B. S. (2012). Hydrogen sulfide inhibits high glucose-induced matrix protein synthesis by activating amp-activated protein kinase in renal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*, 287(7):4451–4461.

[Leibovich and Ross, 1975] Leibovich, S. J. and Ross, R. (1975). The role of the macrophage in wound repair. a study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *The American journal of pathology*, 78(1):71–100.

[Levenson et al., 1965] Levenson, S. M., Geever, E. F., CROWLEY, L. V., OATES, J. F. r., BERARD, C. W., and ROSEN, H. (1965). The healing of rat skin wounds. *Annals of surgery*, 161:293–308.

[Lin et al., 2004] Lin, C., McGough, R., Aswad, B., Block, J. A., and Terek, R. (2004). Hypoxia induces hif-1alpha and vegf expression in chondrosarcoma cells and chondrocytes. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 22(6):1175–1181.

[Liu et al., 2011] Liu, Z., Blattner, S. M., Tu, Y., Tisherman, R., Wang, J. H., Rastaldi, M. P., Kretzler, M., and Wu, C. (2011). Alpha-actinin-4 and clp36 protein deficiencies contribute to podocyte defects in multiple human glomerulopathies. *The Journal of biological chemistry*, 286(35):30795–30805.

[Liu et al., 2015] Liu, Z., Zhan, Y., Tu, Y., Chen, K., and Wu, C. (2015). Pdz and lim domain protein 1(pdlim1)/clp36 promotes breast cancer cell migration, invasion and metastasis through interaction with alpha-actinin. *Oncogene*, 34(10):1300–1311.

[Longa et al., 1989] Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S., and Cummins, R. (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 20(1):84–91.

[Longen et al., 2016] Longen, S., Richter, F., Kohler, Y., Wittig, I., Beck, K.-F., and Pfeilschifter, J. (2016). Quantitative persulfide site identification (qpers-sid) reveals protein targets of h2s releasing donors in mammalian cells. *Scientific reports*, 6:29808.

[Lopez et al., 2009] Lopez, R. G., Garcia-Silva, S., Moore, S. J., Bereshchenko, O., Martinez-Cruz, A. B., Ermakova, O., Kurz, E., Paramio, J. M., and Nerlov, C. (2009). C/ebpalpha and beta couple interfollicular keratinocyte proliferation arrest to commitment and terminal differentiation. *Nature cell biology*, 11(10):1181–1190.

[Lovvorn et al., 1999] Lovvorn, H. N. r., Cheung, D. T., Nimni, M. E., Perelman, N., Estes,

J. M., and Adzick, N. S. (1999). Relative distribution and crosslinking of collagen distinguish fetal from adult sheep wound repair. *Journal of pediatric surgery*, 34(1):218–223.

[Lu et al., 2010] Lu, M., Liu, Y.-H., Goh, H. S., Wang, J. J. X., Yong, Q.-C., Wang, R., and Bian, J.-S. (2010). Hydrogen sulfide inhibits plasma renin activity. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 21(6):993–1002.

[Mackenzie, 1997] Mackenzie, I. C. (1997). Retroviral transduction of murine epidermal stem cells demonstrates clonal units of epidermal structure. *Journal of Investigative Dermatology*, 109(3):377–383.

[Maeda et al., 2009] Maeda, M., Asano, E., Ito, D., Ito, S., Hasegawa, Y., Hamaguchi, M., and Senga, T. (2009). Characterization of interaction between clp36 and palladin. *The FEBS journal*, 276(10):2775–2785.

[Martin, 1997] Martin, P. (1997). Wound healing–aiming for perfect skin regeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5309):75–81.

[Mason and Wahab, 2003] Mason, R. M. and Wahab, N. A. (2003). Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 14(5):1358–1373.

