

**Die essentielle Bedeutung des
„Classical Transient Receptor Potential 6“ (TRPC6)-Ionenkanals
für die akute vaskuläre Hypoxiereaktion
der Lunge - Untersuchungen an isolierten pulmonalarteriellen
glatten Muskelzellen**

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

vorgelegt von
Beate Fuchs
aus Dillenburg

Gießen 2006

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik und Poliklinik II

Direktor: Prof. Dr. W. Seeger
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Herr Prof. Dr. W. Seeger

Gutachter: Frau PD Dr. V. Grau

Tag der Disputation: 16.03.2007

Inhalt

Abkürzungen.....	1
1 Einleitung	3
1.1 Anatomie und Physiologie der Lunge.....	3
1.2 Hypoxische Pulmonale Vasokonstriktion (HPV)	4
1.3 Hypothesen zum Mechanismus der HPV	5
1.4 Einfluss des Endothels auf die HPV	6
1.5 Die Rolle der Ca ²⁺ -Kanäle im Hypoxie-induzierten Signaltransduktionsweg	7
1.6 Klassischer „Transient Receptor Potential“ TRPC6-Ionenkanal	8
1.7 Zielsetzung der vorliegenden Untersuchungen.....	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Isolierung und Kultivierung glatter Muskelzellen (SMC)	10
2.1.1 Isolierung der pulmonalarteriellen SMC (PASMC) aus Ratten.....	10
2.1.2 Isolierung der PASMC aus Mäusen.....	13
2.1.3 Zellkultivierung der PASMC	14
2.1.4 Isolierung und Kultivierung der aortalen SMC aus Mäusen.....	15
2.2 Charakterisierung der PASMC	16
2.2.1 Immunohistochemische Untersuchung zur Isolierung der PASMC	16
2.2.2 Immunofluoreszenzfärbung der PASMC.....	18
2.2.3 Western-Blot	20
2.3 Messung der Kontraktion der PASMC der Ratte.....	22
2.3.1 Experimenteller Aufbau	22
2.3.2 Experimenteller Ablauf.....	24
2.3.2.1 Experimente ohne Perfusion	24
2.3.2.2 Experimente mit Perfusion.....	25
2.3.3 Auswertung	25
2.4 Messung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration ([Ca ²⁺] _i) in PASMC der Ratte	26
2.4.1 Prinzip der Messmethode.....	26
2.4.2 Experimenteller Aufbau	28
2.4.3 Experimenteller Ablauf.....	28
2.4.3.1 Experimente ohne Perfusion	29
2.4.3.2 Experimente mit Perfusion.....	29

2.4.4 Auswertung	29
2.5 Untersuchungen zur Hypoxie-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in PASMC der Maus	30
2.5.1 Prinzip der Messmethode	30
2.5.2 Infektion von PASMC aus TRPC6-defizienten Mäusen mit einem viralen TRPC6-GFP (Grün Fluoreszierendes Protein)-Konstrukt	31
2.5.3 Experimenteller Aufbau	31
2.5.4 Experimenteller Ablauf	32
2.5.4.1 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ der PASMC nach Applikation von Endothelin-1 (ET-1).....	32
2.5.4.2 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ unter Hypoxie und der Einfluß des TRPC6-Kanals auf die Hypoxieantwort.....	32
2.5.4.3 Untersuchung der Ursache für den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ unter Hypoxie	33
2.5.4.4 Untersuchungen zur TRPC6-Kanalaktivierung	34
2.5.4.5 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ aortaler SMC unter Hypoxie	35
2.5.5 Auswertung	35
2.6 Messung der normobaren Sauerstoffkonzentration des hypoxischen Perfusats	36
2.7 Statistik.....	37
3 Ergebnisse	38
3.1 Charakterisierung der PASMC der Ratte	38
3.1.1 Immunohistochemische Untersuchung zur Isolierung der PASMC	38
3.1.2 Immunofluoreszenzfärbung der PASMC.....	40
3.1.3 Western-Blot	50
3.2 Messung der normobaren Sauerstoffkonzentration des hypoxischen Perfusats	51
3.3 Messung der Kontraktion der PASMC der Ratte.....	52
3.3.1 Effekt von ET-1 auf die PASMC	52
3.3.2 Effekt von Hypoxie auf die PASMC	53
3.4 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in PASMC der Ratte	55
3.4.1 Einfluß der Zellpassage auf die ET-1-Antwort.....	55
3.4.2 Etablierung des Perfusionssystems	58
3.5 Untersuchungen zur Hypoxie-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in PASMC der Maus	60
3.5.1 Immunofluoreszenzfärbung der PASMC der Maus.....	60

3.5.2	Reaktion der PASMC auf ET-1	64
3.5.3	Messung der $[Ca^{2+}]_i$ unter Hypoxie und der Einfluß des TRPC6-Kanals auf die Hypoxieantwort.....	65
3.5.4	Untersuchung der Ursache für den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ unter Hypoxie	69
3.5.5	Untersuchungen zur TRPC6-Kanalaktivierung	73
3.5.6	Messung der $[Ca^{2+}]_i$ aortaler SMC unter Hypoxie.....	76
4	Diskussion.....	77
4.1	Charakterisierung der PASMC der Ratte	77
4.1.1	Immunohistochemische Untersuchung zur Isolierung der PASMC	78
4.1.2	Immunofluoreszenzfärbung der PASMC.....	78
4.1.3	Western-Blot	79
4.2	Messung der Kontraktion der PASMC der Ratte.....	80
4.3	Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in PASMC der Ratte	82
4.3.1	Einfluß der Zellpassage auf die ET-1-Antwort.....	83
4.3.2	Etablierung des Perfusionssystems	84
4.4	Untersuchungen zur Hypoxie-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in PASMC der Maus	85
4.4.1	Immunofluoreszenzfärbung der PASMC der Maus.....	85
4.4.2	Reaktion der PASMC auf ET-1	85
4.4.3	Einfluß des ET-1-„Primings“ auf die Hypoxieantwort.....	86
4.4.4	Die Rolle der Ca^{2+} -Kanäle und des TRPC6-Kanals für die Hypoxieantwort	88
4.4.4.1	Einfluß des TRPC6-Kanals auf die Hypoxieantwort	89
4.4.4.2	Die Rolle der internen Ca^{2+} -Speicher für die Hypoxieantwort.....	90
4.4.4.3	Die Rolle der membranständigen Ionenkanäle für die Hypoxieantwort.....	91
4.4.5	Untersuchungen zur TRPC6-Kanalaktivierung	93
4.4.6	Messung der $[Ca^{2+}]_i$ aortaler SMC unter Hypoxie.....	96
4.4.7	Zusammenfassende Abschlußbetrachtung zum Mechanismus der HPV.....	97
5	Literaturverzeichnis	99
6	Zusammenfassung	109
	Veröffentlichungen des Autors.....	113
	Lebenslauf	115
	Danksagung.....	116

Abkürzungen

AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzenesulphonyl fluorid	Bovines Serumalbumin
BSA	Bovines Serumalbumin	
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration	
DAG	Diacylglycerin	
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DPBS	Dulbecco's Phosphat Buffered Saline (Phosphatpufferlösung)	
EGTA	Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid	
ET-1	Endothelin-1	
ETC	Elektronentransportkette	
FCS	Fetales Kälberserum	
FITC	fluorescein isothiocyanate	
g	Gramm	
x g	x Erdbeschleunigung	
G	Gauge	
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein	
HEK-Zellen	Human embryonic kidney-Zellen (humane embryonale Nierenzellen)	
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	
HPV	Hypoxische Pulmonale Vasokonstriktion	
I.E.	Internationale Einheiten	
IP ₃	Inositoltrisphosphat	
kg	Kilogramm	
K _v -Kanal	voltage-dependend (spannungsabhängiger) Kaliumkanal	
l	Liter	
M	Molar	
ml	Milliliter	
mM	Millimolar	
μM	Mikromolar	
nM	Nanomolar	
MnCl ₂	Manganchlorid	
n	Anzahl der Einzelexperimente	
NaCl	Natriumchlorid	
O ₂ ^{·-}	Superoxidradikal	
O ₂	Sauerstoff	
P0, P1, P3	Passage 0, Passage 1, Passage 3	
PASMC	pulmonalarterielle glatte Muskelzellen	
PBS	Phosphatpufferlösung	
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck	
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat	
PKC	Proteinkinase C	
PLC	Phospholipase C	
ROC	receptor-operated channel (Rezeptor-operierter Kanal)	
ROS	reaktive Sauerstoffspezies	
rpm	Umdrehungen pro Minute	
SEM	standard error of mean (Standardfehler)	
SM	smooth muscle (glattmuskulär)	
SMC	smooth muscle cell (glatte Muskelzelle)	
SM-α-Aktin	α-smooth muscle actin (glattmuskuläres α-Aktin)	

SM-MHC	smooth muscle myosin heavy chain (glattmuskuläre schwere Kette des Myosins)
SOC	store-operated channel (Speicher-aktivierter Kanal)
t-BHP	tertiäres Butyl-Wasserstoffperoxid
TRP	transient receptor potential
U	Units
vWF	von Willebrand factor (von Willebrand Faktor)
VOCC	voltage-operated Ca ²⁺ channel (spannungsabhängiger L-Typ Kalziumkanal)
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie der Lunge

Die Lunge der Säuger besteht in ihrem äußeren Aufbau aus zwei Lungenflügel, wobei der rechte humane Lungenflügel aus drei und der linke aus zwei Lungenlappen besteht, die wiederum in Lungensegmente unterteilt werden. Die Luftleitung in der Lunge erfolgt über die Bronchien, die sich fortlaufend verzweigen und den sogenannten Bronchialbaum bilden, und endet in den Alveolen, in denen der Gasaustausch stattfindet. Die Endverzweigungen des Bronchialbaums (Bronchioli terminales) teilen sich in mehrere kleine Äste auf, die in Alveolengänge münden. Jeder Alveolengang führt dann in ein Alveolarsäckchen, in denen die Alveolen dicht nebeneinander angeordnet sind^{20, 25}. Die Lungenbläschen, die von einem Bronchiolus terminalis aus versorgt werden, bilden gemeinsam den sogenannten Acinus. Parallel zu den Bronchien verlaufen die pulmonalarteriellen Blutgefäße des Lungenkreislaufs, die sich auch immer weiter aufteilen bis sie schließlich ein ausgedehntes Kapillarnetz um die Alveolen bilden. Blutgefäße bestehen grundsätzlich aus drei Schichten, wobei die einzelnen Schichten bei Arterien und Venen unterschiedlich aufgebaut sind. Die innere Schicht (Tunica intima) besteht aus einschichtigen Endothelzellen, die mittlere Schicht (Tunica media) vor allem aus glatten Muskelzellen und elastischen Fasern und schließlich die äußere Schicht (Tunica adventitia) überwiegend aus Fibroblasten. Bei Arterien findet sich zusätzlich zwischen den drei Schichten jeweils noch eine elastische Membran (Membrana elastica interna und Membrana elastica externa). Arterien besitzen außerdem eine dickere Muskelschicht als Venen, um gefäßmotorische Funktionen wahrzunehmen. Durch Veränderung des Gefäßdurchmessers infolge einer Vasodilatation bzw. Vasokonstriktion kann der Blutstrom reguliert und gesteuert werden. Im Vergleich zu Arterien bestehen Kapillaren nur aus einer Schicht, der Tunica intima, um den Gasaustausch durch die so verkürzte Diffusionsstrecke zu erleichtern. Bei Venen ist die Dreischichtung der Gefäßwand nicht so stark ausgeprägt wie bei Arterien, und sie besitzen insgesamt ein größeres Lumen. Außerdem haben die meisten Venen Venenklappen^{20, 25}.

Das venöse Blut des Körperkreislaufs gelangt zum rechten Vorhof des Herzens und wird über den rechten Ventrikel in die Pulmonalarterie gepumpt. Nach Anreicherung des Blutes mit Sauerstoff in den Kapillaren der Lunge strömt das Blut über die Lungenvenen zurück zum Herzen in den linken Vorhof und wird schließlich über die Aorta in den

Körperkreislauf gepumpt. Der Gasaustausch in den Kapillaren dient nicht nur der Anreicherung des Blutes mit Sauerstoff, sondern auch der Abgabe von Kohlendioxid in den Alveolarraum. Die treibende Kraft für die Diffusion der Atemgase liegt in den Partialdruckunterschieden zwischen den Alveolen und dem Blut. Im venösen Blut der Pulmonalarterie liegt der Partialdruck für Sauerstoff etwa bei 40 mmHg und für Kohlendioxid bei etwa 46 mmHg, während in den Alveolen der Partialdruck für Sauerstoff etwa bei 100 mmHg und für Kohlendioxid bei etwa 40 mmHg liegt. Nach Angleichen der Partialdrücke von Blut und Alveolarraum beträgt im arteriellen Blut der Sauerstoffpartialdruck ca. 100 mmHg und der Kohlendioxidpartialdruck ca. 40 mmHg^{20, 25}.

1.2 Hypoxische Pulmonale Vasokonstriktion (HPV)

Eine angemessene Sauerstoffversorgung ist für alle höheren Lebewesen und damit auch für den Menschen von essentieller Bedeutung, da Sauerstoff zum einen als Oxidationsmittel eine wichtige Rolle bei der Energiegewinnung zur Bildung von ATP in den Mitochondrien spielt und zum anderen auch als Substrat an verschiedenen enzymatischen Prozessen beteiligt ist⁴⁸. Da der Sauerstoffversorgung des Körpers eine so gravierende Bedeutung zukommt, ist eine Optimierung des Gasaustauschs in der Lunge besonders wichtig. In diesem Zusammenhang nimmt die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) eine wichtige Rolle ein, die als physiologische Antwort der Lunge auf alveoläre Hypoxie wegen der sich ständig ändernden lokalen Ventilationsbedingungen die Perfusion des Blutes an die Ventilation anpasst. Sinkt der Sauerstoffpartialdruck in den Alveolen, bewirkt dies eine Erhöhung des präkapillären Gefäßtonus in diesem Lungenbereich. Die so erzielte Drosselung der Durchblutung minderbelüfteter Lungenareale leitet den Blutfluß in besser ventilerte Lungenbezirke, d.h. solche mit höherem alveolären Sauerstoffangebot. Dadurch wird der Gasaustausch optimiert und einer arteriellen Hypoxämie entgegengewirkt^{21, 71, 101}. Die HPV wurde erstmals 1946 als Grund für den Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks bei alveolärer Hypoxie von von Euler und Liljestrand beschrieben¹⁸. Seitdem wird kontinuierlich versucht, den der HPV zugrundeliegenden Mechanismus zu erfassen.

Der HPV kommt nicht nur im physiologischen, sondern auch im pathophysiologischen Zustand eine wichtige Rolle zu. Eine chronische alveoläre Hypoxie, wie sie bei verschiedenen Krankheiten (z.B. COPD (chronic obstructive pulmonary disease), Pneumonie, Fibrose) aber auch durch Aufenthalt in der Höhe auftritt, führt aufgrund eines generalisiert und permanent erhöhten Gefäßwiderstandes zum Anstieg des

pulmonalarteriellen Drucks und schließlich zur pulmonalen Hypertonie und einem vaskulären Gefäßumbauprozess^{24, 37, 86, 89}.

Die HPV wird schon durch eine leichte Hypoxie, d.h. bei einem alveolären Sauerstoffpartialdruck von etwa 80 mmHg, ausgelöst und ihre Intensität hängt von der Stärke und Dauer der alveolären Hypoxie ab^{31, 115, 115}. Insgesamt kann die HPV in drei Phasen unterteilt werden: 1. die akute alveoläre Hypoxie (Sekunden bis Minuten), 2. die protrahierte alveoläre Hypoxie (Stunden), die zu den chronischen Hypoxieprozessen überleitet und 3. die chronische Hypoxie, die die pulmonale Hypertonie und einen Gefäßumbau bewirkt¹¹⁴. Obwohl verschiedene Faktoren wie Spezies, Alter, Geschlecht, pH-Wert, pCO₂ und auch die verwendete Forschungsmethode die Charakteristika und Stärke der HPV beeinflussen, besteht trotzdem ein grundsätzlicher Mechanismus, der von diesen Faktoren unabhängig und hoch konserviert zu sein scheint^{16, 21, 73, 101}.

1.3 Hypothesen zum Mechanismus der HPV

Die Bedeutung der HPV ist schon lange bekannt¹⁸, aber dennoch konnte der zugrundeliegende Mechanismus des Sauerstoffsensors und des Signaltransduktionsweges, der schließlich zur Kontraktion der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) in den präkapillären Widerstandsgefäßen im Eingangsbereich des Acinus führt, noch nicht umfassend ergründet werden^{11, 33, 38, 114}. Bei der Frage nach dem Sensor der HPV, zeigten Untersuchungen, dass isolierte PASMC mit einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) und einer Kontraktion auf Hypoxie reagierten. Dies zeigt, dass PASMC zugleich Sensor- als auch Effektorzelle - zumindest für die akute Hypoxie - sind¹¹⁴. Interessanterweise zeigten sich dabei aber Unterschiede in der Stärke der Hypoxieantwort zwischen PASMC aus dem distalen und proximalen Bereich. Denn die PASMC aus dem distalen Bereich (200 bis 700 µm Gefäßinnendurchmesser) zeigten eine deutlich stärkere Kontraktion als PASMC aus dem proximalen Bereich (> 800 µm bzw. 5-10 mm Gefäßinnendurchmesser)^{51, 88}.

Als Sauerstoffsensor der HPV werden verschiedene Sensoren diskutiert. Dazu gehören in besonderer Weise die mitochondriale Atmungskette, NAD(P)H-Oxidase, die ADP-Ribosecyclase und cADP-Ribose-Hydrolase, Cytochrom P450-Enzyme und die Hämoxigenase-2. Daneben kommen als Mediatoren des Signaltransduktionsweges ebenfalls verschiedene Kandidaten in Frage: Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), das zelluläre Redoxpotential, die ADP-Ribose-Konzentration, cGMP und Kohlenmonoxid. Die

verschiedenen Hypothesen bezüglich des Mechanismus der HPV werden in der Diskussion dieser Arbeit (Kapitel 4) näher erläutert.

