

**„Veränderungen der Expression von
zweiporigen Kaliumkanälen und
Dopaminrezeptoren unter septischen
Bedingungen in der murinen *Arteria
mesenterica*“**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Florian Bieling aus Coesfeld

Gießen 2015

Aus dem medizinischen Zentrum Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie
Klinik Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie

Direktor Prof. Dr. med. M. A. Weigand

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Michael Henrich D. Phil.

Gutachter: Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter

Tag der Disputation: 28.05.2015

meiner Familie

1	VORWORT	1
2	EINLEITUNG	1
2.1	SEPSIS.....	1
2.1.1	EPIDEMIOLOGIE	1
2.1.2	DEFINITIONEN.....	2
2.2	HÄMODYNAMIK IN DER SEPSIS.....	3
2.3	KARDIOVASKULÄRE VERÄNDERUNGEN IN DER SEPSIS	3
2.3.1	BESONDERE ROLLE DER MESENTERIALSTROMBAHN	5
2.4	VASOMOTORIK UND MEMBRANPOTENZIAL.....	6
2.5	ZWEI-PORIGE KALIUMKANÄLE (K₂P)	8
2.6	DOPAMINREZEPTOREN	10
2.7	NO-SYNTHASEN.....	12
2.7	FRAGESTELLUNG	13
3	MATERIAL UND METHODEN	14
3.1	VERSUCHSTIERE	14
3.2	CAECALE LIGATION UND PUNKTION (CLP).....	14
3.3	VERSUCHSDESIGN.....	15
3.4	EUTHANASIE UND ORGANPRÄPARATION	16
3.5	RNA-UNTERSUCHUNGEN	16
3.5.1	ARTERIENISOLIERUNG FÜR DIE RNA-UNTERSUCHUNGEN	16
3.5.2	RNA-ISOLIERUNG	18
3.5.3	REVERSE-TRANSKRIPTASE-PCR.....	19
3.5.4	PCR.....	20
3.5.5	REAL-TIME PCR.....	23
3.5.6	AUSWERTUNG DER REAL-TIME PCR.....	25
3.6	PROTEIN-UNTERSUCHUNGEN.....	26
3.6.1	ARTERIENISOLIERUNG FÜR DIE PROTEIN-UNTERSUCHUNGEN	26
3.6.2	PROTEIN-ISOLIERUNG	26
3.6.3	BESTIMMUNG DES PROTEINGEHALTES	27
3.6.4	PROTEINVORBEREITUNG	27

3.6.5	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE).....	28
3.6.6	WESTERNBLOTVERFAHREN	29
3.6.7	IMMUNOLOGISCHER PROTEINNACHWEIS	30
3.6.8	WIEDERVERWERTUNG DER PVDF-MEMBRAN („STRIPPEN“)	31
3.6.9	AUSWERTUNG DER WESTERNBLOTS	31
3.7	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	32
3.8	CHEMIKALIEN.....	32
3.9	ZUSAMMENSETZUNG DER PUFFER UND LÖSUNGEN	33
4	ERGEBNISSE	34
4.1	ÜBERLEBENSZAHLEN DER TIERE NACH CLP	34
4.2	RNA- UND PROTEINQUANTIFIZIERUNG DER GEWONNENEN PROBEN.....	35
4.3	DETEKTION DER ZIELGENE DURCH DIE PCR.....	35
4.4	QUANTITATIVE AUSWERTUNG MITTELS REAL-TIME PCR UND WESTERNBLOT	37
4.4.1	ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN ZU TASK 1	38
4.4.2	ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN ZU TASK 2	41
4.4.3	ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN ZU TREK 1	43
4.4.4	ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN ZU TWIK 2	46
4.4.5	ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN ZUR eNOS	47
4.4.6	ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN ZUR iNOS	49
4.4.7	ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN ZUM DOPAMIN-D1-REZEPTOR	50
4.4.8	ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN ZUM DOPAMIN-D2-REZEPTOR	52
5	DISKUSSION	54
5.1	DISKUSSION DER METHODE	54
5.1.1	REPRÄSENTATIVITÄT NUR FÜR ÜBERLEBENDE TIERE.....	54
5.1.2	ZEITLICHER VERLAUF DER PROBENENTNAHME	54
5.1.3	SEPSISINDUKTION DURCH DIE CLP-METHODE.....	55
5.1.4	GERINGE INDIVIDUENZAHLE PRO VERSUCHSGRUPPE.....	56
5.2	HERLEITUNG DER FRAGESTELLUNG.....	58
5.2.1	ZWEIPORIGE KALIUMKANÄLE	58
5.2.2	DOPAMINREZEPTOREN	59

5.3	DAS NO-SYNTHASE EXPRESSIONSMUSTER SPRICHT FÜR EINE INDUZIERT	
	SEPSIS NACH CLP OPERATION	60
5.4	UNTERSCHIEDLICHES RNA-EXPRESSIONSVERHALTEN DER EINZELNEN	
	KALIUMKANÄLE AUF DIE SEPSISINDUKTION UND DAS CHIRURGISCHE TRAUMA.....	61
5.4.1	EXPRESSIONSVERHALTEN VON TASK-1.....	61
5.4.2	EXPRESSIONSVERHALTEN VON TASK 2	61
5.4.3	EXPRESSIONSVERHALTEN VON TREK-1.....	62
5.4.4	EXPRESSIONSVERHALTEN VON TWIK-2.....	62
5.5	PROTEINEXPRESSIONSVERHALTEN VON TASK-1 UND TREK-1 WÄHREND DER	
	SEPSIS UND NACH DEM CHIRURGISCHEN TRAUMA	63
5.6	ZUSAMMENFASSENDE BEURTEILUNG UND MÖGLICHE FUNKTIONELLE	
	BEDEUTUNG DES EXPRESSIONSVERHALTENS DER ZWEIPORIGEN	
	KALIUMKANÄLE	64
5.7	EXPRESSIONSVERHALTEN DER DOPAMINREZEPTOREN UNTER SEPSIS	66
5.8	AUSBLICK AUF WEITERE UNTERSUCHUNGEN.....	68
6	SCHLUSSFOLGERUNG.....	70
7	ZUSAMMENFASSUNG	71
8	SUMMARY.....	72
9	LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	74
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	77
11	TABELLENVERZEICHNIS	78
12	LITERATURVERZEICHNIS	79
13	PUBLIKATION UND FÖRDERUNG	86
14	DANKSAGUNG	87

1 Vorwort

Die Arbeit wurde im experimentellen Labor der Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie mit dem ärztlichen Direktor Prof. Dr. med. M. A. Weigand in dem Zeitraum von Dezember 2010 bis März 2013 durchgeführt. Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht (s. Kap. 13).

2 Einleitung

2.1 Sepsis

2.1.1 Epidemiologie

Das Krankheitsbild der Sepsis ist seit Jahrhunderten bekannt und wurde schon von Hippokrates 400 Jahre vor Christus als ein Fieber beschrieben, welches 7-14 Tage nach einer Verwundung auftritt, oft einen letalen Ausgang hat und „verursacht wird durch eine Materie, die fault“. Auch heute sind die Sepsis, das Multiorganversagen und der septische Schock eine große Herausforderung der Medizin (Angus et al. 2001). Bei der 2002 durchgeführten SOAP-Studie lag die Mortalität im europäischen Durchschnitt bei Patienten auf Intensivstationen, die eine Sepsis entwickelten bei 27%, mit schwerer Sepsis bei 32,2% und im septischem Schock bei 54,1%. Intensivpatienten, die keine Sepsis entwickelten, verstarben dagegen in 14% der Fälle. Zwischen den an der Studie beteiligten Ländern gab es jedoch größere Unterschiede in Bezug auf die Mortalität bei Patienten mit Sepsis. Sie reichte von 10% in der Schweiz bis zu 35% in Italien. Deutschland wies eine Mortalität von 16% auf (Vincent et al. 2006). Nach einer Studie aus dem Jahr 2007 des deutschen Kompetenznetzwerkes Sepsis (SepNet) erkrankten in Deutschland jährlich 79.000 Menschen an einer Sepsis und nochmals 75.000 an einer schweren Sepsis. Die Inzidenz liegt somit bei 116 bzw. 110 / 100.000 Einwohnern (Engel et al. 2007). Trotz intensiver Forschung konnte bisher noch keine zufriedenstellende Therapie gefunden werden.

2.1.2 Definitionen

Der Begriff Sepsis bezeichnet allgemein ein heterogenes, dynamisches Syndrom, das durch eine überschießende Immunreaktion des Wirtsorganismus auf einen Infekt ausgelöst wird. Hierbei liegt ein Ungleichgewicht aus pro- und antiinflammatorischen Faktoren im Organismus vor (Rittirsch et al. 2008). 1914 schrieb Hugo Schottmüller: „...eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb eines Körpers ein Herd gebildet hat, von dem aus konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, derart, dass durch Invasion subjektive oder objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden“ (Schottmüller 1914). Diese Definition ist auch heute noch weitgehend gültig. Der Begriff Sepsis wird allerdings eher als Oberbegriff verstanden. Anhand von Vital- und Laborwerten, kardiovaskulären Daten und Organbeteiligungen werden ein systemic inflammatory response syndrome (SIRS), Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock untereinander abgegrenzt. 1992 wurden in Nordamerika in einer Konsensuskonferenz des „American College of Chest Physicians“ (ACCP) und der „Society of Critical Care Medicine“ (SCCM) die Begriffe definiert (Bone et al. 1992).

Definitionsgemäß liegt ein SIRS vor, wenn zwei oder mehr der folgenden Parameter gegeben sind:

- Hypothermie oder Hyperthermie (Körpertemperatur niedriger als 36 °C oder höher als 38 °C)
- Herzfrequenz mehr als 90 Schläge pro Minute
- Atemfrequenz mehr als 20 pro Minute oder ein pCO_2 unter 32 mmHg
- Leukozyten $\leq 4000/\mu\text{l}$ oder $\geq 12000/\mu\text{l}$ oder eine Linksverschiebung (stabkernige Leukozyten) $\geq 10 \%$

Ein SIRS als an sich sterile Situation kann dabei nicht nur als Reaktion auf mikrobiologische Pathogene (Bakterien, Viren, Parasiten und Pilze) hervorgerufen werden, sondern auch durch Traumata, Verbrennungen, Hämorrhagien, Pankreatitiden und Organtransplantationen (Marik 2002).

Eine Sepsis ist definiert als eine SIRS mit mikrobiologisch nachgewiesenem Infektionsherd, der bakteriell, viral, fungal oder parasitär bedingt sein kann (Levy et al. 2003). Bei einer 1995 in den Vereinigten Staaten durchgeführten Studie betrafen diese

nachgewiesenen Infektionen zum Beispiel in 38,4% der Fälle den Respirationstrakt, in 9,3% das Abdomen und in 8,7% den Urogenitaltrakt. Bei 8,9% der Patienten lag eine Wundinfektion vor und bei 14,6% konnte eine Bakteriämie ohne gesicherten Herd nachgewiesen werden (Angus et al. 2001).

Bei der schweren Sepsis wird eine vorhandene Sepsis durch mindestens eine Organdysfunktion verkompliziert.

Ein septischer Schock ist eine schwere Sepsis mit arterieller Hypotension trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution (systolischer Druck weniger als 90 mmHg, mittlerer Druck weniger als 60 mmHg oder ein Abfall des systolischen Druckes von mehr als 40 mmHg des Ausgangswertes) (Levy et al. 2003). Diese Hypotension führt unter Anderem zu einer hämodynamischen Minderversorgung lebenswichtiger Organe wie Lunge, Leber, Gehirn oder Nieren. Die Kombination von Organdysfunktionen auf Grund eines SIRS wird als sekundäres Multiorganversagen (*multi organ dysfunction syndrom*, MODS) bezeichnet. Ein primäres MODS wird durch direktes Trauma, Hypoxie oder ischämische Reperfusion hervorgerufen (Ciesielski und Modzelewski 1995).

2.2 Hämodynamik in der Sepsis

2.3 Kardiovaskuläre Veränderungen in der Sepsis

Die generalisierte Entzündungsreaktion während des septischen Geschehens beeinträchtigt maßgeblich die Makro- und Mikrozirkulation. Ursächlich dafür sind vor allem die Entzündungsmediatoren Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Lipopolysaccharid (LPS) und Interleukin-1 β , welche die ansonsten fein regulierte und bedarfsangepasste Vasomotorik stören (Rabuel und Mebazaa 2006). Entzündungsmediatoren führen dabei auch zu einer stark erhöhten Aktivität der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) (siehe 2.7), womit es zu einer Störung der Vasomotorik in Richtung Vasodilatation kommt (Matsuda und Hattori 2007). Makrozirkulatorisch unterscheidet man eine hyperdynamische Phase (hohes Herzzeitvolumen mit gleichzeitig vermindertem systemischen Gefäßwiderstand) von einer hypodynamischen Phase (erniedrigtes Herzzeitvolumen mit normalem bis leicht erhöhtem systemischen Gefäßwiderstand) (Rabuel und Mebazaa 2006; Henrich et al. 2012).

Die Störungen der Makro- und Mikrozirkulation laufen dabei keineswegs einheitlich im Organismus ab. Oft kommt es zu einer Dilatation der großen Arterien und zu einer Vasokonstriktion der kleinen Arteriolen (Cronenwett und Lindenauer 1979; Cryer et al. 1987). Die Mikrozirkulationsstörung wird von Lehr et al. auch als Motor der Organdysfunktion bezeichnet. Ihre Perfusion wird physiologisch über viele verschiedene Mechanismen neuroendokrin, parakrin und mechano-sensibel reguliert. Eine Aktivierung, Dysfunktion und/oder Verletzung des mikrovaskulären Endothels kann bedingt sein durch Ischämie, inflammatorische Mediatoren oder adhärente Leukozyten, mit ihrem großen Arsenal an wiederum inflammatorischen Mediatoren und proteolytischen Enzymen. Als Folge der Dysfunktion kommt es zur Schädigung der endothelialen Schrankenfunktion mit Extravasation von Flüssigkeit, einem unkontrollierten Einwandern von Entzündungszellen und dem Verlust der Autoregulationsfähigkeit. Dies kann entweder zur Vasokonstriktion der Endstrombahn führen, wobei es zur Ausbildung von arteriovenösen Shunts kommt, oder zur Vasodilatation durch den Verlust des peripheren Widerstandes. Beides führt auch zu schweren makrozirkulatorischen Konsequenzen (Lehr et al. 2000). Durch die Schädigung des Endothels bekommt der auf glatten Muskelzellen und der Extrazellulärmatrix exprimierte *tissue factor* Kontakt zu den im Blut zirkulierenden Gerinnungsfaktoren, wodurch die Gerinnungskaskade vermehrt aktiviert wird. Außerdem wird durch Entzündungsmediatoren der *tissue factor* auch verstärkt auf Leukozyten (v.a. Monozyten) und Endothelzellen exprimiert (Mackmann 2009; Osterud und Flaegstad 1983; Colucci et al. 1983). Die dadurch begünstigte und die Sepsis oft begleitende disseminierte intravasale Gerinnung mit Verbrauchskoagulopathie aggraviert besonders die Mikrozirkulationsstörung zusätzlich zu dem Shunting (Ebelt und Werdan 2012). Die für den Stoffaustausch wichtige Endstrombahn der Kapillaren kann durch die oben genannten Faktoren keine bedarfsgerechte Versorgung der Organe mit Sauerstoff und weiteren Substraten gewährleisten (Ebelt und Werdan 2012). Die so bedingte Minderperfusion und Unterversorgung führt zur Organdysfunktion bis zum MODS. Nicht alle Organe sind durch Vasokonstriktion, Vasodilatation, Shunting und aktivierte Gerinnung gleichermaßen betroffen. Während die Cerebral- und Koronarperfusion meist weitgehend erhalten oder gesteigert ist, kommt es bei der Nieren-, Skelett- und Mesenterialdurchblutung zu einer Reduktion der Perfusion (Lehr et al. 2000; Henrich et al. 2012).

2.3.1 Besondere Rolle der Mesenterialstrombahn

Die Mesenterialstrombahn, welche das Splanchnikusgebiet versorgt, spielt eine große Rolle in der Entstehung, Aufrechterhaltung und Verstärkung der Sepsis, des septischen Schocks und des oft daraus folgenden MODS (Deitch 1990; Lamprecht und Heininger 2012). Eine Blut-Darm Schranke, welche aus intestinalen Mukosaepithelzellen, subepithelialelem Bindegewebe und Gefäßendothelzellen besteht, verhindert, dass die im Darm enthaltenen Mikroorganismen in den systemischen Blutkreislauf gelangen. Die ausreichende Substratversorgung und der Abtransport von Stoffwechselendprodukten sind für die Integrität der Blut-Darm-Schranke sehr wichtig (Landow und Andersen 1994; Taylor et al. 1998). Funktionell wird sie maßgeblich von den Epithelzellen der Mukosa mit ihren *zonae occludentes* gebildet. Eine mukosale Schleimproduktion und aus dem subepithelialen Bereichen sezernierte Defensine und Immunglobulin A-Moleküle unterstützt diese Barrierefunktion (Blikslager et al. 2007; Shen et al. 2009). $\text{TNF-}\alpha$, was bei Ischämie freigesetzt wird, kann diese mukosale, intestinale Barriere stören (Taylor et al. 1998). Zum Lumen der versorgenden Mesenterialgefäße hin befindet sich eine Schicht Endothelzellen, welche ebenfalls durch *zonae occludentes* miteinander verbunden sind. Normal bilden sie eine kontinuierliche, selektivpermeable Membran, welche auch den Stoffaustausch kontrolliert (Mandel et al. 1993). Sie ist maßgeblich dafür verantwortlich Plasmaproteine und Flüssigkeit im Gefäß zu halten. Bei bereits bestehender epithelialer Schrankenstörung in der Mesenterialstrombahn verhindert sie auch in gewissem Rahmen die weitere Passage von Mikroorganismen und bakteriellen Endo- und Exotoxinen aus dem Darmlumen in den systemischen Blutfluss. Im septischen Schock kann es ausgelöst durch Caspase-vermittelte Zerstörung der *zonae occludentes* der Endothelzellen zu einer Erhöhung der Permeabilität kommen (Bannerman et al. 1998). Hauptsächlich daran beteiligt sind $\text{TNF-}\alpha$, LPS und Thrombin (Tirupathi et al. 2001). Durch die epitheliale Permeabilitätsstörung können Mikroorganismen aus dem Lumen des Gastrointestinaltraktes auswandern und direkt die Endothelzellen der Gefäße weiter schädigen. Die mit der systemischen Entzündungsreaktion vergesellschaftete verringerte Perfusion der Mesenterialstrombahn wird so aufrechterhalten und ein sich selbst verstärkender *circulus virtiosus* ist geschaffen (Navaratnam et al. 1990). Marshall et al. bezeichnet den Gastrointestinaltrakt auch als den undrainierten Abzess des MODS (Marshall et al. 1993).

2.4 Vasomotorik und Membranpotenzial

In glatten Muskelzellen und Perizyten wird der Tonus der Zelle und somit die Gefäßweite durch die intrazelluläre Calciumkonzentration bestimmt. Diese wird neben exogenen Mediatoren, wie zum Beispiel Norepinephrin, Angiotensin 2, Dopamin und Endothelin-1, welche G-Proteingekoppelt die Calciumkonzentration beeinflussen auch durch dehnungs- und vor allem spannungsabhängigen Calciumkanälen in der Plasmamembran bestimmt. Ist die Konzentration an Calcium intrazellulär erhöht, binden Calciumionen an Calmodulin und der so entstandene Calcium-Calmodulin-Komplex aktiviert die Myosinleichtketten-Kinase. Diese Kinase phosphoryliert die regulatorische leichte Kette des Myosins. Die Actin-Myosin Interaktion und somit der Kontraktionszyklus beginnt. Eine Senkung der Calciumkonzentration bewirkt eine Relaxation der Muskelzelle (Webb 2003; Jackson 2000). Ionenkanäle, die die Spannung der Zellmembran regulieren, spielen also eine wichtige Rolle bei der Regulation der Funktion glatter Muskelzellen. Sie befinden sich dabei in der Plasmamembran und in dem glatten endoplasmatischen Retikulum der Muskelzelle, der Perizyten und der Endothelzellen. Das Membranpotenzial der jeweiligen Zelle beeinflusst so den Calciumein- oder ausstrom über spannungsabhängige Calciumkanäle. Dieses wird wiederum hauptsächlich durch Kalium-, Natrium-, Chlorid,- und Calciumkanäle selbst bestimmt (Bolton et al. 1999). Natrium- und Calciumioneneinstrom, sowie Chloridionenausstrom depolarisieren die Zelle und führen zur Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit für spannungsabhängige Calciumkanäle, wodurch Calciumionen einströmen und es zur Erhöhung des Tonus kommt. Ein verminderter Kaliumausstrom und somit eine Retention von positiv geladenen Kaliumionen bewirkt auch eine Depolarisation der Zelle und eine Erhöhung des Tonus (Jackson 2005; Nelson und Quayle 1995; s. Abb. 1). Die Hintergrundkaliumströme sind maßgeblich für das Ruhemembranpotenzial der Zelle verantwortlich, welches den Grundtonus der Muskelzelle steuert und die Offenwahrscheinlichkeit der spannungsabhängigen Calciumkanäle sehr gering hält (Powell et al. 1980). Glatte Gefäßmuskelzellen haben im Vergleich zu Herz- und Skelettmuskelzelle ein weniger negatives Ruhemembranpotenzial von nur -40 bis -60 mV. Es liegt damit näher an dem Schwellenpotenzial, ab dem die spannungsabhängigen Calciumkanäle ihre Offenwahrscheinlichkeit erhöhen. Geringe Schwankungen in der Hintergrundkaliumleitfähigkeit mit Änderung des Membranpotenzials führen somit

schnell zu einem Überschreiten dieses Schwellenpotentials (Gurney und Manoury 2009).

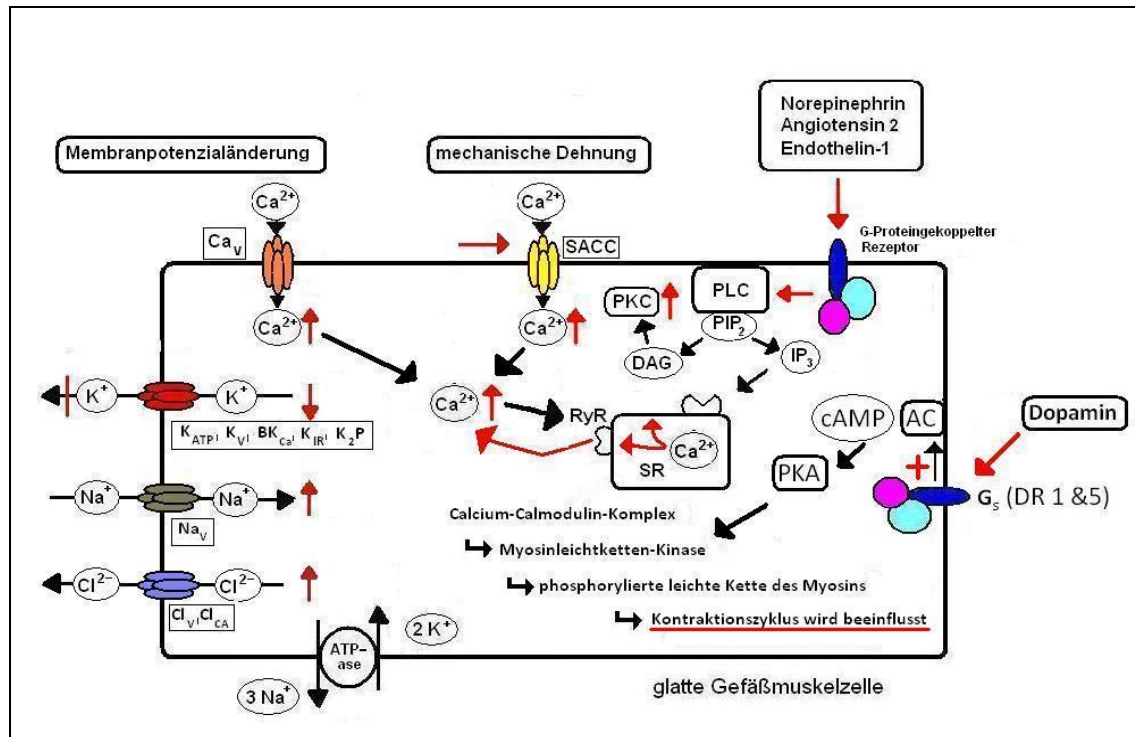


Abb.: 1 Schematische Darstellung kontraktionsbegünstigender Faktoren in einer glatten Muskelzelle. Der Kontraktionszustand der glatten Muskelzelle wird durch die intrazelluläre Calciumkonzentration bestimmt, wobei hohe Calciumkonzentrationen eine Kontraktion bewirken. Humorale Faktoren, wie Norepinephrin, Angiotensin-2 und Endothelin-1 bewirken dabei über G-Proteingekoppelte Rezeptoren eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC), welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. IP₃ bindet an Rezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), wodurch große Mengen an Calciumionen aus der Zellorganelle ins Zytosol gelangen. DAG aktiviert zusammen mit Ca²⁺-Ionen die Proteinkinase C (PKC), welche spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle (voltage gated Ca²⁺-channels (Ca_v)) phosphoryliert und damit ihre Offenwahrscheinlichkeit erhöht. Stretch-activated Ca²⁺-Channels (SACC) in der Plasmamembran erhöhen ihre Offenwahrscheinlichkeit bei mechanischer Dehnung der Zelle, z.B. bei erhöhtem Blutfluss. Des Weiteren werden spannungsabhängige Calciumkanäle bei Änderungen des Membranpotenzials vermehrt geöffnet. Ein vermehrter Cl⁻-Ionen Ausstrom durch Chloridionenkanäle (Ca²⁺-activated Cl-Channels (Cl_{Ca}) und voltage-gated Cl-channels (Cl_v)), ein vermehrter Einstrom von Natrium (voltage-gated Na⁺-channels (Na_v)- und Calciumionenkanäle (voltage gated Ca²⁺ channels (Ca_v); L- und T-Typ-Kanäle)), sowie ein verminderter Ausstrom von K⁺-Ionen (ATP-sensitive K⁺ (K_{ATP}) channels, large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK_{Ca}) channels, voltage-activated K⁺ (K_v) channels, inward rectifier K⁺ (K_{IR}) channels, sowie die in dieser Arbeit untersuchten two-pored K⁺ (K_{2P}) channels) depolarisieren die Zelle. Die einströmenden Calciumionen binden intrazellulär an Ryanodinrezeptoren (RyR) des SR und bewirken eine calciumabhängige Calciumfreisetzung aus dem SR. Das intrazelluläre Calcium bindet an das Protein Calmodulin. Dieser Calcium-Calmodulin-Komplex aktiviert die Myosinleichtenketten-Kinase, welche die regulatorische leichte Kette des Myosins phosphoryliert. Die Aktin-Myosin Interaktion und somit der Kontraktionszyklus beginnt (Webb 2003; Jackson 2000; Jackson 2005; Bolton et al. 1999; Nelson und Quayle 1995). Die zur D1-Gruppe gehörenden, D1- und D5-Rezeptoren, welche über ein stimulierendes G-Protein die intrazelluläre Adenylatzyklase aktivieren, erhöhen die cAMP-Konzentration und aktivieren die Proteinkinase A. Der Kontraktionszyklus wird gehemmt (Monsma et al. 1990).