[Melchionna et al., 2012] Melchionna, R., Bellavia, G., Romani, M., Straino, S., Germani, A., Di Carlo, A., Capogrossi, M. C., and Napolitano, M. (2012). C/ebpgamma regulates wound repair and egf receptor signaling. *The Journal of investigative dermatology*, 132(7):1908–1917.

[Meng et al., 2007] Meng, Q. H., Yang, G., Yang, W., Jiang, B., Wu, L., and Wang, R. (2007). Protective effect of hydrogen sulfide on balloon injury-induced neointima hyperplasia in rat carotid arteries. *The American journal of pathology*, 170(4):1406–1414.

[Menon et al., 2013] Menon, M. C., Chuang, P. Y., and He, J. C. (2013). Role of podocyte injury in iga nephropathy. *Contributions to nephrology*, 181:41–51.

[Mestecky et al., 1995] Mestecky, J., Hashim, O. H., and Tomana, M. (1995). Alterations in the iga carbohydrate chains influence the cellular distribution of iga1. *Contributions to nephrology*, 111:66–71; discussion 71–2.

[Mullis et al., 1992] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H.

(1992). Specific enzymatic amplification of dna in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 24:17–27.

[Muniraj et al., 2014] Muniraj, N., Stamp, L. K., Badiei, A., Hegde, A., Cameron, V., and Bhatia, M. (2014). Hydrogen sulfide acts as a pro-inflammatory mediator in rheumatic disease. *International journal of rheumatic diseases*.

[Nagahara et al., 1998] Nagahara, N., Ito, T., Kitamura, H., and Nishino, T. (1998). Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis. *Histochemistry and cell biology*, 110(3):243–250.

[Nagahara et al., 2013] Nagahara, N., Nagano, M., Ito, T., Shimamura, K., Akimoto, T., and Suzuki, H. (2013). Antioxidant enzyme, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase-knockout mice exhibit increased anxiety-like behaviors: a model for human mercaptolactate-cysteine disulfiduria. *Scientific reports*, 3:1986.

[Nagahara et al., 2007] Nagahara, N., Yoshii, T., Abe, Y., and Matsumura, T. (2007). Thioredoxin-dependent enzymatic activation of mercaptopyruvate sulfurtransferase. an intersubunit disulfide bond serves as a redox switch for activation. *The Journal of biological chemistry*, 282(3):1561–1569.

[Namekata et al., 2004] Namekata, K., Enokido, Y., Ishii, I., Nagai, Y., Harada, T., and Kimura, H. (2004). Abnormal lipid metabolism in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model for hyperhomocysteinemia. *The Journal of biological chemistry*, 279(51):52961–52969.

[Niu et al., 2015] Niu, W.-N., Yadav, P. K., Adamec, J., and Banerjee, R. (2015). S-glutathionylation enhances human cystathionine beta-synthase activity under oxidative stress conditions. *Antioxidants & redox signaling*, 22(5):350–361.

[Norgaard, 1983] Norgaard, J. O. (1983). Cellular outgrowth from isolated glomeruli. origin and characterization. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 48(5):526–542.

[O'Farrell, 1975] O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of biological chemistry*, 250(10):4007–4021.

[Olson et al., 2010] Olson, K. R., Whitfield, N. L., Bearden, S. E., St Leger, J., Nilson, E., Gao, Y., and Madden, J. A. (2010). Hypoxic pulmonary vasodilation: a paradigm shift

with a hydrogen sulfide mechanism. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 298(1):R51–60.

[Ortonne et al., 1981] Ortonne, J. P., Loning, T., Schmitt, D., and Thivolet, J. (1981). Immunomorphological and ultrastructural aspects of keratinocyte migration in epidermal wound healing. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histology*, 392(2):217–230.

[Papapetropoulos et al., 2009] Papapetropoulos, A., Pyriochou, A., Altaany, Z., Yang, G., Marazioti, A., Zhou, Z., Jeschke, M. G., Branski, L. K., Herndon, D. N., Wang, R., and Szabo, C. (2009). Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51):21972–21977.