1.4 Einfluss des Endothels auf die HPV

Neben einem direkten Effekt der Hypoxie auf die PASMC wird auch ein indirekter Effekt über die Freisetzung von Faktoren des Endothels diskutiert. Denn es konnte gezeigt werden, dass die HPV ohne das Vorhandensein des Endothels teilweise oder sogar komplett fehlte^{34, 41, 79, 82}. Allerdings fanden andere Autoren keine oder nur kleine Effekte auf die HPV nach Entfernung des Endothels^{7, 68, 125}. Somit bleibt die Rolle des Endothels für die Hypoxieantwort umstritten. Allerdings wird nur für die protrahierte Phase eine Endothelabhängigkeit diskutiert, während die akute Phase endothelunabhängig ist^{104, 109}.

Interessanterweise scheint Endothelin-1 (ET-1), ein u.a. aus dem Endothel freigesetztes, stark vasokonstriktiv wirkendes Peptid, das aus 21 Aminosäuren aufgebaut ist⁸⁹, an der HPV beteiligt zu sein. Denn in distalen Pulmonalarterien konnte die HPV einerseits sowohl durch Entfernung des Endothels als auch durch BQ123, einen ET-1-Rezeptor-Agonisten, verhindert und andererseits nach Entfernung des Endothels durch Zugabe einer Mindestkonzentration von ET-1 wiederhergestellt werden⁴⁷. Außerdem konnte die HPV in intakten Tieren durch die Applikation eines ET-1-Rezeptorantagonisten inhibiert werden⁷⁰. Sham et al.⁸⁸ hingegen zeigte nur eine Verstärkung der Hypoxie, wenn die PASMC vor der Hypoxiephase mit einer geringen Konzentration des ET-1 vorstimuliert wurden. In diesen Untersuchungen bewirkte ET-1 somit nur eine Sensibilisierung der PASMC für Hypoxie, das nachfolgend als „Primen“ bezeichnet wird.

Die genaue Relevanz und der Mechanismus des Effekts von ET-1 für die HPV ist noch unklar⁸⁹. Grundsätzlich gibt es in den pulmonalen Gefäßen zwei verschiedene ET-1-Rezeptor-Typen, ET_A und ET_B. Beide sind in den vaskulären SMC vorhanden und vermitteln eine Vasokonstriktion^{39, 54, 85}. Der ET-1-Signalweg beinhaltet dabei die Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) in Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) spaltet. Die durch DAG vermittelte Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) bewirkt eine Membrandepolarisation durch Inhibition der spannungsabhängigen Kaliumkanäle oder durch Aktivierung der Ca²⁺-abhängigen Kaliumkanälen, was zum Ca²⁺-Einstrom durch aktivierte spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle und einem Anstieg der [Ca²⁺]_i führt. Eine Verstärkung des Effekts kann durch Ca²⁺-aktivierte Kaliumkanäle und eine Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern

bewirkt werden. Es gibt ebenfalls Hinweise, dass eine basale ET-1-Menge die Aktivität ATP-sensitiver Kaliumkanäle in isolierten Lungen komplett herabsetzt, das dann zur Membrandepolarisation der PASMOC beiträgt⁸⁹.

1.5 Die Rolle der Ca^{2+} -Kanäle im Hypoxie-induzierten Signaltransduktionsweg

Die HPV ist mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in den PASMOC verknüpft¹⁰⁶. Eine weit verbreitete Hypothese ist, dass nach Inhibition der spannungsabhängigen Kaliumkanäle (K_V -Kanäle)^{4, 72, 77, 99} und der damit verknüpften Membrandepolarisierung ein Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (VOCC) die vasokonstriktive Antwort der HPV auslöst^{3, 69, 89, 112}. Gegen diese Hypothese spricht allerdings, dass L-Typ Ca^{2+} -Kanalblocker keine oder nur eine teilweise HPV-Blockierung auslösten. Dies bedeutet aber nicht zwangsläufig, dass VOCC keine Rolle für die Regulation der HPV spielen, da andere Untersuchungen zeigten, dass Hypoxie ohne ein „Priming“ keine ausreichende Membrandepolarisierung für die Aktivierung der VOCC verursachen kann^{88, 99}. Somit bleibt die Rolle der VOCC für die HPV umstritten.

Nichtsdestotrotz ging aus vielen Studien hervor, dass extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen bei der HPV eine wichtige Rolle spielen, da ohne extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen oder durch Blockierung des Ca^{2+} -Einstroms der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ deutlich reduziert oder verhindert wurde^{10, 43, 56, 81, 84, 100}. In diesem Zusammenhang schlugen besonders Robertson et al. als weitere Hypothese vor, dass Hypoxie einen spannungsunabhängigen Ca^{2+} -Einstrom durch nicht-selektive Kationenkanäle aktiviert^{81, 82}. Somit scheint ein Ca^{2+} -Einstrom durch die Zellmembran für die Hypoxieantwort wichtig zu sein, was aber eine gleichzeitige Rolle von intrazellulären Ca^{2+} -Speichern für die Regulation der HPV nicht ausschließt. Denn auch eine Hypoxie-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern als Voraussetzung für die HPV wird diskutiert^{15, 36, 62}, die Speicher-aktivierte Kanäle (SOC) und einen kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom aktivieren soll¹⁰⁵. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Hypoxie einen kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom nach einer Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern aktiviert und dadurch $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sowohl in frisch isolierten als auch kultivierten PASMOC erhöht^{66, 103}. Diese Hypothese wird weiterhin dadurch gestützt, dass pharmakologische Substanzen, die den kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom blockieren, aber bei den verwendeten Konzentrationen nicht die VOCC beeinflussen, die HPV stark inhibierten

¹⁰⁵. Dies war ein erster Hinweis dafür, dass bei der HPV ein kapazitiver Ca^{2+} -Einstrom oder zumindest eine Aktivierung der nicht-selektiven Kationenkanäle, die durch dieselben pharmakologischen Substanzen wie der kapazitative Ca^{2+} -Einstrom blockiert werden können, eine wichtige Rolle spielen. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Blockade sowohl des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms als auch der VOCC die hypoxische Druckantwort verhinderte ¹¹⁰. Dies spricht für ein Zusammenspiel der beiden Wege bei der Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, die für eine Vasokonstriktion im Rahmen der HPV erforderlich ist. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Speicher-aktivierten Kanäle und andere nicht-selektiven Kanäle durch homo- oder heteromultimere TRP (transient receptor potential)-Proteine gebildet werden ¹⁰⁵, auf die im nächsten Kapitel näher eingegangen wird.

1.6 Klassischer „Transient Receptor Potential“ TRPC6-Ionenkanal

Der zuerst in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckte TRP (transient receptor potential)-Ionenkanal eröffnete die Möglichkeit, neue TRP-Familien auch in Säugetieren zu identifizieren. Insgesamt sind inzwischen sechs TRP-Familien in Säugetieren identifiziert worden. So gibt es neben der TRPC-Familie (C steht für „classical“ or „canonical“) noch die TRPM (M steht für Melastatin), TRPV (V steht für Vanilloid), TRPP (P steht für „polycystic kidney disease“), TRPA (A steht für Ankyrin Domäne) und die TRPML (ML steht für Mucolipin) Familie ^{67, 78}.

TRPC6 gehört zur TRPC-Familie und ist ein nicht-selektiver Kationenkanal. Im besonderen Maße wird TRPC6 im Lungengewebe exprimiert, wo ihm eine wichtige Rolle in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen zukommen könnte. Denn einige Untersuchungen haben gezeigt, dass TRPC6 eine essentielle Komponente der nicht-selektiven Kationenkanäle in glatten Muskelzellen ist ^{12, 13, 14}. Im Zusammenhang mit der HPV wird auch über die Beteiligung von TRP-Kanälen am Signaltransduktionsweg spekuliert ¹⁰⁶, obwohl hierfür bisher keine Beweise vorliegen.

Wie bei allen TRP-Kanälen stellt sich auch bei den TRPC6-Kanälen die Frage nach der Regulation ihrer Aktivität. Zur Zeit werden besonders zwei Mechanismen diskutiert: Speicher-aktivierter und Rezeptor-operierter Ca^{2+} -Einstrom. Untersuchungen des TRPC6-Kanals zeigten, dass dieser ein Rezeptor-aktivierter Kationenkanal (ROC) mit einer minimalen Basalaktivität ist, der unabhängig von einer PKC-Aktivierung durch DAG stimuliert werden kann ^{12, 14}. Darüberhinaus konnte auch eine Sensitivität des TRPC6-Kanals gegenüber dem Arachidonsäuremetabolit 20-Hydroxyeicosatetraenoic Säure

festgestellt werden. Einen weiteren stimulierenden Einfluss auf die Kanalaktivität von TRPC6 konnte durch Ca^{2+} /Calmodulin ausgelöst werden^{12,14}.

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Untersuchungen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der HPV auf der Ebene der PASMC. Dafür sollte zunächst eine Methode zur Isolierung der PASMC aus der Ratte in Anlehnung an eine bereits veröffentlichte Methode¹⁰⁷ etabliert und die kultivierten PASMC mit Hilfe der Immunofluoreszenzmethode und des Western Blots charakterisiert werden. Zur Etablierung einer Methode für die Untersuchung der HPV auf der Ebene der PASMC sollten zwei verschiedene Methoden miteinander verglichen werden, zum einen die Messung der Kontraktion, bei der die Fläche der PASMC als Messparameter diente, und zum anderen die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) durch den Ca^{2+} -Indikator Fura-2 AM, da eine Kontraktion mit dem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verknüpft ist. Dabei sollte ET-1 als positiver, vasokonstriktiv wirkender Stimulus eingesetzt werden. Zur Optimierung der Versuchsbedingungen hinsichtlich der zu verwendenden Zellpassage sollte zusätzlich die ET-1-Antwort der PASMC aus verschiedenen Passagen miteinander verglichen werden, da bekannt ist, dass die Zellen sich durch das Kultivieren funktionell verändern können. In einem zweiten Schritt sollte der Messaufbau durch ein Perfusionssystem erweitert werden, das die Verwendung von hypoxischem Perfusat für die Untersuchung der Hypoxieantwort der PASMC ermöglichte.

Nach Etablierung einer Isolierungsmethode für PASMC der Ratte und einer Methode zur Untersuchung der HPV auf zellulärer Ebene, sollten beide Methoden auf die Maus übertragen werden, was die Verwendung von PASMC aus TRPC6-defizienten Mäusen ermöglicht. Da neuere Untersuchungen auf eine wichtige Rolle des TRPC6-Kanals bei der Regulation der Kontraktionsfähigkeit glatter Muskelzellen hinweisen, könnte so eine Rolle des TRPC6-Kanals für die Hypoxieantwort der PASMC identifiziert werden^{13,35}.

2 Material und Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus der HPV auf zellulärer Ebene untersucht. Zunächst wurde die Methode zur Isolierung und Kultivierung der PASMC aus intrapulmonalen Gefäßen der Ratte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Schumacker der Universität von Chicago erlernt¹⁰⁷ und in etwas modifizierter Weise in der eigenen Arbeitsgruppe in Gießen etabliert. Für die Charakterisierung dieser Methode und der gewonnenen PASMC wurden eine immunohistochemische Untersuchung, Immunofluoreszenzfärbungen und der Western-Blot herangezogen. Zur Untersuchung der HPV auf der Ebene der isolierten PASMC wurde eine geeignete Messmethode etabliert. Dazu wurden zwei verschiedene Messmethoden - die Messung der Kontraktion und die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration der PASMC - miteinander verglichen. Zur Optimierung der Versuchsbedingungen wurde dabei auch die Reaktionsfähigkeit der PASMC verschiedener Passagen untersucht.

Die Zellisolierungsmethode und die Methode zur Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurden in einem zweiten Schritt zur Untersuchung der HPV auf die Maus übertragen, da dies die Verwendung von PASMC aus gendefizienten Mäusen ermöglichte.

2.1 Isolierung und Kultivierung glatter Muskelzellen (SMC)

2.1.1 Isolierung der pulmonalarteriellen SMC (PASMC) aus Ratten

Für die Isolierung der PASMC aus Ratten wurden männliche Ratten des Auszuchtstammes Sprague-Dawley (Handelsbezeichnung CD-Ratte, Charles River Laboratories, Sulzfeld) mit einem Gewicht zwischen 250 g und 350 g verwendet. Nach Fixierung der Ratte in einem Kleintier-Restrainer (Harvard Apparatus, March-Hugstetten) erfolgte die Narkotisierung über eine intraperitoneale Injektion von 2,5 ml/kg eines Gemisches aus Narkosen und NaCl im Verhältnis 1:3, das einer Dosierung von 100 mg/kg Narkosen entspricht (Narkosen = Pentobarbital-Natrium, Merial GmbH, Hallbergmoos; NaCl = Natriumchlorid, Braun, Melsungen). Die intravenöse Applikation von 1000 I.E. Heparin (Roche, Basel, Schweiz) diente zur Antikoagulation. Zur weiteren Präparation wurde die narkotisierte Ratte in Rückenlage fixiert und das Fell in Hals-, Thorax- und Bauchregion entfernt. Nach Freipräparation der Trachea wurde diese durch Querinzision geöffnet und

eine Trachealkanüle eingebunden. Danach wurde die Bauchdecke angehoben und parallel zu den unteren Rippenbögen aufgeschnitten. Durch stumpfes Abpräparieren des Diaphragmas konnte der Thorax eröffnet werden. Die vollständige Eröffnung des Thorax erfolgte durch einen medianen Schnitt entlang des gesamten Sternums. Mit Hilfe von zwei Klemmen wurden die beiden durch den Schnitt entstandenen Rippenenden fixiert und der Thorax gespreizt. Nach Entfernung des Thymus und Eröffnung des Perikards wurden die Pulmonalarterie und die Aorta ascendens gemeinsam mit einem Faden (Coats GmbH, Kenzingen) locker umschlungen. Ein Schnitt in den rechten Ventrikel des Herzens ermöglichte das Einführen einer Kanüle in die Pulmonalarterie, die über einen Drei-Wege-Hahn (Braun, Melsungen) mit einer leichtgängigen Spritze (Becton Dickinson, Heidelberg) verbunden war. Da diese Einheit von der Spritze bis zur Kanülenspitze luftblasenfrei mit DPBS (PAN Biotech, Aidenbach) befüllt war, bestand nach Einbinden der Einheit mit Hilfe der Fadenschlinge Luftblasenfreiheit für das gesamte System. Nach Eröffnen des linken Ventrikels wurde die pulmonalvaskuläre Strombahn über die Pulmonalarterie langsam mit 15 ml DPBS gespült. Beim nun folgenden Wechseln der Spritze gewährleistete das Umstellen des Drei-Wege-Hahns den Erhalt eines luftblasenfreien Systems. Nach Austausch der Spritze folgte die langsame Perfusion von 40°C warmem Medium 199 (24 ml/kg, GIBCO (Invitrogen), Karlsruhe), das 1% Penicillin/Streptomycin (PAN Biotech, Aidenbach), 0,5% Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt (Sigma-Aldrich, Steinheim) und 0,5% Eisenpartikel (Eisenoxid, Sigma-Aldrich, Steinheim) enthielt und zuvor zum Lösen der Agarose für 10 Minuten bei ca. 75°C erwärmt worden war. Die Eisenpartikel sammelten sich besonders in den präkapillären Gefäßen, da diese nicht durch die Kapillaren passten. Die überwiegend präkapilläre Lokalisation wurde histologisch gesichert. Eine visuelle Kontrolle bestand dabei darin, dass sich die Eisenpartikel sichtbar in der Lunge akkumulierten. Letzteres ist beispielhaft in Abb. 1 dargestellt.

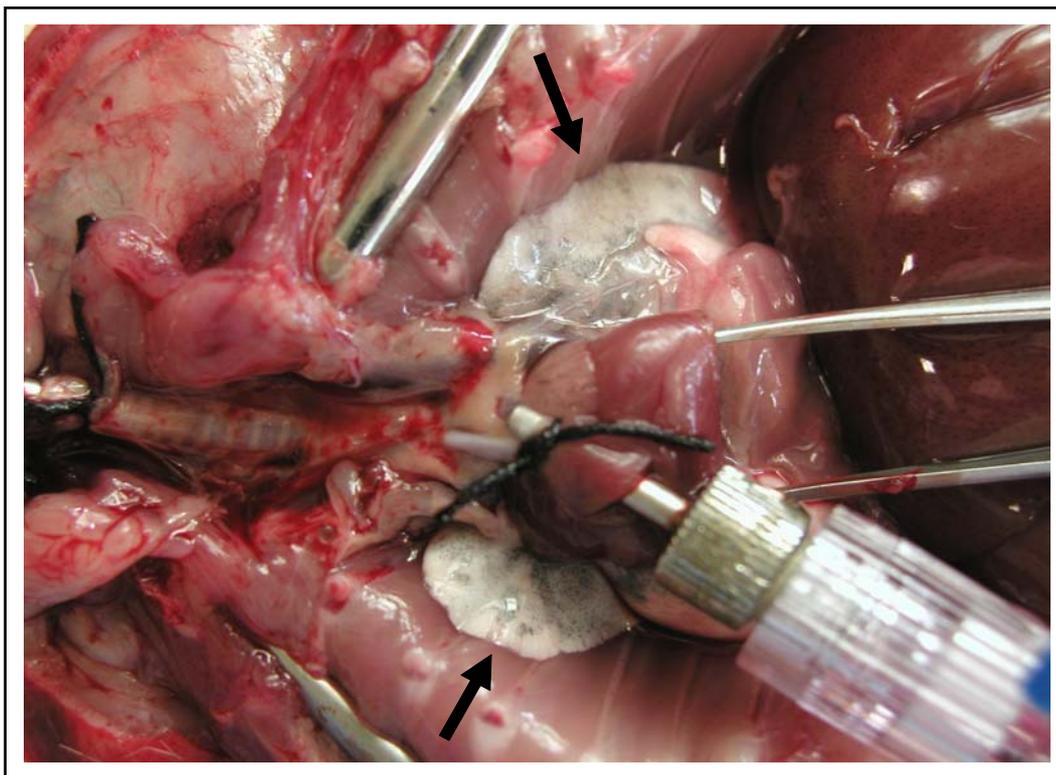


Abb. 1: Lunge mit Eisenpartikel (Pfeile) in den intrapulmonalarteriellen Gefäßen bei der Isolierung der PASMIC aus der Ratte

Um das Lungengewebe anschließend besser zerkleinern zu können, wurden die Luftwege über die Trachealkanüle mit 40°C warmem Medium 199, das 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt enthielt und ebenfalls zuvor zum Lösen der Agarose für 10 Minuten bei ca. 75°C erwärmt worden war, langsam mit 60 ml/kg Körpergewicht befüllt.