2.5 Zwei-porige Kaliumkanäle (K₂P)

Bis 1996 wurden alle bis dahin bekannten Kaliumkanäle anhand ihrer Anzahl transmembranärer Einheiten und der Anzahl darin gebildeter Poren in den α -Untereinheiten in zwei Gruppen eingeteilt. Die Erste hat zwei transmembranäre Einheiten mit einer P-Domäne. Zu dieser Gruppe gehören die einwärtsgerichtenden- und ATP-abhängigen Kaliumkanäle. Die zweite Gruppe hat sechs oder sieben transmembranäre Einheiten mit ebenfalls einer P-Domäne. Sie umfasst die spannungs- und calciumabhängigen Kaliumkanäle. Mehrere dieser α -Untereinheiten lagern sich zu einem funktionsfähigen Kanal zusammen (Salkoff und Jegla 1995; Goldstein et al. 2005). Von Lesage et al. wurde 1996 erstmals ein Kaliumkanal beschrieben, der nicht in die bisherige Klassifikation passt. Gleichzeitig wurde die Beteiligung dieses Kanals an der Stabilisierung des Ruhemembranpotenzials gezeigt. Dieser Kanal besitzt vier transmembranäre Einheiten und bildet damit zwei p-Domänen (4TM/2P). Zwei α -Untereinheiten lagern sich dabei je zu einem Kanal zusammen (Lesage et al. 1996; s. Abb. 2).

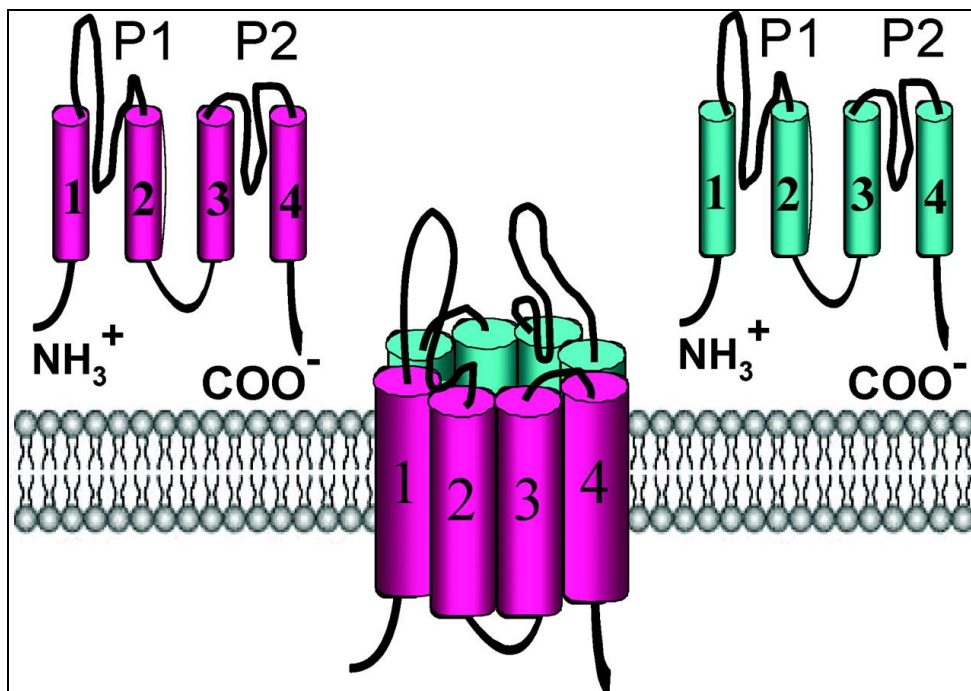


Abb. 2: Schemazeichnung zweiporiger Kaliumkanal Die für jeden der K₂P-Kanäle spezifischen α -Untereinheiten (hier je eine in rot und eine in grün dargestellt) bestehen aus vier transmembranären Einheiten und haben je 2 P-Domänen. Zwei homologe Untereinheiten bilden einen funktionsfähigen Kanal (aus Bryan et al. 2007).

Bis heute konnten 15 verschiedene Gene identifiziert werden, die für die Untereinheiten dieser zweiporigen Kanäle kodieren. Diese werden zu der KCNK-Gen-Familie gezählt. Dazu gehört der erstbeschriebene TWIK (Tandem of Pore Domain in a Weak Inward Rectifying K⁺-Channel), TREK (TWIK-related K⁺-Channel), TASK (TWIK- Related Acid-Sensitive K⁺-Channel), TRAAK (TWIK-Related Arachidonic Acid-stimulated K⁺-Channel), TALK (TWIK-Related Alkaline pH-Activated K⁺-Channel), THIK (Tandem Pore Domain Halothane-Inhibited K⁺-Channel) und TRESK (TWIK-Related Spinal Cord K⁺-Channel). Diese lassen sich jeweils nochmals in mehrere nummerierte Varianten unterteilen (Goldstein et al. 2005). Zwei-porige Kaliumkanäle reagieren mit einer Änderung ihrer Offenwahrscheinlichkeit auf viele metabolische Faktoren und Medikamente. Dazu gehören zum Beispiel pH-Werte, Sauerstoffpartialdrücke, verschiedene Lipide, Neurotransmitter, G-Proteingekoppelte Rezeptoren, mechanische Dehnung, sowie Medikamente wie volatile Anästhetika und Bupivacain (Goldstein et al. 2005). Zusammen mit ihrer hohen Kaliumselektivität und der weitgehenden Spannungsunabhängigkeit sind sie sehr gut geeignet, um das Membranpotenzial und die aus der Änderung dessen resultierender Konsequenz der jeweiligen Zelle an verschiedene physiologische und pathologische Situationen anzupassen (Gurney und Manoury 2009). Die verschiedenen Untereinheiten sind nicht gleichmäßig auf alle Gewebe verteilt. In der Mesenterialarterie konnte RNA und Protein für TASK-1, TASK-2, TREK-1 und TWIK-2 nachgewiesen werden (Gardener et al. 2004). In einigen Organsystemen konnte gezeigt oder zumindest der dringende Verdacht geäußert werden, dass einzelne K₂P-Kanäle als Mediator zwischen exogenem Einfluss und dem Gefäßtonus fungieren. Blondeau et al. konnten 2007 nachweisen, dass in TREK-1 defizienten Mäusen der normal vasodilatierende Effekt von Arachidonsäure und andere mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie α -Linolensäure und Docosahexaensäure, in der Basilararterie nicht hervorgerufen werden kann. Dies spricht für einen neuroprotektiven Effekt der Fettsäuren bei Ischämie unter Beteiligung von TREK-1 (Blondeau et al. 2007). Garry et al. haben 2007 gezeigt, dass TREK-1 im Endothel und in Myozyten von Gefäßen exprimiert wird. Des Weiteren fanden sie heraus, dass die endothelabhängigen Vasodilatoren Acetylcholin und Bradykinin einen geringeren vasodilatatorischen Effekt in TREK-1-knock-out- Mäusen haben als in den entsprechenden Wildtypen. Da es bei der Gabe von endothelunabhängigem Natriumnitroprussid zur Vasodilatation kommt, könnte der verminderte Effekt von Acetylcholin und Bradykinin auf eine verminderte endotheliale Stickstoffmonoxidproduktion zurückzuführen sein, welche

von der intrazellulären Calciumkonzentration und diese wiederum vom Membranpotenzial abhängt (Garry et al. 2007). TASK-1 Kanäle wurden unter anderem von Gardner et al. untersucht. Sie konnten zeigen, dass diese Kaliumkanäle in Mesenterial- und Pulmonalarterien von Ratten vorkommen und auf Änderungen des pH-Wertes mit einer Veränderung ihrer Offenwahrscheinlichkeit reagieren (Gardener et al. 2004). In humanen Pulmonalarterien wurden zusätzlich zur oben genannten pH-Wert- auch eine Hypoxiesensitivität gezeigt, wobei die Kaliumströme durch die Hypoxie vermindert wurden und es so zu einer Depolarisation und zur Vasokonstriktion kam. TASK-1 scheint damit auch maßgeblich am Mechanismus der hypoxischen Vasokonstriktion beteiligt zu sein. Ebenso konnte eine spezifische Reaktion auf Treprostinil, einem Prostacyclin-Derivat, welches bei pulmonaler Hypertonie eingesetzt wird, bei den Kaliumströmen, die durch TASK-1 verursacht sind, gezeigt werden. Da TASK-1 auch durch cAMP aktiviert wird könnte der Kanal ein Hauptziel der Therapie der pulmonalen arteriellen Hypertonie sein (Olschewski et al. 2006; Gardener et al. 2004).

2.6 Dopaminrezeptoren

Fünf verschiedene Dopaminrezeptoren sind bisher bekannt. Dabei ist das Katecholamin-Dopamin der Hauptagonist und ein Beispiel für die G-Proteingekoppelte Beeinflussung des Gefäßmuskeltonus durch exogene Mediatoren. Dopamin hat je nach interagierendem Rezeptor unterschiedliche Wirkungen. Die zur D1-Gruppe gehörenden, D1- und D5-Rezeptoren, welche über ein stimulierendes G-Protein die intrazelluläre Adenylatzyklase aktivieren, erhöhen die cAMP-Konzentration und aktivieren die Proteinkinase A (Monsma et al. 1990). Im kardiovaskulären System phosphoryliert diese die Myosinleichtkettenkinase, wodurch ihre Aktivität erniedrigt wird und die leichte Kette des Myosins weniger phosphoryliert wird. Die leichte Kette des Myosins steht somit für den Kontraktionszyklus nicht zur Verfügung (Webb 2003). Eine verminderte Vasokonstriktion in vielen verschiedenen Gefäßregionen ist die Folge. Dieser Effekt wird besonders ausgeprägt in Niere und im Splanchnikusgebiet beobachtet (Goldberg und Rajfer 1985). Pfeil et al. konnten 2014 den vasodilatatorischen Effekt von Dopamin in der isolierten Mesenterialarterie von Ratten unter hypoxischen Bedingungen zeigen. Bei der Blockade des D1-Rezeptors war dieser

Effekt vollständig aufgehoben. Als Quelle von Dopamin wurde nach der Symphektomie dabei vor allem das Endothel, aber auch in geringem Maße die Media der Gefäße ausfindig gemacht (Pfeil et al. 2014). Andererseits gibt es die zur D2-Gruppe gehörenden D2-, D3- und D4-Rezeptoren, die über präsynaptische, inhibitorische G-Proteine eine verminderte Freisetzung von Noradrenalin aus sympathischen Ganglien bewirken und auch K⁺-Kanäle aktivieren (Kebabian und Calne 1979; Andersen et al. 1990; Goldberg und Rajfer 1985). Dopamin wirkt darüber hinaus auch dosisabhängig an verschiedenen Rezeptoren in unterschiedlicher Weise. Niedrigdosiert appliziert (2 µg/kg/min) bewirkt Dopamin vor allem im Splanchnikusgebiet und in der Niere vasodilatierend. Bis 10 µg/kg/min exogen appliziert wirkt es hauptsächlich an β1-adrenergen Rezeptoren und damit positiv inotrop, wodurch die Herzleistung und so fast die gesamte Organdurchblutung erhöht wird. Ab 12 µg/kg/min bindet Dopamin vor allem an α-adrenergen Rezeptoren und führt dann eher zu einer Vasokonstriktion der peripheren Gefäße und einer Zentralisierung des Blutvolumens (Holmes 2005; Pfeil et al. 2014). Eine Dosierung unter 5 µg/kg/min wird als die Nierendosis bezeichnet, da ihr eine vasodilatierende und somit eine Blutfluss erhöhende Wirkung vor allem in den Nierenarterien, aber auch in den das Intestinum versorgenden Gefäßen zugesprochen wird. Diese Dosierung galt lange als protektiv und therapeutisch in Bezug auf das akute Nierenversagen und in der Verbesserung der Durchblutung des Splanchnikusgebietes (Meier-Hellmann und Reinhart 1995). Dieses Konzept konnte bis heute nicht bewiesen werden. In der großen Multizenterstudie ANZIAC mit 328 Patienten wurde im Jahr 2000 von Bellomo et al. versucht der positive Effekt von niedrig dosiertem Dopamin auf die Nierenfunktion endgültig zu zeigen. Es stellte sich heraus, dass es bei septischen Patienten mit Anzeichen eines beginnenden Nierenversagens zwar einen kurzen, positiven Einfluss auf die Diurese hat, jedoch die Mortalität und das Outcome dieser Patienten nicht verbessert werden konnten (Bellomo et al. 2000). Arrhythmien und die endokrinen Wirkungen von Dopamin scheinen außerdem den generellen Benefit zu reduzieren (Friedrich et al. 2005; van den Berghe und Zegher 1996). Auch konnte bereits früh gezeigt werden, dass es während der auch im Splanchnikusgebiet vasodilatatorisch wirkenden Therapie mit Dopamin zu einer Umverteilung des nutritiven Blutflusses kommt, sodass die ischämiegefährdete Mukosa des Darms noch schlechter oxygeniert wird (Giraud und MacCannell 1984). 1996 wurde von Lherm et al. gezeigt, dass der Effekt von Dopamin in Nierendosis auf Patienten in einer Sepsis in dessen Verlauf

abnimmt. Sie vermuteten eine Desensitivierung der Dopaminrezeptoren (Lherm et al. 1996). Seit den Sepsisleitlinien von 2004 wird die Gabe von niedrig dosiertem Dopamin nicht mehr generell zur Nierenprotektion empfohlen (Dellinger et al. 2004). Festzuhalten bleibt aber, dass es regional zu einem verbesserten Blutfluss in Nieren- und Mesenterialarterien kommt. Hildebrand et al. haben 2004 dies in Bezug auf die Splanchnikusdurchblutung nochmals in einem Schweine-Sepsis-Modell gezeigt. Vor allem Dopamin in einer Konzentration zwischen 5 und 10 µg/kg/min und auch Dopexamin in einer Konzentration von 1-2 µg/kg/min haben die Herzauswurfleistung und den Blutfluss in der Arteria mesenterica signifikant erhöht. Die Oxygenierung der Darmmukosa konnte aber auch hier wieder nicht verbessert werden (Hildebrand et al. 2004).

2.7 NO-Synthasen

Das vasodilatativ wirkende, freie Radikal Stickstoffmonoxid (NO) wird von verschiedenen NO-Synthasen aus L-Arginin produziert. Bei Säugetieren gibt es drei verschiedene Isoenzyme. Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) kommt in Endothelzellen, Epithelzellen, Kardiomyozyten (Wang et al. 2007) und Neuronen vor (Henrich et al. 2002 und 2003). Die neuronale NO-Synthase (nNOS) hingegen in Neuronen und Skelettmuskelzellen (Wang et al. 2007). Beide werden von den Zellen konstitutiv exprimiert und durch intrazelluläre Calciumkonzentrationserhöhung aufgrund physikalischer oder rezeptorvermittelter Reize aktiviert (Knowles und Moncada 1994). Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wird in Makrophagen, Hepatozyten, glatten Muskelzellen, wie zum Beispiel in Gefäßwänden, und verschiedenen anderen Geweben unter physiologischen Bedingungen nur in sehr geringen Mengen exprimiert (Knowles und Moncada 1994; Morris und Billiar 1994). Eine deutlich vermehrte Expression wird bei entzündlichen Prozessen beobachtet, bei denen die Mediatoren Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon γ freigesetzt werden (Morris und Billiar 1994). Die iNOS produziert dann große Mengen an NO, was einerseits einen antimikrobiellen Effekt hat, aber auch für die in der Sepsis auftretende übermäßige Vasodilatation sorgt (Titheradge 1999; Moncada et al. 1991). McGown et al. sprechen auch von einer Balance bezüglich der Expression der endothelialen und der induzierbaren NOS. Wenn es ausgelöst durch

Endotoxine und Cytokine zu einer vermehrten Aktivität und Expression der iNOS kommt, verringern sich diese Parameter der eNOS (McGown und Brookes 2007). Der Nachweis oder der Anstieg in der Expression der iNOS im Gewebe kann somit ein Indikator für eine induzierte Infektion oder Sepsis sein. Gleichzeitig sollte sich die Expression der eNOS durch den vermehrten Anfall von TNF- α verringern, wie Yoshizumi et al. bereits zeigen konnten (Yoshizumi et al. 1993).

2.7 Fragestellung

In Bezug auf die Mesenterialstrombahn liegen molekularbiologische Untersuchungen bezüglich der Expression einzelner Kaliumkanäle noch nicht vor. Das Vorhandensein der vier oben genannten zweiporigen Kaliumkanäle (TASK-1, TASK-2, TREK-1 und TWIK-2) und ihre Beeinflussbarkeit durch multiple Faktoren, die auch teilweise in der Sepsis und Ischämie freigesetzt werden oder vorhanden sind, könnte auf eine wichtige Rolle der Kaliumkanäle auch bei den septischen Veränderungen der Hämodynamik in der Mesenterialstrombahn hindeuten.

Dopamin wurde lange in der Sepsistherapie zur Erhöhung der Nierenperfusion, als Schutz vor Nierenversagen eingesetzt. Studien zur Dopaminwirkung unter Sepsis legen eine Veränderung an den Rezeptoren nahe, welche bisher noch nicht gezeigt wurde.

In dieser Arbeit soll deshalb den folgenden Fragen nachgegangen werden:

- Verursachen septische Bedingungen eine veränderte Genexpression von zweiporigen Kaliumkanälen?
- Sind alle Kaliumkanäle gleichermaßen betroffen? Wie ist der zeitliche Verlauf einer eventuellen Veränderung?
- Ist die Sepsis für eine eventuelle Veränderung der Expression im Tiermodell verantwortlich, oder spielt das chirurgische Trauma durch die Operation in dem verwendeten Tiermodell auch eine Rolle?
- Spiegelt sich eine veränderte Transkription an spezifischer mRNA auch direkt in einer proportional veränderten Translation und Expression der Proteine wieder?
- Kommt es unter septischen Bedingungen zu einer veränderten Genexpression von Dopaminrezeptoren in der Mesenterialstrombahn?

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die für die Versuche entnommenen Mesenterien und umgebenden Darmabschnitte entstammen einer nicht für dieses Experiment explizit konzipierten, anderen tierexperimentellen Untersuchung. Bei den Tieren handelte es sich um männliche C57BL/6J Mäuse, die zwischen 25 und 40 g wogen. Sie waren ca. 23 Wochen alt. Die Tiere entstammten aus einer hauseigenen Zucht. Alle in dieser Studie durchgeführten Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Gießen gemäß § 7 des Tierschutzgesetzes nach Vorlage eines Tierversuchsantrages (Gi 20/10 Nr. 39/2010) genehmigt.

3.2 Caecale Ligation und Punktion (CLP)

Um die komplexen pathophysiologischen Vorgänge während eines septischen Geschehens zu erforschen, existieren verschiedene Tiermodelle. Das am häufigsten benutzte und weltweit als Goldstandard zählende ist das CLP (Cecal ligation and puncture) -Modell, welches erstmals 1980 beschrieben wurde (Wichterman et al. 1980). Analog des dafür entwickelten, aktuellen Protokolls (Rittirsch et al. 2009) wurden die Tiere operiert. Sämtliche Operationen wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Die Mäuse erhielten eine vollständig antagonisierbare Narkose. Eingeleitet wurde sie mit 0,05 mg/kg Fentanyl, 5 mg/kg Midazolam und 0,5 mg/kg Medetomidin, was jeweils perkutan intraperitoneal appliziert wurde. Bei den spontanatmenden Tieren wurde nach Rasur und Desinfektion der Abdominalregion ein 1,5 bis 2 cm langer Hautschnitt gesetzt und die Bauchmuskeln an der *linea alba* durchtrennt. Das Caecum wurde aufgesucht und außerhalb der Bauchhöhle mobilisiert. Der Schweregrad der induzierten Sepsis hängt maßgeblich von der Höhe der Ligation am Caecum ab. Diese wurde so gewählt, dass es zu einer 25%igen Letalität bis zum achten Tag nach CLP bei den Tieren kommen soll. Weitere wichtige Einflussfaktoren sind die Größe der für die Punktion benutzen Nadel und die Anzahl der Punktionen. So wurden vor der Punktion 2 mm des Caecums abgebunden und mit einer 26 G Nadel einmalig punktiert. Anschließend wurde das Caecum rückverlagert, die Muskelschicht mit einer durchgängigen Naht und die Haut mit Einzelknopfnähten zugenäht. Nach der Operation wurden 0,5 mg/kg Flumazenil und 2,5 mg/kg Atipamezol subkutan

verabreicht. Das Fentanyl wurde nicht antagonisiert. Alle 12 Stunden wurden zur postoperativen Analgesie 0,05 mg Buprenorphin verabreicht. Durch die Punktion des Caecums kommt es zu einer polymikrobiell ausgelösten Infektion in der Bauchhöhle, welche anschließend in das Blutgefäßsystem transloziert. Es entwickelt sich eine systemischen Entzündungsreaktion. Dieses Mausmodell zeichnet sich durch eine hohe Konstanz der Sepsisinduktion und eine gute Reproduzierbarkeit aus. Die Tiere wurden für die laut Versuchsplanung (siehe 3.3) entsprechende Zeit unter Standardbedingungen der neuen EU-Tierversuchsrichtlinie (2010/63/EU / ETS 123 Appendix A) in den Käfigen gehalten. Bei einer Temperatur zwischen 20 °C und 24 °C und einer Luftfeuchtigkeit zwischen 45% und 65% wurde ein 12h Tag-Nacht-Rhythmus eingestellt. Die Tiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Pelletfutter (Altromin, Lage, Deutschland).

3.3 Versuchsdesign

Um den zeitlichen Verlauf einer eventuellen Änderung der Expression von Kaliumkanälen und Dopaminrezeptoren in der Sepsis zu untersuchen, wurden die Tiere nach der CLP-Operation unterschiedlich lange in der Sepsis und postseptischen Phase belassen. Euthanasien mit darauf folgender Auswertung fanden jeweils zwei, fünf oder acht Tage nach der Operation statt. Es wurden immer Gruppen von 10 Tieren operiert. Eine nicht caecal punktierte, aber ansonsten analog des Protokolls operierte Kontrollgruppe wurde ebenfalls am Tag zwei euthanasiert. Postoperativ wurden die Tiere mindestens zweimal täglich anhand eines einheitlichen Bewertungsschemas beurteilt. Dabei wurden je nach Zustand unterschiedlich viele Punkte für jeweils das Aussehen, die Futter- und Wasseraufnahme, die Atemform und Atemfrequenz sowie das Verhalten der Tiere gegeben. Je nach erreichter Punktzahl wurden die Tiere einer von vier verschiedenen Kategorien zugeordnet, mit denen dann das weitere Vorgehen festgelegt war. Es konnte im Idealfall mit der Routineüberwachung und Schmerzmedikation mit 0,05 mg Buprenorphin alle 12h bis zum entsprechenden Tag nach Versuchsprotokoll fortgefahren werden. In der zweiten Kategorie wurden sie ab dann mindestens fünfmal täglich begutachtet, von einem Tierarzt gesehen und bekamen eine erhöhte Dosis der Schmerzmedikation. Wenn die Mäuse in die dritte Kategorie fielen, wurden sie permanent beobachtet und gegebenenfalls euthanasiert. In der letzten

Kategorie war von starken Schmerzen auszugehen und die Tiere wurden sofort euthanasiert.

3.4 Euthanasie und Organpräparation

Zur Euthanasie wurde eine Überdosis Isofluran verwendet. Hierfür wurden die Tiere in einen gasdichten Inkubator gesetzt, welcher einen mit 2 ml Isofluran getränkten Wattetupfer enthielt. Ein bis zwei Minuten nach Isofluranexposition kam es bei den Tieren zur Schnappatmung. Wenn diese sistiert hatte wurde das Tier aus dem Inkubator geholt und nach Bestätigung des Todes mithilfe von Kanülenspitzen auf einer Styroporunterlage fixiert. Der gesamte Bauch der Tiere wurde mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Nach einer Peritoneallavage mit gekühltem PBS erfolgte die Präparation des Darms mit den Mesenterialgefäßen. Hierfür wurde der Bauch der Tiere linkslateral der Op-Naht mit einer Feinschere (FST-Dumont, Foster City, Kalifornien, USA) eröffnet. Der Maussitus wurde mit 4 °C kaltem PBS gefüllt. Mithilfe eines sterilen Nylonfadens wurden das orale Ende am Magen-Duodenum-Übergang, sowie das aborale Ende am Kolon-Rektum Übergang abgebunden, um einen Austritt von Darminhalt zu verhindern. Das Darm-Mesenterium-Konglomerat wurde en bloc entnommen und in eine gekühlte und mit Silikon beschichtete Petrischale gelegt, welche mit ca. 15 ml 4 °C kaltem PBS befüllt wurde. Nach diesem Schritt unterschieden sich die Vorgehensweisen der RNA-Isolierung von der der Protein-Isolierung.

3.5 RNA-Untersuchungen

Um eine quantitative Aussage über die mRNA eines bestimmten Zielgens zu treffen, kann die Menge der mRNA mit einer Real-Time PCR bestimmt werden. Hierfür wird gesamt-RNA isoliert, zu cDNA umgeschrieben und danach in einer PCR (polymerase chain reaction) vervielfältigt (siehe Kapitel 3.5.3 bis 3.5.5).

3.5.1 Arterienisolsierung für die RNA-Untersuchungen

Für die Arterienisolierung wurde die Petrischale mit dem Mesenterium auf eine mit Wasser gefüllte und bei -20 °C gefrorene Plastikschielle gestellt. Das Konglomerat wurde

unter diesen gekühlten Bedingungen mithilfe von Minutien aufgespannt und die Ansätze des Mesenteriums in der Nähe der Darmwand abgetrennt (s. Abb. 3a und 3b). Das Mesenterium wurde in ein mit RNAlater (Quiagen, Hilden) gefülltes 15 ml Falcon Gefäß (BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) transferiert und bis zur Entnahme aller Mesenterien der an einem Tag euthanasierten Tiere auf Eis gestellt. Alle Proben wurden in einem 4 °C Kühlschrank mindestens 12 Stunden aufbewahrt und anschließend in einem -20 °C Gefrierschrank mindestens einen Tag eingefroren. Zur Isolierung der Arterien aus dem gesamten Mesenterium tauten die Proben dann über Nacht im 4 °C Kühlschrank langsam auf. Erneut, wie bei der vorherigen Präparation, wurden die Arterien dann in eine auf 4 °C gekühlte Petrischale gelegt und auf eine mit Wasser gefüllte und bei -20 °C gefrorene Plastikschiene gestellt. Die Petrischale wurde mit ca. 15 ml 4 °C kaltem RNAlater befüllt und zur weiteren Präparation unter das Mikroskop (Retsch SR, Zeiss, Oberkochen) gestellt, wo die Arterien von den Venen, den Nerven und dem Fettgewebe bei 20facher Vergrößerung getrennt wurden. Das präparierte Arteriengeflecht (Abb. 4a und b) wurde in 1 ml Trizol® (Carlsbad, Kalifornien, USA) überführt, auf Eis gelagert und eine 6 mm Metallkugel hinzugefügt. Sofort im Anschluss wurde mit der weiteren RNA-Isolierung fortgefahren.