[Paul et al., 2014] Paul, B. D., Sbodio, J. I., Xu, R., Vandiver, M. S., Cha, J. Y., Snowman, A. M., and Snyder, S. H. (2014). Cystathionine gamma-lyase deficiency mediates neurodegeneration in huntington's disease. *Nature*, 509(7498):96–100.

[Qu et al., 2006] Qu, K., Chen, Christopher P L H, Halliwell, B., Moore, P. K., and Wong, P. T.-H. (2006). Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 37(3):889–893.

[Radeke and Resch, 1992] Radeke, H. H. and Resch, K. (1992). The inflammatory function of renal glomerular mesangial cells and their interaction with the cellular immune system. *The Clinical investigator*, 70(9):825–842.

[Rais et al., 2004] Rais, I., Karas, M., and Schagger, H. (2004). Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification. *Proteomics*, 4(9):2567–2571.

[Robert et al., 2003] Robert, K., Vialard, F., Thiery, E., Toyama, K., Sinet, P.-M., Janel, N., and London, J. (2003). Expression of the cystathionine beta synthase (cbs) gene during mouse development and immunolocalization in adult brain. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 51(3):363–371.

[Roop et al., 1983] Roop, D. R., Hawley-Nelson, P., Cheng, C. K., and Yuspa, S. H. (1983). Keratin gene expression in mouse epidermis and cultured epidermal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(3):716–720.

[Ruef et al., 1990] Ruef, C., Budde, K., Lacy, J., Northemann, W., Baumann, M., Sterzel,

R. B., and Coleman, D. L. (1990). Interleukin 6 is an autocrine growth factor for mesangial cells. *Kidney international*, 38(2):249–257.

[Ruef et al., 1992] Ruef, C., Kashgarian, M., and Coleman, D. L. (1992). Mesangial cell-matrix interactions. effects on mesangial cell growth and cytokine secretion. *The American journal of pathology*, 141(2):429–439.

[Schweizer and Winter, 1983] Schweizer, J. and Winter, H. (1983). Keratin biosynthesis in normal mouse epithelia and in squamous cell carcinomas. mrna-dependent alterations of the primary structure of distinct keratin subunits in tumors. *The Journal of biological chemistry*, 258(21):13268–13272.

[Sen et al., 2012] Sen, N., Paul, B. D., Gadalla, M. M., Mustafa, A. K., Sen, T., Xu, R., Kim, S., and Snyder, S. H. (2012). Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of nf-kappab mediates its antiapoptotic actions. *Molecular cell*, 45(1):13–24.

[Sharma et al., 2011] Sharma, P., Shathasivam, T., Ignatchenko, V., Kislinger, T., and Gramolini, A. O. (2011). Identification of an fhl1 protein complex containing actn1, actn4, and pdlim1 using affinity purifications and ms-based protein-protein interaction analysis. *Molecular bioSystems*, 7(4):1185–1196.

[Shibuya et al., 2013] Shibuya, N., Koike, S., Tanaka, M., Ishigami-Yuasa, M., Kimura, Y., Ogasawara, Y., Fukui, K., Nagahara, N., and Kimura, H. (2013). A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from d-cysteine in mammalian cells. *Nature communications*, 4:1366.

[Shibuya et al., 2009] Shibuya, N., Mikami, Y., Kimura, Y., Nagahara, N., and Kimura, H. (2009). Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *Journal of biochemistry*, 146(5):623–626.

[Siess et al., 1982] Siess, W., Lapetina, E. G., and Cuatrecasas, P. (1982). Cytochalasins inhibit arachidonic acid metabolism in thrombin-stimulated platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(24):7709–7713.

[Silbernagl et al., 2003] Silbernagl, S., Despopoulos, A., and Gay, R. (2003). *Taschenatlas der Physiologie*. Flexibles Taschenbuch. Thieme, Stuttgart, 6., korrigierte aufl. edition.