Für die Entnahme des Herz-Lungen-Komplexes wurde die Trachea oberhalb der Trachealkanüle durchtrennt, die Lunge entlang der Wirbelsäule freipräpariert und schließlich der Ösophagus, die Aorta und die Hohlvene durchtrennt. Zur Abkühlung und der damit verbundenen Fixierung der Agarose in den Luftwegen bzw. der Agarose mit den Eisenpartikeln in den Gefäßen wurde der Herz-Lungen-Komplex in eiskaltes DPBS transferriert. Nach 15-20 Minuten erfolgte die Abpräparation der Lungenlappen vom Herz-Lungen-Komplex und eine intensive Zerkleinerung derselben. Nach Überführung des zerkleinerten Lungengewebes in drei sterile Plastikröhrchen (Greiner bio-one, Frickenhausen) mit jeweils 30-35 ml DPBS wurden die Plastikröhrchen in einem Magnetkonzentrierer (Dynal A.S, Oslo, Norwegen) fixiert, das eine Ansammlung der auf Grund der Eisenpartikel magnetischen Gewebestückchen an den Rand des

Plastikröhrchens bewirkte. So wurde ein Absaugen des Überstandes mit Gewebestückchen, die keine Eisenpartikel enthielten, ermöglicht. Nach Entnahme des Röhrchens aus dem Magnetkonzentrierer wurde dieses wieder mit 30-35 ml DPBS aufgefüllt. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt.

Daraufhin wurden die Gewebestückchen zum Ablösen des die Gefäße umgebenden Gewebes und der Fibroblasten mit 80 U/ml Kollagenase Typ IV (Sigma-Aldrich, Steinheim) im Inkubator (Flow Laboratories, Meckenheim) bei 37°C und 5% Kohlendioxid über einen Zeitraum von 55 Minuten angedaut. Die Kollagenase war in Medium 199 und 1% Penicillin/Streptomycin gelöst. Das angedaute Lungengewebe wurde mit Hilfe einer Spritze mehrfach zunächst durch eine 15G-Kanüle (Dispomed Witt, Gelnhausen) und dann durch eine 18G-Kanüle (HMD Healthcare LTD., Horsham, UK) bis zum deutlichen Zerfall der Gewebestückchen gezogen. Dann wurde es in ein Plastikröhrchen mit Zellkulturmedium, das aus Medium 199 mit 1% Penicillin/Streptomycin und 10% FCS (Fetales Kälberserum, PAA Laboratories, Cölbe) bestand, überführt. Die die Eisenpartikel enthaltenden Gefäßstückchen wurden nachfolgend mittels des Magnetkonzentrierers selektiert und nach dem gleichen Prinzip wie bereits oben beschrieben dreimal mit Zellkulturmedium gewaschen.

Die isolierten Gefäßstücken wurden in Zellkulturmedium aufgenommen und entweder zur Kultivierung in Zellkulturflaschen (T25 (Corning, Wiesbaden) oder T75 (Greiner Bio-One, Frickenhausen) oder bei Verwendung der Passage 0 der PASMCMC direkt auf beschichtete Deckgläser (Schilder, Giessen) ausgesät. Zur Beschichtung der Deckgläser diente eine 0,01%ige Kollagenlösung (Typ 1, Sigma-Aldrich, Steinheim), die sich für vier Stunden auf den Deckgläsern im Inkubator befand. Nach Entfernung der Kollagenlösung wurden die Deckgläser mit steriler isotoner Kochsalzlösung (Baxter S.A., Unterschleißheim) gewaschen.

2.1.2 Isolierung der PASMCMC aus Mäusen

Für die Versuche mit PASMCMC aus Mäusen wurden C57BL6/N-Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld), TRPC6-Wildtyp (WT)-Mäuse oder TRPC6-defiziente (TRPC6^{-/-})-Mäuse (Arbeitsgruppe PD Dr. A. Dietrich, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg) verwendet, deren Gewicht in der Regel zwischen 20 und 25 g lag. Die Isolierung der PASMCMC erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei den Ratten (Kapitel 2.1.1). Der Unterschied bestand nur in der Verwendung einer geringeren Dosis der Narkose (150 µl eines Gemisches aus Narkoren und NaCl im

Verhältnis 1:9, das einer Dosierung von 2,4 mg Pentobarbital-Natrium entsprach) und des Heparins (75 I.E.), des zum Spülen der pulmonalen Gefäße verwendeten DPBS (4 ml), des durch die Pulmonalarterie zu perfundierenden Agarose-Eisenpartikel-Gemisches (1-2 ml) und der zur Befüllung der Atemwege verwendeten Agarose (1-2 ml). Gemäß der kleineren anatomischen Gegebenheiten bei Mäusen wurden kleinere Kanülen für den Zugang zur Trachea und der Pulmonalarterie benutzt. Außerdem befand sich zwischen der Kanüle der Pulmonalarterie und der Spritze aufgrund des kleineren Durchmessers nur ein kurzer Schlauch anstelle des Drei-Wege-Hahns. Zum Erhalt eines luftblasenfreien Systems beim Wechseln der Spritze wurde der Schlauch zwischen Kanüle und Spritze abgeklemmt. Für die Kultivierung der Gefäßstückchen enthielt das Zellkulturmedium 20% FCS. Die Gefäßstückchen wurden auf Deckgläsern (24 mm Durchmesser, Menzel, Braunschweig) ausgesät, die wie am Ende von Kapitel 2.1.1 beschrieben mit 0,01% Kollagen beschichtet waren.

2.1.3 Zellkultivierung der PASMC

Zum Kultivieren der Gefäßstückchen und der PASMC der Ratte wurde Medium 199 mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet.

Im Falle der Verwendung der Passage 0 der PASMC für Versuche wurden die isolierten Gefäßstückchen direkt auf Kollagen-beschichtete Deckgläsern ausgesät (siehe Kapitel 2.1.1), die je nach Verwendungszweck unterschiedliche Durchmesser besaßen. Nach zwei Tagen wurden weitere 2 ml Zellkulturmedium pro Zellkulturschale hinzugefügt. Bereits nach drei Tagen waren PASMC vorhanden, die aus den Gefäßstückchen gewachsen waren. Dies wurde durch mikroskopische Beobachtung sichergestellt (Mikroskop IMT-2, Olympus, Hamburg).

Im Falle der Verwendung von PASMC höherer Passagen als Passage 0 wurden die isolierten Gefäßstückchen in Zellkulturflaschen (T25 oder T75) kultiviert. Alle 3-4 Tage wurde das Zellkulturmedium durch neues ersetzt. Nach 10-14 Tagen erfolgte die Passagierung der Zellen. Dazu wurden nach 1-2 minütigem Einwirken von Trypsin/EDTA (PAN Biotech, Aidenbach) im Inkubator die abgelösten Zellen in FCS aufgenommen und die Zellkulturflasche nochmals mit Medium 199 ausgewaschen. Mit Hilfe einer Zentrifuge (Mikro 22, Hettich, Tuttlingen) wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 250 x g zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in Zellkulturmedium aufgenommen. Die Aussaat erfolgte entweder für Versuchszwecke auf Kollagen-beschichtete Deckgläser oder zur weiteren Kultivierung in neue Zellkulturflaschen.

Zum Kultivieren der Gefäßstückchen und der PASMC der Maus wurde Medium 199 mit 20% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet. Da bei den PASMC der Maus nur Versuche mit Passage 0 durchgeführt wurden, entfiel das Passagieren hierbei.

2.1.4 Isolierung und Kultivierung der aortalen SMC aus Mäusen

Zur Isolierung der aortalen SMC wurden C57BL6/N-Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld) verwendet. Nach Tötung der Maus durch zervikale Dislokation wurde das Fell der Maus entfernt, der Brustkorb eröffnet und die Aorta herauspräpariert. Nach dem Transfer der Aorta in Isolierlösung (127 mM NaCl (Roth, Karlsruhe), 5,9 mM KCl (Merck, Darmstadt), 1,2 mM $MgCl_2 \times 6 H_2O$ (Sigma-Aldrich, Steinheim), 11,8 mM Glukose (Sigma-Aldrich, Steinheim), 10 mM Hepes (Roth, Karlsruhe), 2,4 mM $CaCl_2$ (Merck, Darmstadt)) wurde das die Aorta umgebende Gewebe entfernt, die Adventitiaschicht abpräpariert, die Aorta longitudinal aufgeschnitten, in zwei Teile geteilt und in Ca^{2+} -freier Isolierlösung gewaschen. Danach wurden die Aortastücke für 30 Minuten bei 37°C und 25 rpm in 5 ml Enzymlösung (0,1% Albumin (Sigma-Aldrich, Steinheim), 0,07% Papain (Worthington, St. Katharinen), 0,5% Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in Ca^{2+} -freier Isolierlösung) inkubiert. In einem weiteren Schritt wurden die Aortastücke für 10 Minuten bei 37°C und 25 rpm in einer zweiten Enzymlösung folgender Zusammensetzung angedaut: 0,1% Albumin, 0,1% Kollagenase (Sigma-Aldrich, Steinheim) und 0,1% Hyaluronidase (Sigma-Aldrich, Steinheim) in Isolierlösung in Gegenwart von 50 μM Kalzium. Danach wurden die Aortastücke in 0,5-1 ml Isolierlösung überführt, mittels einer hitzepolierten Pasteurpipette mehrfach bis zu einem sichtbaren Zerfall der Aortastücke resuspendiert und auf Deckgläser ausgesät (24 cm Durchmesser). Als Zellkulturmedium diente Medium 199, das 1% Penicillin/Streptomycin und 20% FCS enthielt.

2.2 Charakterisierung der PASMCM

Zur Charakterisierung der Isolierungsmethodik der PASMCM aus Ratten wurde eine immunohistochemische Untersuchung und zur Charakterisierung der gewonnenen PASMCM Immunofluoreszenzfärbungen und der Western-Blot angewandt. Da bekannt war, dass sich Zellen durch das Kultivieren funktionell verändern können, wurde bei der Charakterisierung der PASMCM auch ein Vergleich zwischen verschiedenen Passagen durchgeführt. Bei der Immunofluoreszenzfärbung fand dieser Vergleich zwischen den Passagen 0 (= P0, d.h. drei Tage nach Isolierung), Passage 1 (= P1) sowie Passage 3 (= P3) statt, da diese drei Passagen auch im Zuge der Optimierung einer Messmethodik für die Untersuchung der HPV miteinander verglichen wurden. Beim Western-Blot wurden nur P1 und P3 miteinander verglichen, da bei P0 die Zellzahl zu gering war.

Nach dieser Grundcharakterisierung der PASMCM wurde die Zellisolierungsmethode auf die Maus übertragen. Hierbei wurde die Charakterisierung der gewonnenen PASMCM mittels der Immunofluoreszenzfärbung nur für P0 durchgeführt, da höhere Passagen für Versuche mit PASMCM der Maus nicht verwendet wurden.

2.2.1 Immunohistochemische Untersuchung zur Isolierung der PASMCM

Ziel der immunohistochemischen Untersuchung bei der Isolierungsmethode der PASMCM war die Kontrolle der Lokalisation der Eisenpartikel in den intrapulmonalarteriellen Gefäßen.

Nach Abkühlung des Herz-Lungen-Apparates in eiskaltem DPBS bei der Isolierung der PASMCM aus der Ratte wurde ein Lungenflügel in 3,5%-igem Formaldehyd (Rotihistofix, Roth, Karlsruhe) über Nacht bei Raumtemperatur gelagert und dann in Einbettkassetten (Leica Microsystems, Nussloch) in 0,1 M Phosphatpuffer überführt. In einem nächsten Schritt wurde der Lungenflügel über Nacht im Routineprogramm des Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten (Leica Microsystems, Nussloch) entwässert. Danach erfolgte das Einbetten in Paraffin (Paraplast Plus, Sigma Aldrich, Steinheim) mittels einer Paraffinausgießstation (EG 1140H, Leica Microsystems, Nussloch). Nach dem Schneiden des Gewebes in 3 µm dicke Scheiben mittels eines vollautomatischen Rotationsmikrotoms (RM 2165, Leica Microsystems, Nussloch) und der Übertragung auf einen Objektträger (Langenbrinck, Emmendingen) unter Zuhilfenahme eines Objektträgerstrecktisches (HI 1220, Leica Microsystems, Nussloch) wurde eine immunohistochemische Doppelfärbung zur Färbung der glatten Muskelzellen und der Endothelzellen wie folgt durchgeführt.

Nach Entparaffinierung und Rehydrierung des Gewebeschnittes wurden die endogenen Peroxidasen mit 10 ml 30%-igem H₂O₂ (Merck, Darmstadt) in 190 ml Methanol (Fluka Chemie, Buchs, Schweiz) für 15 Minuten geblockt. Darauf folgte eine 10-minütige proteolytische Demaskierung mittels Trypsin Digest All 1:3 (Zytomed, Berlin). Der Serumblock mit einem Gemisch aus Pferdeserum (Normal Horse Serum, Alexis Biochemicals, Grünberg), Ziegen Serum (Normal Goat Serum, Alexis Biochemicals, Grünberg) und Histopuffer (PBS mit 3% BSA (Bovines Serumalbumin, PAA Laboratories, Cölbe) und 0,2% Triton X 100 (Sigma-Aldrich, Steinheim) im Verhältnis 1:1:2 erstreckte sich über einen Zeitraum von 45 Minuten.

Im nächsten Schritt fand die Inkubation mit einem primären Antikörper gegen das glattmuskuläre α -Aktin (anti- α -smooth muscle actin, Clone 1A4, monoklonal, Maus anti-Human, Sigma-Aldrich, Steinheim) bei einer Verdünnung von 1:1000 in Histopuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur statt. Darauf erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten sekundären Antikörper (Vectastain ABC Elite Kit horse anti-mouse, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen) für 20 Minuten. Danach wurde das ABC-Reagenz (Vectastain ABC Elite Kit, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen) für 20 Minuten, das violette Chromogen Vector VIP (Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen) für ca. 1 Minute und das Avidin- und Biotin-Reagenz (Avidin-Biotin-Blocking Kit, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen) zum Blocken endogenen Avidins bzw. Biotins nacheinander jeweils für 15 Minuten appliziert.

Im nächsten Schritt folgte die Inkubation mit einem primären Antikörper gegen den von Willebrand Faktor (anti-von Willebrand factor, polyklonal, Kaninchen anti-Human, Dako Cytomation, Hamburg) bei einer Verdünnung von 1:1000 in Histopuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wirkte der biotinylierte sekundäre Antikörper (Vectastain ABC Elite Kit goat anti-rabbit, Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen) und das schon erwähnte ABC-Reagenz nacheinander jeweils für 20 Minuten, das braune Chromogen Vector DAB (Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen) für 15 Sekunden und Methylgrün (Vector/Linaris, Wertheim-Bettingen) zur Gegenfärbung der Zellkerne für 1 Minute auf einer 60°C Heizplatte. Abschließend wurde der Schnitt noch dehydriert und Pertex® (Eindeckmedium Xylol-löslich, Medite GmbH, Burgdorf) eingedeckt. Zwischen den beschriebenen Schritten außer beim Serumblock wurde jeweils 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen.

2.2.2 Immunofluoreszenzfärbung der PASMC

Als Immunofluoreszenzfärbung wurde eine indirekte Fluoreszenzfärbung durchgeführt, die die Verwendung eines primären Antikörpers gegen das nachzuweisende Protein und einen sekundären Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet war und einen Fluoreszenzfarbstoff trug, beinhaltete. Bei Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes mit einer entsprechenden Wellenlänge emittierte dieser Licht einer für den jeweiligen Farbstoff spezifischen Wellenlänge, das mittels einer Kamera detektiert und über eine entsprechende Software als digitales Bild dargestellt wurde. Um bei der Signalgabe einen Eigeneffekt des sekundären Antikörpers ausschließen zu können, wurde auch als sogenannte negative Kontrolle die Fluoreszenzfärbung ohne den primären Antikörper durchgeführt. Als positive Kontrolle, die als Nachweis für die prinzipielle Funktionsfähigkeit der Fluoreszenzfärbung diente, wurde ein Antikörper gegen Vimentin (Clone V9, monoklonal, Maus anti-Human, Sigma-Aldrich, Steinheim) verwendet, das in allen Zellen mesodermaler Herkunft und damit auch in PASMC vorkommt.

Die PASMC aus der Ratte wurden durch die Immunofluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen das glattmuskuläre α -Aktin, im Folgenden als SM- α -Aktin abgekürzt (anti- α -smooth muscle actin, Clone 1A4, monoklonal, Maus anti-Human, Sigma-Aldrich, Steinheim), die glattmuskulären schweren Ketten des Myosins, im Folgenden als SM-MHC abgekürzt (anti-myosin heavy chain, Clone SMMS-1, monoklonal, Maus anti-Human, Dako Deutschland, Hamburg), den von Willebrand Faktor, im Folgenden als vWF abgekürzt (anti-von Willebrand factor, Kaninchen anti-Human, Dako Diagnostika, Hamburg) und Cytokeratin (Clone MNF116, monoklonal, Maus anti-Human, Dako Cytomation, Hamburg) charakterisiert. Bei den PASMC der Maus wurden Antikörper gegen Vimentin, SM- α -Aktin, SM-MHC und vWF verwendet.