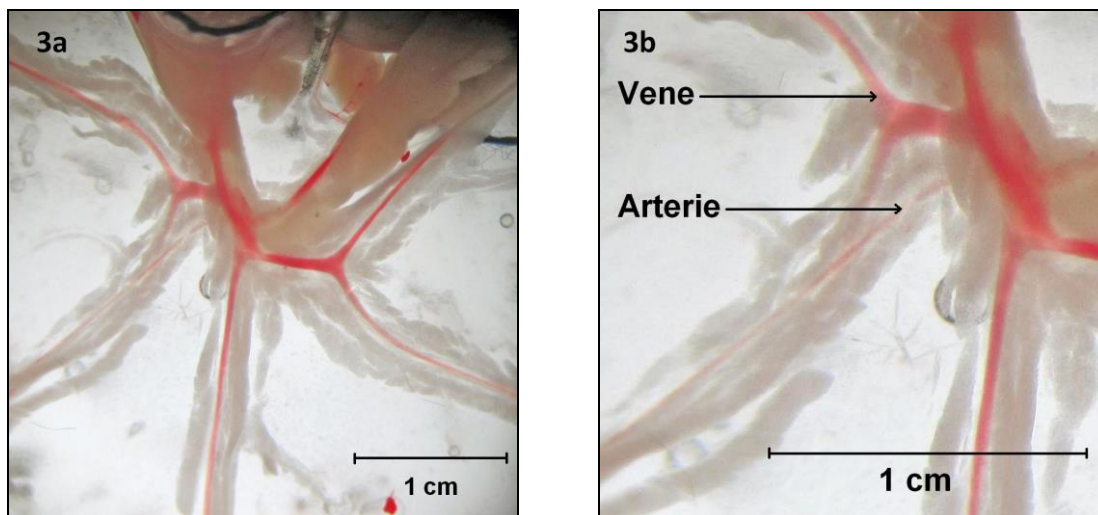


Abb. 3a und b Das aus dem Situs entnommene Mesenterium wurde in einer Petrischale mithilfe von Minutien aufgespannt. Zu sehen sind die relativ großen, dunkelroten Venen, die darunterliegenden Arterien und das die Gefäße umgebende Fettgewebe. Das Mesenterium wurde so ausgebreitet, dass die *Vena mesenterica* über der Arterie und in Zentrum der Petrischale ist. Vom Hauptstamm aus verzweigen sich die kleineren Gefäße zur Peripherie hin. Abb. 3b zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus Abb. 3a. Beschriftet ist die oben aufliegende, großlumige und dünnwandige Vene. Darunter kommt ein kleineres, arterielles Gefäß hervor. Das mit Blut gefüllte Lumen der Arterie ist von einer hier heller erscheinenden Arterienwand umgeben.

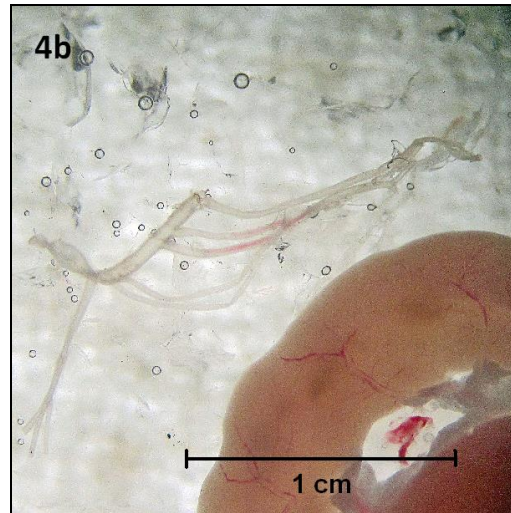
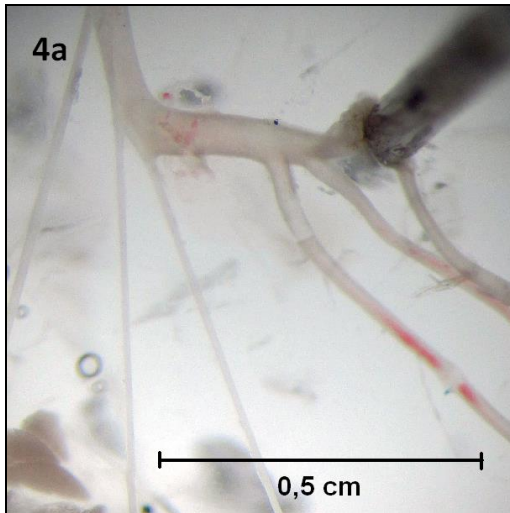


Abb. 4a und b: Die mesenteriale Arterie und ihre Abgänge sind freipäpariert. Venen, Fettgewebe und Nervenflechte wurden entfernt. In Abb. 4a sind die von der *Arteria mesenterica* abgehenden kleineren Arteriengut zu erkennen. In dieser radspeichenähnlichen Aufspannung konnten die Arterienäste besser präpariert werden. In Abb. 4b ist das fertige Präparat zum Größenvergleich neben einer Darmschlinge zu sehen.

3.5.2 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung begann direkt im Anschluss an die Präparation, wobei das Eppendorfgefäß mit dem in Trizol[®] gelagerten Arteriengeflecht in eine Kugelmühle (Retsch MM 301, Haan) eingespannt und bei 30 Hz für 4 min. gemahlen wurde. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (21 °C) wurden 0,2 ml Chloroform hinzupipettiert und für 20 sec. gevortex (Vortex-Genie, Scientific Industries, Bohemia, New York, USA). Nach erneuter 3 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde schließlich für 15 min. bei 4 °C und 10000xg zentrifugiert (Zentrifuge Mikro 200R, Hettich, Tuttlingen). Hierbei entstanden in dem Eppendorfgefäß 3 Phasen; eine rötliche untere DNA-Phase, eine trübe mittlere Interphase mit enthaltenen Proteinen und eine fast klare obere Phase mit enthaltener RNA. Die obere Phase wurde vorsichtig, ohne die mittlere Phase zu berühren, abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Langsam wurde hier unter zu beobachtender Schlierenbildung 99%iges Ethanol, äquivalent zu der abgenommenen Menge der RNA-Lösung, hinzu pipettiert und dabei gemischt. Danach begann die Säulenaufreinigung der RNA mit Hilfe des RNeasy[®] Mini Kit plus (Quiagen, Hilden, Deutschland), wobei aufgrund der vorigen Trizolbehandlung der RTL Puffer nicht benutzt wurde. So wurden bis zu 700 µl der RNA-Lösung auf eine RNeasy[®] Säule gegeben und für 30 sec. bei 8000xg zentrifugiert. Danach wurden 700 µl des RW 1 Puffers auf die Säule pipettiert. Nach kurzer Zentrifugation von 30 sec. bei

8000xg wurde der Durchfluss verworfen und zweimal hintereinander 500 µl RPE Puffer hinein pipettiert und der Durchfluss ebenfalls zwischendurch verworfen, wobei das erste Mal 30 sec. und beim zweiten Mal 2 min. zentrifugiert wurde. Nach Aufsetzen in ein neues Sammelgefäß wurde die RNA aus der Säule mit 35 µl RNase freiem Wasser eluiert. Die Konzentration der Nukleinsäuren, sowie das Verhältnis zwischen Protein und Nukleinsäuren wurden mithilfe der Spektralphotometrie mit einem Nanodrop-Gerät (PEQlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Hierbei wurden die Absorptionen bei 260 nm Wellenlänge für Nukleinsäuren und bei 280 nm für die Proteine bestimmt. Proben mit einem Verhältnis (ratio) E260/E280 von 1,8-2,2, welches für eine geringe Proteinkontamination spricht, wurden dann für weitere Untersuchungen verwendet. Bei -80 °C wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

3.5.3 Reverse-Transkriptase-PCR

Voraussetzung für das Durchführen einer PCR ist das Vorhandensein einer DNA-Matrize. Zur Vermehrung und späteren Quantifizierung einer spezifischen mRNA-Sequenz ist deshalb vor der Durchführung der PCR das Umschreiben der mRNA in eine cDNA nötig. cDNA-Synthese und anschließende PCR wird Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) genannt. Um einen möglichst sauberen und kontaminationsarmen Umgang beim Pipettieren mit RNA und DNA zu gewähren wurden die folgenden Schritte in einer PCR-Workstation (PEQlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt. Für die RT-PCR wurde das Quantitec[®] Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Der erste Schritt war die genomische DNA (gDNA)-Eliminations-Reaktion. Hierfür wurden einzeln auf Eis 2 µl gDNA Wipeout Buffer 7x aus dem oben genannten Kit und eine zu 0,1 µg äquivalente Menge der jeweiligen RNA-Lösung gemischt und dann bis zu 14 µl Gesamtmenge mit RNase freiem Wasser aufgefüllt. Im PCR Mastercycler gradient (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) wurde dieser Ansatz für 2 min. bei 42 °C inkubiert. Währenddessen wurde die RT-Stammlösung, wie in Tab. 1 beschrieben, pipettiert und die vorher gemischte gDNA-Eliminationsreaktion hinzupipettiert.

Tab. 1: Komponenten für die Reverse-Transkriptase-Reaktion

Komponente	Volumen
Quantiscript Reverse Transkriptase	1 µl
Quantiscript RT Buffer, 5x	4 µl
RT Primer Mix	1 µl
gDNA-Eliminations- Ansatz der vorigen Reaktion aus Cyclor	14 µl
Gesamtmenge	20 µl

Bei 42 °C, dem Temperaturoptimum der reversen Transkriptase, wurde für 30 min. inkubiert, bevor dann für 3 min. bei 95° C das Enzym inaktiviert wurde.

3.5.4 PCR

Die PCR ist ein Verfahren zur Vervielfältigung eines DNA-Moleküls eines bestimmten Zielgens (Mullis et al. 1987). Die Matrize zur Vervielfältigung ist in diesem Fall die vorher synthetisierte cDNA (s.o.). Des Weiteren wird für die PCR eine DNA-Polymerase, die vier Nukleotide als Bausteine der neuen DNA-Stränge und die zu den zu amplifizierenden Genabschnitten komplementären Primer benötigt. Ein PCR-Zyklus besteht aus Strangtrennung (Denaturierung), Primerbindung (Annealing) und DNA-Synthese, der in einem vorprogrammierten Thermocycler 30- bis 40-mal durchlaufen wird. Hierbei wird die Ausgangsmenge an DNA mit jedem Zyklus theoretisch verdoppelt. Da die Reaktionsansätze auf teilweise 95 °C erhitzt werden, ist eine hitzestabile Polymerase, die Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus*-Polymerase), nötig. In dieser Arbeit wurde die normale PCR zur erstmaligen Detektion der Zielgene und zur Kontrolle der isolierten RNA angewandt. Die entsprechenden Ansätze wurden dem GoTaq®Flexi DNA Polymerase PCR Kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA) entnommen und auf Eis pipettiert. Sie setzen sich für jede Reaktion wie in Tab. 2 aufgelistet zusammen.

Tab. 2: Komponenten für die Polymerase Kettenreaktion (nach Herstellerangaben der Firma Promega, Madison, Wisconsin, USA)

Komponente	Volumen	Konzentration
5xGreen GoTaq®Flexi Buffer	10 µl	1 X
MgCl ₂ -Solution 25 mM	4 µl	2 mM
PCR Nucleotide Mix 10 mM each	1 µl	0,2 mM / dNTP
upstream Primer	1 µl	0,2 µM
downstream Primer	1 µl	0,2 µM
GoTaq®DNA Polymerase (5 u/µl)	0,25 µl	1,25 u
template DNA	1 µl	
Nuklease freies Wasser	31,75 µl	

Das Programm für den Thermocycler wurde für den Reaktionsablauf wie in Tab. 3 aufgelistet programmiert.

Tab. 3: Programm für Thermocycler

Arbeitsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min.	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C	30 sec.	35 Zyklen
Annealing	56,6 – 65 °C	30 sec.	
Extension	72 °C	30 sec.	
Finale Extension	72 °C	5 min.	1 Zyklus
Kühlung	4 °C	beliebig	1 Zyklus

Die Annealing Temperaturen wurden für jedes Primerpaar einzeln optimiert und sind Tab. 4 zu entnehmen.

Tab. 4: PCR Primer Sequenzen (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) und spezifische Annealing-Temperaturen

Bezeichnung	Sequenzen	Temperatur
TASK 1 (KCNK 3):	5'-CCTTCTACTTCGCCATCACC-3' 3'-GACACGAAACCGATGAGCAC-5'	60,0 °C
TASK 2 (KCNK 5):	5'-ACGCAGTTCCCCGCGTTCAG-3' 3'-CCATGTCAGGCACAGCGGCA-5'	64,1 °C
TREK 1 (KCNK 2):	5'-GGCCTACTTTGCACCTGTTC-3' 3'-CGGAGTCAGTTCCTGGTTGT-5'	57,8 °C
TWIK 2 (KCNK 6):	5'-TACAGCACAGCCCGTGCGTG-3' 3'-CGCGGACAGTGACGACGAGT-5'	61,8 °C
β-Actin:	5'-TGACAGGATGCAGAAGGAGA-3' 3'-AGTCCGCCTAGAAGCATTG-5'	59,1 °C
NOS 2 (iNOS):	5'-ATGTCCGAAGCAAACATCAC-3' 3'-GTGGATGAAGGACCTGTAAT-5'	56,6 °C
NOS 3 (eNOS):	5'-GGCTGGGTTTAGGGCTGTG-3' 3'-GTAGTGGATGCTGTGGGAGTC-5'	65,0 °C
Dopaminrezeptor 1:	5'-GCCCCGAGGCTCCATCTCCA-3' 3'-TATGCCACCGGCCTCCTCCC-5'	60,0 °C
Dopaminrezeptor 2:	5'-GCCGCAGGAAGCTCTCCCAG-3' 3'-AGCCCAGCCATGTGAAGGCG-5'	55,0 °C

Die PCR-Produkte wurden zur Auswertung auf ein 1,5%iges Agarosegel (2,25 g Agarose in 150 ml TAE Rotiphorese Puffer 1x) geladen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit SYBR[®] green (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) angefärbt. Anschließend wurden die DNA Fragmente anhand des interkalierenden Farbstoffes unter UV Licht mit einem Fluoreszenz Imager (Vilber, Eberhardzell) sichtbar gemacht (Kemp et al. 1989). Durch einen vorher zugegebenen Größenmarker ließ sich die relative Größe der Produkte bestimmen (Mullis und Faloona 1987). Bei dieser Methode handelt es sich allerdings nur um eine Endpunktbetrachtung der gesamten Reaktion, wobei die Bandenstärke nur bedingt Rückschlüsse auf die enthaltene DNA Menge zulässt. Die Kinetik der Reaktion und somit die genauere relative Quantifizierung ist dagegen mit der Real-Time PCR Methode (s.u.) möglich.

3.5.5 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR stellt eine Weiterentwicklung der normalen PCR dar. Mit ihr kann das Ausmaß der RNA-Expression in einer Probe absolut oder, wie in dieser Arbeit, relativ quantifiziert werden. Diese Methode beruht auf der direkten, in Echtzeit (Real-time), Detektion der entstehenden Fluoreszenz während der exponentiellen Phase der Reaktion. Die Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge des entstehenden PCR-Produktes. In dieser Arbeit wurden Fluoreszenzfarbstoff markierte Sonden (Taqman[®]-Sonden, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) verwendet (Holland et al. 1991). Die Taqman[®]-Sonde besitzt einen Reporter am 5'-Ende und einen Quencher am 3'-Ende (s. Abb. 5). Wenn die Sonde intakt ist, wird die vom Reporter emittierte Fluoreszenz von dem Quencher absorbiert. Erreicht jetzt die im Reaktionsansatz enthaltene Taq-Polymerase die Sonde, wird der Reporter durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität zuerst abgetrennt und entfernt sich vom Quencher. Die Fluoreszenz wird nicht mehr absorbiert und kann gemessen werden (Heid et al. 1996).

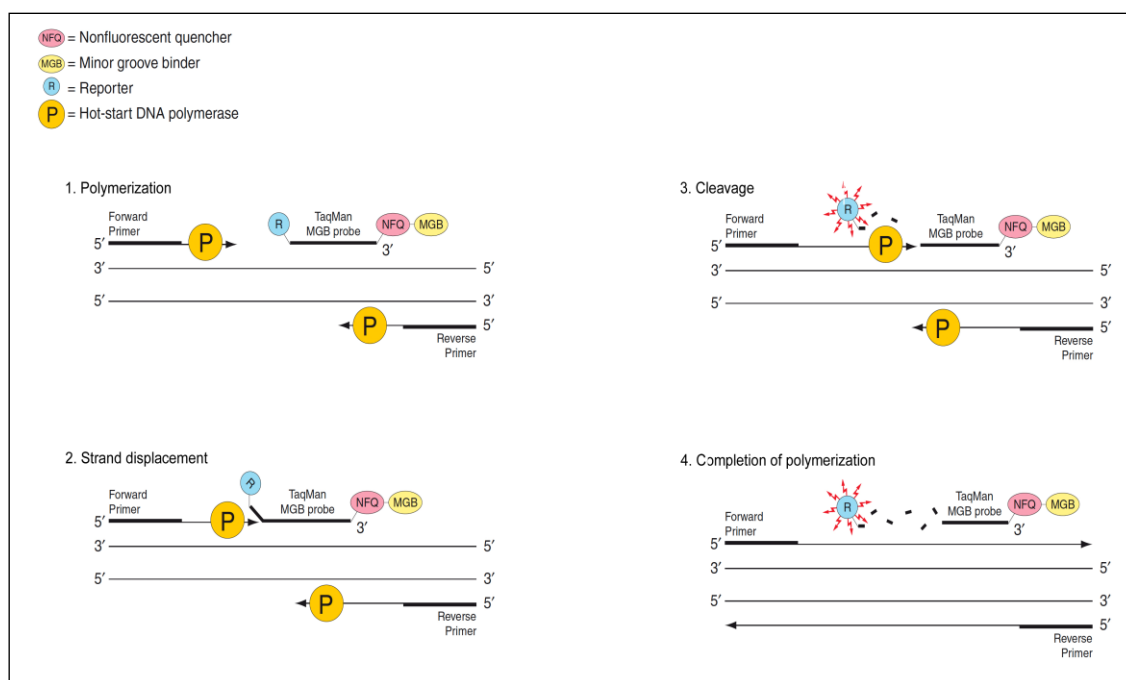


Abb. 5 Schematischer Ablauf eines Real-Time PCR Zyklus (aus Applied Biosystems 11.2010, 2010) Schematisch Real-Time PCR-Zyklus. Die verwendeten Taqman[®]-Sonden sind für eine bestimmte Nukleotidsequenz spezifisch. Sie bestehen aus dem zur mRNA-Sequenz komplementären Nukleotidstrang, einem Reporter am 5'-Ende, einem nicht fluoreszierenden Quencher am 3'-Ende und einem an den Quencher angehängten „minor groove binder“, der eine sehr stabile Verbindung zum RNA-Strang herstellt und somit eine Verkürzung der Sonde an sich ermöglicht. (1) Die TaqMan[®]-Polymerase (P) synthetisiert den zur mRNA passenden Gegenstrang auf die angelagerte Sonde zu. (2) Die Polymerase besitzt auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, mit der sie die Sonde abbaut. (3 und 4) Wenn sich der Reporter vom Quencher entfernt wird die Fluoreszenz des Reporters nicht mehr absorbiert und kann jetzt direkt gemessen werden.

Wie bei der konventionellen PCR muss die zu untersuchende mRNA zuerst, wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben, in cDNA umgeschrieben werden. Dabei wurde die genaue Gesamt-RNA-Konzentration der Proben mithilfe des NanoDrop-Gerätes (Eppendorf, Hamburg) bestimmt und die entsprechenden Mengen der RNA-Probe in den RT-PCR-Ansatz pipettiert. So erhielt man gleiche Ausgangsmengen an cDNA für die Real-Time-PCR. Danach wurden die Reaktionsansätze für die einzelnen Zielgene (siehe Tab. 5 und 6) hergestellt, auf eine 96-well Mikrotiterplatte gebracht und in den Real-Time PCR Cycler „Step One Plus“ (Applied Biosystems, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) eingebracht.

Tab. 5: Zusammensetzung Real-Time PCR Reaktionsansatz

Komponente	Volumen
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (2X)	10 µl
20X TaqMan® Gene Expression Assay Mix	1 µl
cDNA diluted in RNase-free water	9 µl
Total	20 µl

Tab.6: Real-Time PCR Sonden-assay ID (Applied Biosystems, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA)

Zielgen	Assay-ID
TASK 1 (KCNK 3)	Mm00807036_m1
TASK 2 (KCNK 5)	Mm00498900_m1
TREK 1 (KCNK 2)	Mm01323942_m1
TWIK 2 (KCNK 6)	Mm01176312_g1
β-Actin	Mm00607939_s1
NOS 2 (iNOS)	Mm00440502_m1
NOS 3 (eNOS)	Mm00435217_m1
Dopaminrezeptor 1a	Mm13532211_m1
Dopaminrezeptor 2	Mm00438545_m1

Jedes Zielgen unterlag dabei einer Dreifachbestimmung. Das Programm im *Cycler* begann mit einem Zyklus (2 min. bei 50 °C und 10 min. bei 95 °C) gefolgt von 40 Zyklen (15 sec. bei 95 °C und 1 min. bei 60 °C).

3.5.6 Auswertung der Real-Time PCR

Für eine relative Quantifizierung wird das Zielgen in Relation zu einer endogenen Kontrolle gesetzt, in diesem Fall β -Actin als Referenzgen, um einen Anstieg oder einen Abfall in der Expression des Zielgens beobachten zu können. Die endogene Kontrolle (Referenzgen) sollte nicht reguliert sein und einer konstanten Expression unterliegen, so dass es zur Normalisierung der gemessenen Werte des Zielgens benutzt werden kann. Bei der relativen Quantifizierung ist es wichtig, dass die Ziel- und Referenzgen-PCR vergleichbare Reaktionseffizienzen aufweisen. Während der Real-Time PCR wird dann der Fluoreszenz-Schwellenwert berechnet. Dieser auch *cycle threshold* oder C_T -Wert genannte PCR-Zyklus gibt den Zeitpunkt an, an dem das neu entstehende Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz deutlich übersteigt. Damit bezeichnet der C_T -Wert den Zeitpunkt, bei welchem die Synthese der doppelsträngigen-cDNA exponentiell wird. Der C_T -Wert ist umso kleiner, je mehr cDNA-Template initial vorhanden sind. Das bedeutet, es werden weniger Zyklen benötigt, damit die Hintergrundfluoreszenz überschritten werden kann. Mit der Formel: $\Delta C_T \text{ Zielgen} = C_T \text{ Referenzgen} - C_T \text{ Zielgen}$ berechnet man die Differenz an Zyklen für das Zielgen und für die endogene Kontrolle. Zur Darstellung der relativen Expression wird anschließend der $\Delta \Delta C_T$ -Wert berechnet. Hierfür ist ein Kalibrator zu bestimmen. In dieser Arbeit ist der Kalibrator der Mittelwert der Proben von Tag 0. Durch Abzug des ΔC_T -Wertes des Kalibrators von den ΔC_T -Werten aller Proben erhält man den $\Delta \Delta C_T$ -Wert ($\Delta \Delta C_T = \Delta C_T \text{ Zielgen} - \Delta C_T \text{ Kalibrator}$). Hiermit kann die relative Gen-Expression (RGE) nach folgender Formel bestimmt werden: $RGE = 2^{(-\Delta \Delta C_T)}$. Der RGE-Wert gibt dann die n-fache Expression eines Gens in Bezug auf den Kalibrator an.

3.6 Protein-Untersuchungen

3.6.1 Arterienisolierung für die Protein-Untersuchungen

Für die Protein-Isolierung wurde das entnommene Darm-Mesenterium-Präparat bis zur Entnahme aller an einem Tag euthanasierten Tiere in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt, welches mit 20 ml gekühltem PBS gefüllt war, und auf Eis gelagert. Nach Abschluss aller an einem Tag durchgeführten Entnahmen wurden die Präparate entsprechend der Reihenfolge der Entnahme in eine ebenfalls mit 4 °C kaltem PBS gefüllte und mit Silikon beschichtete Petrischale überführt. Mit Hilfe von Minutien wurde das Präparat wie in den Abb. 3a und 3b wieder aufgespannt. Die Petrischale wurde auf eine mit Wasser gefüllte und bei -20 °C gefrorene Plastikschiel gestellt, mit Eis aufgefüllt und unter das Mikroskop gestellt. Bei 20-facher Vergrößerung konnte nun begonnen werden, mit einer feinen Pinzette und Schere (FST Dumont, Foster City, Kalifornien, USA) die nun radspeichenähnlich aufgespannten Mesenterialgefäße zu trennen. Venen, Nervenflechte und Fettgewebe wurden vorsichtig vom Stamm der Arteria mesenterica superior ausgehend entfernt (siehe Abb. 4a). Am Ende der Präparation wurden die Enden der kleinen, peripheren Arterienäste in der Nähe der Darmwand abgetrennt und das zusammenhängende Arterienflecht (siehe Abb. 4b) in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben, welches ebenfalls mit 4° C kaltem PBS gefüllt war. Sofort im Anschluss wurde mit der Proteinisolierung fortgefahren (Rodrigo et al. 2002).

3.6.2 Protein-Isolierung

Die Protein-Isolierung begann direkt im Anschluss an die Präparation (s.o.), wobei das präparierte Arterienflecht zum Zerkleinern in einen mit flüssigem Stickstoff gefrorenen Achatmörser gelegt und mit einem Pistill vorsichtig pulverisiert wurde. Nach dem Erwärmen des Mörsers auf Raumtemperatur konnte das Pulver mit 35 µl RIPA Puffer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA) aufgelöst werden. Zur Abtrennung der Zellrückstände von den im RIPA gelösten Proteinen wurden die Proben 3 min. bei 10.000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Bei einer Temperatur von -20 °C wurden die gewonnenen Proben bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

3.6.3 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Proben erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific, Waltham, Massachusetts, USA), das unter anderem robust gegen Detergentien ist. Bei der BCA Reaktion macht man sich zu Nutze, dass zweiwertige Kupferionen quantitativ mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen reagieren, welche mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff bilden. Bei einer Wellenlänge von 562 nm kann die Absorption photometrisch ausgewertet werden. Die Absorptionen der Proben wurden mit einer Verdünnungsreihe eines bovinen Albumin-Standardproteins verglichen. Als Konzentrationen der Verdünnungsreihe wurden 0, 10, 20, 35, 60, 100, 200, 1000 µg/µl gewählt. Hierzu wurde eine Betriebsarbeitslösung hergestellt, die zu einem Teil aus Substanz A und 50 Teilen Substanz B bestand. Beide Substanzen entstammen dem oben genannten BCA Kit. Substanz A enthält Natriumcarbonat, Natriumbikarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat gelöst in 0,1 molare Natriumhydroxid und Substanz B enthält 4%iges Kupfersulfat. Davon wurden je 1 ml zu den entsprechenden Mengen des Albuminstandards gegeben. Die zu bestimmenden Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit H₂O verdünnt und in einer Menge von jeweils 50 µl zur Betriebsarbeitslösung (jeweils 1 ml) gegeben. Die Ansätze wurden dann 30 min. bei 37 °C inkubiert. Die Absorptionsmessung wurde mit Hilfe des Biophotometers plus (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) durchgeführt. Aus der Absorption der unbekannten Proben im Vergleich zur vorher gemessenen Eichkurve kann auf ihren Proteingehalt rückgeschlossen werden (Holtzhauer 1997).

3.6.4 Proteinvorbereitung

Die Proteinlösungen, welche 10 µg Protein enthalten, wurden entsprechend den Herstellerangaben im Verhältnis 1:3 zu vierfach konzentriertem ROTI® Load Puffer 4x reduzierend (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) pipettiert, dabei kurz gemischt und bei 67 °C für 10 min. in einem Thermocycler erhitzt. So wurden die Proteine vollständig denaturiert und anschließend bis zu ihrem Verbrauch bei -20 °C eingefroren.

3.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS ist ein anionisches Tensid mit starker Affinität zu Proteinen, welches deren Eigenladung überdeckt und proportional zur Masse der Proteine eine negative Ladung erzeugt. SDS in einer Menge von 1,4 g überlädt dabei 1 g Protein. Die Proteine trennen sich dann auf Grund der bei der Wanderung entstehenden Reibungskräfte im Gelnetz, welche proportional mit der Masse der Proteine ansteigen.