[Silver and Erecinska, 1990] Silver, I. A. and Erecinska, M. (1990). Intracellular and extracellular changes of ca2+ in hypoxia and ischemia in rat brain in vivo. *The Journal of general physiology*, 95(5):837–866.

[Singer and Clark, 1999] Singer, A. J. and Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *The New England journal of medicine*, 341(10):738–746.

[Smith et al., 1988] Smith, P. J., Friede, M. H., Scott, B. J., and von Holt, C. (1988). Isolation of nuclei from melittin-destabilized cells. *Analytical biochemistry*, 169(2):390–394.

[Stipanuk and Beck, 1982] Stipanuk, M. H. and Beck, P. W. (1982). Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *The Biochemical journal*, 206(2):267–277.

[Sun et al., 1983] Sun, T. T., Eichner, R., Nelson, W. G., Tseng, S. C., Weiss, R. A., Jarvinen, M., and Woodcock-Mitchell, J. (1983). Keratin classes: molecular markers for different types of epithelial differentiation. *The Journal of investigative dermatology*, 81(1 Suppl):109s–115s.

[Szabo et al., 2013] Szabo, C., Coletta, C., Chao, C., Modis, K., Szczesny, B., Papapetropoulos, A., and Hellmich, M. R. (2013). Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine-beta-synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(30):12474–12479.

[Tamura et al., 2007] Tamura, N., Ohno, K., Katayama, T., Kanayama, N., and Sato, K. (2007). The pdz-lim protein clp36 is required for actin stress fiber formation and focal adhesion assembly in bewo cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 364(3):589–594.

[Taniguchi et al., 1996] Taniguchi, Y., Yorioka, N., Oda, H., and Yamakido, M. (1996). Platelet-derived growth factor, interleukin (il)-1 beta, il-6r and tumor necrosis factor-alpha in iga nephropathy. an immunohistochemical study. *Nephron*, 74(4):652–660.

[Taoka and Banerjee, 2001] Taoka, S. and Banerjee, R. (2001). Characterization of no binding to human cystathionine beta-synthase: possible implications of the effects of co and no binding to the human enzyme. *Journal of inorganic biochemistry*, 87(4):245–251.

[Tateishi et al., 1977] Tateishi, N., Higashi, T., Naruse, A., Nakashima, K., and Shiozaki, H. (1977). Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. *The Journal of nutrition*, 107(1):51–60.

[Ubuka et al., 1985] Ubuka, T., Hosaki, Y., Nishina, H., and Ikeda, T. (1985). 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase activity in guinea pig and rat tissues. *Physiological chemistry and physics and medical NMR*, 17(1):41–43.

[Vallenius et al., 2000] Vallenius, T., Luukko, K., and Makela, T. P. (2000). Clp-36 pdz-lim protein associates with nonmuscle alpha-actinin-1 and alpha-actinin-4. *The Journal of biological chemistry*, 275(15):11100–11105.

[Vallenius and Makela, 2002] Vallenius, T. and Makela, T. P. (2002). Clik1: a novel kinase targeted to actin stress fibers by the clp-36 pdz-lim protein. *Journal of cell science*, 115(Pt 10):2067–2073.

[Ventre et al., 2009] Ventre, M., Mollica, F., and Netti, P. A. (2009). The effect of composition and microstructure on the viscoelastic properties of dermis. *Journal of biomechanics*, 42(4):430–435.

[Walpen, 2001] Walpen, S. (2001). Dissertation.

[Wang et al., 2015] Wang, G., Li, W., Chen, Q., Jiang, Y., Lu, X., and Zhao, X. (2015). Hydrogen sulfide accelerates wound healing in diabetic rats. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(5):5097–5104.

[Wang, 2003] Wang, R. (2003). The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxidants & redox signaling*, 5(4):493–501.