Nach Beschichtung eines Objektträgers mit abnehmbaren Kammern (8er Permanox Slide, Nalge Nunc, Wiesbaden) mit Kollagen nach der Vorgehensweise wie am Ende des Kapitels 2.1.1 beschrieben wurden die Gefäßstückchen bei P0 bzw. 20.000 Zellen bei P1 und P3 pro Kammer ausgesät. Nach 3 Tagen bei P0 bzw. nach 1 Tag bei P1 und P3 wurde das Zellkulturmedium entfernt und zweimal vorsichtig mit warmem Medium 199 gewaschen. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mittels eines eiskalten Gemisches aus Aceton (Sigma-Aldrich, Steinheim) und Methanol (Sigma-Aldrich, Steinheim) im Verhältnis 1:1 für 5 Minuten wurde vier Mal mit Waschpuffer, d.h. 0,1% BSA in PBS, das aus 0,8% NaCl (Roth, Karlsruhe), 0,02% KCl (Merck, Darmstadt), 0,115% Na₂HPO₄ x 2H₂O (Merck, Darmstadt), 0,02% KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt) bei

einem pH-Wert von 7,4 besteht, gewaschen. Darauf folgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 3% BSA in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der primäre Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur appliziert. Die Antikörper wurden dabei in Waschpuffer wie folgt verdünnt: Vimentin 1:150, SM- α -Aktin 1:450, SM-MHC 1:20, Cytokeratin 1:100 und vWF 1:500. Bei der negativen Kontrolle wurde nur Waschpuffer verwendet. Danach wurde vier Mal mit Waschpuffer gewaschen und der FITC (fluorescein isothiocyanate)-konjugierte sekundäre Antikörper (1:100 in Waschpuffer verdünnt) für 1 Stunde bei Raumtemperatur und im Dunkeln appliziert. Dabei wurde bei der Färbung gegen Vimentin, SM- α -Aktin, SM-MHC und Cytokeratin ein Antikörper Ziege gegen Maus (Goat F(ab')₂, polyklonal, Dako Cytomation, Hamburg) und beim vWF ein Antikörper Schwein gegen Kaninchen (polyklonal, Dako Cytomation, Hamburg) verwendet. Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer folgte die Färbung der Zellkerne für 5 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole, Sigma-Aldrich, Steinheim), das 1:100 in Waschpuffer verdünnt wurde. DAPI besitzt die Eigenschaft, spezifisch an doppelsträngige DNA zu binden und einen fluoreszierenden Komplex zu bilden. Nach der DAPI-Färbung wurde nochmal dreimal mit Waschpuffer gewaschen, die Kammern vom Objektträger entfernt, der Objektträger mit Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako cytomation, Hamburg) eingedeckt und durch ein Deckglas (24x50 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig) abgedeckt.

Die Immunfluoreszenzfärbung der PASMC wurde unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Leica CTR MIC) und eines Computers mit der Software Leica QWin (Leica Microsystems, Wetzlar) ausgewertet. Die Anregung des FITC-konjugierten sekundären Antikörpers erfolgte unter Zuhilfenahme eines Filters der Bandbreite 450-490 nm (Filter I3L, Leica Microsystems, Wetzlar), und die Detektion des emittierten Fluoreszenzlichtes (Maximum des Emissionsspektrums bei 530 nm) mit anschließender Digitalisierung geschah mittels einer Kamera (Leica DC300FX, Leica Microsystems, Wetzlar) und eines Personalcomputers. Die maximale Anregungswellenlänge für DAPI lag bei 359 nm (Filter AL, 340-380 nm, Leica Microsystems, Wetzlar) und das Maximum des Emissionsspektrums bei 461 nm.

Obwohl bei allen drei Zellpassagen für jeden Antikörper jeweils dieselbe Belichtungszeit und Verstärkung verwendet wurde, ist eine genaue quantitative Auswertung mit der Immunfluoreszenzmethode grundsätzlich nicht möglich ist.

Die Fluoreszenzbilder der negativen Kontrolle wurden jeweils mit denselben Einstellungen (Belichtungszeit und Verstärkung) aufgenommen wie die Bilder mit einem primären Antikörper. Der an den primären Antikörper gebundene FITC-konjugierte sekundäre Antikörper wurde als grünes Signal detektiert, während die Zellkerne durch die DAPI-Färbung blau erschienen. Nach Aufnahme der beiden Fluoreszenzbilder wurden diese zu einem neuen Bild überlagert.

2.2.3 Western-Blot

Für den Western-Blot wurden die PSMC der Ratte (P1 und P3) in Kollagen-beschichtete Zellkulturschalen (35 mm Durchmesser, Beckton Dickinson, Heidelberg) ausgesät (120.000 Zellen pro Schale). Die Beschichtung der Zellkulturschalen erfolgte mit einer 0,01%igen Kollagenlösung nach der Vorgehensweise wie am Ende des Kapitels 2.1.1 beschrieben. Ein Tag später wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem DPBS gewaschen, mit 100µl verdünntem Auftragspuffer (NUPAGE SDS sample buffer (4x), Invitrogen, Karlsruhe) abgeschrappt (Scraper von Corning, Wiesbaden) und in ein Eppendorf-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Die gesamte Prozedur wurde auf Eis durchgeführt. Nach Gewinnung der Proben wurden diese für 10 Minuten bei 95°C mittels eines Heizblocks (VWR, Darmstadt) aufgeköcht und danach kurz in Eis abgekühlt. Zum Sammeln der Probe am Boden des Eppendorf-Röhrchens wurden diese kurz zentrifugiert (Mikro 22, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) und anschließend bei -20°C aufbewahrt.

Vor Verwendung der Proben für den Western-Blot wurden diese nochmal für 10 Minuten bei 95°C erwärmt, kurz in Eis abgekühlt und zentrifugiert. Nach Zugabe von 2% β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim) und je nach Antikörper einer eventuellen Verdünnung mit Auftragspuffer, der ebenfalls 2% β -Mercaptoethanol enthielt, (1:20 bei β -Aktin (Clone AC-74, monoklonal, Sigma-Aldrich, Steinheim), 1:80 bei SM- α -Aktin) wurden die Proben und der Marker (SeeBlue Plus 2, Invitrogen, Karlsruhe) auf ein Gradientengel (NUPAGE Tris-Acetat-Gel 3-8%, Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen. Das aufgetragene Gesamtvolumen betrug dabei jeweils 20 µl. Als Puffer für die Gelelektrophorese wurde Tris-Acetat-Running-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Gelelektrophorese lief spannungsgesteuert bei 100 V (E835, Consort, Turnhout, Belgien) und über einen Zeitraum von 1,5 Stunden. Nach Auftrennung der Proteine erfolgte das Blotting auf eine vorbereitete PVDF-Membran (Pall, Dreieich) mit 2 mA/cm² und über einen Zeitraum von 1 Stunde und 15 Minuten. Zur Vorbereitung der PVDF-Membran wurde diese aktiviert (5 Minuten in Methanol), dreimal gewaschen (jeweils 5

Minuten in destilliertem Wasser) und äquilibriert (5 Minuten in Transferpuffer). Der Transferpuffer enthielt pro Liter 5,8 g Tris (Roth, Karlsruhe), 2,9 g Glycin (Sigma-Aldrich, Steinheim), 3,7 ml 10% SDS (Roth, Karlsruhe) und 200 ml Methanol. Die beim Blotten verwendeten Filter wurden von Schleicher&Schuell BioScience in Dassel bezogen. Nach fünfminütigem Schwenken der Membran in Waschpuffer (100 mM Tris HCl pH 7,5 (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA), 0,9% NaCl, 0,1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, Steinheim)) wurde diese zum Blocken der unspezifischen Bindungsstellen für 1 Stunde in Waschpuffer, das 5% Magermilchpulver (Sigma-Aldrich, Steinheim) enthielt, gelegt. Darauf folgte eine einstündige Inkubation der primären Antikörper, die im Blockpuffer verdünnt wurden: SM- α -Aktin 1:10.000, SM-MHC 1:200 und β -Aktin 1:5.000. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für jeweils 5 Minuten wurde der sekundäre Antikörper (IgG-Peroxidase-konjugiert, Kaninchen gegen-Maus, Verdünnung im Blockpuffer 1:10.000, Sigma-Aldrich, Steinheim) für 1 Stunde inkubiert. Danach wurde nochmals dreimal jeweils fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Für das Sichtbarmachen der Proteine wurde Lumigen PS-3 (ECL plus, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) als Substrat für den Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper verwendet. Das chemilumineszierende Produkt wurde dann mit Hilfe eines Videobildaufnahmesystems (ChemiGenius, Bio Imaging Systems, VWR, Darmstadt) detektiert und mittels der zugehörigen Software (GeneSnap from SynGene und GeneTools from SynGene) quantifiziert.

2.3 Messung der Kontraktion der PASMC der Ratte

Für die Untersuchung der HPV auf der Ebene der PASMC wurden zwei Methoden miteinander verglichen, nämlich die Messung der Kontraktion und die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration der PASMC. Die Messung der Kontraktion, auf den in diesem Kapitel eingegangen wird, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Schumacker der Universität von Chicago erlernt und dann für eigene Untersuchungen übernommen¹⁰⁷.

Zuerst wurde bei diesem Assay die Reaktion der isolierten PASMC der Ratte auf ET-1, eine vom vaskulären Endothel produzierte Substanz, die bei vielen Spezies eine Kontraktion der Gefäße verursacht^{89, 91} untersucht. Dabei wurden drei verschiedene Passagen (P0, d.h. drei Tage nach Zellisolierung, P1 und P3) zur Optimierung der zu verwendenden Zellpassage miteinander verglichen. In einem zweiten Schritt wurde ein Perfusionssystem für die hypoxischen Messungen etabliert. Dabei bestand das Prinzip des experimentellen Aufbaus aus einer Perfusion von hypoxischem Perfusat über die Zellen, die sich in einer geschlossenen Zellkammer befanden. Dabei wurden PASMC von P2 und P3 verwendet. Zur Optimierung der Versuchsbedingungen wurde in diesem Modus auch der Einfluß einer 24-stündigen FCS-Reduzierung von 10% auf 0,2% FCS vor Versuchsbeginn auf die Reaktionsfähigkeit der PASMC auf Hypoxie untersucht. Denn FCS bewirkt die Proliferation von Zellen, wodurch der funktionelle Zustand der Zellen geändert wird, was einen Einfluß auf die Reaktionsfähigkeit der Zellen haben kann. Diese Zellproliferation kann durch eine FCS-Reduzierung gestoppt werden^{75, 124}.

2.3.1 Experimenteller Aufbau

Für die Messung der Kontraktion bestand der experimentelle Aufbau aus einem Mikroskop (DM IRE2, Leica Microsystems, Wetzlar) mit Personalcomputer und einer speziellen Software (Leica ASMDW, Leica Microsystems, Wetzlar), einer Kamera (Coolsnap HQ, Roper Scientific), einer Zellkammer (Ludin-Zellkammer Typ1, Leica Microsystems, Wetzlar) und im Falle einer Perfusion zusätzlich aus einem Perfusionssystem. Das Ziel des Perfusionssystems war die Schaffung einer hypoxischen Atmosphäre für die PASMC in der Zellkammer. Dafür wurde das Perfusat (Medium 199 mit 1% Penicillin/Streptomycin) mindestens 30 Minuten vor Versuchsbeginn mit 5% Kohlendioxid, Rest Stickstoff (Airliquide, Siegen) begast. Im Falle einer normoxischen Perfusion wurde das Perfusat mit 21% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid, Rest Stickstoff (Airliquide, Siegen) begast. Die

Messung der normobaren Sauerstoffkonzentration in der Zellkammer unter Hypoxie wurde bereits in Kapitel 2.6 beschrieben.

Das Perfusat befand sich zur Begasung in doppelwandigen Glasgefäßen (Glasbläserei, Fachbereich Chemie, Universität Gießen) und floß per Schwerkraft nahezu ausschließlich über Metallleitungen zur Zellkammer. Der Fluß wurde durch eine der Zellkammer nachgeschalteten Schlauchpumpe (Novodirekt, Kehl/Rhein) auf 0,5 ml/min begrenzt. Das System enthielt insgesamt drei doppelwandige Glasgefäße, um zwischen verschiedenen Bedingungen mittels Drei-Wege-Hähnen aus Metall (B.E.S.T. Ventil+Fitting, Frankfurt) wechseln zu können. Zur Erwärmung des Perfusats auf 36°C wurde Wasser entlang der Metallzuleitung und durch die doppelwandigen Glasgefäße im Gegenstromprinzip gepumpt (Sartorius BBI Systems, Melsungen). Die Temperatur des in die Zellkammer fließenden Perfusats wurde mit einem Thermometer überprüft (Labo-Tech J. Stofer LTS, Biel-Benken, Schweiz). Der pH-Wert des Perfusats nach Durchfluß durch die Zellkammer betrug unter normoxischen Bedingungen $7,401 \pm 0,007$ und unter hypoxischen Bedingungen $7,400 \pm 0,005$ (ABL 500, Radiometer, Copenhagen).

Eine schematische Darstellung des Perfusionssystems ist in Abb. 2 dargestellt.

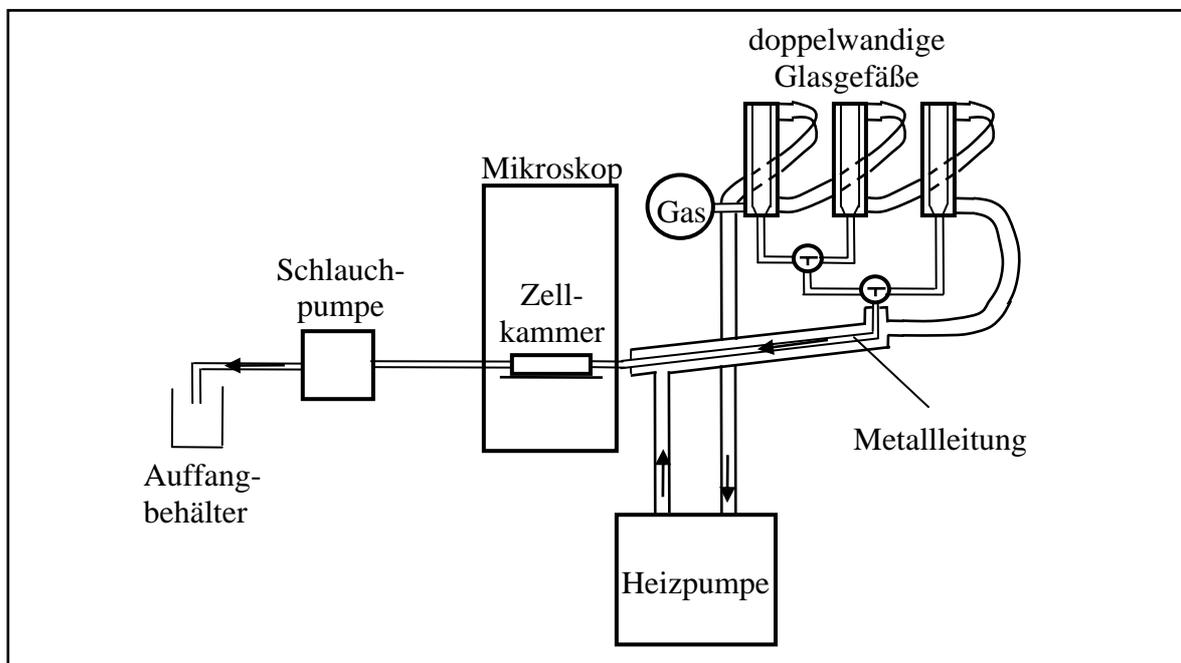


Abb. 2: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Messung unter hypoxischen Bedingungen mittels eines Perfusionssystems.

Die Pfeile geben die Fließrichtung an. Nähere Erläuterungen sind im Text zu finden.

Die Temperatur des Perfusats beim Durchfluß durch die Kammer wurde durch eine Klimabox, die sich um das Mikroskop befand und auf 36°C temperiert war, aufrechterhalten. Das Mikroskop verfügte über einen Mikroskoptisch mit Scanfunktion, das die Bildaufnahme von verschiedenen Positionen in der fokussierten Ebene zu jedem Messzeitpunkt nacheinander ermöglichte. Diese Multipositionierung erbrachte den Vorteil, eine größere Anzahl Zellen pro Experiment zu messen. Für die Bildaufnahme wurde ein 40-faches Luftobjektiv mit einer numerischen Aperture von 0,55 verwendet.

2.3.2 Experimenteller Ablauf

Für die Experimente mit PASMC der Passage 0 wurden die isolierten Gefäßstückchen und für die Experimente mit PASMC der Passage 1 bis 3 jeweils 10.000 Zellen auf die Kollagen-beschichteten Deckgläser (18 mm Durchmesser, Schilder, Gießen) ausgesät und in Zellkulturmedium kultiviert. Die Vorgehensweise bei der Beschichtung der Deckgläser wurde bereits am Ende des Kapitels 2.1.1 beschrieben. Die Durchführung der Experimente erfolgte bei P0 drei Tage nach Zellisolierung und bei den höheren Passagen ein Tag nach Zellaussaat. Im folgenden wird die Vorgehensweise für die Versuche ohne und mit Perfusion getrennt beschrieben.