Tab. 7: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für je ein SDS-Gel

10% TRENN-GEL	SAMMEL-GEL
1,9 ml H ₂ O	1,4 ml H ₂ O
1,7 ml 30% Rotiphorese-Acryl-Gel	330 µl 30% Rotiphorese-Acryl-Gel
1,3 ml 1,5 M Tris pH 8,8	250 µl 1,5 M Tris pH 6,8
50 µl 10% SDS	20 µl 10% SDS
2,0 µl TEMED	2,0 µl TEMED
50 µl 10% APS	20 µl 10% APS

Zuerst wurde das Trenngel entsprechend der in Tab. 7 genannten Zusammensetzung gemischt, in die gemäß Herstellerangaben zusammengebaute Kammer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA) gegossen und mit 100 µl Isopropanol zur Oberflächenglättung überschichtet. Nach Auspolymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol vorsichtig abgegossen. Das Sammelgel wurde wie in Tab. 7 gemischt, auf das Trenngel in die Kammer gegeben und ein 12-well Kamm oben aufgesetzt. Nach circa 30 min. war auch das Trenngel auspolymerisiert, der Kamm wurde entnommen, die Gelkammern aus der Halterung entnommen und in die Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA) eingespannt. Nach dem Befüllen mit Elektrophoresepuffer (siehe Zusammensetzung Puffer und Lösungen) wurden die vorbereiteten Proteinproben in die Geltaschen hineinpipettiert. Pro Gel standen maximal 12 Taschen zur Verfügung, wobei immer die erste und letzte mit 10 µl Proteinladder (Thermo scientific, Waltham, Massachusetts, USA) mit den Referenzbanden bei 15, 25, 35, 40, 50, 70, 100, 140 und 260 kD beladen wurde. Die Elektrophoresekammer wurde an das Power-Supply Power Pac (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA) angeschlossen und zunächst 10 min. bei 10 V/cm und anschließend ca. 100 min. bei 15 V/cm laufen gelassen, bis die blaue Laufbande des Ladepuffers am unteren Ende der Gelkammer angekommen war.

3.6.6 Westernblotverfahren

Unter Westernblotting versteht man das Übertragen der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Millipore, Billerica, Massachusetts USA). Zunächst wurde dafür das Trenngel vom Sammelgel gelöst und zur Äquilibrierung 15 min. in Blotpuffer gelegt. Die Membran wurde zur Aktivierung 15 sec. in Methanol und anschließend ebenfalls 15 min. in Blotpuffer gelegt. Wie in Abb. 6 dargestellt, wurde das Blotsandwich in Blotpuffer getaucht und luftblasenfrei zusammengebaut, so dass die Proteine im Gel durch den angelegten elektrischen Strom in Richtung der Anode auf die Membran übertragen wurden. Da in einem Gel nur 10 Proben nebeneinander Platz haben, wurden zwei entsprechende Gelabschnitte anhand der mitgelaufenen Größenmarker ausgeschnitten und zusammen auf eine Membran übertragen. So befanden sich für ein Zielprotein alle zu untersuchenden Proben auf einer Membran. Der Transfer erfolgte bei 100 V für 80 min. Um die Bindungsstellen zu blockieren und eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wurde die Membran über Nacht bei 4 °C oder für eine Stunde bei Raumtemperatur (21 °C) auf einen Schüttler (Rotamax 120, Heidolph, Schwabach) in 5%iger Milchlösung in PBS-T gelegt.

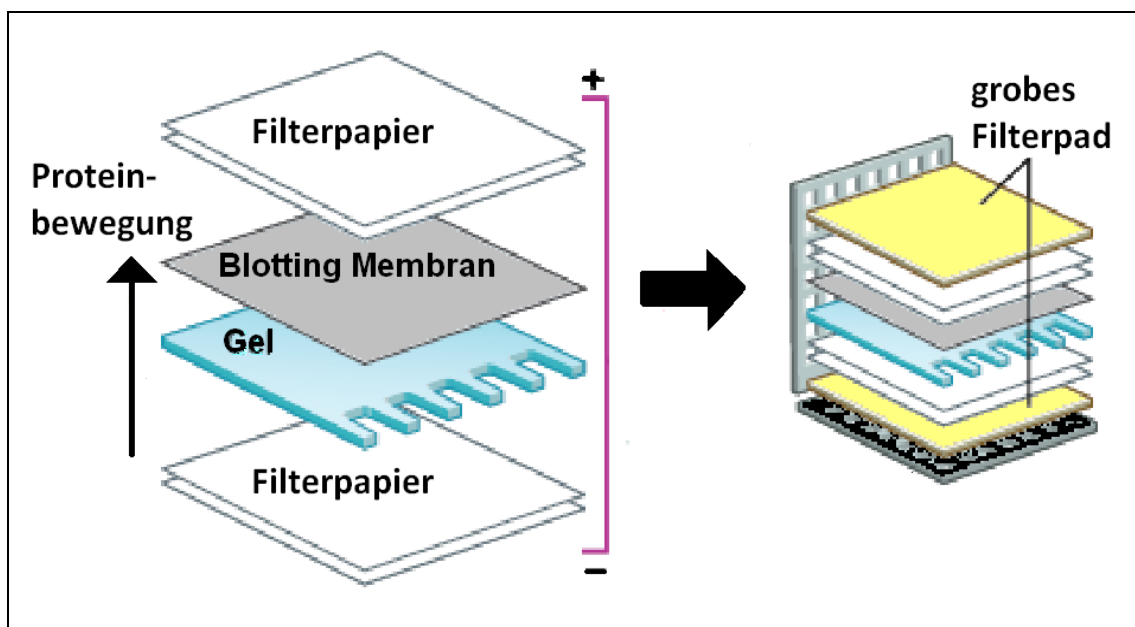


Abb. 6: Aufbau und Schichtung im Blotkäf. Dieser besteht von der Kathode zur Anode aus einem groben Filterpad, zwei Filterpapieren, dem Gel mit den aufgetrennten Proteinen, der PVDF-Membran und erneut zwei Filterpapieren und einem groben Filterpad. Die Einbettung der Membran und des Gels in Filterpapiere und Filterpads dient zum Aufsaugen vom Blotpuffer und so dem Feuchthalten.

3.6.7 Immunologischer Proteinnachweis

Nach Zugabe des Primärantikörpers in eine Plastikschaale mit der proteinbeladenen PVDF-Membran wurde sie für eine Stunde auf dem Schüttler Rotamax 120 (Heidolph, Schwabach) bei Raumtemperatur inkubiert. Der Primärantikörper bindet dabei mit seinem antigenbindenden Fragment (FAB) an die spezifischen Epitope der auf der Membran aufgetrennten Proteine an. Anschließend wurde 3 mal 10 min. mit PBS-T gewaschen, um überschüssige, nicht gebundene Primärantikörper zu entfernen. Die jeweilige Sekundärantikörperlösung wurde anschließend auf die Membran gegeben und ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Der Sekundärantikörper bindet mit seinen FAB-Teil an das kristallisierbare Fragment (Fc) des Primärantikörpers an und besitzt an seinem Fc-Teil eine Peroxidase, die *horseradish peroxidase* (HRP). Danach wurde erneut 3 mal 10 min. mit PBS-T und einmal 10 min. mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Schließlich erfolgte der Nachweis der gebundenen HRP am Sekundärantikörper mit 1 ml Immobilion Western® Chemiluminescent HRP Substrat (Millipore, Billerica, Massachusetts USA). Dabei reagiert das zugegebene HRP-Substrat mit dem am Fc-Teil des Sekundärantikörpers gebundenen Enzym. Es entsteht Chemilumineszenz. Dieses kann detektiert werden und ist in seiner Gesamtheit proportional der gebundenen Primärantikörpermenge und damit auch der spezifischen Proteinmenge. Nach einminütiger Inkubationszeit der Membran mit dem HRP Substrat und mehrmaligem Wenden wurden mit der Chemilumineszenz-Kamera (Vilber, Eberhardzell) die Bilder aufgenommen.

verwendete Primärantikörper:

- TASK 1 (KCNK3): sc28635, Kaninchen, Santa Cruz Biotechnology INC., Kalifornien, USA
Verdünnung: 1:2.000 in 5%iger Milchlösung
- TREK 1 (KCNK2): ab90855, Kaninchen, abcam, Cambridge, UK
Verdünnung: 1:1000 in 5%iger Milchlösung
- β – Actin: sc1616, Ziege, Santa Cruz Biotechnology INC., Kalifornien, USA
Verdünnung: 1:500 in 5%iger Milchlösung

verwendete Sekundärantikörper:

- Ziege gegen Kaninchen, polyklonal IgG-HRP, sc2054, Santa Cruz Biotechnology, INC., Kalifornien, USA
Verdünnung: 1:5000 in 5%iger Milchlösung
- Esel gegen Ziege, polyklonal IgG-HRP, sc2020, Santa Cruz Biotechnology INC., Kalifornien, USA
Verdünnung: 1:10.000 in 2,5%iger Milchlösung

Für die Milchlösung wurde die entsprechende Menge Milcpulver in PBS-T gelöst.

3.6.8 Wiederverwertung der PVDF-Membran („Strippen“)

Um die PVDF-Membran erneut verwenden zu können und einen anderen Primärantikörper darauf zu hybridisieren, müssen die gebundenen Antikörper entfernt werden. Dieses Verfahren bezeichnet man als „Strippen“. Hierfür wurde die Membran in Stripping Puffer für 2 mal 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde sie für 2 mal 10 min. mit PBS und anschließend 2 mal 5 min. mit PBS-T gewaschen. Im Anschluss erfolgte wieder das Blocken für 1 h bei Raumtemperatur in 5%iger Milchlösung in PBS-T, bevor der neue Primärantikörper aufgetragen werden konnte.

3.6.9 Auswertung der Westernblots

Die Bilder der Westernblots wurden mit Hilfe des Programms „Image J“ (Freeware, Sun Microsystems Inc., N.I.H. USA) analysiert. Das Programm quantifiziert die bei den Aufnahmen entstandenen Graustufen anhand ihrer Helligkeit. Das Hintergrundsignal wurde dann von den mehr oder weniger dunklen Signalen, die durch die Immunreaktion entstanden sind, subtrahiert. Die entstandenen Werte wurden mit Hilfe einer auf jedem Westernblot mitgeführten, immer gleich großen Standardprobe geeicht. Danach wurden die Werte der Zielgene zu denen des Haushaltgens (β -Actin) in Relation gesetzt. Aus diesen Verhältnissen der Einzelmessungen wurden die Mittelwerte gebildet.

3.7 Statistische Auswertung

Um die verschiedenen Daten hinsichtlich Signifikanzen zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen zu untersuchen wurde die einfache Varianzanalyse ANOVA (analysis of variance) mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließender Post hoc Testung nach Dunn angewendet. p-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant gewertet. Die Auswertung wurde mit dem Programm „GraphPad Prism“ Version 6 (GraphPad Software, Inc. Kalifornien, USA) vorgenommen. Alle in Texten, Tabellen und Graphiken angegebenen Werte in dieser Arbeit sind als Mittelwerte $\pm$ die Standardabweichung des Mittelwertes angegeben. Der Stichprobenumfang n bezeichnet die unabhängig voneinander in einer Gruppe durchgeführten Versuche.

(* = $p < 0,05$ signifikant ; ** = $p < 0,01$ sehr signifikant; n.s.: nicht signifikant)

3.8 Chemikalien

Agarose HR plus	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
APS	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
Chloroform	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
Ethanol	(Otto Fischar GmbH & Co.KG)
Isofluran	(Baxter Deerfield, Illinois, USA)
Isopropanol	(Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
VE-Wasser	
Galaktose	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
Glycin	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
Methanol	(Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
Nonidet-P40 1%	(Amresco, Solon, Ohio, USA)
PBS 1x ph 7,2	(Gibco by life technologies, Darmstadt)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
SDS-Laufpuffer 10X	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
Natrium deoxycholate	(Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

TAE Rotiphorese 50x	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
TRIZOL	(Invitrogen, by life technologies, Darmstadt)
Tris Base	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
Tween20 (Polysorbat 20)	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
30% Rotiphorese-Acryl-Gel	(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
Proteaseinhibitor Tabletten	(Roche, Basel, Schweiz)
RNAlater	(Quiagen, Hilden)
RIPA Buffer	(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)
SYBR [®] green	(Invitrogen, by life technologies, Darmstadt)

3.9 Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

Die entsprechenden Puffer und Lösungen wurden, wie in folgender Tab. 8 beschrieben, angesetzt und selbst hergestellt:

Tab. 8 : Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

Lösung/Puffer	Herstellung
Blot Puffer	25 mM TRIS
	192 mM Glycin
	20% Methanol
	in VE Wasser
Elektrophoresepuffer	10X SDS-Laufpuffer mit VE Wasser zu 1X SDS-Laufpuffer
5%ige Milchlösung	5% Milchpulver in PBST
PBS-T	PBS plus 0,1% Tween20
1,5 M Tris pH 8,8	1,5M Tris Base; pH-Wert mit HCl und NaOH eingestellt
1,5 M Tris pH 6,8	1,5M Tris Base; pH-Wert mit HCl und NaOH eingestellt
Stripping Puffer pH 2,2	Glycine 0,2 M
	SDS 3,46 mM
	TWEEN 20 0,1%
	pH-Wert 2,2 mit HCl-Lsg. Eingestellt

4 Ergebnisse

4.1 Überlebenszahlen der Tiere nach CLP

Für die Auswertung wurden nur lebende Tiere verwendet. Unmittelbar Verstorbene wurden nicht mit in die Auswertung einbezogen. Von den jeweils 10 (bzw. 15 für Tag 8 post CLP) operierten Tieren haben zwischen 60% (Tag 5) und 73,3% (Tag 8) bis zur Euthanasie überlebt (s. Tab. 9). Jeweils die Hälfte der euthanasierten Mäuse wurde entweder für die Protein-Isolation oder die RNA-Isolation verwendet. Drei Individuen wurden je der Protein-Isolationsgruppe und die restlichen Tiere für die RNA-Isolation zugeteilt. Die endgültige Zahl zur Verfügung stehender Tier beläuft sich dann in der RNA-Gruppe an Tag 0 auf n=3, an Tag 2 auf n=4, Tag 5 auf n=3, Tag 8 auf n=5 und in der sham-operierten Kontrollgruppe Tag 2 auf n=3. Für die Proteingruppe stehen für jeden Tag post CLP drei Proben zur Verfügung.

Tab. 9: Überlebenszahlen der Tiere

Tage nach CLP	operiert nach CLP	Überlebt bis Euthanasie (abs. / %)	Tiere für RNA-Proben	Tiere für Protein-Proben	Gesamtzahl für Auswertung
0	0	6 / 100%	3	3	6
2	10	7 / 70%	4	3	7
5	10	6 / 60%	3	3	6
8	15	11 / 73,3%	5	3	8
Kontrolle Tag 2	6	6 / 100%	3	3	6

4.2 RNA- und Proteinquantifizierung der gewonnenen Proben

Die RNA Proben wurden durch das Nanodrop-Gerät quantifiziert (Methodik s. 3.5.2). Mit einer Elutionsmenge von 35 µl RNase freiem Wasser konnten nach Optimierung der Isolation bei den Hauptversuchstieren Konzentrationen von 23,5 ng/µl bis 67,7 ng/µl erreicht werden. Der Mittelwert liegt bei 45,04 ng/µl. Die für die einzelnen Mesenterialarterien isolierte RNA Menge belief sich damit auf durchschnittlich 1,58 µg (0,82 µg bis 2,77 µg). Die Ratio (E260/E280) lag bei allen RNA Proben zwischen 1,81 und 2,04.

Die für die Proteinuntersuchungen zermörserten Mesenterialarterien wurden in 35 µl RIPA gelöst. Die Proben wurden mit dem BCA Protein Assay Kit vorbereitet und anschließend mit dem BioPhotometers plus® (Eppendorf, Hamburg) quantifiziert (Methodik s. 3.6.3). Dabei ergaben sich Gesamtproteinmengen von durchschnittlich 21,4 µg (16,4 µg bis 29,5 µg).

4.3 Detektion der Zielgene durch die PCR

Nach Umschreiben der gewonnenen mRNA in cDNA durch die RT-PCR (Methodik s. 3.5.3) konnten die zu untersuchenden Zielsequenzen zunächst mit der normalen PCR (Methodik s. 3.5.4) in der Mesenterialarterie detektiert werden. Als Positivkontrolle und zur Optimierung der Primer für die zweiporigen Kaliumkanäle und die Dopaminrezeptoren (D1R und D2R) wurde anfangs murines Cerebellum nicht-septischer Tiere verwendet. Die Funktionsfähigkeit und Spezifität der NO-Synthase-Primer wurde direkt an der RNA der Mesenterialarterie getestet. Die PCR-Produktgröße und damit ihre Laufeigenschaften in der Gelelektrophorese wurde anhand der spezifischen Primersequenzen (siehe Tab. 4) der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) entnommen und die Herstellerangaben so nochmal bestätigt.

Die mRNA der zweiporigen Kaliumkanäle TASK 1, TASK 2, TREK 1 und TWIK 2 sind in der Mesenterialarterie von Kontrolltieren ohne Operation vorhanden (s. Abb. 7). Die Banden erscheinen jeweils in der erwarteten Höhe im Agarosegel. Die mRNA der eNOS ist ebenfalls vorhanden. In dieser PCR nicht darstellbar ist die cDNA der iNOS, welche unter Kontrollbedingungen auch normal nicht exprimiert wird. Es hätte eine Bande in einer Höhe von 450 bp erscheinen können.

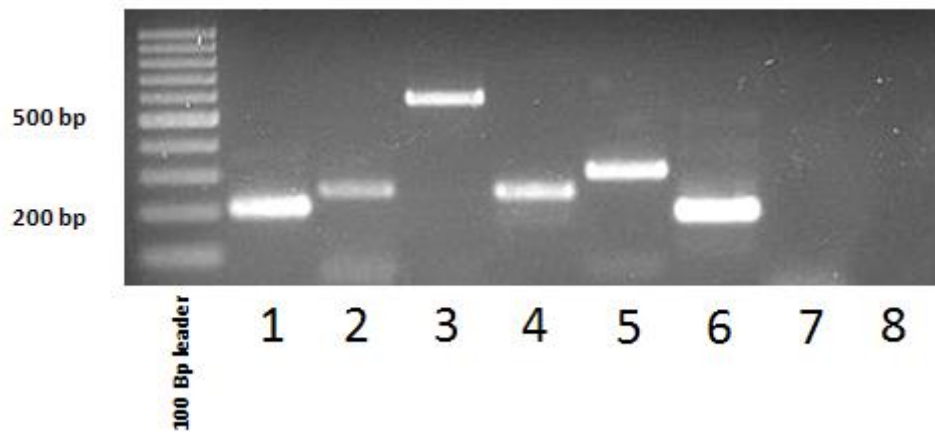


Abb. 7: Gelelektrophorese der PCR-Produkte der *Arteria mesenterica* bei nicht-septischem Tier in 2%igem Agarosegel Links im Bild wurde ein 100 Basenpaar-Größenmarker zum Größenvergleich mitlaufen gelassen. **1** β -Actin liegt bei 206 bp, **2** TASK 1 bei 250 bp, **3** TASK 2 bei 576 bp, **4** TREK 1 bei 247 bp, **5** TWIK 2 bei 306bp und **6** eNOS bei 193 bp. **7** iNOS ist hier nicht darstellbar. Sie würde bei 450 bp liegen. **8** Wasserkontrolle

In Abb. 8 wurden cDNAs verschiedener Tiere eingesetzt. Die eNOS ist zweimal gut darstellbar. Die iNOS erscheint hier bei einem Kontrolltier in der erwarteten Bandenhöhe.

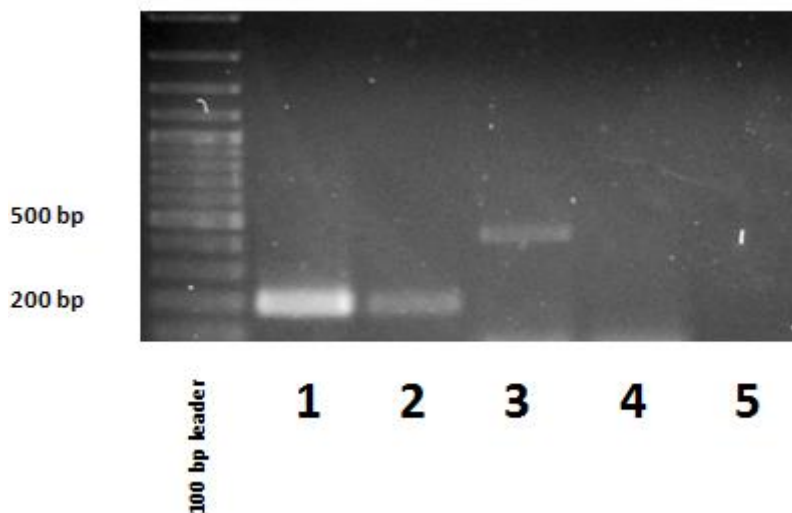


Abb. 8: Gelelektrophorese der PCR-Produkte der *Arteria mesenterica* verschiedener nicht-septischer Tiere in 1,5%igem Agarosegel Links im Bild wurde ein 100 Basenpaar-Größenmarker zum Größenvergleich mitlaufen gelassen. **1&2** eNOS in unterschiedlicher Intensität bei 193 bp **3** iNOS bei nicht-septischen Tier mit einer Bandenhöhe von 450 bp **4** iNOS nicht darstellbar **5** Wasserkontrolle

Die mRNA der D1R und D2R wird in der Mesenterialarterie nicht-septischer Kontrolltiere exprimiert (s. Abb. 9). Hierbei erscheint die Bande für D2R wesentlich schwächer als die für D1R.

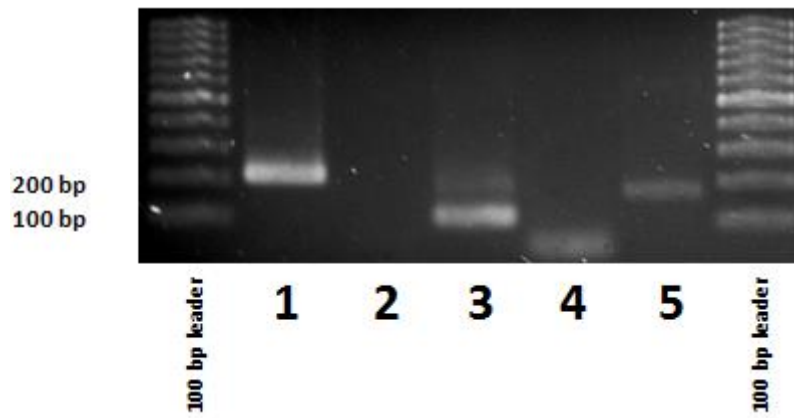


Abb. 9: Gelelektrophorese der PCR-Produkte bei einem nicht-septischer Tiere in 1,5%igem Agarosegel Links und rechts im Bild wurden zum Größenvergleich 100 Basenpaar-Größenmarker mitlaufen gelassen. 1 β -Actin liegt bei 206 bp 2 -RT für D1R 3 D1R erscheint bei 100 bp 4 -Rt für D1R 5 D2R erscheint bei 171 bp

4.4 Quantitative Auswertung mittels Real-Time PCR und Westernblot

Durch die quantitative Real-Time PCR und das Westernblotverfahren (Methodik s. 3.5.5 und 3.6.6) konnte erstmalig der Verlauf der mRNA- und Protein-Expression der in der Mesenterialarterie enthaltenen zweiporigen Kaliumkanäle, der D1R und D2R, sowie der eNOS und iNOS quantitativ gezeigt werden. Zwischen den einzelnen Tagesgruppen gibt es teilweise statistisch signifikante Unterschiede im Ausmaß der mRNA- und Protein-Expression.

4.4.1 Ergebnisse der Untersuchungen zu TASK 1

4.4.1.1 Real-Time PCR Ergebnisse

Im zeitlichen Verlauf kommt es zu Veränderungen der RGE (Berechnung s. Kapitel 3.5.6) zwischen den einzelnen Tagesgruppen bezüglich der mRNA-Expression von TASK 1 (Abb. 10). Ausgehend vom Tag 0 mit einer RGE von $1,03 (\pm 0,27)$ als Bezugswert fällt der Wert in der Gruppe Tag 2 nach CLP auf $0,33 (\pm 0,12)$ und damit auf 32% des Ausgangswertes ab. Er steigt über Tag 5 mit $1,02 (\pm 0,48)$ bis auf $1,36 (\pm 0,87)$ an Tag 8 an. Die RGE liegt somit an Tag 8 über dem Ausgangswert. Die sham-operierte Kontrollgruppe fällt mit einer RGE von $0,4 (\pm 0,2)$ auf einen ähnlich tiefen Wert wie die CLP Gruppe an Tag 2 ab. Signifikante Unterschiede konnten hier nicht aufgezeigt werden und nur tendenzielle Aussagen sind zu treffen.

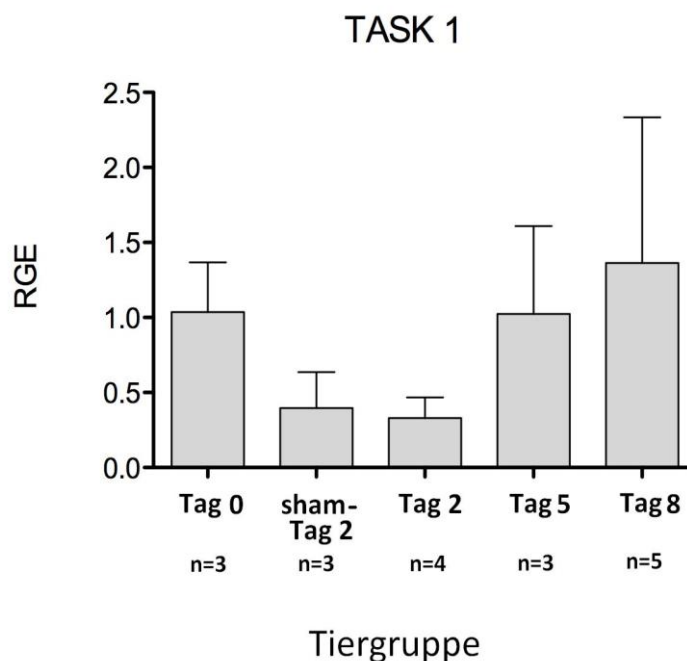


Abb. 10: Ergebnisse der Real-Time PCR-Untersuchungen zu der mRNA-Expression der TASK 1-Kanälen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Tage 0 (n=3), 2 (n=4), 5 (n=3), 8 (n=5) nach CLP und in der Kontrollgruppe (sham Tag 2 (n=3)). Mittelwerte und positive Standardabweichungen der relativen Genexpression (RGE) sind jeweils bezogen auf Tag 0 mit einem Wert von $1,03 (\pm 0,27)$. Die gezeigten Unterschiede sind nicht signifikant.

Tab. 10: Mittelwerte und Standardabweichungen der Real-Time PCR-Untersuchungen zu den TASK 1-Kanälen. Dargestellt sind die Werte der Tage 0, 2, 5, 8 nach CLP und der Kontrollgruppe; $RGE = 2^{-\Delta\Delta CT}$

Tag	Relative Genexpression Mittelwert	Standardabweichung
0	1,03	$\pm 0,27$
sham Tag 2	0,4	$\pm 0,2$
2	0,33	$\pm 0,12$
5	1,02	$\pm 0,48$
8	1,36	$\pm 0,87$

4.4.1.2 Westernblot-Ergebnisse

In allen untersuchten Proben konnte mit den entsprechenden Antikörpern TASK 1 und β -Actin detektiert werden (Methodik s. 3.6.6–3.6.8). Die erzielte Bandenhöhe im Westernblot entsprach dabei den Bereichen der Herstellerangaben für die jeweiligen Primärantikörper und stimmen mit den Ergebnissen von Inoue et al. aus 2008 und Pogorzelska et al. aus 1990 überein (Inoue et al 2008; Pogorzelska et al. 1990) (s. Abb. 11).