[Wehner et al., 1995] Wehner, R., Gehring, W., and Kühn, A. (1995). *Zoologie*. Thieme, Stuttgart, 23., neu bearb. aufl. edition.

[Wei et al., 2015] Wei, X., Zhang, B., Cheng, L., Chi, M., Deng, L., Pan, H., Yao, X., and Wang, G. (2015). Hydrogen sulfide induces neuroprotection against experimental stroke in rats by down-regulation of aqp4 via activating pkc. *Brain research*, 1622:292–299.

[Werner and Grose, 2003] Werner, S. and Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews*, 83(3):835–870.

[Werner et al., 2007] Werner, S., Krieg, T., and Smola, H. (2007). Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *The Journal of investigative dermatology*, 127(5):998–1008.

[Werner and Smola, 2001] Werner, S. and Smola, H. (2001). Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation. *Trends in cell biology*, 11(4):143–146.

[Wong et al., 1983] Wong, A. J., Pollard, T. D., and Herman, I. M. (1983). Actin filament stress fibers in vascular endothelial cells in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 219(4586):867–869.

[Wong et al., 2006] Wong, P. T. H., Qu, K., Chimon, G. N., Seah, A. B. H., Chang, H. M.,

Wong, M. C., Ng, Y. K., Rumpel, H., Halliwell, B., and Chen, Christopher P L H (2006). High plasma cyst(e)ine level may indicate poor clinical outcome in patients with acute stroke: possible involvement of hydrogen sulfide. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 65(2):109–115.

[Yang et al., 2004] Yang, G., Cao, K., Wu, L., and Wang, R. (2004). Cystathionine gamma-lyase overexpression inhibits cell proliferation via a h2s-dependent modulation of erk1/2 phosphorylation and p21cip/wak-1. *The Journal of biological chemistry*, 279(47):49199–49205.

[Yang et al., 2012] Yang, G., Li, H., Tang, G., Wu, L., Zhao, K., Cao, Q., Xu, C., and Wang, R. (2012). Increased neointimal formation in cystathionine gamma-lyase deficient mice: Role of hydrogen sulfide in alpha5beta1-integrin and matrix metalloproteinase-2 expression in smooth muscle cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(3):677–688.

[Yang et al., 2008] Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., Meng, Q., Mustafa, A. K., Mu, W., Zhang, S., Snyder, S. H., and Wang, R. (2008). H2s as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5901):587–590.

[Yap and Naughten, 1998] Yap, S. and Naughten, E. (1998). Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in ireland: 25 years' experience of a newborn screened and treated population with reference to clinical outcome and biochemical control. *Journal of inherited metabolic disease*, 21(7):738–747.

[Yuan et al., 2011] Yuan, P., Xue, H., Zhou, L., Qu, L., Li, C., Wang, Z., Ni, J., Yu, C., Yao, T., Huang, Y., Wang, R., and Lu, L. (2011). Rescue of mesangial cells from high glucose-induced over-proliferation and extracellular matrix secretion by hydrogen sulfide. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 26(7):2119–2126.

[Yurchenco and Schittny, 1990] Yurchenco, P. D. and Schittny, J. C. (1990). Molecular architecture of basement membranes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 4(6):1577–1590.

[Zaidel-Bar et al., 2004] Zaidel-Bar, R., Cohen, M., Addadi, L., and Geiger, B. (2004). Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochemical Society transactions*, 32(Pt3):416–420.

[Zanardo et al., 2006] Zanardo, R. C. O., Brancaleone, V., Distrutti, E., Fiorucci, S., Cirino, G., and Wallace, J. L. (2006). Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(12):2118–2120.

[Zhang et al., 2010] Zhang, J., Sio, S. W. S., Moochhala, S., and Bhatia, M. (2010). Role of hydrogen sulfide in severe burn injury-induced inflammation in mice. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 16(9-10):417–424.