2.3.2.1 Experimente ohne Perfusion

Der Effekt von ET-1 auf die PASMC der drei Passagen P0, P1 und P3 wurde als Kontrollstimulus und zur Optimierung der Messung der Kontraktion hinsichtlich der zu verwendenden Passage untersucht. Dabei wurden alle Experimente ohne Perfusion durchgeführt. Als Versuchslösung diente eine Hepes-Ringer-Lösung mit einem stabilen pH-Wert von 7,4 folgender Zusammensetzung: 5,6 mM KCl (Merck, Darmstadt), 136,4 mM NaCl (Roth, Karlsruhe), 1 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich, Steinheim), 2,2 mM CaCl₂ (Merck, Darmstadt), 11 mM Glucose (Sigma-Aldrich, Steinheim) und 10 mM Hepes (Roth, Karlsruhe). Nach zweimaligem Waschen der PASMC mit Hepes-Ringer-Lösung wurde das Deckglas in die Zellkammer eingebaut. Nach Befüllung der Kammer mit 1 ml Hepes-Ringer-Lösung wurde diese auf dem Mikroskoptisch fixiert und mit einem Deckglas (28 mm Durchmesser, Schilder, Gießen) bedeckt. Mit Hilfe der Multipositionierungsfunktion des Mikroskoptisches wurden zehn bis fünfzehn Positionen für die Bildaufnahme festgelegt. Nach Start des Versuches erfolgte die Bildaufnahme alle fünf Minuten über einen Zeitraum von 35 Minuten. Nach Ablauf der ersten fünf Minuten wurde ET-1 appliziert (10 nM Endkonzentration, Stock: 200 µM in 5% Essigsäure gelöst,

Merck, Darmstadt). Als ET-1-Konzentration wurden 10 nM gewählt, da isolierte Pulmonalarterien bei ET-1-Konzentrationen zwischen 0,1 und 100 nM kontrahieren⁸⁹. In den Kontrollversuchen erfolgte nur die Zugabe des Lösungsmittels in der entsprechenden Konzentration.

2.3.2.2 Experimente mit Perfusion

Für die Verwendung von hypoxischem Perfusat wurde das bereits in Kapitel 2.3.1 beschriebene Perfusionssystem benutzt. Nach Einbau des Deckglases in die Zellkammer wurde die Kammer durch ein weiteres Deckglas (23,5 mm, Schilder, Gießen) geschlossen, luftblasenfrei in das Perfusionssystem integriert und auf dem Mikroskoptisch fixiert. Nach Festlegung der Positionen für die Bildaufnahme mit Hilfe der Multipositionierungsfunktion des Mikroskoptisches erfolgte zeitgleich zum Versuchsstart der Wechsel der Perfusion von normoxischem zu hypoxischem oder in den Kontrollexperimenten zu weiterhin normoxischem Perfusat. Die Perfusion erfolgte über einen Zeitraum von 30 Minuten mit einem Bildaufnahmeabstand von fünf Minuten.

2.3.3 Auswertung

Die Kontraktion von Zellen äußert sich *in vivo* in einer Verkleinerung derselben. Deshalb wurde in diesem Assay die Änderung der Zellfläche der fokussierten Zellen als Maß für eine Kontraktion verwendet wie bereits von Civelek et al. beschrieben wurde⁹. Zur Bestimmung der Zellfläche wurden die Zellen mit Hilfe der bereits genannten Software des Systems ausgewertet. Als Zeitpunkt für die Auswertung wurde in Anlehnung an das Protokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Schumacker das Ende der Versuchszeit (d.h. nach 30 Minuten) gewählt, da zu diesem Zeitpunkt mit der maximalen Verkleinerung der PASMC zu rechnen war. Die Größe der Zellfläche nach 30 Minuten Versuchszeit wurde dabei in Bezug zur Größe der Zellfläche zu Versuchsbeginn, die als 100% definiert wurde, gesetzt.

2.4 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in PASMCM der Ratte

Für die Etablierung einer Methode zur Untersuchung der HPV an PASMCM wurde neben der bereits in Kapitel 2.3 beschriebenen Messung der Kontraktion auch die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) der PASMCM herangezogen. Dabei wurde in einem ersten Schritt die Wirkung von ET-1 auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der PASMCM der Ratte als positive Kontrolle und darüber hinaus zur Optimierung der Versuchsbedingungen auch in Abhängigkeit von der Zellpassage untersucht. In einem zweiten Schritt wurde dann die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ für die Anwendung eines Perfusionssystems ebenso mittels ET-1 etabliert.

2.4.1 Prinzip der Messmethode

Für die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde der Ca^{2+} -Indikator Fura-2 AM [AM = Azetoxymethylester, Invitrogen (Molecular Probes), Karlsruhe] verwendet (Abb. 3).

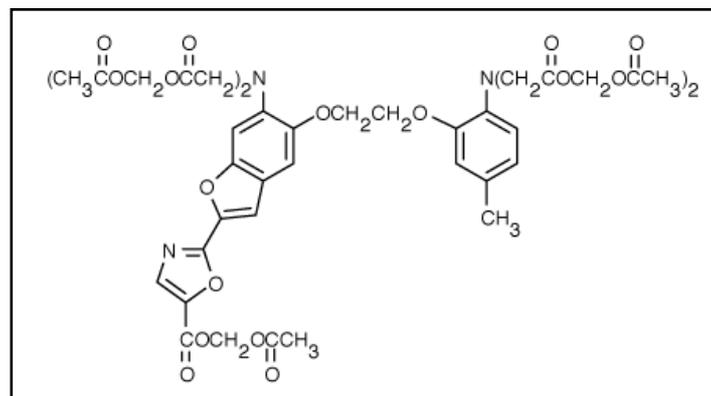


Abb. 3: Strukturformel von Fura-2 AM⁶¹

Fura-2 AM ist aufgrund seiner lipophilen Estergruppen membrangängig. Da im Zytoplasma vorhandene Esterasen die Estergruppe entfernen, wird das Fura-2 Molekül hydrophil und kann nicht mehr in den Extrazellulärraum zurückdiffundieren. Im Zytosol wirkt es als selektiver Ca^{2+} -Chelator, der nach Exzitation mit unterschiedlichen Wellenlängen (340nm, 360nm und 380 nm) Fluoreszenzlicht von 510 nm emittiert (siehe Abb.4)^{29, 59}.

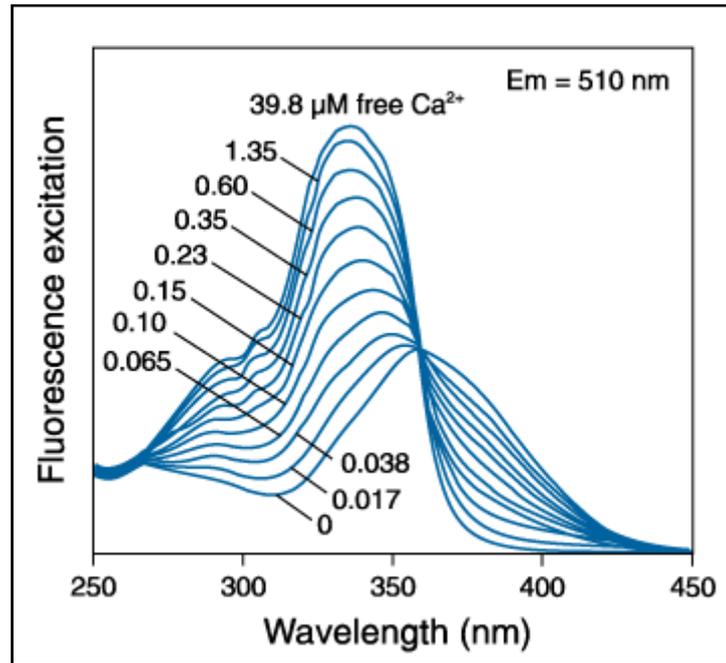


Abb. 4: Emissionsspektrum des Ca^{2+} -Indikators Fura-2⁶⁰. Fura-2 ist ein fluoreszierender Ca^{2+} -Chelator, der durch Bindung von Ca^{2+} -Ionen bei nahezu identischem Emissionsspektrum sein Exzitationsmaximum von 380 nm nach 340 nm verschiebt. Der isosbestische Punkt, d.h. die Wellenlänge, welche gegenüber der Änderung der Ca^{2+} -Ionenkonzentration indifferent ist, liegt in Abhängigkeit vom optischen Apparat bei 358-362 nm.

Mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration nimmt die Fluoreszenzemission bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm zu und bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm ab, so dass sich das Maximum des Emissionsspektrums von 365 nm nach 340 nm verschiebt. Nur die Fluoreszenzemission bei 360 nm ist unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration und wird als isosbestischer Punkt bezeichnet.

Vereinfacht lässt sich sagen, dass der Quotient der gemessenen Fluoreszenz bei 340 nm (=F340) und der gemessenen Fluoreszenz bei 380 nm (=F380) ein Maß für die absolute intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) unabhängig von der Beladungseffizienz der Zelle durch den Ca^{2+} -Indikator Fura-2 ist²⁹.

2.4.2 Experimenteller Aufbau

Für die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde ein Mikroskop (Olympus BX50 WI, Olympus, Hamburg) verwendet, das über einen Quartzlichtleiter mit einem Monochromator (Polychrome II) verbunden war. Der Monochromator verfügte über eine 150 W Xenon-Lampe. Nach Herausfiltern des Lichts der Wellenlängen 340 nm, 360 nm und 380 nm aus dem Lampenlicht mit einem entsprechenden Anregungsfilter, wurde das Anregungslicht durch ein 40-faches Eintauchobjektiv (numerische Apertur: 0,8) zu den Zellen geleitet. Die Anregung von Fura-2 bewirkte die Emission von Fluoreszenzlicht, das nach Passieren eines Emissionsfilters (510 bis 530 nm) von einer IMAGO CMOS-Kamera (Till Photonics, Martinsried) detektiert wurde. Die aufgenommenen Bilder wurden an einen Personalcomputer mit spezieller Software (TILLvisION v3.3, Till Photonics, Martinsried) weitergeleitet.

Bei den Versuchen ohne Perfusion befanden sich die Deckgläser in einer offenen Schale (Bioptechs, Butler, PA, USA). Für die Perfusionsversuche wurde das Perfusionssystem der Versuche zur Messung der Kontraktion, das in Kapitel 2.3.1 bereits beschrieben wurde, verwendet. Dabei wurde nur eine andere Zellkammer (Bioptechs, Butler, PA, USA) mit einem Kammervolumen von 500 μ l verwendet. Sowohl die offene Schale als auch die Zellkammer wurde auf 33°C temperiert (Bioptechs, Butler, PA, USA). Die Begasung des Perfusats zur Schaffung der hypoxischen Bedingung erfolgte mit 100% Stickstoff (Airliquide, Siegen).

2.4.3 Experimenteller Ablauf

Für die Versuche ohne Perfusion wurden entweder die isolierten Gefäßstückchen (bei P0) oder 10.000 Zellen (bei P1 und P3) auf die Kollagen-beschichteten Deckgläser (18 mm Durchmesser) ausgesät. Für die Perfusionsversuche wurden nur PASMC von P0 verwendet, so dass die Gefäßstückchen direkt auf die Kollagen-beschichteten Deckgläser (40 mm Durchmesser, Schilder, Giessen) ausgesät wurden. Die Deckgläser waren jeweils wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben mit Kollagen beschichtet. Die Durchführung der Experimente erfolgte bei P0 nach drei bis vier Tagen und bei den höheren Passagen nach einem Tag. Für alle Versuche wurde als Perfusionslösung Hepes-Ringer-Lösung verwendet.

Nach zweimaligem Waschen der PASMC mit Hepes-Ringer-Lösung wurden die PASMC mit 5 μ M Fura-2 AM (1 mM Stock, gelöst in DMSO (= Dimethylsulfoxid, Invitrogen, Karlsruhe)) für 1 Stunde bei 37°C beladen. Danach wurden sie zweimal gewaschen und

nochmals über einen Zeitraum von 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Im folgenden wird nun die Vorgehensweise für die Versuche ohne und mit Perfusion getrennt beschrieben.

2.4.3.1 Experimente ohne Perfusion

Nach dem Transfer des Deckglases mit den Fura-2 beladenen PASMC in die offene Schale und der Zugabe von 1 ml Hepes-Ringer-Lösung wurde die Schale auf dem Mikroskopisch fixiert. Eine Position für die Aufnahme der Bilder wurde festgelegt und das Experiment gestartet. Zunächst wurden alle 10 Sekunden ein Bild bei 340 nm bzw. 380 nm aufgenommen. Nach 50 Sekunden wurde dann entweder ET-1 (10 nM Endkonzentration) oder bei den Kontrollversuchen nur das Lösungsmittel in der entsprechenden Konzentration appliziert. Die Bildaufnahme geschah in der ersten Minute in sekundlichen Abständen und in den darauffolgenden 9,5 Minuten alle 30 Sekunden.

2.4.3.2 Experimente mit Perfusion

Nach Einbau des Deckglases in die Zellkammer wurde die Perfusionslösung mit einer Perfusionsrate von 0,5 ml/min über die PASMC geleitet und ein Bildausschnitt für die Messung festgelegt. Nach Start des Experiments wurden in den ersten beiden Minuten alle 30 Sekunden und nach Umschalten zum Perfusat mit 10 nM ET-1 für die folgenden 30 Minuten alle 3 Sekunden die beiden Fluoreszenzbilder aufgenommen. In den Kontrollversuchen wurde in dieser zweiten Phase Perfusat ohne ET-1 verwendet. Dabei war es nicht notwendig, das Lösungsmittel von ET-1 zu applizieren, da in den vorangegangenen Experimenten (in Kapitel 2.4.3.1 beschrieben) das Lösungsmittel keine Reaktion in den PASMC ausgelöst hatte.

2.4.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit der gleichen Software (TILLvisION), mit der auch die Fluoreszenzbilder aufgenommen wurden. Dabei wurden nur PASMC ausgewertet, bei denen das Fura 2-Signal mindestens doppelt so stark war wie der Hintergrund. Außerdem wurden nur PASMC gemessen, bei denen das Fluoreszenzsignal bei 380 nm mindestens genauso groß war wie bei 340 nm, da die Zellen ansonsten eine zu hohe basale Ca^{2+} -Konzentration schon vor Versuchsbeginn besaßen, was auf einen unphysiologischen Zellzustand hinweist.

Nach Markierung der auszuwertenden Zellen erfolgte die Bildung eines Quotienten aus den beiden Fluoreszenzmesswerten F_{340} und F_{380} nach Subtraktion eines Hintergrundwertes. Der Mittelwert dieses Quotienten wurde mit dem Standardfehler des Mittelwertes als Kurve über die Zeit dargestellt. Außerdem wurde die Differenz zwischen dem Quotient direkt vor ET-1-Zugabe und dem größten Wert (Peakwert) innerhalb 30 Sekunden nach Zugabe von ET-1 jeder einzelnen Kurve gebildet, Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes berechnet und in einem weiteren Diagramm dargestellt. Nach Ermittlung des zeitlichen Mittelwertes der Peakwerte wurde für die entsprechenden Kontrollversuche jeweils der gleiche Zeitpunkt ausgewertet.

2.5 Untersuchungen zur Hypoxie-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in PASMC der Maus

Nach Etablierung und Optimierung der Messmethodik zur Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ mit PASMC der Ratte wurden die Experimente zur Untersuchung der HPV auf zellulärer Ebene mittels dieser Messmethodik mit PASMC der Maus durchgeführt, da dies auch die Verwendung von PASMC aus gendefizienten Mäusen ermöglichte. Die Durchführung der Experimente erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. A. Dietrich im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg (Direktor: Prof. Dr. T. Gudermann).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben den C57BL6/N- und TRPC6-WT-Mäusen auch TRPC6^{-/-}-Mäuse für die Gewinnung der PASMC verwendet, um die Bedeutung des TRPC6-Kanals für die zelluläre Hypoxieantwort zu untersuchen. Als Rekonstitutions-Experiment wurden PASMC von TRPC6^{-/-}-Mäusen mit adeno-assoziierten Viren infiziert, die ein Konstrukt zur Expression des TRPC6-Kanals enthielten. Die PASMC von C57BL6/N-Mäusen zeigten gegenüber PASMC von TRPC6-WT-Mäusen keinen Unterschied in ihrer Reaktion auf Hypoxie.

2.5.1 Prinzip der Messmethode

Neben der in Kapitel 2.4.1 bereits beschriebenen Methode zur Messung der $[Ca^{2+}]_i$ durch Bestimmung des Quotienten aus der Fluoreszenzemission nach Anregung mit 340 nm bzw. 380 nm unter Verwendung von Fura-2, wurde auch die sogenannte Manganionen (Mn^{2+})-Quench-Methode durchgeführt. Dies erlaubte die Messung des Ioneneinstroms aus dem

Extrazellulär- in den Intrazellulärraum durch nicht-selektive Ionenkanäle, zu denen auch TRPC6 gehört. Denn die zu untersuchenden TRPC6-Kanäle sind neben Ca^{2+} -Ionen auch für andere Ionen wie Mangan- und Strontiumionen durchlässig. Mn^{2+} -Ionen zeigen eine stärkere Affinität zu Fura-2 als Ca^{2+} -Ionen und vermindern („quenchen“) die Fluoreszenzemission von Fura-2 nach Exzitation bei 360 nm, dem für Ca^{2+} -Ionen-unabhängigen isosbestischen Punkt. Eine Abnahme der Fluoreszenzemission steht somit in direkter Korrelation zur Aktivität der TRPC6-Kanäle.

2.5.2 Infektion von PSMC aus TRPC6-defizienten Mäusen mit einem viralen TRPC6-GFP (Grün Fluoreszierendes Protein)-Konstrukt

Die rekombinanten adeno-assoziierten Viren (AAV), die den TRPC6-Kationenkanal fusioniert mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) exprimierten, wurden von der Arbeitsgruppe von PD Dr. A. Dietrich im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg (Direktor: Prof. Dr. T. Gudermann) bereitgestellt. Die PSMC aus den TRPC6^{-/-}-Mäusen wurden mindestens drei Tage vor Versuchsbeginn infiziert. Für die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden nur PSMC verwendet, bei denen eine Fluoreszenzemission nach Exzitation bei 470 nm durch das grün-fluoreszierenden Protein nachweisbar war. Die Überprüfung der korrekten plasmamembranären Lokalisation der TRPC6-Kanäle in den PSMC erfolgte mittels eines konfokalen Laserscanning Mikroskops (Zeiss LSM 510 Meta, Jena).