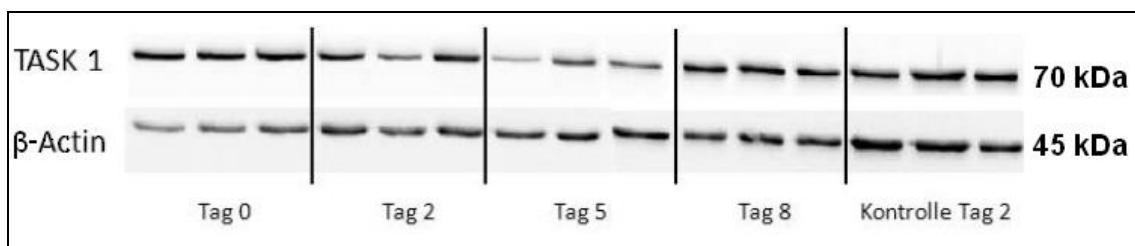


Abb. 11: Westernblot zur Detektion von TASK 1 und β -Actin. Senkrecht untereinander sind jeweils die gleichen Proben eines Tieres an den entsprechenden Tagen nach CLP bzw. nach der sham-Operation am zweiten postoperativen Tag dargestellt. In der oberen Reihe ist die Antikörperkombination für TASK 1 und in der unteren die Kombination für β -Actin verwendet worden. Pro Versuchstag standen je 3 Einzelproben ($n=3$) zur Verfügung. TASK 1 liegt bei 70 kDa und β -Actin bei 45 kDa.

Mit dem Programm „Image J“ wurden die Westernblotgele densitometrisch ausgewertet (Methodik s. 3.6.9). Ausgehend von dem Verhältnis von 0,86 ($\pm 0,15$) zwischen TASK 1 und β -Actin am Tag 0 nach CLP fällt der Wert und damit die Proteinexpression am Tag 2 auf 0,41 ($\pm 0,09$) bis schließlich zu seinem tiefsten Punkt am Tag 5 nach CLP von 0,25 ($\pm 0,08$). Die Expression Tag 2 nach CLP sinkt auf 48% und die nach der sham-Operation auf 52% des Ausgangswertes ab. Von Tag 0 auf Tag 5 besteht ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). Hier ist die RGE um 71% reduziert. Am achten Tag nach CLP kommt es wieder zu einem leichten Anstieg auf 0,49 ($\pm 0,03$). Der Ausgangswert vom Tag 0 wird aber nicht mehr erreicht. Die Kontrollgruppe des Tages 2 liegt bei 0,45 ($\pm 0,12$) und somit sehr nahe an dem Verhältnis des Tages 2 post CLP.

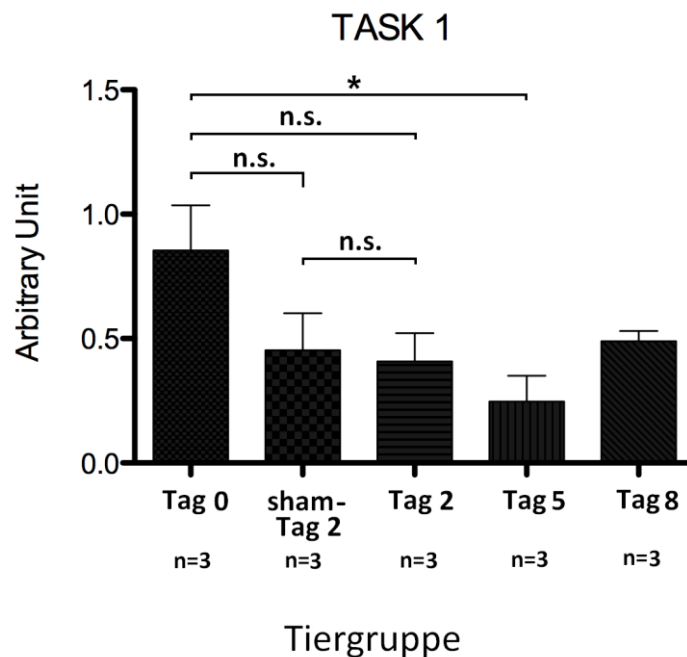


Abb. 12: Ergebnisse der Westernblot-Untersuchungen zu der Proteinexpression der TASK 1-Kanäle. Dargestellt sind die Mittelwerte und positive Standardabweichungen der Verhältnisse der einzelnen TASK 1-Werte zu ihren jeweiligen β -Actin-Werten desselben Tieres an den Tagen 0, 2, 5, 8 nach CLP und in der Kontrollgruppe (sham Tag 2). Jede Gruppe bestand aus 3 Tieren ($n=3$). Gruppe Tag 5 weicht signifikant von Tag 0 ab ($p < 0,05$), wohingegen die Unterschiede zwischen den Tagen 0, 2 und Tag 2 nach sham-Operation nicht statistisch signifikant sind.

Tab. 11: Durch densitometrische Messung ermittelte Werte für TASK 1 mit dem Programm „Image J“. (Beschreibung s. 3.6.9). Die Einzelwerte der jeweiligen Messung zu TASK 1 wurden zu den entsprechenden Einzelwerten von β -Actin desselben Tieres ins Verhältnis gesetzt (TASK1 / β -Actin). Aus jeder Gruppe mit n=3 wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung errechnet.

Tag	Mittelwerte	Standardabweichung
0	0,86	0,15
sham Tag 2	0,45	0,12
2	0,41	0,09
5	0,25	0,08
8	0,49	0,03

4.4.2 Ergebnisse der Untersuchungen zu TASK 2

4.4.2.1 Real-Time PCR-Ergebnisse

Im Versuchsverlauf kommt es zu Veränderungen der RGE zwischen den einzelnen Tagesgruppen bezüglich der mRNA-Expression von TASK 2 (s. Abb. 13). Ausgehend vom Tag 0 mit einer RGE von 1,17 ($\pm 0,67$) als Bezugswert fällt der Wert in der Gruppe Tag 2 nach CLP um 82% auf 0,21 ($\pm 0,07$) ab. Von Tag 2 auf Tag 5 steigt er nur leicht auf 0,27 ($\pm 0,01$). Erst am achten Tag nach CLP erreicht die RGE mit 1,82 ($\pm 0,68$) ihren Höchstwert. Dieser liegt statistisch signifikant ($p < 0,05$) über dem Wert am Tag 2 und auch wieder über dem Ausgangswert. Die sham-operierte Kontrollgruppe erreicht eine RGE von 0,5 ($\pm 0,18$) und liegt so zwischen Tag 0 und Tag 2 post CLP.

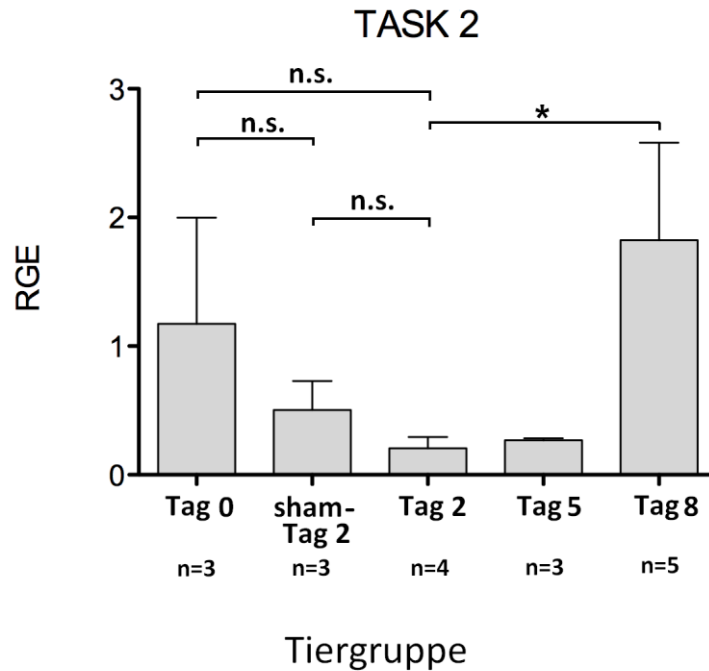


Abb. 13: Ergebnisse der Real-Time PCR-Untersuchungen zu der mRNA-Expression der TASK 2-Kanäle. Dargestellt sind die Werte der Tage 0 (n=3), 2 (n=4), 5 (n=3), 8 (n=5) nach CLP und in der Kontrollgruppe (sham Tag 2 (n=3)). Mittelwerte und positive Standardabweichungen der RGE sind jeweils bezogen auf Tag 0 mit einem Wert von 1,17 ($\pm 0,67$). Die Gruppe Tag 2 weicht signifikant von Gruppe Tag 8 ab ($p < 0,05$), wohingegen die Unterschiede zwischen den Tagen 0, 2 und Tag 2 nach sham-Operation nicht statistisch signifikant sind.

Tab. 12: Mittelwerte und Standardabweichungen der Real-Time PCR-Untersuchungen zu den TASK 2-Kanälen. Dargestellt sind die Werte der Tage 0, 2, 5, 8 nach CLP und der Kontrollgruppe; $RGE = 2^{-\Delta\Delta CT}$

Tag	Relative Genexpression Mittelwert	Standardabweichung
0	1,17	$\pm 0,67$
sham Tag 2	0,5	$\pm 0,18$
2	0,21	$\pm 0,07$
5	0,27	$\pm 0,01$
8	1,82	$\pm 0,68$

4.4.3 Ergebnisse der Untersuchungen zu TREK 1

4.4.3.1 Real-Time PCR-Ergebnisse

Die mRNA-Expression von TREK 1 (s. Abb. 14) fällt ausgehend vom Tag 0 mit einer RGE von 1,02 ($\pm 0,22$) als Bezugswert in der Gruppe Tag 2 nach CLP gleich auf den Tiefstwert von 0,35 ($\pm 0,12$), 34% des Ausgangswertes, ab. An Tag 5 steigt die RGE auf 1,44 ($\pm 0,59$) und sinkt anschließend wieder leicht an Tag 8 auf 1,33 ($\pm 0,36$). Die RGE liegt somit an Tag 5 und 8 über dem Ausgangswert. Von Tag 2 auf Tag 8 kommt es zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,05$). Die sham-operierte Kontrollgruppe an Tag 2 bleibt weitgehend unverändert gegenüber dem Ausgangswert. Tendenziell kommt es somit zu einer deutlichen Abnahme der Expression von TREK 1 lediglich am Tag 2 nach CLP.

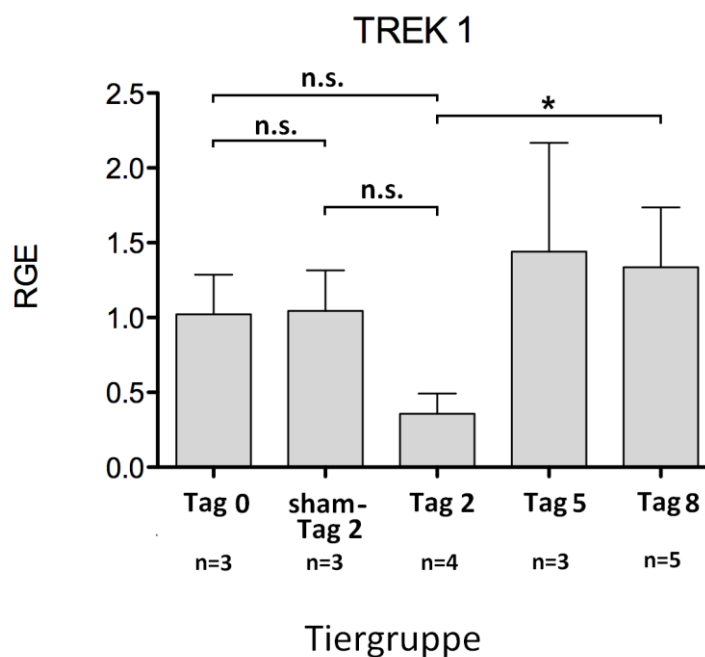


Abb. 14: Ergebnisse der Real-Time-PCR-Untersuchungen zu der mRNA-Expression der TREK 1-Kanälen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Tage 0 (n=3), 2 (n=4), 5 (n=3), 8 (n=5) nach CLP und in der Kontrollgruppe (sham Tag 2 (n=3)). Mittelwerte und positive Standardabweichungen der RGE sind jeweils bezogen auf Tag 0 mit einem Wert von 1,02 ($\pm 0,22$). Die Gruppe Tag 2 weicht signifikant von Gruppe Tag 8 ab ($p < 0,05$), wohingegen die Unterschiede zwischen den Tagen 0, 2 und Tag 2 nach sham-Operation nicht statistisch signifikant sind.

Tab. 13: Mittelwerte und Standardabweichungen der Real-Time-PCR-Untersuchungen zu den TREK 1-Kanälen. Dargestellt sind die Werte der Tage 0, 2, 5, 8 nach CLP und der Kontrollgruppe; $RGE = 2^{-\Delta\Delta CT}$

Tag	Relative Genexpression Mittelwert	Standardabweichung
0	1,02	$\pm 0,22$
sham Tag 2	1,05	$\pm 0,22$
2	0,35	$\pm 0,12$
5	1,44	$\pm 0,59$
8	1,33	$\pm 0,36$

4.4.3.2 Westernblot-Ergebnisse

In allen untersuchten Proben konnte mit den entsprechenden Antikörpern TREK 1 und β -Actin detektiert werden (Methodik siehe 3.6.6–3.6.8). Die erzielte Bandenhöhe im Westernblot entsprach dabei den Bereichen der Herstellerangaben für die jeweiligen Primärantikörper und stimmt bezüglich β -Actin mit den Ergebnissen von Pogorzelska et al. aus 1990 überein (Pogorzelska et al. 1990) (Abb. 15).

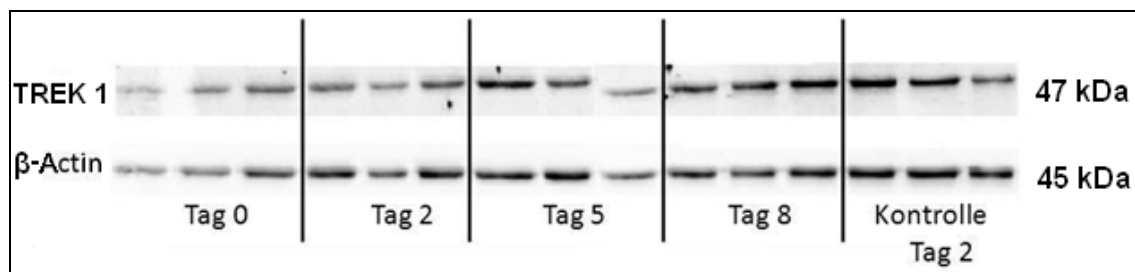


Abb. 15: Westernblot zur Detektion von TREK 1 und β -Actin. Senkrecht untereinander sind jeweils die gleichen Proben eines Tieres an den entsprechenden Tagen nach CLP bzw. nach der sham-Operation am zweiten postoperativen Tag dargestellt. Die jeweiligen Antikörperkombinationen für TREK 1 und β -Actin sind Kapitel 3.6.7 zu entnehmen. Pro Versuchstag standen je 3 Einzelproben ($n=3$) zur Verfügung. TREK 1 liegt bei 47 kDa und β -Actin bei 45 kDa.

Mit dem Programm „Image J“ wurden die Westernblots densitometrisch ausgewertet (Methodik siehe 3.6.9). Ausgehend von dem Verhältnis von 1,42 ($\pm 0,68$) zwischen TREK 1 und β -Actin am Tag 0 nach CLP steigt das Verhältnis und damit die Proteinexpression von TREK 1 leicht am Tag 2 auf 1,54 ($\pm 0,15$) an. Es steigt am Tag 5 bis auf den Höchstwert von 2,02 ($\pm 0,69$). An Tag 8 post CLP liegt der Wert noch bei

2,0 ($\pm 0,19$). Die Kontrollgruppe des Tages 2 liegt bei 1,62 ($\pm 0,43$) und somit nahe an dem Verhältnis von TREK 1 zu β -Actin des Tages 2 post CLP. Statistische Signifikanzen konnten zwischen den Gruppen nicht gezeigt werden. Bei TREK 1 kommt es somit nur zu einem tendenziellen Anstieg der Proteinkonzentration von Tag 0 zu bis zu Tag 5, welche sich bis Tag 8 hält (s. Abb. 16).

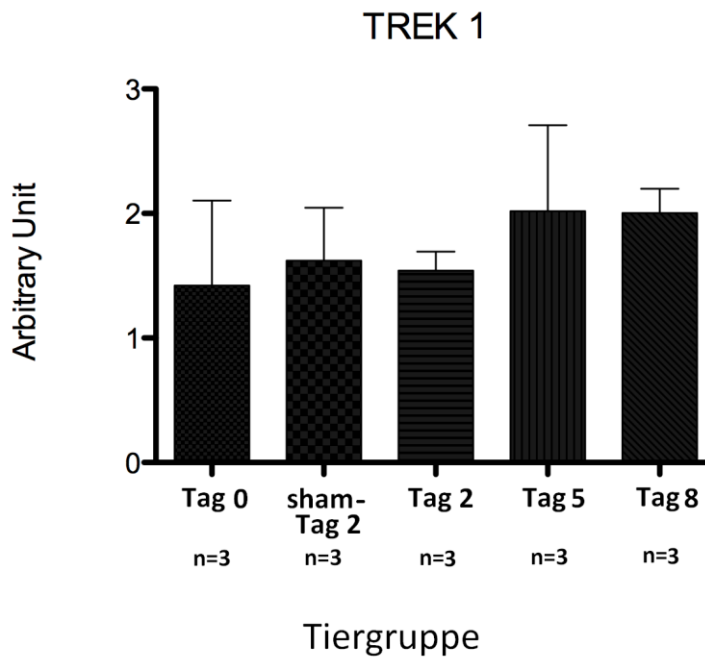


Abb. 16: Ergebnisse der Westernblot-Untersuchungen zu den TREK 1-Kanälen.. Dargestellt sind die Mittelwerte und positive Standardabweichungen der Verhältnisse der einzelnen TREK 1-Werte zu ihren jeweiligen β -Actin-Werten desselben Tieres an den Tagen 0, 2, 5, 8 nach CLP und in der Kontrollgruppe (sham Tag 2). Jede Gruppe bestand aus 3 Tieren (n=3). Signifikante Unterschiede konnten nicht gezeigt werden.

Tab. 14: Durch densitometrische Messung ermittelte Werte für TREK 1 mit dem Programm „Image J“. (Beschreibung siehe 3.6.9). Die Mittelwerte der jeweiligen Tagesgruppeneinzelwerte zu TREK 1 wurden zu den Mittelwerten von β -Actin ins Verhältnis gesetzt (TREK 1/ β -Actin)

Tag	Mittelwerte	Standardabweichung
0	1,42	0,68
sham Tag 2	1,62	0,43
2	1,54	0,15
5	2,02	0,69
8	2,00	0,19

4.4.4 Ergebnisse der Untersuchungen zu TWIK 2

4.4.4.1 Real-Time PCR-Ergebnisse

Die mRNA-Expression von TWIK 2 (s. Abb. 17) fällt ausgehend vom Tag 0 mit einer RGE von $1,02 (\pm 0,22)$ als Bezugswert minimal in der Gruppe Tag 2 nach CLP auf $0,99 (\pm 0,24)$ ab. Von Tag 2 aus steigt die RGE dann über Tag 5 mit $1,19 (\pm 0,59)$ bis zu $1,41 (\pm 0,49)$ an Tag 8 an. Die sham-operierte Kontrollgruppe an Tag 2 liegt mit $1,4 (\pm 0,26)$ über dem Bezugswert an Tag 0 und dem der Gruppe Tag 2 post CLP. Ein tendenzieller Anstieg der RGE von Tag 2 bis Tag 8 post CLP ist zu erkennen.

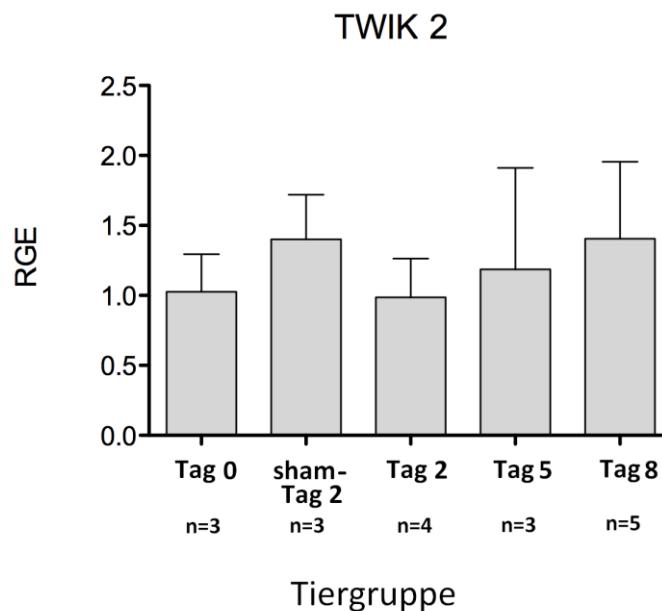


Abb. 17: Ergebnisse der Real-Time PCR-Untersuchungen zu der mRNA-Expression der TWIK 2-Kanäle. Dargestellt sind die Werte der Tage 0 (n=3), 2 (n=4), 5 (n=3), 8 (n=5) nach CLP und in der Kontrollgruppe (sham Tag 2(n=3)). Mittelwerte und positive Standardabweichungen der RGE sind jeweils bezogen auf Tag 0 mit einem Wert von $1,02 (\pm 0,22)$. Signifikante Unterschiede konnten nicht gezeigt werden.

Tab. 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der Real-Time PCR-Untersuchungen zu den TWIK 2-Kanälen. Dargestellt sind die Werte der Tage 0, 2, 5, 8 nach CLP und der Kontrollgruppe; $RGE = 2^{-\Delta\Delta CT}$

Tag	Relative Genexpression Mittelwert	Standardabweichung
0	1,02	$\pm 0,22$
sham Tag 2	1,4	$\pm 0,26$
2	0,99	$\pm 0,24$
5	1,19	$\pm 0,59$
8	1,41	$\pm 0,49$

4.4.5 Ergebnisse der Untersuchungen zur eNOS

Real-Time PCR-Ergebnisse

Der Bezugswert der mRNA-Expression der eNOS am Tag 0 nach CLP liegt bei einer RGE von 1,02 ($\pm 0,17$) (s. Abb. 18). Von hier aus fällt der Wert statistisch sehr signifikant ($p < 0,01$) in der Gruppe Tag 2 nach CLP um 79% auf 0,21 ($\pm 0,04$) ab. Ab Tag 2 steigt die RGE dann über Tag 5 mit 0,32 ($\pm 0,13$) bis zu 0,4 ($\pm 0,05$) an Tag 8 an. Die sham-operierte Kontrollgruppe an Tag 2 liegt mit 0,39 ($\pm 0,11$) deutlich, aber nicht signifikant, unter dem Bezugswert an Tag 0, aber noch über dem der Gruppe Tag 2 post CLP. Ein tendenzieller Anstieg der RGE von Tag 2 bis Tag 8 post CLP ist zu erkennen, wobei der Ausgangswert von Tag 0 nicht wieder erreicht wird.

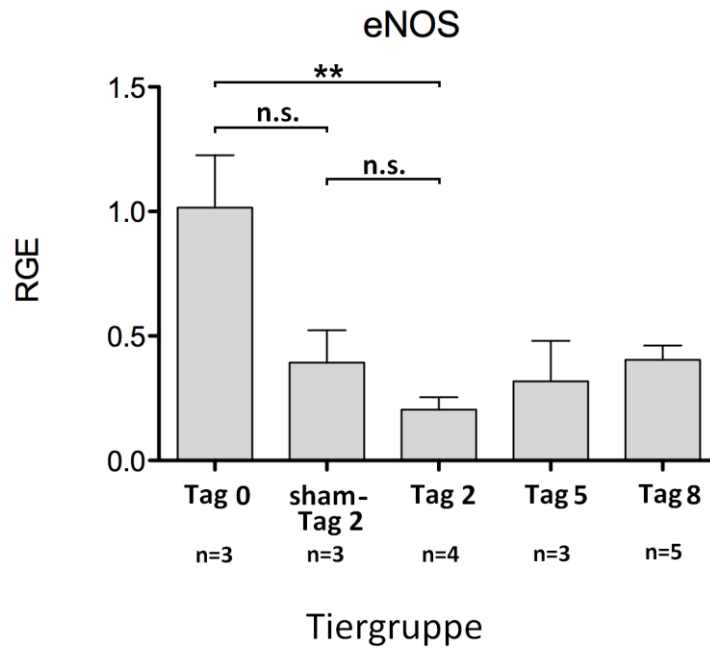


Abb. 18: Ergebnisse der Real-Time-PCR-Untersuchungen zu der mRNA-Expression der eNOS Dargestellt sind die Werte der Tage 0 (n=3), 2 (n=4), 5 (n=3), 8 (n=5) nach CLP und in der Kontrollgruppe (sham Tag 2(n=3)). Mittelwerte und positive Standardabweichungen der RGE sind jeweils bezogen auf Tag 0 mit einem Wert von 1,02 ($\pm 0,17$). Gruppe Tag 2 weicht sehr signifikant ($p < 0,01$) von Gruppe Tag 0 ab. Weitere signifikante Unterschiede konnten nicht gezeigt werden.

Tab. 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der Real-Time-PCR-Untersuchungen zu der eNOS. Dargestellt sind die Werte der Tage 0, 2, 5, 8 nach CLP und der Kontrollgruppe; $RGE = 2^{-\Delta\Delta CT}$

Tag	Relative Genexpression Mittelwert	Standardabweichung
0	1,02	$\pm 0,17$
sham Tag 2	0,39	$\pm 0,11$
2	0,21	$\pm 0,04$
5	0,32	$\pm 0,13$
8	0,4	$\pm 0,05$

4.4.6 Ergebnisse der Untersuchungen zur iNOS

Real-Time PCR Ergebnisse

Die iNOS unterliegt ebenfalls Variationen im Ausmaß ihrer mRNA-Expression im Verlauf des Versuches (s. Abb. 19). Ausgehend vom Tag 0 mit einer RGE von 1,02 ($\pm 0,17$) als Bezugswert steigt der Wert in der Gruppe Tag 2 nach CLP um 99% auf 2,09 ($\pm 0,74$) an. Von Tag 2 an sinkt die RGE auf fast gleiche Werte an Tag 5 mit 1,58 ($\pm 1,53$) und Tag 8 mit 1,57 ($\pm 0,92$) ab. Die sham-operierte Kontrollgruppe an Tag 2 liegt mit 0,34 ($\pm 0,15$) 67% unter dem Bezugswert an Tag 0 und noch weiter unter dem der Gruppe Tag 2 post CLP. Signifikante Unterschiede konnten nicht gezeigt werden.

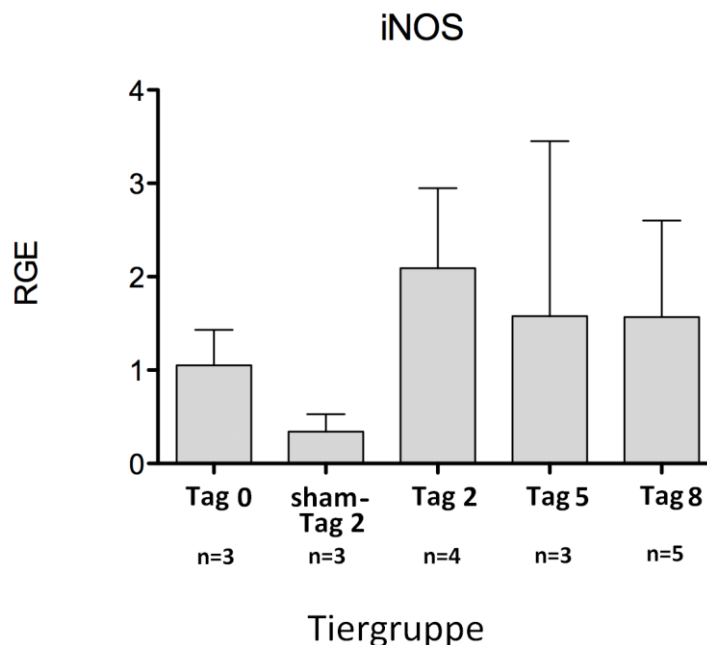


Abb. 19: Ergebnisse der Real-Time PCR-Untersuchungen zu der mRNA-Expression der iNOS. Dargestellt sind die Werte der Tage 0 (n=3), 2 (n=4), 5 (n=3), 8 (n=5) nach CLP und in der Kontrollgruppe (sham Tag 2 (n=3)). Mittelwerte und positive Standardabweichungen der RGE sind jeweils bezogen auf Tag 0 mit einem Wert von 1,05 ($\pm 0,31$). Die Unterschiede sind nicht signifikant.