[Zhang et al., 2012] Zhang, L.-J., Tao, B.-B., Wang, M.-J., Jin, H.-M., and Zhu, Y.-C. (2012). Pi3k p110alpha isoform-dependent rho gtpase rac1 activation mediates h2s-promoted endothelial cell migration via actin cytoskeleton reorganization. *PLoS ONE*, 7(9):e44590.

[Zhao et al., 2013] Zhao, H., Chan, S.-J., Ng, Y.-K., and Wong, P. T.-H. (2013). Brain 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3mst): Cellular localization and downregulation after acute stroke. *PLoS ONE*, 8(6):e67322.

[Zhao et al., 2001] Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., and Wang, R. (2001). The vasorelaxant effect of h(2)s as a novel endogenous gaseous k(atp) channel opener. *The EMBO journal*, 20(21):6008–6016.

[Zhou et al., 2014] Zhou, X., Feng, Y., Zhan, Z., and Chen, J. (2014). Hydrogen sulfide alleviates diabetic nephropathy in a streptozotocin-induced diabetic rat model. *The Journal of biological chemistry*, 289(42):28827–28834.

[Zhu et al., 1999] Zhu, S., Oh, H. S., Shim, M., Sterneck, E., Johnson, P. F., and Smart, R. C. (1999). C/ebpbeta modulates the early events of keratinocyte differentiation involving growth arrest and keratin 1 and keratin 10 expression. *Molecular and Cellular Biology*, 19(10):7181–7190.

[Zhu et al., 2010] Zhu, X.-Y., Liu, S.-J., Liu, Y.-J., Wang, S., and Ni, X. (2010). Glucocorticoids suppress cystathionine gamma-lyase expression and h2s production in lipopolysaccharide-treated macrophages. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(7):1119–1132.

10 Anhang

10.1 Publikationen

Goren I. and **Köhler Y.**, Aglan A., Pfeilschifter J., Beck K.F., Frank S., 2019. Increase of cystathionine-γ-lyase (CSE) during late wound repair: Hydrogen sulfide triggers cytokeratin 10 expression in keratinocytes. Nitric Oxide 87:31-42

Aglan A, Longen S., Dehne N., **Köhler Y.**, Hassan M., Beck M., Tredup C., Boosen M., Hsieh T., Schaefer L., Beck K.F., 2017. Nitric oxide mediates prolyl hydroxylase 3 expression in mesangial cells and in glomerulonephritis. Journal of molecular medicine 95(3):257-271

Firedländer F., Bohmann F., Brunkhorst M, Chae J.H., Devraj K., **Köhler Y.**, Kraft P., Kuhn H., Lucaciu A., Luger S., Pfeilschifter W., Sadler R., Liesz A., Scholtyschik K., Stolz L., Vutukuri R., Brunkhorst R., 2017. Reliability of infarct volumetry: Its relevance and the improvement by a software-assisted approach. Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism 37(8):3015-3026

Longen S., Richter F., **Köhler Y.**, Wittig I., Beck K.F., Pfeilschifter J., 2016. Quantitative Persulfide Site identification (qPerS-SID) Reveals Protein Targets of H2S Releasing Donors in Mammalian Cells. Scientific Reports - Nature 14;6:29808

Syhr K.M.J., Boosen M., Hohmann S.W., Longen S., **Köhler Y.**, Pfeilschifter J., Beck K.F., Geisslinger G., Schmidtko A., Kallenborn-Gerhardt W., 2015. The H2S-producing enzyme CSE is dispensable for the processing of inflammatory and neuropathic pain.Brain Research 1624:380-389

Beck K.F., Euler J., Eisel F., Beck M.,**Köhler Y.**, Sha L.K., von Knethen A., Longen S., Pfeilschifter J., 2015. Cytokines induce protein kinase A-mediated signaling by a redox-dependent mechanism in rat renal mesangial cells. Biochemical Pharmacology 93(3):362-9