2.5.3 Experimenteller Aufbau

Das Messsystem zur Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der PSMC der Maus war prinzipiell so aufgebaut wie bereits in Kapitel 2.4.2 beschrieben wurde. Abweichend davon ist zu erwähnen, dass es sich bei dem Mikroskop um ein OLYMPUS IX70 (Olympus, Hamburg) handelte und ein 20-faches Öbobjektiv (numerische Aperture von 0,80) verwendet wurde. Außerdem diente eine temperierbare Zellkammer (Institut für Medizinische Pharmakologie, Philipps-Universität Marburg) sowohl für die Versuche ohne als auch mit Perfusion (500 μl Kammervolumen). Die Versuchstemperatur betrug 30°C. Als Perfusionssystem diente dasselbe System, das auch für die Messung der Kontraktion und der Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der PSMC der Ratte benutzt wurde. Die genauere Beschreibung desselben ist in Kapitel 2.3.1 zu finden. Zur Herstellung der hypoxischen Perfusionslösung wurde HEPES-Ringer-Lösung über einen Zeitraum von mindestens 30 Minuten vor Versuchsbeginn mit 100% Stickstoff (Airliquide, Siegen) begast.

2.5.4 Experimenteller Ablauf

Für die Experimente mit PASMCM der Maus wurden nur PASMCM der Passage 0 verwendet. Dabei befanden sich die PASMCM auf Kollagen-beschichteten Deckgläsern (24 mm Durchmesser, Menzel, Braunschweig). Die Beschichtung der Deckgläser erfolgte nach derselben Vorgehensweise wie bereits am Ende des Kapitels 2.1.1 beschrieben wurde. Nach zweimaligem Waschen mit Hepes-Ringer-Lösung wurden die PASMCM mit 5 μM Fura-2 AM in Hepes-Ringer-Lösung, das 0,1% BSA enthielt, bei 37°C mindestens 60 Minuten beladen. Nach erneutem Waschen der Fura-2 beladenen PASMCM mit Hepes-Ringer-Lösung wurde das Deckglas in die Zellkammer platziert. Bei den Versuchen ohne Perfusion wurde dann 250 μl Hepes-Ringer-Lösung in die Zellkammer pipettiert. Dahingegen wurde die Zellkammer bei den Versuchen mit Perfusion mit einem weiteren Deckglas (28 mm Durchmesser) verschlossen, mit Hepes-Ringer-Lösung befüllt und luftblasenfrei in das Perfusionssystem integriert. Nach Festlegung eines Bildausschnittes für die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde das Experiment gestartet. Im folgenden wird das Versuchsschema für die verschiedenen Experimente getrennt beschrieben.

2.5.4.1 Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der PASMCM nach Applikation von Endothelin-1 (ET-1)

Zur Untersuchung der grundsätzlichen Reaktionsfähigkeit der PASMCM der Maus auf einen vasokonstriktiv wirkenden Stimulus wurde 20 nM ET-1 verwendet. Eine Minute nach Versuchsstart erfolgte die Applikation von ET-1, wobei die Aufnahme der Fluoreszenzbilder in sekundlichen Abständen und über einen Zeitraum von elf Minuten durchgeführt wurde.

2.5.4.2 Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter Hypoxie und der Einfluß des TRPC6-Kanals auf die Hypoxieantwort

Bei den in diesem Kapitel beschriebenen Versuchen wurde über einen Zeitraum von 37 Minuten alle sechs Sekunden die Aufnahme der beiden Fluoreszenzbilder durchgeführt. Die Hypoxiephase für die PASMCM begann immer nach zwölf Minuten. Darüberhinaus wurden in einer Versuchsreihe die PASMCM 7,5 Minuten vor und während der Hypoxiephase mit einer niedrigen Dosis ET-1 (4 nM) „geprint“. Wie bereits in der Literatur beschrieben sollte dies eine Sensibilisierung der PASMCM für die Hypoxieantwort bewirken⁸⁸. In Kontrollexperimenten wurde die normoxische Bedingung während des gesamten Versuchs beibehalten. Zur Untersuchung des Einflusses der TRPC6-Kanäle auf

die Hypoxieantwort, wurden die Hypoxieversuche mit ET-1-„Priming“ auch mit PASMCMC der TRPC6^{-/-}-Mäuse durchgeführt. In Rekonstitutions-Experimenten wurden PASMCMC aus TRPC6^{-/-}-Mäusen verwendet, die zuvor mit einem adeno-assoziierten Virus infiziert wurden, das ein Konstrukt für TRPC6-GFP (grün fluoreszierendes Protein) enthielt (siehe Kapitel 2.5.2).

2.5.4.3 Untersuchung der Ursache für den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ unter Hypoxie

Der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ der PASMCMC der Maus (C57BL6/N- und TRPC6-WT-Maus) unter Hypoxie wirft die Frage nach der Quelle der Ca^{2+} -Ionen auf. Um den Beitrag der Ca^{2+} -Ionen aus internen Speichern am Gesamtsignal ermitteln zu können, wurden Experimente ohne extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen durchgeführt. Dafür wurde HEPES-Ringer-Lösung ohne Ca^{2+} -Ionen verwendet, das zusätzlich 2 mM EGTA (Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, Sigma-Aldrich, Steinheim) als Ca^{2+} -Chelator enthielt. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte alle sechs Sekunden über einen Zeitraum von 48 Minuten. Zu Versuchbeginn wurde Ca^{2+} -Ionen enthaltende HEPES-Ringer-Lösung verwendet, und 4 Minuten nach Versuchsbeginn fand der Wechsel zur HEPES-Ringer-Lösung ohne Ca^{2+} -Ionen statt. Nach weiteren 8 Minuten wurden die PASMCMC mit 4 nM ET-1 „geprimt“ bis nach weiteren 8 Minuten die PASMCMC der Hypoxie ausgesetzt wurden. Um die Reaktionsfähigkeit der PASMCMC auch ohne extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen zu überprüfen wurde in einem parallelen Ansatz 5,5 Minuten nach dem Wechsel zur HEPES-Ringer-Lösung ohne Ca^{2+} -Ionen statt des ET-1-„Primings“ 20 nM ET-1 für weitere 11 Minuten appliziert. Dieser Versuchsmodus wurde mit PASMCMC aus WT- und TRPC6^{-/-}-Mäusen durchgeführt.

Zur Untersuchung der Rolle der spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (VOCC) für den hypoxieabhängigen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ wurde zur Inhibition der VOCC in einem weiteren Versuchsansatz 10 μ M Nicardipin (Sigma-Aldrich, Steinheim) parallel zum ET-1-„Priming“ und der Hypoxiephase appliziert. Dabei wurden PASMCMC aus WT-Mäusen verwendet und die Messung nach dem gleichen Versuchsschema wie bereits in Kapitel 2.5.4.2 beschrieben durchgeführt.

Im weiteren wurde die TRPC6-Kanalaktivität unter hypoxischen Bedingungen mittels der Mn^{2+} -Quench-Methode (s. Kapitel 2.5.1) mit PASMCMC aus WT-Mäusen im Vergleich zu PASMCMC aus TRPC6^{-/-}-Mäusen untersucht. Das Versuchsschema entsprach dabei ebenfalls dem in Kapitel 2.5.4.2 beschriebenen, allerdings wurde zusätzlich ab Beginn des ET-1-„Primings“ kontinuierlich 300 μ M $MnCl_2$ (Sigma-Aldrich, Steinheim) appliziert.

2.5.4.4 Untersuchungen zur TRPC6-Kanalaktivierung

Zur Aufklärung der Signalschritte bei der TRPC6-Kanalaktivierung unter hypoxischen Bedingungen wurde untersucht, ob der TRPC6-Kanal direkt oder indirekt aktiviert wird. Zur Untersuchung eines direkten Effekts von Hypoxie auf den TRPC6-Kanal, wurden zunächst HEK 293-Zellen (ATCC-Nr. CRL-1573), die heterolog TRPC6-GFP exprimierten, hinsichtlich ihrer Reaktionsfähigkeit auf Hypoxie untersucht. Zum „Primen“ der Zellen wurde Carbachol verwendet, das über den in HEK 293-Zellen exprimierten muskarinischen Azetylcholin-Rezeptor wirkt. Carbachol wirkt somit ebenso wie ET-1 über einen G-Protein-gekoppelten Signalweg⁸⁷. In diesem Versuchsansatz wurde fünf Minuten nach Versuchsbeginn zuerst 10 nM Carbachol (Sigma-Aldrich, Steinheim) appliziert bis die Zellen schließlich nach weiteren zehn Minuten über einen Zeitraum von 33 Minuten hypoxischen Bedingungen ausgesetzt wurden. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte dabei alle sechs Sekunden.

Zum Kultivieren der HEK 293-Zellen wurde Kulturmedium verwendet, das 1% Penicillin/Streptomycin und 10% FCS in MEM (Minimal Essential Medium) mit Earle's-Salzen (PAA Laboratories, Cölbe) enthielt.

Zur Aufklärung eines indirekten Effekts auf die TRPC6-Kanalaktivierung wurde die Rolle intrazellulärer Mediatoren untersucht. Dafür wurde zum einen der Einfluß von DAG durch Inhibition der DAG-Kinase mittels des DAG-Kinase-Inhibitors R59949 (Merck, Darmstadt), und zum anderen der Einfluß von reaktiven Sauerstoffspezies in Form von t-BHP (tertiäres Butyl-Wasserstoffperoxid, Sigma-Aldrich, Steinheim) auf die TRPC6-Kanalaktivität untersucht. Dazu wurde ein Vergleich der Signalantwort zwischen PSMC aus WT- und PSMC aus TRPC6^{-/-}-Mäusen vorgenommen. Die Versuche wurden in der offenen Zellkammer, d.h. ohne Perfusion, durchgeführt. Eine Minute nach Versuchsbeginn wurde 4 nM ET-1 als „Priming“ appliziert und nach einer weiteren Minute erfolgte die Zugabe des DAG-Kinase-Inhibitors R59949 (100 µM Endkonzentration, 100 mM-Stock in DMSO gelöst) bzw. des t-BHP (100 µM Endkonzentration, 7,77 M-Stock in 70%-iger wässriger Lösung). Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder fand in sekundlichen Abständen statt. Beim DAG-Kinase-Inhibitor R59949 wurde der Versuch nach 13 Minuten und beim t-BHP nach 16 Minuten gestoppt.

2.5.4.5 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ aortaler SMC unter Hypoxie

Neben den Versuchen mit SMC's aus der pulmonalen Strombahn wurden auch Versuche mit aortalen SMC's zur Untersuchung der Reaktion auf Hypoxie vorgenommen. Dabei sollte festgestellt werden, ob die Hypoxieantwort nur speziell bei den pulmonarteriellen SMC zu finden ist oder auch bei SMC der systemischen Gefäße. Als Versuchsschema diente dasselbe wie bei den PASMC unter Hypoxie mit ET-1-, „Priming“ (siehe Kapitel 2.5.4.2).

2.5.5 Auswertung

Das Messsystem war für die Ermittlung der $[Ca^{2+}]_i$ aus den Rohdaten (Quotient F340/F380) kalibriert worden, so dass bei den Messungen die $[Ca^{2+}]_i$ direkt mit Hilfe der Software TILLvisION ausgewertet werden konnte. Die Grundlage zur Berechnung der $[Ca^{2+}]_i$ bestand in der Gleichung von Grynkiewicz²⁹:

$$[Ca^{2+}] = K_d \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right)$$

Dabei ist der K_d -Wert die effektive Dissoziationskonstante von Fura-2, die durch die Kalibrierung mit einer bekannten Ca^{2+} -Konzentration ermittelt werden kann, R (= Ratio F340/F380) ist der Quotient der Fluoreszenzemission bei einer Anregung mit der Wellenlänge von 340 nm zu der bei einer Anregung mit der Wellenlänge von 380 nm, R_{\max} ist dieser Quotient bei maximaler Ca^{2+} -Freisetzung und R_{\min} dieser Quotient in Abwesenheit von freien Ca^{2+} -Ionen. Weiter steht S_{f2} für die Fluoreszenzemission nach Anregung bei 380 nm in Abwesenheit von freien Ca^{2+} -Ionen und S_{b2} für die Fluoreszenzemission bei einer maximalen Ca^{2+} -Freisetzung in der Zelle nach Anregung bei 380 nm.

Die maximale Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen wurde durch die Verwendung von 10 μ M Ionomycin (Sigma-Aldrich, Steinheim) erreicht und die Abwesenheit der freien Ca^{2+} -Ionen wurde mit Hilfe von 5 mM des Ca^{2+} -Chelators EGTA geschaffen⁸.

Bei den Mn^{2+} -Quench-Versuchen wurden die Basalwerte der Fluoreszenzemission bei einer Exzitation mit 360 nm Wellenlänge als 100% definiert. Die Mn^{2+} -Quench-Rate unter Hypoxie wurde aus dem linearen Teil des Fluoreszenzabfalls in %/Sekunde ermittelt.

2.6 Messung der normobaren Sauerstoffkonzentration des hypoxischen Perfusats

Für die Untersuchung der Hypoxieantwort der PASMC wurde ein Perfusionssystem verwendet, das in Kapitel 2.3.1 näher beschrieben ist. Zur Schaffung der hypoxischen Bedingung für die PASMC in der Zellkammer wurde in den Experimenten das Perfusat, das durch die Zellkammer geleitet wurde, je nach seiner Zusammensetzung mit 5% Kohlendioxid, Rest Stickstoff bzw. mit 100% Stickstoff begast.

Zur Bestimmung der normobaren Sauerstoffkonzentration des über die PASMC fließenden Perfusats wurde ein System verwendet, das aus einer Sauerstoffnadelelektrode, einer Kalibrierkammer und einem Verstärker (Firma Science Products GmbH, Hofheim) bestand. Für die Messung der normobaren Sauerstoffkonzentration, nachfolgend als O₂-Konzentration benannt, wurde das Perfusat über einen Zeitraum von 1 Stunde mit 100% Stickstoff begast. Nach einer Zwei-Punkt-Kalibrierung (0% und 21% Sauerstoff) der Sauerstoffnadelelektrode bei 36°C wurde die Elektrode im Perfusionsschlauch direkt nach der Zellkammer luftdicht fixiert, so dass die O₂-Konzentration des aus der Kammer fließenden Perfusats gemessen wurde. Eine direkte Messung in der Zellkammer war nicht möglich, da die Zellkammer eine geschlossene Kammer war. Nach einer fünfminütigen normoxischen Perfusion wurde auf hypoxische Perfusion mittels des Drei-Wege-Hahns umgestellt und die Sauerstoffmessung gestartet. In den ersten drei Minuten wurde halbsminütig gemessen und danach für weitere 17 Minuten alle 15 Sekunden. Da die Messung in dem der Kammer nachgeschalteten Perfusionsschlauch stattfand, hatte dies die Konsequenz, dass der Abfall der O₂-Konzentration zeitlich etwas verschoben gemessen wurde gegenüber den Werten in der Kammer. Die Perfusion vom Ausgang der Zellkammer bis zur Sauerstoffelektrode dauerte etwa 1 Minute.

2.7 Statistik

Die Daten wurden als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die n-Zahl beinhaltet jeweils die Summe aller gemessenen PASMIC. Für die Untersuchung hinsichtlich der Signifikanz wurde der zweiseitige t-Test bei einem Vergleich von nur zwei Gruppen verwendet und der Student-Newman-Keuls-post-hoc-Test bei einem Vergleich zwischen mehr als zwei Gruppen. Alle p-Werte $< 0,05$ galten als signifikant.

3 Ergebnisse

Im folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Charakterisierung der isolierten PASMC und der Etablierung einer Methode zur Untersuchung der HPV auf zellulärer Ebene dargestellt und dann die Ergebnisse der Untersuchungen zur HPV.

3.1 Charakterisierung der PASMC der Ratte

3.1.1 Immunohistochemische Untersuchung zur Isolierung der PASMC

Die Isolierung der intrapulmonalen glatten Muskelzellen basierte auf der Perfusion eines Agarose-Eisenpartikel-Gemisches über die Pulmonalarterie in die pulmonale Strombahn, wobei die Eisenpartikel aufgrund ihrer Größe die Kapillaren nicht passieren konnten und somit im präkapillären Bereich akkumulierten. Da die Gesamtquerschnittsfläche von der Pulmonalarterie zu den Kapillaren hin um ein Vielfaches zunimmt, befanden sich mengenmäßig die meisten Eisenpartikel im präkapillären Bereich. Hinzu kam, dass sich während der Perfusion des Agarose-Eisenpartikel-Gemisches mittels einer leichtgängigen Spritze die Eisenpartikel zeitlich zunehmend in der Spritze absetzten und somit gegen Perfusionsende fast nur noch Agarose perfundiert wurde, die die Eisenpartikel in Richtung Kapillarbett verdichtete. Durch Abkühlen des Herz-Lungen-Präparates wurde die Agarose und damit auch die Eisenpartikel in den Gefäßen der pulmonalen Strombahn fixiert. Die Eisenpartikel dienten in den folgenden Schritten der Zellisolierungsmethode zur magnetischen Selektion der Gefäßstückchen, aus denen dann in Kultur PASMC wuchsen. Abb. 5 zeigt beispielhaft einen immunohistochemisch gefärbten Lungenschnitt mit den Eisenpartikeln in den arteriellen Gefäßen. Dabei befanden sich die Eisenpartikel besonders in den kleineren Gefäßen. In dem Lungenschnitt ist die immunohistochemische Färbung gegen SM- α -Aktin (violett) und gegen vWF (braun) zu sehen.