Tab. 17: Mittelwerte und Standardabweichungen der Real-Time PCR-Untersuchungen zu der iNOS. Dargestellt sind die Werte der Tage 0, 2, 5, 8 nach CLP und der Kontrollgruppe; $RGE = 2^{(-\Delta\Delta CT)}$

Tag	Relative Genexpression Mittelwert	Standardabweichung
0	1,05	$\pm 0,31$
sham Tag 2	0,34	$\pm 0,15$
2	2,09	$\pm 0,74$
5	1,58	$\pm 1,53$
8	1,57	$\pm 0,92$

4.4.7 Ergebnisse der Untersuchungen zum Dopamin-D1-Rezeptor

Real-Time PCR-Ergebnisse

Die mRNA-Expression des D1R (s. Abb. 20) fällt ausgehend vom Tag 0 mit einer RGE von 1,07 ($\pm 0,43$) als Bezugswert auf 0,51 ($\pm 0,36$) in der Gruppe Tag 2 nach CLP und weiter, um insgesamt 92%, an Tag 5 statistisch signifikant ($p < 0,05$) auf den Tiefstwert von 0,09 ($\pm 0,01$) ab. Von da an steigt die RGE wieder auf den Wert 0,83 ($\pm 0,47$) an Tag 8, aber liegt damit noch unterhalb des Ausgangswertes. Die sham-operierte Kontrollgruppe an Tag 2 ist mit 0,14 ($\pm 0,03$) deutlich unter dem Bezugswert an Tag 0 und auch unter dem der Gruppe Tag 2 post CLP.

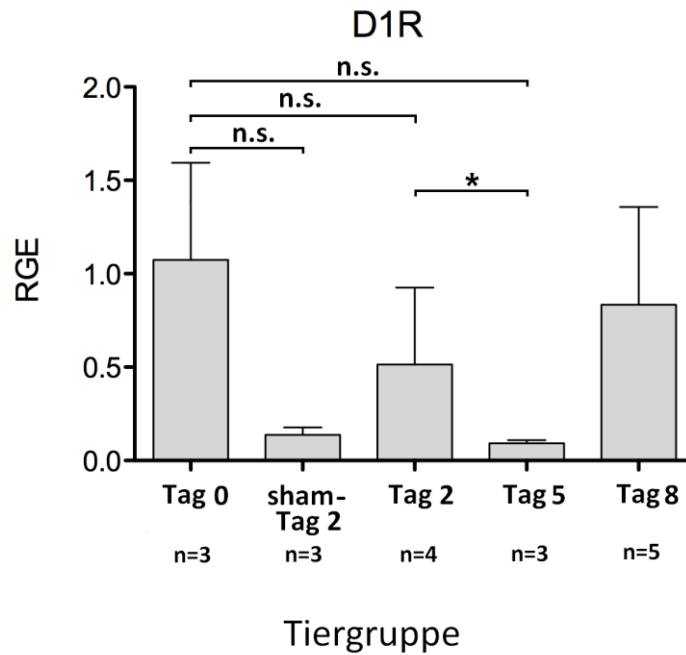


Abb. 20: Ergebnisse der Real-Time PCR-Untersuchungen zu der mRNA-Expression des D1R. Dargestellt sind die Werte der Tage 0 (n=3), 2 (n=4), 5 (n=3), 8 (n=5) nach CLP und in der Kontrollgruppe (sham Tag 2 (n=3)). Mittelwerte und die positive Standardabweichungen der RGE sind jeweils bezogen auf Tag 0 mit einem Wert von 1,07 ($\pm 0,43$). Gruppe Tag 5 weicht signifikant ($p \leq 0,05$) von Gruppe Tag 0 ab. Weitere signifikante Unterschiede konnten nicht gezeigt werden.

Tab. 18: Mittelwerte und Standardabweichungen der Real-Time PCR-Untersuchungen zum D1R. Dargestellt sind die Werte der Tage 0, 2, 5, 8 nach CLP und der Kontrollgruppe; $RGE = 2^{-\Delta\Delta CT}$

Tag	Relative Genexpression Mittelwert	Standardabweichung
0	1,07	$\pm 0,43$
sham Tag 2	0,14	$\pm 0,03$
2	0,51	$\pm 0,36$
5	0,09	$\pm 0,01$
8	0,83	$\pm 0,47$

4.4.8 Ergebnisse der Untersuchungen zum Dopamin-D2-Rezeptor

Real-Time PCR-Ergebnisse

Im Verlauf der Sepsis kommt es zu Veränderungen der RGE zwischen den einzelnen Tagesgruppen bezüglich der mRNA-Expression des D2R (s. Abb. 21). Ausgehend vom Tag 0 mit einer RGE von 1,02 ($\pm 0,18$) als Bezugswert steigt der Wert in der Gruppe Tag 2 nach CLP um 205% auf den Höchstwert von 3,11 ($\pm 0,94$) an. Von Tag 2 an fällt die RGE bis Tag 5 auf 2,03 ($\pm 0,94$). An Tag 8 liegt der Wert mit 0,95 ($\pm 0,06$) wieder geringfügig unterhalb des Ausgangswertes. Die sham-operierte Kontrollgruppe an Tag 2 liegt mit 0,75 ($\pm 0,1$) etwas unter dem Bezugswert an Tag 0 und statistisch signifikant ($p < 0,05$) unter dem der Gruppe Tag 2 post CLP. Weitere Signifikanzen haben sich nicht gezeigt.

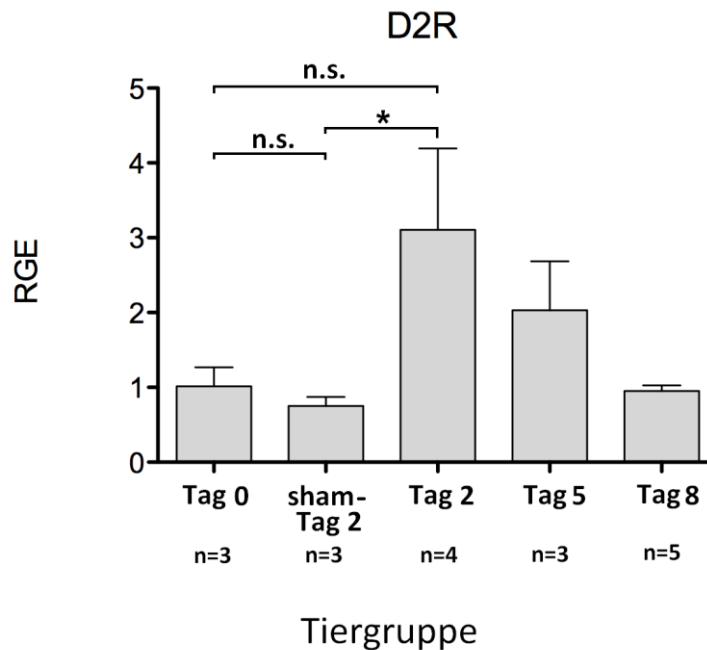


Abb. 21: Ergebnisse der Real-Time PCR-Untersuchungen zu der mRNA-Expression des D2R. Dargestellt sind die Werte der Tage 0 (n=2), 2 (n=4), 5 (n=3), 8 (n=4) nach CLP und in der Kontrollgruppe (sham Tag 2(n=3)). Mittelwerte und die positive Standardabweichungen der RGE sind jeweils bezogen auf Tag 0 mit einem Wert von 1,02 ($\pm 0,18$). Gruppe sham Tag 2 weicht signifikant ($p < 0,05$) von Gruppe Tag 2 ab.

Tab. 19: Mittelwerte und Standardabweichungen der Real-Time PCR-Untersuchungen zum D2R. Dargestellt sind die Werte der Tage 0, 2, 5, 8 nach CLP und der Kontrollgruppe; $RGE = 2^{-\Delta\Delta CT}$

Tag	Relative Genexpression Mittelwert	Standardabweichung
0	1,02	$\pm 0,18$
sham Tag 2	0,75	$\pm 0,1$
2	3,11	$\pm 0,94$
5	2,03	$\pm 0,46$
8	0,95	$\pm 0,06$

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methode

Das zugrunde liegende Versuchsdesign ist nicht explizit für die Fragestellungen dieser Studie ausgelegt. Die murinen Proben wurden einer anderen tierexperimentellen Multizenterstudie entnommen und in dieser Arbeit verwendet.

5.1.1 Repräsentativität nur für überlebende Tiere

Methodisch war es nur möglich, diejenigen Tiere in die Auswertung einzubeziehen, die die CLP-Operation und die anschließenden postoperativen Tage bis zur geplanten Euthanasie überlebt haben. Die gewonnenen Daten beziehen sich somit ausschließlich auf Tiere, die die induzierte Sepsis, den septischen Schock und / oder ein daraus resultierendes Multiorganversagen ohne medizinische Therapie, mit Ausnahme postoperativer Schmerztherapie mit Buprenorphin, überstanden haben. Die zu untersuchenden Materialien machten eine Euthanasie der Tiere unabdingbar, sodass es sich bei den gewonnenen Daten um eine Endpunktbestimmung für das jeweilige Tier handelt und keine Aussage über den vorherigen, individuellen Verlauf bezüglich der untersuchten Parameter bis zur Auswertung getroffen werden kann.

5.1.2 Zeitlicher Verlauf der Probenentnahme

Durch das Versuchsdesign waren die Zeiten für die Auswertung in den jeweiligen Gruppen strikt vorgegeben, sodass die Tiere an den Tagen 0, 2, 5 und 8 post CLP-Operation immer zur gleichen Tageszeit euthanasiert wurden. Gerade die ersten 24 bis 48 Stunden nach Sepsisinduktion sind aber für hämodynamische und immunologische Studien sehr interessant, da die vermutlich sepsisinduzierten Veränderungen der Hämodynamik in diesem Zeitfenster sehr gravierend sind (Rudyk et al. 2013; Villa et al. 1995; Cotroneo et al. 2012). Vor allem die inflammatorischen Mediatoren wie TNF- α und Interleukine können in den ersten 48 Stunden nach Sepsisinduktion bereits wieder zu ihren Ursprungswerten zurückkehren (Rabuel und Mebazaa 2006), wenn die Tiere die initiale inflammatorische Phase überstanden haben. Die interessantesten Ergebnisse, auch in dieser Arbeit, zeigen sich zwischen Tag 0 und Tag 2 post CLP, wobei jedoch

nur die Werte dieser beiden Zeitpunkte beurteilt werden können. Veränderungen der Expression auf RNA- und Proteinebene im Verlauf der ersten beiden Tage post CLP können mit diesem Versuchsdesign nicht erhoben werden. Die großen Zeitintervalle zwischen den einzelnen Gruppen und der lange Zeitabstand zwischen Tag 0 und der ersten folgenden Gruppe an Tag 2 post CLP sind somit nicht optimal für Beobachtungen der Reaktion des Organismus auf hämodynamische Veränderungen, die während der relevanten Phase der Sepsisentstehung auftreten, geeignet. Aussagen zu einer dauerhaften Expressionsänderung können auf Grund der Limitierung des Experimentes bis Tag 8 getroffen werden.

5.1.3 Sepsisinduktion durch die CLP-Methode

Die Sepsisinduktion im Tiermodell kann durch drei verschiedene Strategien ausgelöst werden, die an unterschiedlichen Ebenen der klinischen Sepsisentstehung ansetzen. So können entweder direkt Toxine, z.B. LPS, oder aber verschiedene Pathogene, wie Bakterien oder Viren, dem Versuchstier verabreicht werden. Die hier verwendete CLP-Operation zählt als dritte Strategie neben der etwas jüngeren, aber schwieriger durchzuführenden, colon ascendens stent peritonitis (CASP), in der nach Laparotomie ein Stent im Colon ascendens gesetzt wird, zu den Methoden, in denen durch eine Operation die endogene, intestinale Barriere der Tiere gestört und so eine polymikrobielle Sepsis ausgelöst wird. SIRS- und sepsisauslösend ist dabei die Kombination aus chirurgischem Trauma durch die Laparotomie, die Nekrose durch die Ligation des Caecums und die Infektion durch den Übertritt der polymikrobiellen Flora aus dem Darm ins Peritoneum (Dejager et al. 2011). Die CLP-Methode kommt dabei der Sepsisentstehung und -progression abdominalen Ursprungs im Menschen sehr nahe (Wichterman et al. 1980), da nacheinander die vorher genannten Schritte des Traumas, der Bakteriämie und der anschließenden Freisetzung von pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), wie LPS, im Organismus stattfinden. Eine die Sepsis kennzeichnende hohe Mortalität (Vincent et al. 2006) spiegelt sich auch in bei den nach CLP-Methode operierten Versuchstieren wieder (siehe 4.1, Tab. 9). Die Kombination dieser oft auch schon im Einzelnen zu einem SIRS oder einer Sepsis führenden Ereignisse macht eine Zuordnung der in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen bezüglich des Expressionsverhalten der zweiporigen Kaliumkanäle und

Dopaminrezeptoren zu einem bestimmten auslösenden Ereignis schwierig und können nicht allein auf eine der Sepsis zu Grunde liegenden Infektion zurückgeführt werden. Refsum et al. haben 1996 unter anderem gezeigt, dass bei der CLP- und der entsprechenden sham-Operation bei Ratten die Konzentration von TNF- α im Blut nach 24 Stunden post OP stark erhöht ist, wenngleich auch der Anstieg in der CLP-Gruppe höher ist. Interleukin 6 ist 6 Stunden postoperativ in beiden Gruppen ähnlich stark erhöht, sinkt nach 18 Stunden fast wieder auf den Ausgangswert und steigt anschließend nur in der CLP-Gruppe wieder stark an. Der Blutdruck sinkt nach 24 Stunden postoperativ stark in der CLP-Gruppe und gering in sham-Gruppe ab (Refsum et al. 1996). Der weitere Verlauf der Parameter wurde in dieser Studie nicht beschrieben. Es lässt sich daraus ableiten, dass, zumindest bezogen auf die ersten postoperativen 24 Stunden, es auch in der sham-operierten Gruppe durch das chirurgische Trauma zu einer, wenn auch geringeren, hämodynamischen und immunologischen Reaktionen bezüglich der Freisetzung von TNF- α und Interleukin 6 kommt. Dies könnte eine Erklärung für die beobachteten Expressionsveränderungen bezüglich der zweiporigen Kaliumkanäle und Dopaminrezeptoren in der sham-operierten Kontrollgruppe an Tag 2 sein. Das der Infektion infolge Darmpunktion vorhergehende chirurgische Trauma der Operation kann so als additiver Effekt bezüglich der insgesamt ausgelösten Immunantwort in den CLP-Gruppen angesehen werden. Insbesondere die Expressionsveränderungen an Tag 2 dürfen nicht allein einer Infektion zugeschrieben werden.

5.1.4 Geringe Individuenzahl pro Versuchsgruppe

In der statistischen Auswertung der gewonnenen Werte konnten weniger Signifikanzen aufgezeigt werden als erwartet. Als Hauptgrund hierfür ist die geringe Anzahl der Individuen in den einzelnen Gruppen zu nennen und weniger eine mangelnde Differenz der gemessenen Parameter. Bei der Festlegung der Anzahl der zu operierenden Tiere wurde sich nicht an der dieser Arbeit zugrunde liegenden Fragestellungen orientiert. Das Versuchsdesign ist für eine andere tierexperimentelle Studie entworfen worden, aus der die hier verwendeten Mesenterien und umgebenden Darmabschnitte lediglich entnommen wurden.

Bei einer geplanten Letalität der Tiere von 25% nach der CLP-Operation bis zum 8. postoperativen Tag hätten bei je einer ursprünglichen Gruppengröße von 10 (bzw. 15 für Tag 8) Tieren 7 bis 8 (bzw. 11 bis 12) für die Auswertung zur Verfügung gestanden. Methodisch ist es nicht gelungen, aus einem Mesenterialarteriengeflecht gleichzeitig RNA und Proteine zu extrahieren. Vor allem die RNA-Qualität war bei gleichzeitiger Proteinextraktion nicht hoch genug, um die selbstgewählten Mindestanforderungen bezüglich Menge und Reinheit zu erreichen. Die Tiere mussten also direkt nach der Euthanasie definitiv entweder der RNA- oder der Proteingruppe zugeordnet werden. Für das semiquantitative Verfahren der densitometrischen Auswertung der Westernblots waren je Gruppe 3 Individuen geplant, sodass für die RNA-Untersuchungen immer 4 bis 5 Tiere übrig geblieben wären. Die geplante Letalität wurde immer leicht überschritten und es entstanden so noch kleinere Gruppengrößen (s. Tab. 9). Ein weiterer Grund für die erhöhte Sterblichkeit der operierten Tiere kann in der Verwendung von Buprenorphin zur postoperativen Analgesie liegen. Cotroneo et al. haben 2012 gezeigt, dass es zu einer erhöhten Sterblichkeit nach der CLP-Methode operierter, männlichen Mäuse kommt, wenn sie Buprenorphin anstatt einfacher Salzlösung ohne Analgetikum bekommen haben (Cotroneo et al. 2012). Zur Zeit der Versuchsplanung lagen diese Erkenntnisse noch nicht vor.

Die Differenz zwischen der Zahl der euthanasierten und der Zahl der ausgewerteten Tiere (s. Tab. 9) ergab sich durch Komplikationen bei der Feinpräparation unter dem Mikroskop, sowie der Protein- oder RNA-Isolierung. Aufgrund von Verwachsungen oder schwierigen anatomischen Verhältnissen in der Splanchnikusregion nach der CLP-Operation konnte eine exakte und fettfreie Präparation teilweise nicht durchgeführt werden. Das Gewicht der präparierten Mesenterialarterien durfte außerdem eine Mindestmenge von 4 mg nicht unterschreiten, um ausreichend RNA oder Proteine für die Auswertung zu erhalten. Bei der Proteinisolierung waren Werte um 4 mg jedoch auch schon problematisch und konnten teilweise nicht mehr verwendet werden. Durch diese Anforderungen wurde die Anzahl der Proben je Gruppen nochmals dezimiert.

5.2 Herleitung der Fragestellung

5.2.1 Zweiporige Kaliumkanäle

Trotz intensiver Bemühungen in den letzten Jahrzehnten stellen die Sepsis und der septische Schock noch immer eine große Herausforderung in der modernen Intensivmedizin dar. Mortalitäten zwischen 27% bei Intensivpatienten in der Sepsis und 54,1% bei Intensivpatienten im septischen Schock machen den großen, weiterhin bestehenden Forschungsbedarf deutlich (Vincent et al. 2006).

Inhomogene Veränderungen der Makro- und Mikrozirkulation sind verantwortlich für das in der Sepsis auftretende Multiorganversagen (Matsuda und Hattori 2007; Rabuel und Mebazaa 2006), wobei es in der Mesenterialarterie zu einer verminderten Perfusion kommt. (Lehr et al. 2000; Henrich et al. 2012; siehe auch Kapitel 2.3 und 2.3.1).

In der Arterienwand regulieren Kaliumkanäle über das Ruhemembranpotenzial den Gefäßwiderstand und somit den Blutfluss entlang dieser Arterien. Aufgrund ihrer Beeinflussbarkeit durch verschiedene humorale sowie metabolische Mediatoren, die auch während entzündlicher Prozesse vermehrt anfallen, können Kaliumkanäle den Gefäßwiderstand auch während der Sepsis bestimmen. Wu et al. und O'Brian et al. konnten zeigen, dass ATP-abhängige Kaliumkanäle eine wichtige Rolle bei der Regulation des Arterienwiderstandes während des septischen Geschehens auch in der Mesenterialarterie spielen (Wu et al. 2004; O'Brien et al. 2005). Da ATP durch die Hypoperfusion unter septischen Bedingungen nur noch in vermindertem Ausmaß zur Verfügung steht, sind die Kanäle ein wichtiger Mediator in der bedarfsangepassten Regulation des Widerstandes und damit des Blutflusses im Splanchnikusgebiet.

Die verminderte Durchblutung in der Sepsis führt auch zum gehäuften Anfallen anderer Metabolite in der Mesenterialstrohmbahn und zu einem veränderten Milieu im gesamten kardiovaskulären Kompartiment. Die in dieser Arbeit untersuchten zweiporigen Kaliumkanäle mit ihrer Sensitivität auf den pH-Wert, die Sauerstoffpartialdrücke und bestimmte Fettsäuren können auch eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang spielen. Eine Mediatorrolle der K₂P-Kanäle konnte für TREK 1 von Blondeau et al. 2007 in der Basilararterie gezeigt werden, wobei ein durch bestimmte Fettsäuren ausgelöster vasodilatierender Effekt in TREK-1 defizienten Mäusen ausblieb (Blondeau et al. 2007). Des Weiteren wurden TASK-1 von Gardner et al. auch bereits Mediatoreigenschaften im Hinblick auf eine wichtige Rolle bei dem

Mechanismus der hypoxischen Vasokonstriktion zugesprochen (Gardener et al. 2004). So liegt es nahe, dass diese Kanäle mit ihren spezifischen Eigenschaften noch weitere wichtige Mediatorrollen einnehmen könnten. Entsprechende Untersuchungen zu zweiporigen Kaliumkanälen und ihrer Rolle bei septischen Geschehen im Splanchnikusgebiet liegen noch nicht vor. In dieser Studie wird somit das Expressionsverhalten verschiedener K₂P-Kanäle auf RNA- und Proteinebene im zeitlichen Verlauf einer CLP-induzierten Sepsis untersucht. Die Proteinuntersuchungen werden aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Proteinmenge (s. Kap. 4.2) nur bei den Kaliumkanälen TASK 1 und TREK 1, bei denen bereits Mediatoreigenschaften zwischen exogenen Einfluss und dem Gefäßtonus gezeigt worden sind, durchgeführt.

5.2.2 Dopaminrezeptoren

Ein weiterer in dieser Arbeit zu untersuchender Aspekt der Hämodynamik während des septischen Geschehens betrifft die Rezeptoren des Katecholamins Dopamin D1R und D2R. Lange Zeit wurde es in der Therapie der Sepsis und besonders zur Prävention des akuten Nierenversagens empfohlen. Die großen ANZIAC-Studie im Jahr 2000 von Bellomo et al. zeigt jedoch, dass die Gabe von Dopamin in der Nierendosis (unter 5 µg/kg/min) keinen langfristig positiven Effekt auf die Mortalität und das Outcome septischer Patienten besitzt (Bellomo et al. 2000). Zudem treten unter der Therapie mit Dopamin vermehrt Arrhythmien und unerwünschte endokrine Wirkungen auf (van den Berghe und Zegher 1996). Seit den Sepsisleitlinien von 2004 wird die Gabe von niedrig dosiertem Dopamin auch nicht mehr generell zur Nierenprotektion bei septischen Patienten empfohlen (Dellinger et al. 2004). Der vasodilatatorische Effekt von Dopamin in der Nierendosis in den größeren Arterien der Nieren und des Splanchnikusgebietes bleibt jedoch unbestritten. Bersten et al. haben schon 1992 vermutet, dass es wesentliche Unterschiede bezüglich der Wirkung von Dopamin auf regionaler Ebene zwischen gesunden und kritisch Kranken, z.B. septischen Patienten, gibt (Bersten et al. 1992). Auch Lherm et al. hatten 1996 bereits den Verdacht geäußert, dass es im Verlauf einer Sepsis zu Veränderungen an den Dopaminrezeptoren kommt. Sie hatten beobachtet, dass die positiven, Blutfluss erhöhenden Effekte im Verlauf geringer werden (Lherm et al. 1996). Ein beeinflussender Faktor kann ein verändertes Expressionsverhalten der beiden Dopaminrezeptortypen sein. Untersuchungen in der

Mesenterialarterie im Verlauf einer Sepsis fehlen bisher und sollten in dieser Arbeit auch untersucht werden.

5.3 Das NO-Synthase Expressionsmuster spricht für eine induzierte Sepsis nach CLP Operation

Die in dieser Arbeit zur Kontrolle der Sepsisinduktion bezüglich ihrer mRNA-Expression gemessenen Enzyme iNOS und eNOS bestätigen, zusätzlich zu der sepsisähnlichen Mortalität, das Gelingen der CLP-Operationen. Die Expression der iNOS wird an Tag 2 post CLP gleich auf den Höchstwert heraufreguliert (s. Kap. 4.4.6) und sinkt an den folgenden Tagen nur geringfügig ab. Der Ausgangswert wird bis Tag 8 nicht wieder erreicht. In der sham-operierten Kontrollgruppe ist dieser Effekt nicht zu sehen, sodass davon ausgegangen werden muss, dass die lediglich durch ein chirurgisches Trauma freigesetzten Entzündungsmediatoren für eine Beeinflussung der Expression nicht ausgereicht haben. Da die iNOS im physiologischen Milieu der Gefäßwände so gut wie nicht vorkommt, muss es durch die CLP-Operation zu einer Freisetzung der inflammatorischen Mediatoren TNF- α , LPS und/oder Interferon γ gekommen sein, wodurch eine verstärkte Expression bedingt ist (Knowles und Moncada 1994; Morris und Billiar 1994). Die eNOS-Expression verhält sich, wie in Kapitel 2.7 beschrieben, entgegengesetzt. Von Tag 0 bis an Tag 2 post CLP kommt es zu einer sehr signifikanten Herabregulation, welche bis Tag 8 auch nur leicht wieder ansteigt (s. Kap. 4.4.5). McGown et al. haben dieses Verhalten bereits beschrieben und auf das Vorhandensein von Endotoxinen und Cytokinen zurückgeführt (McGown und Brookes 2007) (s. Kap. 2.7). Yoshizumi et al. haben 1993 herausgefunden, dass die Zugabe von TNF- α die normale Halbwertszeit der eNOS von 48 auf 3 Stunden reduzieren kann. Auch die mRNA wird durch TNF- α degradiert und so in ihrer Konzentration reduziert (Yoshizumi et al. 1993). Die Annahme einer Sepsisinduktion, wie es durch den iNOS-Anstieg auf mRNA-Ebene nahelegt, würde auch eine Zunahme der TNF- α Konzentration und somit auch die veränderte eNOS-Expression erklären. Eine TNF- α bedingte Herabregulation spiegelt sich auch in der sham-operierten Gruppe an Tag 2 wieder. Hier kommt es zu einer deutlichen, wenn auch geringeren, Herabregulation. Die TNF- α Freisetzung wurde durch Refsum et al. bei sham-operierten Mäusen bereits beschrieben (Refsum et al. 1996). Alle genannten Erkenntnisse sprechen für eine

erfolgreiche Sepsisinduktion durch die CLP-Operation, die Basis dieser Versuchsreihe ist.

5.4 Unterschiedliches RNA-Expressionsverhalten der einzelnen Kaliumkanäle auf die Sepsisinduktion und das chirurgische Trauma

5.4.1 Expressionsverhalten von TASK-1

Der Verlauf der mRNA-Expression von TASK-1 zeigt tendenziell eine Reaktion auf die Interventionen (s. Kap. 4.4.1). Eine deutliche Abnahme der Expression bis Tag 2 post CLP ist sichtbar. Von hier aus steigt die RGE langsam über Tag 5 bis zum Tag 8 hin an und es kommt, eventuell im Rahmen einer Gegenregulation, zu einer Überexpression bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes. Die Herabregulation der Expression an Tag 2 kann dabei nicht ausschließlich auf die induzierte Sepsis zurückgeführt werden, da die sham-operierte Kontrollgruppe einen nur leicht geringeren Abfall in der RGE an Tag 2 zeigt. Da durch die lokale Gewebeschädigung der sham-Operation auch Entzündungsmediatoren wie TNF- α und Interleukin 1 freigesetzt werden, welche bis zur Ausbildung eines SIRS reichen können (Hirota und Ogawa 1996), scheinen die dabei freigesetzten Mengen an Mediatoren, auszureichen, um eine Herabregulation zu bewirken. Die induzierte Sepsis, die in der CLP-Gruppe auf das chirurgische Trauma folgt, scheint im Falle von TASK-1 diesen Effekt nur zu verstärken.