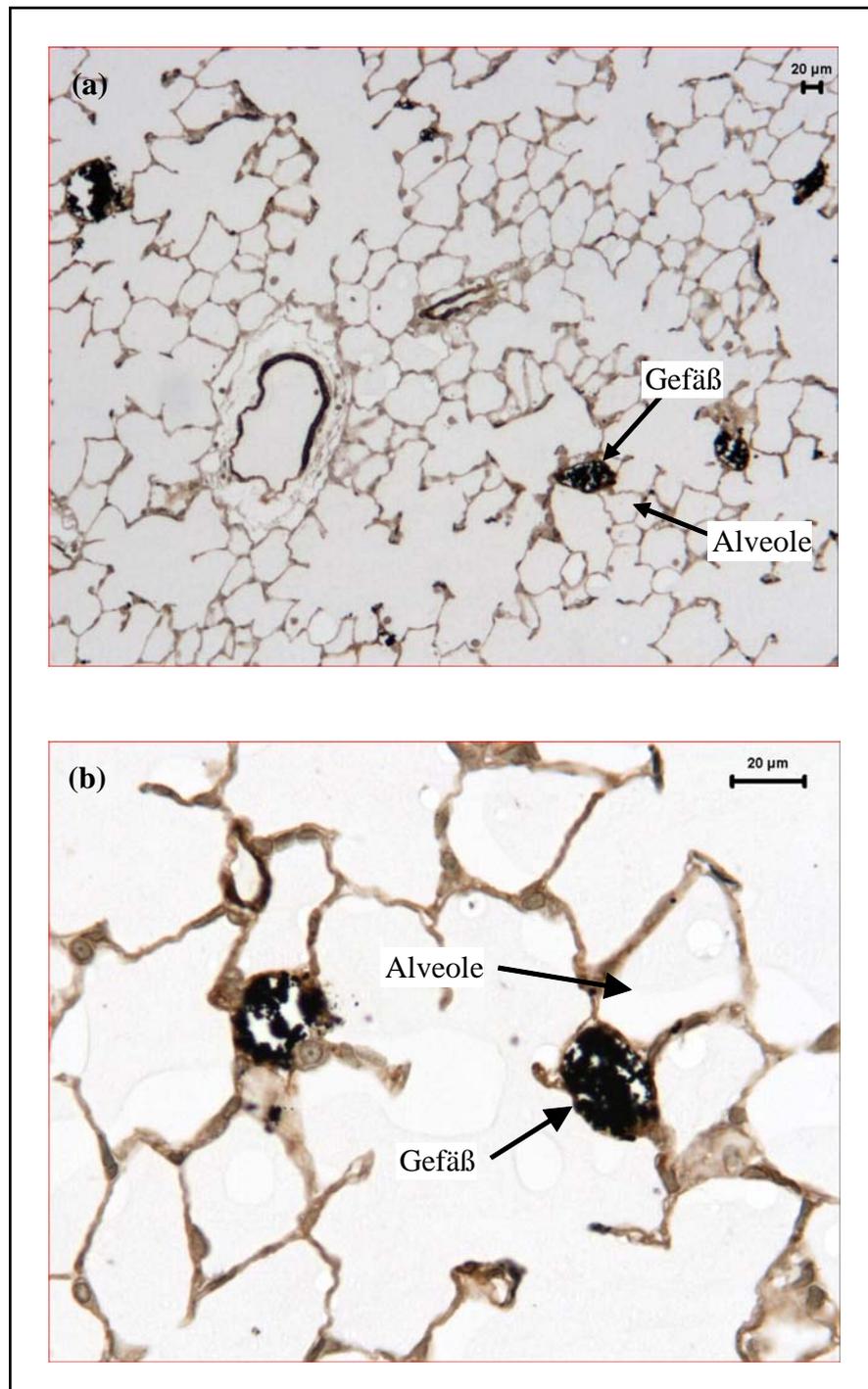


Abb. 5: Immunohistochemische Färbung eines Lungenschnitts der Ratte gegen das glattmuskuläre α -Aktin (SM- α -Aktin, violett) und den von Willebrand Faktor (vWF, braun). Die Eisenpartikel stellen sich schwarz dar. Gefäße und Alveolen sind exemplarisch gekennzeichnet. Vergrößerung: (a) x100 und (b) x400.

3.1.2 Immunfluoreszenzfärbung der PASMC

Zur Charakterisierung der isolierten Zellen aus der Ratte wurden diese mittels der Immunfluoreszenztechnik untersucht. Neben der FITC-markierten Fluoreszenzfärbung gegen verschiedene Proteine wurde auch eine Kernfärbung mittels DAPI durchgeführt. Nach entsprechender Anregung des fluoreszierenden Farbstoffs erschien die FITC-markierte Fluoreszenzfärbung grün und die DAPI-Färbung blau. Nach Aufnahme der beiden Fluoreszenzbilder wurden diese mit Hilfe der Software überlagert. Die Aufnahme der negativen Kontrolle, d.h. die Färbung ohne den primären Antikörper zum Ausschluß eines Signals durch den sekundären Antikörper, erfolgte mit den gleichen Einstellungen wie die entsprechende Aufnahme der Färbung mit einem primären Antikörper gegen ein bestimmtes Protein. Da Vimentin als Zytoskelettprotein in allen Zellen mesodermaler Herkunft², d.h. auch in glatten Muskelzellen vorkommt, wurde die Fluoreszenzfärbung gegen Vimentin als positive Kontrolle zum grundsätzlichen Nachweis der Funktionsfähigkeit der Fluoreszenzfärbung durchgeführt.

Der Gewinnung der PASMC lag die Isolierung von intrapulmonalarteriellen Gefäßen mittels eines in die Pulmonalarterie perfundierten Agarose-Eisenpartikel-Gemisches zugrunde. Dieses Gemisch wurde in den Gefäßen durch Abkühlen fixiert und das Lungengewebe anschließend zerkleinert. Nach Entfernung der Adventitia durch das Andauen mit Kollagenase und anschließender mechanischer Behandlung wurden die Gefäßstückchen, die die Eisenpartikel enthielten, auf magnetische Weise selektiert und anschließend kultiviert. In Kultur wuchsen dann Zellen direkt aus diesen Gefäßstückchen, weshalb bei den Bildern der immunfluoreszenzgefärbten Zellen von P0 zum Teil auch die Gefäßstückchen mit der Agarose und den Eisenpartikeln zu sehen sind. Da die Gefäßstückchen aus Zellen bestehen, erschienen diese nach Überlagerung der beiden Fluoreszenzbilder durch die Kernfärbung bläulich oder auch durch die Färbung gegen ein bestimmtes Protein grün.

Bei der Optimierung der Versuchsbedingungen für die Messung der Kontraktion und die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mit PASMC der Ratte wurde auch ein Vergleich der Reaktionsfähigkeit zwischen verschiedenen Passagen der PASMC auf ET-1 vorgenommen. Da außerdem bei der Kultivierung von PASMC die Möglichkeit besteht, dass diese dedifferenzieren, indem sie vom „kontraktilen“ in den „synthetischen“ Zellzustand wechseln und dadurch ihre Funktion ändern^{92, 121}, wurde auch bei der Immunfluoreszenzfärbung zur Charakterisierung der Zellen ein Passagenvergleich durchgeführt. Der Vergleich fand zwischen P0 (d.h. drei Tage nach Zellisolierung), P1 und

P3 statt. Bei der Aufnahme der Bilder wurden bei allen drei Passagen jeweils die gleichen Einstellungen (Belichtungszeit und Verstärkung) gewählt, um einen Vergleich so gut wie möglich zu gewährleisten. Dabei ist allerdings zu beachten, dass eine genaue Quantifizierung mit dieser Methode nicht möglich ist.

Abb. 6 zeigt eine positive Färbung gegen Vimentin für alle drei Passagen. Die Färbung gegen SM- α -Aktin, ein Protein, das nur in glatten Muskelzellen vorkommt, war ebenso bei allen drei Passagen deutlich positiv (Abb. 7 und Abb. 8). Die negative Kontrolle der Färbung gegen Vimentin und SM- α -Aktin ist in Abb. 9 dargestellt, bei der nur die Kernfärbung zu sehen war. Abb. 10 zeigt die Färbung gegen SM-MHC, die schweren Ketten des glattmuskulären Myosins, die bei allen drei Passagen gegenüber der negativen Kontrolle (Abb. 11) positiv war. Die Färbung gegen vWF, der für Endothelzellen kennzeichnend ist, war bei allen drei Passagen negativ, so dass nur die Kernfärbung zu sehen war (Abb. 12). In Abb. 13 ist die Färbung gegen das in Epithelzellen vorkommende Cytokeratin dargestellt, die ebenfalls für alle drei Passagen negativ war.

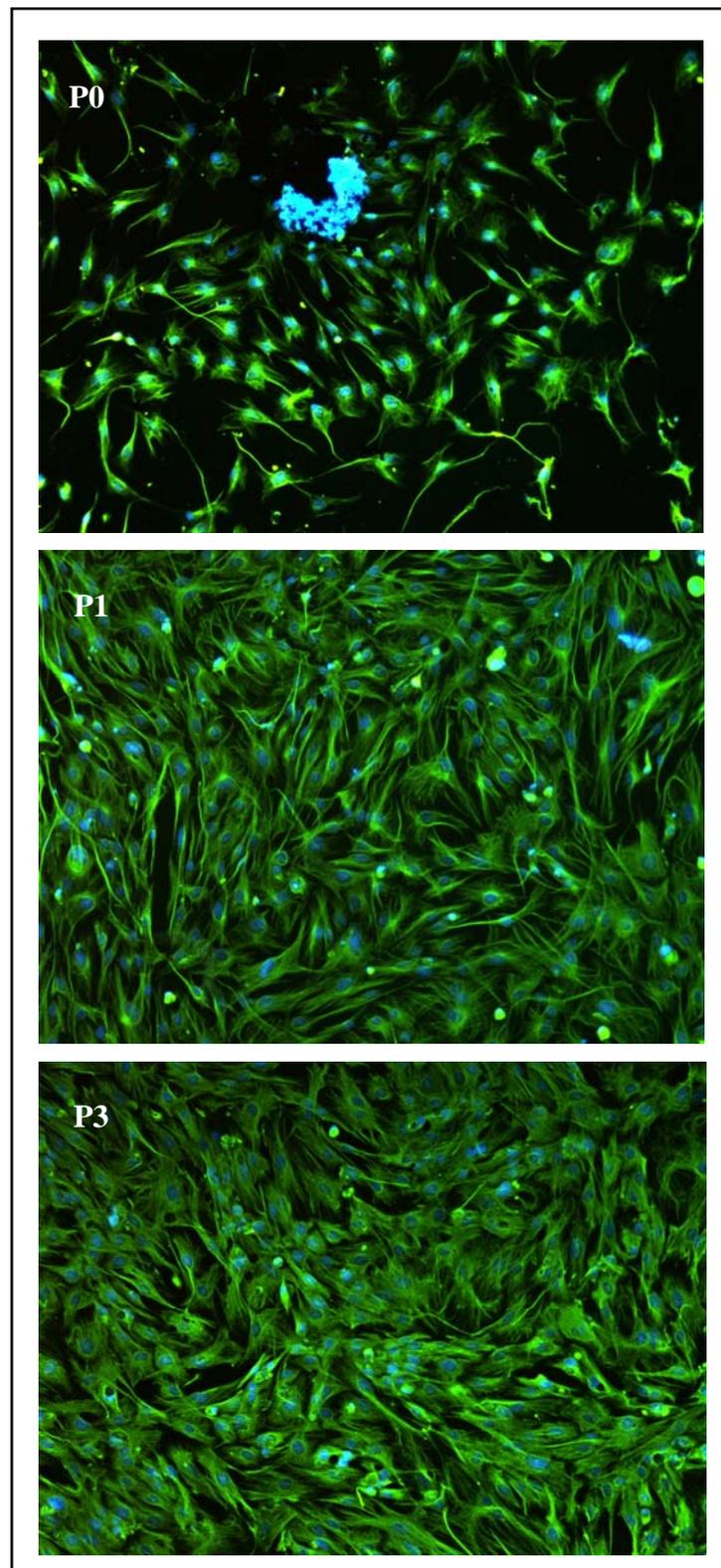


Abb. 6: Immunofluoreszenzfärbung mit einem primären Antikörper gegen Vimentin bei PASM C der Ratte der Passage 0 (P0), Passage 1 (P1) und Passage 3 (P3). Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-konjugierter Antikörper verwendet, der eine grüne Färbung bewirkte. Die Zellkerne sind durch die DAPI-Färbung blau gefärbt. Vergrößerung: x100.

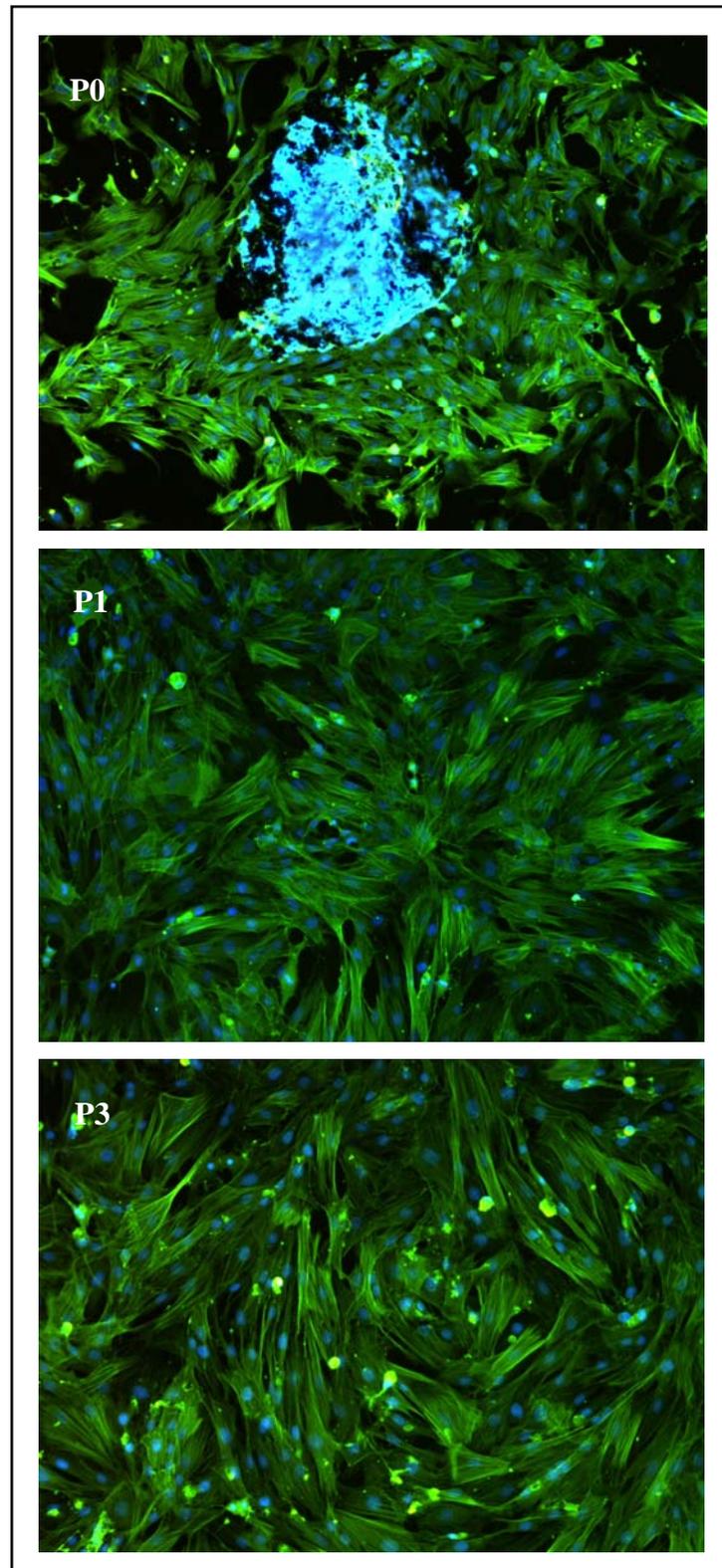


Abb. 7: Immunofluoreszenzfärbung mit einem primären Antikörper gegen das glattmuskuläre α -Aktin (SM- α -Aktin) von PASMC aus Ratte der Passage 0 (P0), Passage 1 (P1) und Passage 3 (P3). Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-konjugierter Antikörper verwendet, der eine grüne Färbung bewirkte. Die Zellkerne sind durch die DAPI-Färbung blau gefärbt. Vergrößerung: x100.

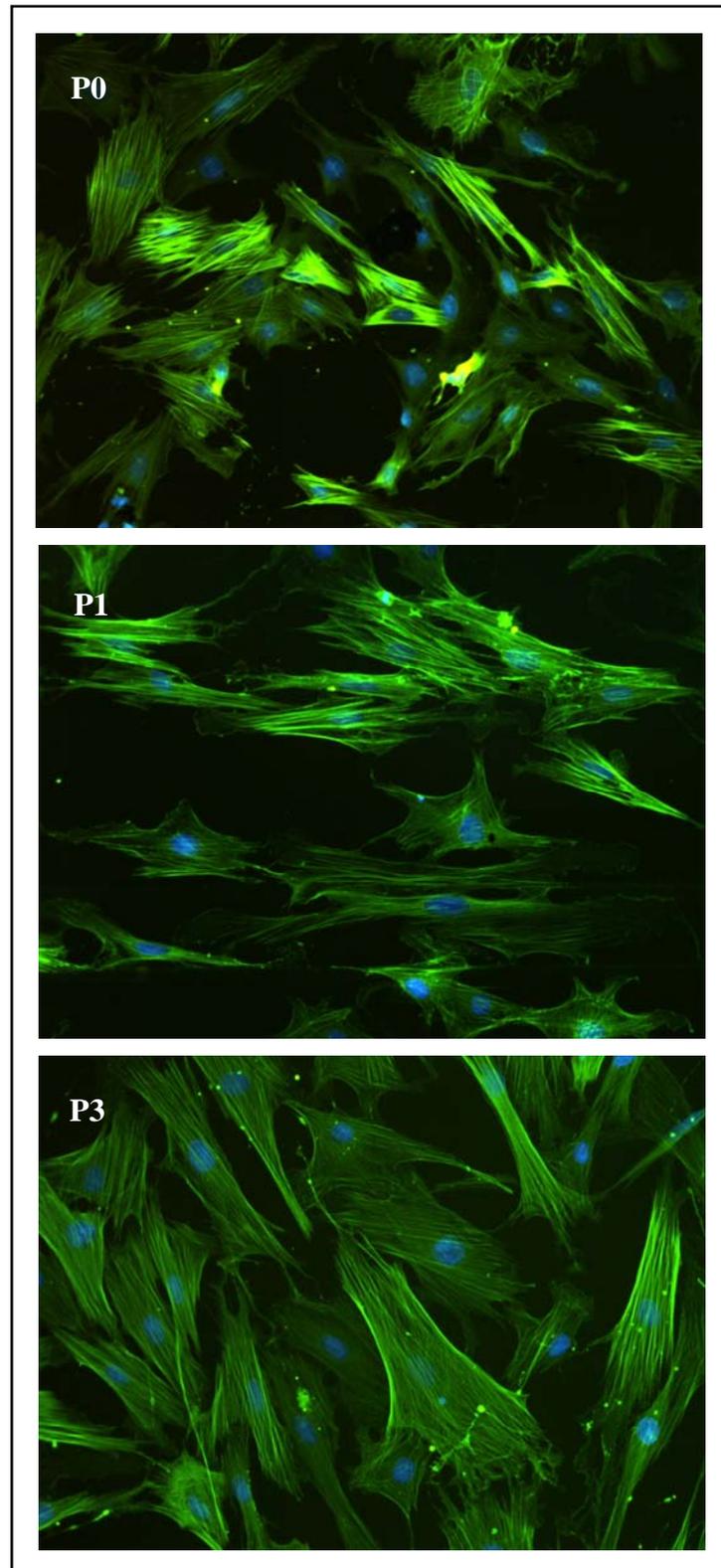


Abb. 8: Immunofluoreszenzfärbung mit einem primären Antikörper gegen das glattmuskuläre α -Aktin (SM- α -Aktin) von PASMC aus Ratte der Passage 0 (P0), Passage 1 (P1) und Passage 3 (P3). Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-konjugierter Antikörper verwendet, der eine grüne Färbung bewirkte. Die Zellkerne sind durch die DAPI-Färbung blau gefärbt. Vergrößerung: x400.