5.4.2 Expressionsverhalten von TASK-2

TASK-2 und TASK-1 reagieren in ähnlicher Art und Weise im Rahmen ihrer mRNA-Expression auf die Interventionen in diesem Experiment (s. Kap. 4.4.2). Der Tiefstwert der RGE wird wie bei TASK-1 gleich an Tag 2 post CLP erreicht. Die mRNA in der Kontrollgruppe wird auch vermindert exprimiert. Das Ausmaß der Beeinflussung ist aber auch hier in der CLP-Gruppe größer als in der sham-operierten Gruppe, sodass die auf das chirurgische Trauma folgende induzierte Sepsis als ein additiver Effekt gesehen werden kann, bei dem die TASK-1 und -2 beeinflussenden Mediatoren vermehrt gebildet werden. Im Gegensatz zu TASK-1 steigt bei TASK-2 die RGE langsamer

wieder an. An Tag 5 post CLP befindet sich die mRNA-Expression noch auf fast gleichem Niveau wie an Tag 2. Erst an Tag 8 wird der Ausgangswert wieder im Rahmen einer eventuellen Überexpression überschritten. Dieses Reaktionsmuster gleicht vom Ablauf her dem von TASK 1 und legt eine nicht nur namentliche Verbundenheit der TASK-Kanäle nahe.

5.4.3 Expressionsverhalten von TREK-1

TREK-1 reagiert im Hinblick auf die mRNA-Expression nur auf die induzierte Sepsis (s. Kap. 4.4.3). Die RGE sinkt dabei an Tag 2 auf weniger als die Hälfte des Ausgangswertes ab. Der Wiederanstieg erfolgt anschließend nicht schrittweise, sondern liegt direkt an Tag 5 und signifikant an Tag 8 gegenüber Tag 2 post CLP auf einem höheren Niveau als der Ausgangswert. Auch hier ist eine Überexpression zu beobachten. Die Expression nach zwei Tagen in der Kontrollgruppe bleibt im Gegensatz zu TASK-1 nahezu unverändert gegenüber dem Ausgangswert, sodass von einem sepsisspezifischen Effekt ausgegangen werden muss. Für die Veränderung des Expressionsverhaltens scheint also entweder ein bestimmter Schwellenwert in der beeinflussenden Mediatorkonzentration vorzuliegen oder es muss zur Freisetzung von Mediatoren kommen, die nur im septischen Geschehen und nicht bei einer SIRS oder lokalen Mediatorproduktion vorhanden sind. Der schnelle Wiederanstieg und die auf TREK-1 wirkungslose sham-Operation sprechen jedoch eher für eine Schwellenwertüberschreitung.

5.4.4 Expressionsverhalten von TWIK-2

TWIK-2 reagiert mit seinem mRNA-Expressionsverhalten im Vergleich zu den anderen untersuchten zweiporigen Kaliumkanälen im geringsten Maße auf die Interventionen (s. Kap. 4.4.4). Eine Verringerung der Expression kann nicht beobachtet werden. An Tag 2 post CLP, an dem es ansonsten zur größten Variation in dem Verhalten der anderen untersuchten K₂P-Kanäle kommt, ist die RGE annähernd so hoch wie am Ausgangswert. Die Expression in der Kontrollgruppe zeigt hier tendenziell sogar eine eher vermehrte Expression. Bis auf den Anstieg der RGE von Tag 2 zu Tag 8 reagiert TWIK-2 nicht wie die anderen K₂P-Kanäle auf die induzierte Sepsis und das chirurgische Trauma.

5.5 Proteinexpressionsverhalten von TASK-1 und TREK-1 während der Sepsis und nach dem chirurgischen Trauma

Die Proteinexpression von TASK-1 und TREK-1 reagieren nicht in gleicher Weise auf die durchgeführten Interventionen (s. Kap. 4.4.1 und 4.4.3). Im Falle von TASK-1 folgt die Proteinexpression mit zeitlicher Verzögerung in ihrem Muster der RNA-Expression. Auch hierbei kommt es zu einer Herabregulation der detektierbaren Proteine. Der Tiefstwert wird nicht wie bei der mRNA an Tag 2, sondern an Tag 5 erreicht und ist als einziger Wert, bezüglich der Proteinexpression, signifikant gegenüber Tag 0 erniedrigt. Von da an steigt die Expression bis Tag 8 an, erreicht jedoch noch nicht den Ausgangswert von Tag 0. Interessanterweise ist auch in der sham-operierten Gruppe die TASK-1 Proteinexpression in ähnlichem Maße reduziert, wie an Tag 2 der CLP-Gruppe und somit gleich dem Verhalten der mRNA-Expression. Eine Überexpression kann hier nicht beobachtet werden. Dieses kann bedeuten, dass es zu keiner vermehrten Expression kommt oder dass diese auf Grund der zu beobachtenden Zeitverzögerung erst nach dem achten Tag post CLP eintritt. Durch das Fehlen einer sham-operierten Kontrollgruppe für den Tag 5 kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die signifikante Herabregulation auf Proteinebene nach der CLP-Operation durch eine Sepsis oder alleine durch das chirurgische Trauma dabei ausgelöst wurde. Die durch die Operationen hervorgebrachten Faktoren scheinen im Falle von TASK-1 die mRNA- und Proteinexpression in ähnlichem Maße zu beeinflussen. Zweiporige Kaliumkanäle scheinen nicht nur bezüglich ihrer Aktivität, sondern auch in ihrer RNA- und Proteinexpression im Rahmen entzündlicher Vorgänge streng reguliert zu sein.

Die Proteinexpression von TREK-1 scheint diesem Muster nicht zu folgen. Auf mRNA-Ebene kommt es zu einem starken Abfall der Expression nur in der CLP-Gruppe an Tag 2. Die Proteinexpression zeigt jedoch an keinem der Tage eine ähnliche Tendenz. Im gesamten Verlauf des Experimentes kommt es zu einer leichten Erhöhung der Proteinexpression, wobei dem Trend bei der mRNA-Expression gefolgt wird. Entweder wurde eine kurzzeitige Expressionsveränderung von TREK-1 bei den Proteinen durch das Versuchsdesign nicht erfasst oder die Proteinexpression reagiert so langsam auf Unterschiede in der mRNA-Konzentration, sodass nur der Effekt des Heraufregulierens über die ganzen acht Tage beobachtet werden kann.

5.6 Zusammenfassende Beurteilung und mögliche funktionelle Bedeutung des Expressionsverhaltens der zweiporigen Kaliumkanäle

Zweiporige Kaliumkanäle sind keineswegs konstitutiv exprimierte Kanäle im elektrischen Regelkreis der Zelle, die nur durch schon bekannte äußere Einflüsse ihre Offenwahrscheinlichkeit ändern. Sie scheinen in ihrem Ausmaß der Expression auf RNA- und Proteinebene streng reguliert zu sein und damit auch auf längerfristige Änderungen in ihrer Umgebung reagieren zu können. Man kann von einer funktionellen Expression sprechen. Nicht alle K_2P -Kanäle reagieren aber in gleicher Weise auf die Interventionen in diesem Experiment. Eine generelle Aussage zum Expressionsverhalten kann kaum getroffen werden, sodass alle in den Mesenterialgefäßen vorkommenden Kanäle, hinsichtlich ihrer Regulation, differenziert betrachtet werden müssen. Art und Ausmaß der Reaktionen in dem Expressionsverhalten unterstreichen nochmals die einzelnen Spezifitäten der zweiporigen Kaliumkanäle. So werden TASK-1 und -2 an Tag 2 in der CLP-Gruppe als auch in etwas geringerem Ausmaß in der sham-operierten Kontrollgruppe herabreguliert. TREK-1 wird an Tag 2 ausschließlich in der CLP-Gruppe vermindert exprimiert und die TWIK-2 Expression scheint keine Reaktion auf die Sepsisinduktion zu zeigen (s. Kap. 5.4.1-5.4.4). Bei allen Kanälen, außer dem hier nicht reagiblen TWIK-2, kommt es somit, ungeachtet des Ausmaßes, unter septischen Bedingungen zu einer verminderten Expression.

Bisherige Untersuchungen haben meist nur einzelne Vertreter der K_2P -Kanäle hinsichtlich ihrer Beeinflussbarkeit oder Funktion im kardiovaskulären System betrachtet. Pathophysiologische Auswirkungen, bedingt durch die in dieser Arbeit gezeigten Änderung im Expressionsverhalten der Kanäle, sind im Gesamtzusammenhang der Hämodynamik unter septischen Bedingungen nur schwer auf die Situation in vivo übertragbar. Vermutungen können aber anhand von bisherigen Forschungsergebnissen für einzelne Komponenten der gestörten Vasomotorik angestellt werden.

2006 haben Olschewski et al. gezeigt, dass es in isolierten, pulmonalarteriellen, glatten Muskelzellen, in denen das Gen für TASK-1 ausgeschaltet wurde, zu einer vermehrten Depolarisation kommt (Olschewski et al. 2006). Aus diesen Ergebnissen kann man ableiten, dass dies auch in glatten Muskelzellen der Mesenterialarterien bei

verminderter TASK-1-Expression geschieht. Funktionell kann es, isoliert betrachtet, bedeuten, dass die Leitfähigkeit für Kaliumionen durch die Zellmembran abnimmt. Die Ionen können weniger dem elektrochemischen Gradienten folgen und es kommt zu einer Akkumulation von positiv geladenen Kaliumionen in den Zellen. Der Überschuss an positiven Ladungen führt zu einem weniger negativen Membranpotenzial und die Muskelzelle depolarisiert. Spannungsabhängige Calciumkanäle erhöhen dann ihre Offenwahrscheinlichkeit und es kommt zum relativen Calciumeinstrom und zur vermehrten Kontraktion der Zelle. Eine Vasokonstriktion mit konsekutiv vermindertem Blutfluss in den abhängigen Organen wäre die Folge. Da die Pulmonalarterien im Gegensatz zu den mesenterialen Widerstandsgefäßen keine eventuell auch involvierten TREK-1-Kanäle besitzen (Gurney und Manoury 2009; Gardener et al. 2004) und auf eine Zunahme des Blutflusses druckpassiv reagieren, bleibt die direkte Übertragbarkeit in einen Gesamtkontext offen.

Gardner et al. haben 2004 gezeigt, dass K_2P -Kanäle nicht nur in den Myozyten, sondern auch in den für die lokale Steuerung der Vasomotorik äußerst wichtigen Endothelzellen vorkommen (Gardener et al. 2004). Diese endothelial gelegenen K_2P -Kanäle, vor allem TREK-1, wurden von Garry et al. hinsichtlich ihrer vasodilatatorischen Eigenschaften untersucht. In TREK-1 defizienten Mäusen blieb ein mechanisch induzierter, vasodilatatorischer Effekt durch erhöhten Blutfluss zwar erhalten, jedoch konnten die Mediatoren Acetylcholin und Bradykinin keine ansonsten für sie typische Vasodilatation mehr herbeiführen. Acetylcholin und Bradykinin wirken dabei über ein G-Protein, wodurch es zu einer intraendothelialen Erhöhung der Calciumkonzentration kommt. Es bilden sich Calcium-Calmodulin-Komplexe, welche die eNOS aktivieren und so über eine erhöhte NO-Produktion vasodilatierend wirken (Garry et al. 2007). Zusätzlich zur, unter septischen Bedingungen, reduzierten Expression der eNOS (s. Kap. 5.3) kann es sein, dass die NO-Produktion durch eine, in dieser Arbeit gezeigte, sepsisspezifische Herabregulation von TREK-1 zu einer zusätzlich verringerten NO-Produktion führt. Es ist anzunehmen, dass dadurch eine Anpassung der eNOS-abhängigen NO-Produktion an lokale Bedürfnisse auch nicht mehr in ausreichendem Maße erfolgen kann.

Die während eines septischen Geschehens auftretenden, inhomogenen Störungen der Mikro- und Makrozirkulation (Cronenwett und Lindenauer 1979; Cryer et al. 1987) bedürfen einer individuellen Regulation auf lokaler Gefäßebene. Die in Kapitel 2.5

genannte Fähigkeit der K₂P-Kanäle durch metabolischen Faktoren, wie pH-Werte, Sauerstoffpartialdrücke, verschiedene Lipide und Neurotransmitter, eventuell eine Anpassung der Durchblutung an regionale Bedürfnisse zu vermitteln, werden durch die weitgehende Herabregulation eingeschränkt werden. Gerade auf die während einer Mesenterialischämie lokal veränderten pH-Werte und Sauerstoffpartialdrücke wird wahrscheinlich durch die Gefäße selbst weniger reagiert werden können.

Der Einfluss der einzelnen durch Herabregulation der K₂P-Kanäle veränderten, vasoaktiven Kaskaden auf das hämodynamische Gesamtgeschehen einer Sepsis kann nur schwierig beurteilt werden. Es ist davon auszugehen, dass die in der Sepsis zur Störung der Makro- und Mikrozirkulation führenden Pathomechanismen ein komplexes Zusammenspiel vieler einzelner Bereiche der Vasomotorik sind, bei denen die K₂P-Kanäle in vielerlei Hinsicht maßgeblich involviert sein können.

5.7 Expressionsverhalten der Dopaminrezeptoren unter Sepsis

Die Bedeutung von Dopamin in der Sepsistherapie wurde lange kontrovers diskutiert und zurzeit wird Dopamin aufgrund mangelnder Wirksamkeit und zu starken unerwünschten Nebenwirkungen nicht mehr in der Sepsistherapie empfohlen (Dellinger et al. 2004). Eine Veränderung an den Rezeptoren in der Nieren- und Mesenterialstrombahn wird für das abweichende Wirkungsprofil unter septischen Bedingungen gegenüber dem physiologischen Zustand vermutet (Bersten et al. 1992; Lherm et al. 1996). Genaue Mechanismen sind hierbei noch nicht bekannt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Vermutungen richtig zu sein scheinen, da es zu einem veränderten Expressionsverhalten im Hinblick auf die mRNA der Dopaminrezeptoren unter septischen und bedingt auch chirurgisch-traumatischen Bedingungen kommt. Der D1R wird im Verlauf der Sepsis ausgehend von Tag 0, über Tag 2 bis auf seinen, gegenüber Tag 0 signifikant erniedrigten, Tiefstwert an Tag 5 herabreguliert. Die Expression in der sham-operierten Gruppe an Tag 2 ist auf einem ähnlich niedrigen Niveau, wie an Tag 5 in der CLP-Gruppe (s. Kap. 4.4.7). Somit muss es postsynaptisch zu einer verminderten cAMP-Produktion im Verlauf der ersten Tage post CLP und nach der sham-Operation kommen. Die vasodilatatorischen Effekte von Dopamin über den D1R sind dann abgeschwächt (s. Kap. 2.6). Vor allem die unter septischen Bedingungen entstehende Hypoxie in der Mesenterialstrombahn hätte

zusätzlich zur systemischen auch zur lokalen Freisetzung von Dopamin und somit zur Vasodilatation über den D1R geführt (Pfeil et al. 2014). Da dieser aber nun unter Sepsis in der Mesenterialarterie vermindert exprimiert wird, kann eine Vasodilatation über D1R-Mechanismus nicht mehr in ausreichendem Maße stattfinden. Von den K₂P-Kanälen reagiert mindestens auch TASK-1 mit einer Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit auf den Mangel an cAMP (Monsma et al. 1990). Ein synergistischer Effekt hin zur vermehrten Vasokonstriktion ist denkbar. Die verminderte Vasodilatation durch das dopaminerge System über die D1R könnte eine Gegenregulation zur enorm gesteigerten Vasodilatation durch NO über die vermehrte Expression der iNOS in den Gefäßwänden der Mesenterialstrombahn sein. Während entzündlicher Prozesse aus dem Endothel u.a. freigesetzte Prostazykline wirken durch eine G-Proteingekoppelte cAMP-Produktion in den Myozyten diesem Mechanismus auch entgegen (Parkington et al. 2004; Henrich et al. 2012).

Der D2R wird im Gegensatz zum D1R verstärkt im Verlauf der Sepsis exprimiert. An Tag 2 post CLP erreicht er gleich sein Maximum und fällt über Tag 5 bis auf Tag 8 wieder auf den Ausgangswert ab. Die sham-operierte Kontrollgruppe ist nicht von diesen Veränderungen betroffen und so kann hier im Gegensatz zum D1R von einem Sepsis-spezifischen Effekt ausgegangen werden (s. Kap. 4.4.8). Die vermehrte Expression des, über G-Proteine inhibitorisch wirkenden, D2R muss zu einer lokal verminderten Freisetzung von vor allem Noradrenalin aus sympathischen Ganglien führen, wodurch auch eine verminderte Vasokonstriktion bewirkt wird.

Die induzierten Expressionsveränderungen am D1R wirken im Gesamtbild also eher in Richtung Vasokonstriktion und die an den D2R in Richtung Dilatation der Mesenterialgefäße. Diese gegensätzlichen Effekte könnten für die schon lange herrschenden Unklarheiten bezüglich der Wirkung von Dopamin in der Sepsistherapie verantwortlich sein. Cronenwett et al. und Cryer et al. haben schon vor Längerem eine in der Sepsis stattfindende inhomogene Gefäßregulation beschrieben, bei der es zur Dilatation der großen und Konstriktion der kleinen Arterien kommt (Cryer et al. 1987). Es entsteht ein Shunt mit Umgehung der Kapillarstrombahn (Cronenwett und Lindenauer 1979). Die von Hiltebrand et al. (s. Kap. 2.6) beobachteten Veränderungen bei Dopamingabe im Schweine-Sepsis-Modell bestätigen diese Ergebnisse. Es kommt dabei zu unterschiedlichen Wirkungen in unterschiedlichen Gefäßabschnitten, was auch eine differenzierte Regulation des Blutflusses durch Dopaminrezeptoren in diesem

Bereich nahe legt (Hiltebrand et al. 2004). In dieser Arbeit wurden die Arteria mesenterica, die von ihr abhängigen Arterien und die bis zur Darmwand reichenden Arteriolen freipräpariert und als eine gemeinsame Probe für die RNA- oder Proteinisolierungen verwendet. Eine Unterscheidung der Veränderungen an den Rezeptoren in den verschiedenen Abschnitten der Mesenterialstrohmbahn könnte zur Klärung beitragen, sie konnte aber aufgrund der angewandten Präparationstechnik nicht vorgenommen werden.

5.8 Ausblick auf weitere Untersuchungen

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bezüglich des durch inflammatorische Ereignisse beeinflussbaren Expressionsverhaltens der K₂P-Kanäle rechtfertigten weitere Forschungsbemühungen auf diesem Gebiet. Um die Ergebnisse deutlich zu verifizieren und dabei gleichzeitig das Expressionsverhalten detailgenauer zu erfassen, sind weitere Studien nötig. Ein speziell für die Fragestellung ausgelegtes Versuchsdesign mit einer ausreichend hohen Anzahl an Individuen pro Versuchsgruppe ist nötig. Um den genauen Verlauf der Reaktionen auf das septische Geschehen beobachten zu können, müssten die Zeitabstände zwischen den einzelnen Endpunkten an denen die Tiere euthanasiert werden verkürzt und auch eher nach Sepsisinduktion begonnen werden. Gerade die ersten 24 Stunden sollten genauer betrachtet werden.

Das CLP-Modell hat sich auch in dieser Arbeit wieder bewährt und kann auch für weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet verwendet werden. Um aber die Auswirkungen des chirurgischen Traumas auf eine Veränderung im Expressionsverhalten der K₂P-Kanäle zu minimieren und einen alleinigen sepsisinduzierten Effekt zu zeigen, sollte parallel auch ein anderes Sepsismodell untersucht und mit dem CLP-Modell verglichen werden. Die Applikation von Pathogenen oder direkt von LPS wäre hier denkbar.

Das dieser Arbeit zugrunde liegende Versuchsdesign bezieht nur die Tier mit ein, die die SIRS, die Sepsis und/oder den septischen Schock überlebt haben. Die verstorbenen oder agonischen Tiere könnten aber auch interessante Erkenntnisse bezüglich des Expressionsverhaltens liefern, da hier die hämodynamischen Komplikationen nicht mehr mit dem Leben vereinbar sind und die Expressionsvariation ihre Grenzen erreicht haben müsste. Gleichzeitig kann so auch festgestellt werden, ob bestimmte

Expressionsmuster mit einer erhöhten Mortalität korrelieren. Ein permanentes hämodynamisches Monitoring kann zusätzlich eine Zuordnung des Grades der Expression der Kanäle zu bestimmten Kreislaufzuständen oder zu hämodynamischen Verläufen erlauben.

Bezüglich der Dopaminrezeptorexpression in der Mesenterialarterie während des septischen Geschehens kann eine differenzierte Untersuchung der einzelnen Abschnitte der mesenterialen Strombahn Erkenntnisse zu einem eventuell unterschiedlichen Expressionsverhalten liefern. Der Beantwortung der durch Hildebrand et al. entstandenen Frage, warum Dopamin auf die verschiedenen Gefäßabschnitte unterschiedlich wirkt, könnte man so vielleicht näherkommen. Auch für die K₂P-Kanäle kann diese abschnittsweise Betrachtung interessant sein und eventuelle Unterschiede in der Ausstattung mit, sowie der Variabilität von K₂P-Kanälen in unterschiedlichen Gefäßabschnitten aufzeigen.

6 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte erstmalig ein verändertes Expressionsverhalten von den in der Mesenterialarterie vorkommenden K₂P-Kanälen und Dopaminrezeptoren unter septischen Bedingungen und nach chirurgischem Trauma im Mausmodell einer Sepsis aufgezeigt werden. K₂P-Kanäle sind dabei nicht einfach nur konstitutiv exprimierte Kanäle im elektrischen Regelkreis der Zelle. Sie reagieren mit einer Änderung ihrer Offenwahrscheinlichkeit auf viele metabolische Faktoren, die unter septischen Bedingungen als Mediatoren zur Regulation des Gefäßtonus dienen, wie zum Beispiel pH-Werte, Sauerstoffpartialdrücke, verschiedene Lipide, Neurotransmitter, G-Protein gekoppelte Rezeptoren und mechanische Dehnung. Hierdurch beeinflussen sie auch die Vasomotorik. Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktion der K₂P-Kanäle in ihrer eigenen Mediatorrolle nicht nur in einer kurzfristigen und schnell reversiblen Änderung ihrer Offenwahrscheinlichkeit, sondern auch in einer relativ längerfristigen Änderung des gesamten Expressionsverhaltens besteht. Die bisherigen Kenntnisse und die hier aufgedeckten Expressionsänderungen legen einen Zusammenhang zwischen den oft letalen hämodynamischen Veränderungen bei septischen Patienten und einer Expressionsänderung der Kanäle nahe.

Die in dieser Arbeit auch erstmalig gezeigten Veränderung in Bezug auf das Expressionsverhalten der Dopaminrezeptoren in der Mesenterialstrombahn unter Sepsis können eine Erklärung für das bereits vermutete, vom physiologischen Zustand abweichende, veränderte Wirkungsprofil des Dopamins seins. Die trotz Vasodilatation der größeren Arterien verminderte Perfusion in der arteriellen Endstrombahn mit Hypoxie der betreffenden Darmmukosa könnte auch mit den Variationen in der Expression der Rezeptoren in Zusammenhang stehen.

Durch die gezeigte Involvierung der Kanäle und Dopaminrezeptoren in hämodynamische Änderungen wird auch eine medikamentös, therapeutische Beeinflussung zur Stabilisierung der in der Sepsis gestörten Vasomotorik denkbar und macht weitere, dahingehende Forschung unabdingbar.

7 Zusammenfassung

Zweiporige Kaliumkanäle (K₂P-Kanäle) bestimmen das Ruhemembranpotenzial vieler Zelltypen. In der Arterienwand regulieren sie darüber hinaus den Gefäßwiderstand. Aufgrund ihrer Beeinflussbarkeit durch verschiedene humorale sowie metabolische Mediatoren, die auch während entzündlicher Prozesse vermehrt anfallen, können sie den Gefäßwiderstand auch während der Sepsis bestimmen. Inhomogene Veränderungen der Makro- und Mikrozirkulation sind verantwortlich für das in der Sepsis auftretende Organversagen. Die von der Mesenterialstrombahn abhängigen Organe sind in dieser Situation durch Vasokonstriktion, konsekutiver Hypoperfusion mit Hypoxie und Dysfunktion der Blut-Darm-Schranke gefährdet. Letztere kann eine bakterielle Translokation in das Gefäßsystem, sowie zusätzlichen Flüssigkeitsverlust in das umgebende Gewebe bedingen, was die Hämodynamik weiter beeinträchtigt. Mit dieser Studie soll untersucht werden, ob die Expression verschiedener K₂P-Kanäle auf RNA- und Proteinebene, sowie Dopaminrezeptoren Typ 1 und 2 auf RNA-Ebene während der Sepsis und nach chirurgischem Trauma verändert wird. Die Wirkung von Dopamin zur Kreislauftherapie und vor allem zur Nierenprotektion war lange umstritten und zurzeit wird es nicht mehr generell in den Sepsisleitlinien empfohlen. Eine Veränderung an den Rezeptoren wird vermutet. Im Mausmodell einer polymikrobiellen Sepsis, ausgelöst durch die cecal ligation and puncture (CLP) Operation, wurden an den Tagen 0 (n=3), 2 (RNA: n=4; Protein: n=3), 5 (n=3) oder 8 (RNA: n=5; Protein: n=3) die Tiere euthanasiert. Eine sham-Gruppe bestand für Tag 2 post OP (n=3). RNA und Proteine der Arterien wurden mittels Real-Time-PCR und Westernblotverfahren untersucht. Die einfache Varianzanalyse ANOVA diente zur Bewertung der gewonnenen Daten. Bei dem Kanal TASK 1 kommt es an Tag 2 in der CLP-, sowie in der sham-Gruppe zu einer ähnlich großen Herabregulation auf RNA- und Proteinebene. TREK 1-RNA wird nur an Tag 2 in der CLP-, nicht aber in der sham-Gruppe vermindert exprimiert. Die Proteinexpression von TREK 1 bleibt in diesem Modell unbeeinflusst. TASK 2 wird auf RNA-Ebene an Tag 2 in der CLP-Gruppe mehr als in der sham-Gruppe herabreguliert. TWIK 2-RNA scheint nicht beeinflusst zu sein. An Tag 8 erreichen alle Kanäle wieder mindestens ihr Ausgangsniveau. Der Dopamin-1-Rezeptor wird im Verlauf der Sepsis ausgehend von Tag 0, über Tag 2 bis auf seinen gegenüber Tag 0 signifikant erniedrigten Tiefstwert an Tag 5 herabreguliert und begünstigt so eine Vasokonstriktion. Der Dopamin-2-Rezeptor wird gleich an Tag 2 post CLP hingegen vermehrt exprimiert und

würde so in Richtung Vasodilatation wirken. Die ebenfalls untersuchte und u.a. durch LPS und TNF- α induzierbare NOS wird heraufreguliert. Die ebenfalls durch TNF- α beeinflusste eNOS wird im Gegensatz zu iNOS herabreguliert. Dies spricht für eine hervorgerufene Entzündungsreaktion durch die CLP-Operation. Die gezeigten Veränderungen in den Expressionsmustern der vasoaktiven K₂P-Kanäle könnten wichtige Faktoren für die reduzierte mesenteriale Perfusion während der Sepsis sein. Die Variation in Bezug auf das Expressionsverhalten der Dopaminrezeptoren kann eine Erklärung für das bereits vermutete und vom physiologischen Zustand abweichende, veränderte Wirkungsprofil des Dopamins sein.

8 Summary

The two-pored potassium channels (K₂P-channels) set the resting membrane potential in many cell types. Due to their suggestibility by various metabolic and humoral mediators, which are also increased during inflammatory processes, they can also determine vascular resistance during sepsis. Inhomogeneous changes in the macro- and microcirculation are responsible for the occurring organ failure in sepsis. In this situation the organs dependent of the mesenterial blood flow are at risk due to vasoconstriction with consecutive hypoperfusion, hypoxia and dysfunction of the blood-intestinal barrier. The latter can cause bacterial translocation in the vascular system, as well as additional fluid loss into the surrounding tissue, which further affects the haemodynamics. This study investigated whether the expression of several K₂P-channels at the level of RNA and protein, as well as dopamine-receptors type 1 and 2 changes only at the level of RNA during sepsis and after a surgical trauma. The effect of dopamine in haemodynamic therapy and especially for acute renal failure protection has long been controversially discussed and currently it is generally not recommended within the sepsis guidelines. A transformation of the receptors caused by inflammatory processes is suspected. In a murine model of polymicrobial sepsis, using the cecal ligation and puncture (CLP) method, mice have been euthanized on day 0 (n=3), 2 (RNA: n=4; protein: n=3), 5 (n=3) or 8 (RNA: n=5; protein: n=3) after sepsisinduction. RNA and proteins of the mesenteric arteries were examined by Real-time PCR and Westernblot-analysis. ANOVA was used to evaluate the data obtained. On day 2 a downregulation at the RNA- and protein-level for the channel TASK-1 in the CLP, as

well as to a similar size in the sham-operated group occurred. TREK-1 RNA is expressed on a lower level only on day 2 in the CLP-group. It is not reduced in the sham-operated group. The protein expression of TREK-1 remains unaffected in this model. TASK-2 is down-regulated at the RNA-level on day 2 more in the CLP-group than in the sham-operated group. TWIK-2 RNA seems to be not affected. All investigated channels reach back at least their initial RNA-level until day 8. The postsynaptically located, activating G-protein-coupled dopamine-1-receptor is down-regulated in the course of sepsis. Starting on day 0 the expression declines over day 2 to its minimum on day 5, which is significantly different in comparison to day 0. Consequently a vasoconstriction is promoted. The presynaptically situated, inhibitory G-protein-coupled dopamine-2-receptor is straight on day 2 post CLP increased expressed and would act so in the direction of vasodilation. The also investigated iNOS, activated amongst others by LPS and TNF- α , is upregulated. In contrast to iNOS eNOS, which is also influenced by TNF- α , is downregulated. This argues for an induced inflammatory reaction caused by the CLP-operation. The changes shown in the expression patterns of the vasoactive K₂P-channels could be important factors causing the reduced mesenteric perfusion during sepsis. The variation concerning to the expression of dopamine-receptors may provide an explanation for the already suspected and not physiologically acting, altered activity profile of dopamine.

9 Liste der verwendeten Abkürzungen

ANOVA	analysis of variance
APS	Ammonium Persulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaaren
BCA	bicinchoninic acid
CASP	colon ascendens stent peritonitis
cDNA	complementary DNA
CLP	cecal ligation and puncture
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D1R	Dopamin-D1-Rezeptor
D2R	Dopamin-D2-Rezeptor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FAB	Antigen bindendes Fragment
Fc	kristallisierbare Fragment
G	Gauge
gDNA	genomische DNA
HCl	Chlorwasserstoff
HRP	horseradish peroxidase
Hz	Hertz
IP3	Inositoltrisphosphat
iNOS	induzierbare NO-Synthase
K2P	zweiporige Kaliumkanäle
LPS	Lipopolysaccharid
max.	maximal

mRNA	messenger RNA
MODS	multi organ dysfunction syndrom
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NO	Stickstoffmonoxid (nitric oxide)
o.g.	oben genannt
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphat buffered saline
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
RGE	relative Gen Expression
RIPA	radioimmunopräzipitations Assay Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
Rpm	rounds per minute
RyR	Ryanodinrezeptoren
SACC	Stretch-activated Ca^{2+} -Channels
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SOAP	sepsis occurrence in actually ill patients
SR	sarkoplasmatischen Retikulums
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

TNF- α

Tumornekrosefaktor- α

VE-Wasser

vollentsalztes Wasser

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung kontraktionsbegünstigender Faktoren in einer glatten Muskelzelle.

Abbildung 2: Schemazeichnung zweiporiger Kaliumkanal

Abbildung 3a: Aufgespanntes Gesamtmesenterium bei 20 facher Vergrößerung

Abbildung 3b: vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 3a

Abbildung 4a: präparierte Mesenterialarterie mit Abgängen

Abbildung 4b: fertiges Präparat

Abbildung 5: Schematischer Ablauf eines Real-Time PCR Zyklus

Abbildung 6: Aufbau und Schichtung im Blotkäfig

Abbildung 7: Gelelektrophorese der PCR-Produkte bei nicht-septischem Tier in 2%igem Agarosegel

Abbildung 8: Gelelektrophorese der PCR-Produkte verschiedener nicht-septischer Tiere in 1,5%igem Agarosegel (1)

Abbildung 9: Gelelektrophorese der PCR-Produkte bei einem nicht-septischer Tiere in 1,5%igem Agarosegel (2)

Abbildung 10: Ergebnisse der Real-Time-PCR-Untersuchungen zu der mRNA-Expression der TASK 1-Kanälen.

Abbildung 11: Westernblot zur Detektion von TASK 1 und β -Actin.

Abbildung 12: Ergebnisse der Westernblot-Untersuchungen zu der Proteinexpression der TASK 1-Kanäle

Abbildung 13: Ergebnisse der Real-Time PCR-Untersuchungen TASK 2

Abbildung 14: Ergebnisse der Real-Time PCR-Untersuchungen zu der mRNA-Expression der TREK 1-Kanälen.

Abbildung 15: Westernblot zur Detektion von TREK 1 und β -Actin

Abbildung 16: Ergebnisse der Westernblot-Untersuchungen TREK 1

Abbildung 17: Ergebnisse der Real-Time PCR-Untersuchungen TWIK 2

Abbildung 18: Ergebnisse der Real-Time PCR-Untersuchungen eNOS

Abbildung 19: Ergebnisse der Real-Time PCR-Untersuchungen iNOS

Abbildung 20: Ergebnisse der Real-Time PCR-Untersuchungen D1R

Abbildung 21: Ergebnisse der Real-Time PCR-Untersuchungen D2R

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Komponenten für die Reverse-Transkriptase-Reaktion

Tabelle 2: Komponenten für die Polymerase Kettenreaktion

Tabelle 3: Programm für Thermocycler

Tabelle 4: PCR Primer Sequenzen

Tabelle 5: Zusammensetzung Real-Time PCR-Ansatz

Tabelle 6: Real-Time PCR Sonden-assay-ID

Tabelle 7: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für je ein SDS-Gel

Tabelle 8: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

Tabelle 9: Überlebenszahlen der Tiere

Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichungen der Real-Time PCR TASK 1

Tabelle 11: Durch densitometrische Messung ermittelte Werte für TASK 1 mit dem Programm „Image J“

Tabelle 12: Mittelwerte und Standardabweichungen der Real-Time-PCR TASK 2

Tabelle 13: Mittelwerte und Standardabweichungen der Real-Time PCR TREK 1

Tabelle 14: Für TREK 1 densitometrisch ermittelte Werte mit „Image J“

Tabelle 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der Real-Time PCR TWIK 2

Tabelle 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der Real-Time PCR eNOS

Tabelle 17: Mittelwerte und Standardabweichungen der Real-Time PCR iNOS

Tabelle 18: Mittelwerte und Standardabweichungen der Real-Time PCR D1R

Tabelle 19: Mittelwerte und Standardabweichungen der Real-Time PCR D2R

12 Literaturverzeichnis

Andersen, P. H.; Gingrich, J. A.; Bates, M. D.; Dearry, A.; Falardeau, P.; Senogles, S. E.; Caron, M. G. (1990): Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. In: *Trends Pharmacol. Sci.* 11 (6), S. 231–236.

Angus, D. C.; Linde-Zwirble, W. T.; Lidicker, J.; Clermont, G.; Carcillo, J.; Pinsky, M. R. (2001): Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. In: *Crit. Care Med.* 29 (7), S. 1303–1310.

Applied Biosystems 11.2010 (2010): TaqMan® Gene Expression Assays Protocol (PN 4333458N).

Bannerman, D. D.; Sathyamoorthy, M.; Goldblum, S. E. (1998): Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins. In: *J. Biol. Chem.* 273 (52), S. 35371–35380.

Bellomo, R.; Chapman, M.; Finfer, S.; Hickling, K.; Myburgh, J. (2000): Low-dose dopamine in patients with early renal dysfunction: a placebo-controlled randomised trial. Australian and New Zealand Intensive Care Society (ANZICS) Clinical Trials Group. In: *Lancet* 356 (9248), S. 2139–2143.

Bersten, A. D.; Hersch, M.; Cheung, H.; Rutledge, F. S.; Sibbald, W. J. (1992): The effect of various sympathomimetics on the regional circulations in hyperdynamic sepsis. In: *Surgery* 112 (3), S. 549–561.

Blikslager, Anthony T.; Moeser, Adam J.; Gookin, Jody L.; Jones, Samuel L.; Odle, Jack (2007): Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. In: *Physiol. Rev.* 87 (2), S. 545–564.

Blondeau, Nicolas; Pétrault, Olivier; Manta, Stella; Giordanengo, Valérie; Gounon, Pierre; Bordet, Régis et al. (2007): Polyunsaturated fatty acids are cerebral vasodilators via the TREK-1 potassium channel. In: *Circ. Res.* 101 (2), S. 176–184.

Bolton, T. B.; Prestwich, S. A.; Zholos, A. V.; Gordienko, D. V. (1999): Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. In: *Annu. Rev. Physiol.* 61, S. 85–115.

Bone, R. C.; Sibbald, W. J.; Sprung, C. L. (1992): The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. In: *Chest* 101 (6), S. 1481–1483.

Bryan, R. M.; Joseph, B. K.; Lloyd, E.; Rusch, N. J. (2007): Starring TREK-1: The Next Generation of Vascular K⁺-Channels (2).

Ciesielski, L.; Modzelewski, B. (1995): Pathogenesis and treatment of multiorgan failure dysfunction syndrome in shock. In: *Rocz. Akad. Med. Białymst.* 40 (1), S. 13–24.

Colucci, M.; Balconi, G.; Lorenzet, R.; Pietra, A.; Locati, D.; Donati, M. B.; Semeraro, N. (1983): Cultured human endothelial cells generate tissue factor in response to endotoxin. In: *J. Clin. Invest.* 71 (6), S. 1893–1896.

Cotroneo, T. M.; Hugunin, Kelly M. S.; Shuster, K. A.; Hwang, H. J.; Kakaraparthi, B. N.; Nemzek-Hamlin, J. A. (2012): Effects of buprenorphine on a

cecal ligation and puncture model in C57BL/6 mice. In: *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 51 (3), S. 357–365.

Cronenwett, J. L.; Lindenauer, S. M. (1979): Direct measurement of arteriovenous anastomotic blood flow in the septic canine hindlimb. In: *Surgery* 85 (3), S. 275–282.

Cryer, H. M.; Garrison, R. N.; Kaebnick, H. W.; Harris, P. D.; Flint, L. M. (1987): Skeletal microcirculatory responses to hyperdynamic *Escherichia coli* sepsis in unanesthetized rats. In: *Arch. Surg.* 122 (1), S. 86–92.

Deitch, E. A. (1990): Bacterial translocation of the gut flora. In: *J Trauma* 30 (12 Suppl.), S. S184-9.

Dejager, L.; Pinheiro, I.; Dejonckheere, El; Libert, C. (2011): Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? In: *Trends Microbiol.* 19 (4), S. 198–208.

Dellinger, R. P.; Carlet, J. M.; Masur, H.; Gerlach, H.; Calandra, T.; Cohen, J. et al. (2004): Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. In: *Intensive Care Med* 30 (4), S. 536–555.

Ebelt, H.; Werdan, K. (2012): Septischer Kreislaufschock und septische Kardiomyopathie. In: *Med. Klin. Intensivmed. Notfmed (Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin)* 107 (1), S. 24–28.

Engel, C.; Brunkhorst, F. M.; Bone, H.-G.; Brunkhorst, R.; Gerlach, H.; Grond, S. et al. (2007): Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. In: *Int. Care Med. (Intensive care medicine)* 33 (4), S. 606–618.

Friedrich, J. O.; Adhikari, N.; Herridge, M. S.; Beyene, J. (2005): Meta-analysis: low-dose dopamine increases urine output but does not prevent renal dysfunction or death. In: *Ann. Intern. Med.* 142 (7), S. 510–524.

Gardener, M. J.; Johnson, I. T.; Burnham, M. P.; Edwards, G.; Heagerty, A. M.; Weston, A. H. (2004): Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries. In: *Br. J. Pharmacol.* 142 (1), S. 192–202.

Garry, A.; Fromy, B.; Blondeau, N.; Henrion, D.; Brau, F.; Gounon, P. et al. (2007): Altered acetylcholine, bradykinin and cutaneous pressure-induced vasodilation in mice lacking the TREK1 potassium channel: the endothelial link. In: *EMBO Rep.* 8 (4), S. 354–359.

Giraud, G. D.; MacCannell, K. L. (1984): Decreased nutrient blood flow during dopamine- and epinephrine-induced intestinal vasodilation. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 230 (1), S. 214–220.

Goldberg, L. I.; Rajfer, S. I. (1985): Dopamine receptors: applications in clinical cardiology. In: *Circulation* 72 (2), S. 245–248.

Goldstein, S. A. N.; Bayliss, D. A.; Kim, D.; Lesage, F.; Plant, L. D.; Rajan, S. (2005): International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. In: *Pharmacol. Rev.* 57 (4), S. 527–540.

Gurney, A.; Manoury, B. (2009): Two-pore potassium channels in the cardiovascular system. In: *Eur. Biophys. J.* 38 (3), S. 305–318.

Heid, C. A.; Stevens, J.; Livak, K. J.; Williams, P. M. (1996): Real time quantitative PCR. In: *Genome Res.* 6 (10), S. 986–994.

- Henrich, M.; Gruß, M.; Weigand, M.A (2012):** Haemodynamic changes during sepsis (part 1). In: *Anästhesiologie & Intensivmedizin* 2012;53(Jan): S.19.
- Henrich, Michael; Hoffmann, Karin; König, Peter; Gruss, Marco; Fischbach, Tamara; Gödecke, Axel; Hempelmann, Gunter; Kummer, Wolfgang; (2002):** Sensory neurons respond to hypoxia with NO production associated with mitochondria. In: *Mol. and Cell. Neurosci.* 20 (2) S. 307–322
- Henrich, Michael; König, Peter; Gruss, Marco; Fischbach, Tamara; Gödecke, Axel; Hempelmann, Gunter; Kummer, Wolfgang (2003):** Sensory neurons of rat and mice dorsal root ganglia respond to hypoxia with increased NO generation. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 536 S. 225–230
- Hiltebrand, L.B.; Krejci, V.; Sigurdsson, G. H. (2004):** Effects of dopamine, dobutamine, and dopexamine on microcirculatory blood flow in the gastrointestinal tract during sepsis and anesthesia. In: *Anesthesiol. (Anesthesiology)* 100 (5), S. 1188–1197.
- Hirota, M.; Ogawa, M. (1996):** [Immune response induced by surgical trauma]. In: *Nihon Geka Gakkai Zasshi* 97 (9), S. 721–725.
- Holland, P. M.; Abramson, R. D.; Watson, R.; Gelfand, D. H. (1991):** Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (16), S. 7276–7280.
- Holmes, C. L. (2005):** Vasoactive drugs in the intensive care unit. In: *Curr. Opin. Crit. Care (Current opinion in critical care)* 11 (5), S. 413–417.
- Holtzhauer, M. (1997):** Biochemische Labormethoden. Berlin u.a: Springer-Verlag, S. 4-23
- Inoue, M.; Harada, K.; Matsuoka, H.; Sata, T.; Warashina, A. (2008):** Inhibition of TASK1-like channels by muscarinic receptor stimulation in rat adrenal medullary cells. In *J. Neurochemistry* 106 (4), S. 1804-1814
- Jackson, W. F. (2000):** Ion channels and vascular tone. In: *Hypertension* 35 (1 Pt. 2), S. 173–178.
- Jackson, William F. (2005):** Potassium channels in the peripheral microcirculation. In: *Microcirculation* 12 (1), S. 113–127.
- Kebabian, J. W.; Calne, D. B. (1979):** Multiple receptors for dopamine. In: *Nature* 277 (5692), S. 93–96.
- Kemp, D. J.; Smith, D. B.; Foote, S. J.; Samaras, N.; Peterson, M. G. (1989):** Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (7), S. 2423–2427.
- Knowles, R. G.; Moncada, S. (1994):** Nitric oxide synthases in mammals. In: *Biochem. J.* 298 (Pt 2), S. 249–258.
- Lamprecht, G.; Heininger, A. (2012):** Neue Erkenntnisse zur Sepsis durch bakterielle Translokation. In: *Zentralbl. Chir.* 137 (03), S. 274–278.
- Landow, L.; Andersen, L. W. (1994):** Splanchnic ischaemia and its role in multiple organ failure. In: *Acta Anaesthesiol. Scand.* 38 (7), S. 626–639.

- Lehr, H. A.; Bittinger, F.; Kirkpatrick, C. J. (2000):** Microcirculatory dysfunction in sepsis: a pathogenetic basis for therapy? In: *J. Pathol.* 190 (3), S. 373–386.
- Lesage, F.; Guillemare, E.; Fink, M.; Duprat, F.; Lazdunski, M.; Romey, G.; Barhanin, J. (1996):** TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺-channel with a novel structure. In: *EMBO J.* 15 (5), S. 1004–1011.
- Levy, M.M.; Fink, M. P.; Marshall, J. C.; Abraham, E.; Angus, D.; Cook, D. et al. (2003):** 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. In: *Crit. Care Med.* 31 (4), S. 1250–1256.
- Lherm, T.; Troché, G.; Rossignol, M.; Bordes, P.; Zazzo, J. F. (1996):** Renal effects of low-dose dopamine in patients with sepsis syndrome or septic shock treated with catecholamines. In: *Intensive Care Med* 22 (3), S. 213–219.
- Mackmann, N. (2009):** The many faces of tissue factor. In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7, S. 136–139.
- Mandel, L. J.; Bacallao, R.; Zampighi, G. (1993):** Uncoupling of the molecular 'fence' and paracellular 'gate' functions in epithelial tight junctions. In: *Nature* 361 (6412), S. 552–555.
- Marik, P. E. (2002):** Definition of sepsis: not quite time to dump SIRS? In: *Crit. Care Med.* 30 (3), S. 706–708.
- Marshall, J. C.; Christou, N. V.; Meakins, J. L. (1993):** The gastrointestinal tract. The "undrained abscess" of multiple organ failure. In: *Ann. Surg.* 218 (2), S. 111–119.
- Matsuda, N.; Hattori, Y. (2007):** Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. In: *J Smooth Muscle Res.* 43 (4), S. 117–137.
- McGown, C. C.; Brookes, Z. L. S. (2007):** Beneficial effects of statins on the microcirculation during sepsis: the role of nitric oxide. In: *Br J Anaesth* 98 (2), S. 163–175.
- Meier-Hellmann, A.; Reinhart, K. (1995):** Effects of catecholamines on regional perfusion and oxygenation in critically ill patients. In: *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 107, S. 239–248.
- Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. (1991):** Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. In: *Pharmacol. Rev.* 43 (2), S. 109–142.
- Monsma, F. J.; Mahan, L. C.; McVittie, L. D.; Gerfen, C. R.; Sibley, D. R. (1990):** Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (17), S. 6723–6727.
- Morris, S. M.; Billiar, T. R. (1994):** New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. In: *Am. J. Physiol.* 266 (6 Pt 1), S. E829–39.
- Mullis, K. B.; Faloona, F. A. (1987):** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: *Meth. Enzymol.* 155, S. 335–350.
- Navaratnam, R. L.; Morris, S. E.; Traber, D. L.; Flynn, J.; Woodson, L.; Linares, H.; Herndon, D. N. (1990):** Endotoxin (LPS) increases mesenteric vascular resistance (MVR) and bacterial translocation (BT). In: *J Trauma* 30 (9), S. 1104–13; discussion 1113–5.

- Nelson, M. T.; Quayle, J. M. (1995):** Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. In: *Am. J. Physiol.* 268 (4 Pt 1), S. C799-822.
- O'Brien, A. J.; Thakur, G.; Buckley, J. F.; Singer, M.; Clapp, L. H. (2005):** The pore-forming subunit of the K(ATP) channel is an important molecular target for LPS-induced vascular hyporeactivity in vitro. In: *Br. J. Pharmacol.* 144 (3), S. 367–375.
- Olschewski, A.; Li, Y.; Tang, B.; Hanze, J.; Eul, B.; Bohle, R. M. et al. (2006):** Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. In: *Circ. Res.* 98 (8), S. 1072–1080.
- Osterud, B.; Flaegstad, T. (1983):** Increased tissue thromboplastin activity in monocytes of patients with meningococcal infection: related to an unfavourable prognosis. In: *Thromb. Haemost.* 49 (1), S. 5–7.
- Parkington, H. C.; Coleman, H. A.; Tare, M. (2004):** Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. In: *Pharmacol. Res.* 49 (6), S. 509–514.
- Pfeil, U.; Kuncova, J.; Brüggmann, D.; Paddenberger, R.; Rafiq, A.; Henrich, M. et al. (2014):** Intrinsic vascular dopamine - a key modulator of hypoxia-induced vasodilation in splanchnic vessels. In: *J. Physiol. (Lond.)*; 592 (Pt 8): S. 1745-56
- Pogorzelska, E.; Dzieniszewski, J.; Regula, A.; Kafel, S. (1990):** Modification of the test for determining bacterial capacity for nitrate reduction. In: *Rocz Panstw Zakl Hig.* 41 (1-2) S. 58-62
- Powell, T.; Terrar, D. A.; Twist, V. W. (1980):** Electrical properties of individual cells isolated from adult rat ventricular myocardium. In: *J. Physiol. (Lond.)* 302, S. 131–153.
- Rabuel, C.; Mebazaa, A. (2006):** Septic shock: a heart story since the 1960s. In: *Int. Care Med. (Intensive care medicine)* 32 (6), S. 799–807.
- Refsum, S. E.; Halliday, M. I.; Campbell, G.; McCaigue, M.; Rowlands, B. J.; Boston, V. E. (1996):** Modulation of TNF alpha and IL-6 in a peritonitis model using pentoxifylline. In: *J. Pediatr. Surg.* 31 (7), S. 928–930.
- Rittirsch, D.; Flierl, M. A.; Ward, P. A. (2008):** Harmful molecular mechanisms in sepsis. In: *Nat. Rev. Immunol.* 8 (10), S. 776–787.
- Rittirsch, D.; Huber-Lang, M. S.; Flierl, M. A.; Ward, P. A. (2009):** Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. In: *Nat. Protoc.* 4 (1), S. 31–36.
- Rodrigo, Manoj C.; Martin, Douglas S.; Redetzke, Rebecca A.; Eyster, Kathleen M. (2002):** A method for the extraction of high-quality RNA and protein from single small samples of arteries and veins preserved in RNAlater. In: *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 47 (2), S. 87–92.
- Rudyk, O.; Phinikaridou, A.; Prysyazhna, O.; Burgoyne, J. R.; Botnar, R. M.; Eaton, P. (2013):** Protein kinase G oxidation is a major cause of injury during sepsis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (24), S. 9909–9913.
- Salkoff, L.; Jegla, T. (1995):** Surfing the DNA databases for K⁺-channels nets yet more diversity. In: *Neuron* 15 (3), S. 489–492.
- Schottmüller, Hugo:** Verhandlungen 31. Deutschen Kongresses für Innere Medizin. Band 31, 1914, S. 257–280

- Shen, L.; Su, L.; Turner, J. R. (2009):** Mechanisms and Functional Implications of Intestinal Barrier Defects. In: *Dig. Dis.* 27 (4), S. 443–449.
- Taylor, C. T.; Dzus, A. L.; Colgan, S. P. (1998):** Autocrine regulation of epithelial permeability by hypoxia: role for polarized release of tumor necrosis factor alpha. In: *Gastroenterol* 114 (4), S. 657–668.
- Tiruppathi, C.; Naqvi, T.; Sandoval, R.; Mehta, D.; Malik, A. B. (2001):** Synergistic effects of tumor necrosis factor-alpha and thrombin in increasing endothelial permeability. In: *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 281 (4), S. L958-68.
- Titheradge, M. A. (1999):** Nitric oxide in septic shock. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1411 (2-3), S. 437–455.
- van den Berghe, G.; Zegher, F. de (1996):** Anterior pituitary function during critical illness and dopamine treatment. In: *Crit. Care Med.* 24 (9), S. 1580–1590.
- Villa, P.; Sartor, G.; Angelini, M.; Sironi, M.; Conni, M.; Gnocchi, P. et al. (1995):** Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. In: *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2 (5), S. 549–553.
- Vincent, J.-L.; Sakr, Y.; Sprung, C. L.; Ranieri, V. M.; Reinhart, K.; Gerlach, H. et al. (2006):** Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. In: *Crit. Care Med.* 34 (2), S. 344–353.
- Wang, L.; Henrich, M.; Buckler, K. J.; McMenamin, M.; Mee, C. J.; Sattelle, D. B.; Paterson, D. J. (2007):** Neuronal nitric oxide synthase gene transfer decreases $[Ca^{2+}]_i$ in cardiac sympathetic neurons. In: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 43 (6), S. 717–725.
- Webb, R. Clinton (2003):** Smooth muscle contraction and relaxation. In: *Adv. Physiol. Educ.* 27 (1-4), S. 201–206.
- Wichterman, K. A.; Baue, A. E.; Chaudry, I. H. (1980):** Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. In: *J. Surg. Res.* 29 (2), S. 189–201.
- Wu, C. C.; Chen, S. J.; Garland, C. J. (2004):** NO and KATP channels underlie endotoxin-induced smooth muscle hyperpolarization in rat mesenteric resistance arteries. In: *Br. J. Pharmacol.* 142 (3), S. 479–484.
- Yoshizumi, M.; Perrella, M. A.; Burnett, J. C.; Lee, M. E. (1993):** Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. In: *Circ. Res.* 73 (1), S. 205–209.

Erklärung zur Dissertation:

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, sowie alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13 Publikation und Förderung

Veröffentlichung:

Bieling F, Uhle F, Weissmüller K, Weigand MA, Henrich M.: Sepsis varies arterial two-pore-domain potassium channel messenger RNA in mice.; J. Surg. Res. 2015 Feb;193(2):816-24

Posterpräsentation:

Bieling F., Uhle F., Weigand M.A. und Henrich M.: Changes in the expression of potassium channels in the murine mesenteric artery under septic conditions; Deutsches Zentrum für Infektionsforschung, Auftakttreffen zur Forschungsk Kooperation Gießen-Marburg-Langen, Gießen 2013

Bieling F., Weissmüller K., Uhle F., Weigand M.A. und Henrich M.: Expression von Kaliumkanälen in der Arteria mesenterica der Maus unter Sepsis; Deutscher Interdisziplinärer Kongress für Intensivmedizin und Notfallmedizin (DIVI), Leipzig 2013

Förderung:

Diese Arbeit wurde durch ein Kurzzeitstipendium des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung (DZIF) gefördert.

14 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Henrich D. Phil. für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas, die wissenschaftliche Unterstützung und die auch darüber hinausgehende Betreuung während der ganzen Entstehungszeit dieser Arbeit bedanken.

Ich danke auch dem Laborteam unter der Leitung von Dipl.-Biol. Florian Uhle, der mich immer methodisch mitbetreut hat, den wissenschaftlichen Mitarbeitern im Labor Dipl.-Biol. Astrid Schulte, Dipl.-Bioinf. Sandra Natascha Ullsperger und MTLA Ilona Magel für die Unterstützung und schöne Zeit im Labor.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und besonders meinen Eltern für die unermüdliche, lebenslange Unterstützung, ohne die das Medizinstudium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.