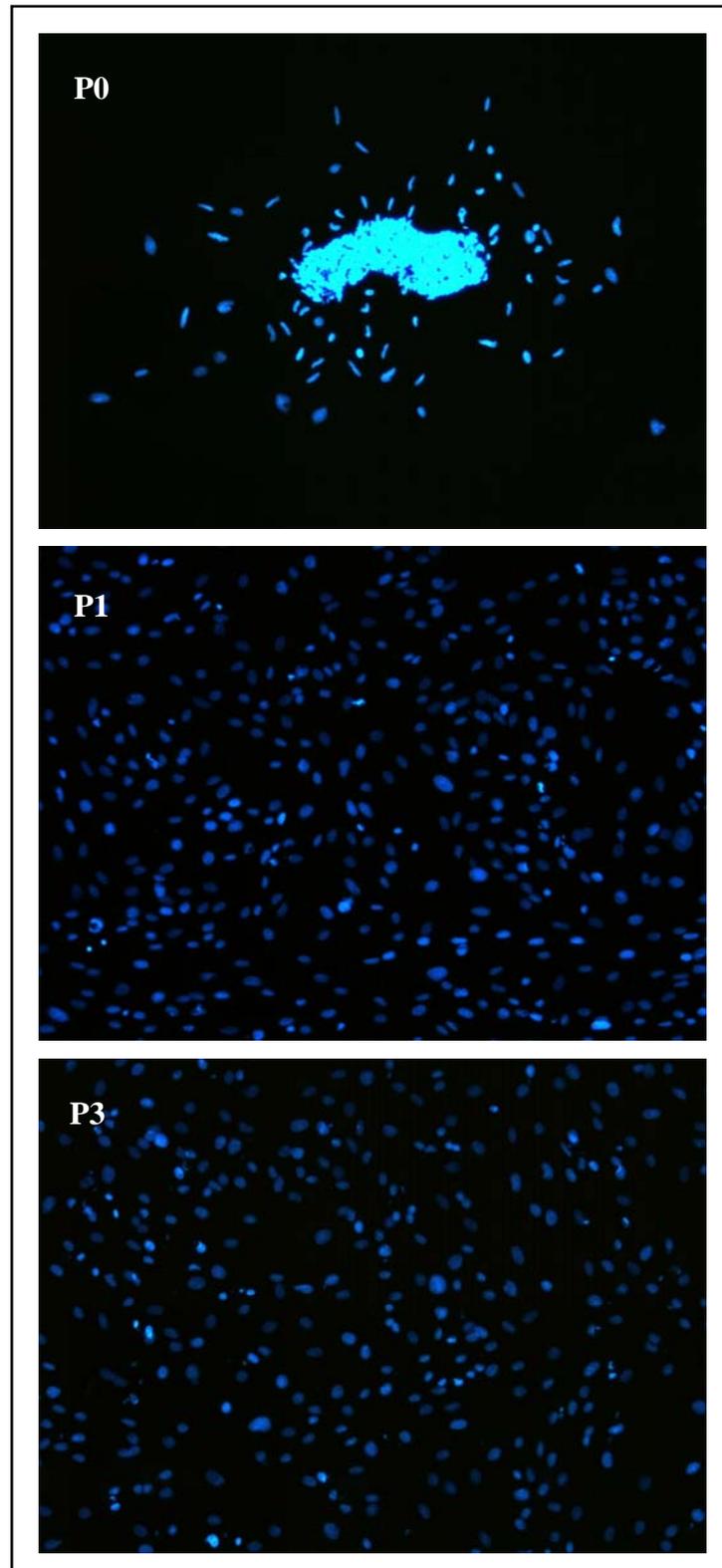


Abb. 9: Negative Kontrolle, d.h. ohne primären Antikörper, zur Immunfluoreszenzfärbung gegen Vimentin (Abb. 6) und das glattmuskuläre α -Aktin (SM- α -Aktin, Abb. 7 und 8) von PASMC aus Ratte der Passage 0 (P0), Passage 1 (P1) und Passage 3 (P3). Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-konjugierter Antikörper verwendet, der eine grüne Färbung bewirkte. Die Zellkerne sind durch die DAPI-Färbung blau gefärbt. Vergrößerung: x100.

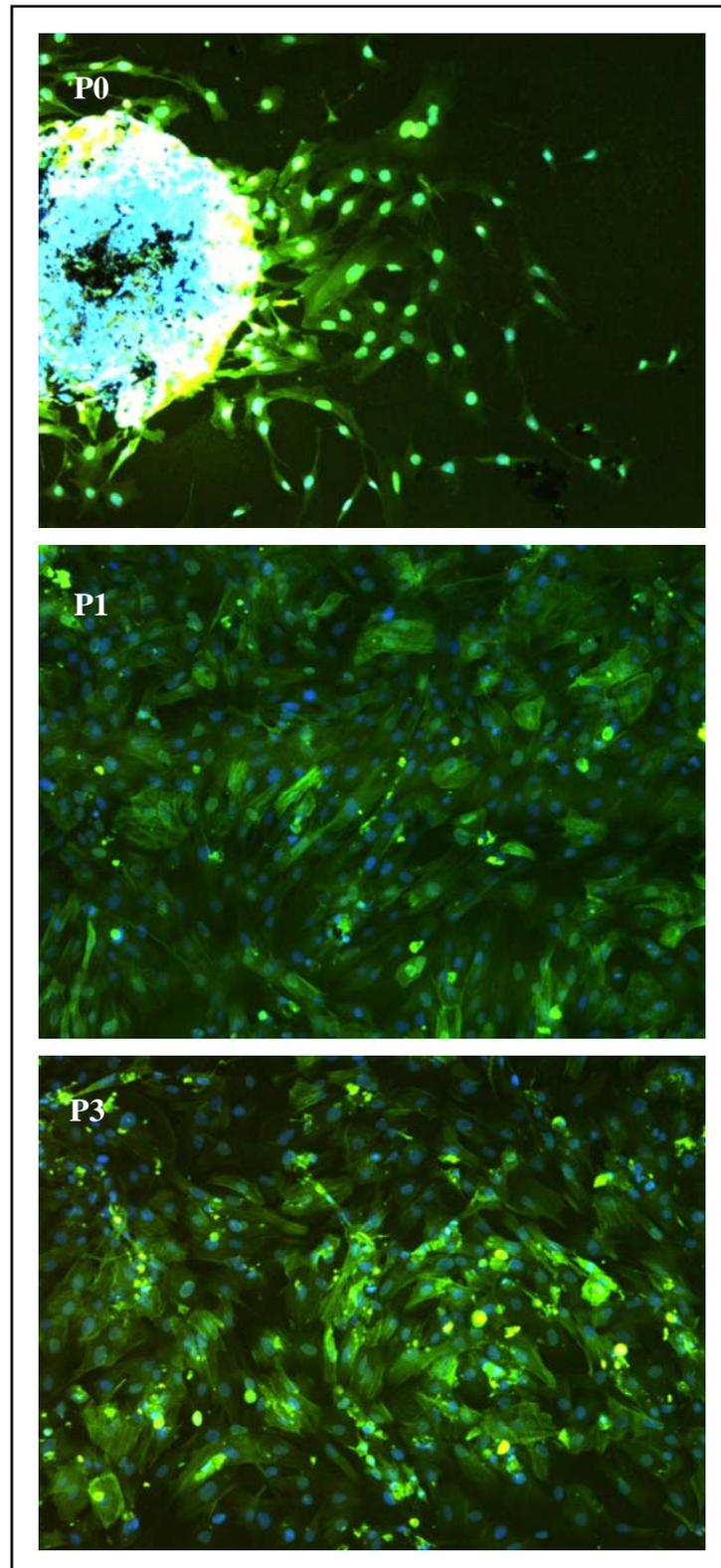


Abb. 10: Immunofluoreszenzfärbung mit einem primären Antikörper gegen die glattmuskulären schweren Ketten des Myosins (SM-MHC) von PASMC aus Ratte der Passage 0 (P0), Passage 1 (P1) und Passage 3 (P3). Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-konjugierter Antikörper verwendet, der eine grüne Färbung bewirkte. Die Zellkerne sind durch die DAPI-Färbung blau gefärbt. Vergrößerung: x100.

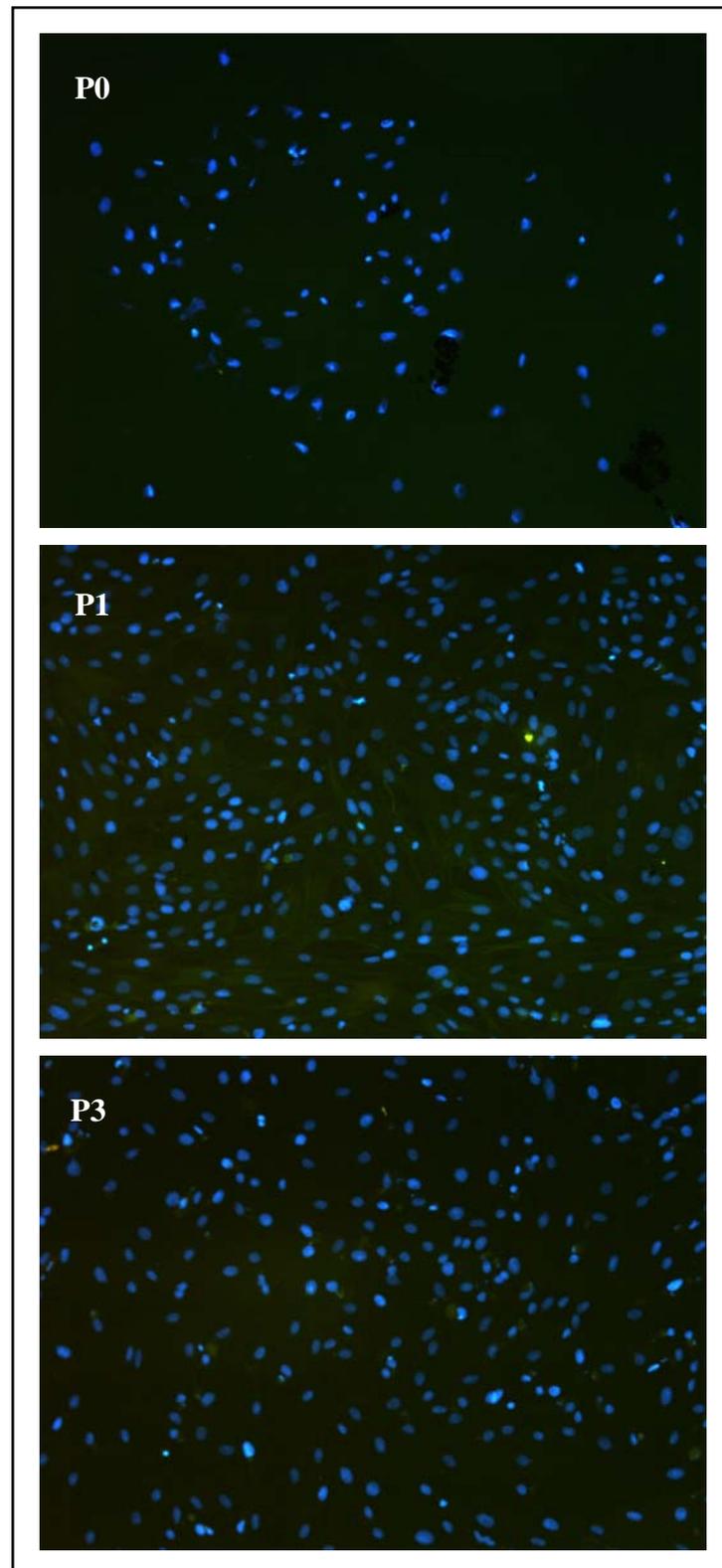


Abb. 11: Negative Kontrolle, d.h. ohne primären Antikörper, zur Immunfluoreszenzfärbung gegen die glattmuskulären schweren Ketten des Myosins (SM-MHC, Abb. 10) von PASMIC aus Ratte der Passage 0 (P0), Passage 1 (P1) und Passage 3 (P3). Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-konjugierter Antikörper verwendet, der eine grüne Färbung bewirkte. Die Zellkerne sind durch die DAPI-Färbung blau gefärbt. Vergrößerung: x100.

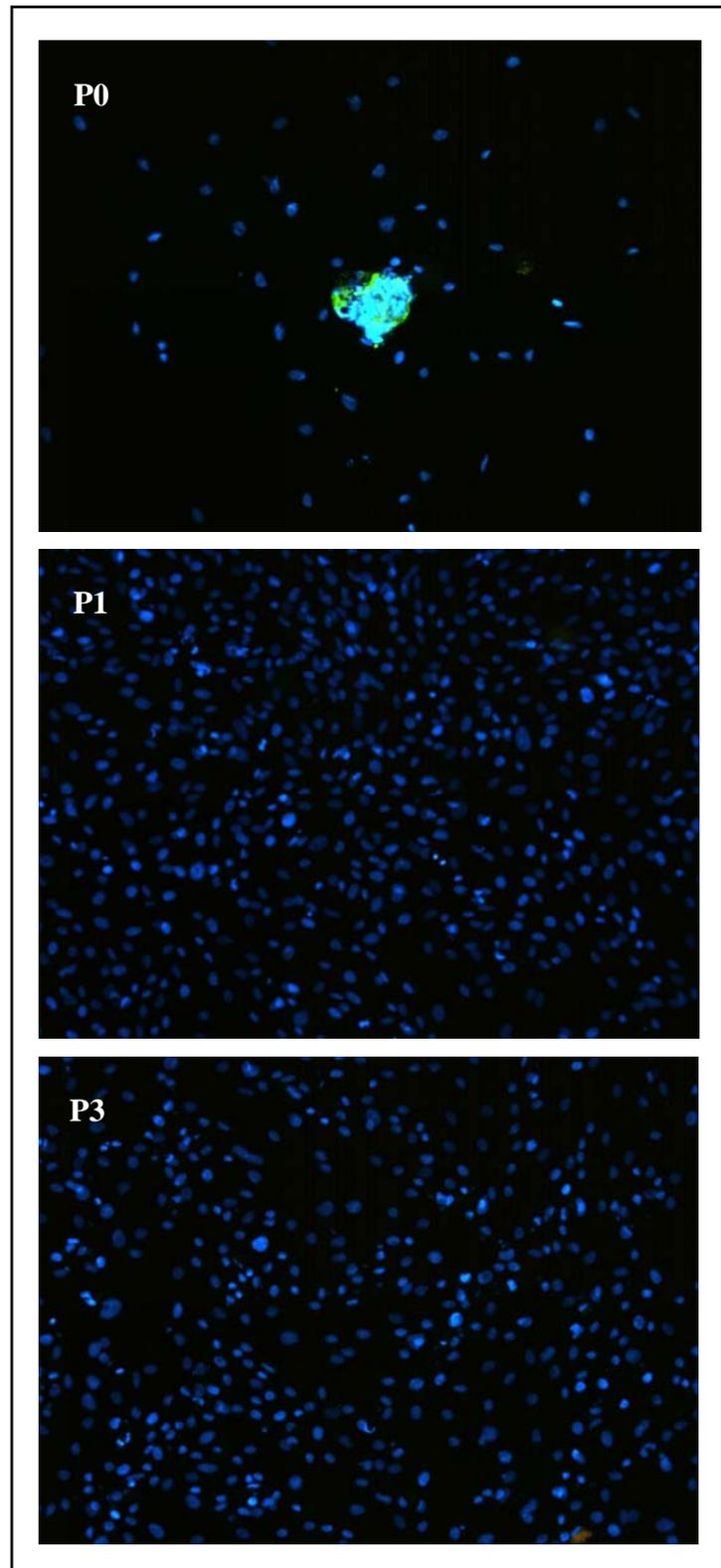


Abb. 12: Immunofluoreszenzfärbung mit einem primären Antikörper gegen den von Willebrand Faktor (vWF) von PASMC aus Ratte der Passage 0 (P0), Passage 1 (P1) und Passage 3 (P3). Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-konjugierter Antikörper verwendet, der eine grüne Färbung bewirkte. Die Zellkerne sind durch die DAPI-Färbung blau gefärbt. Vergrößerung: x100.

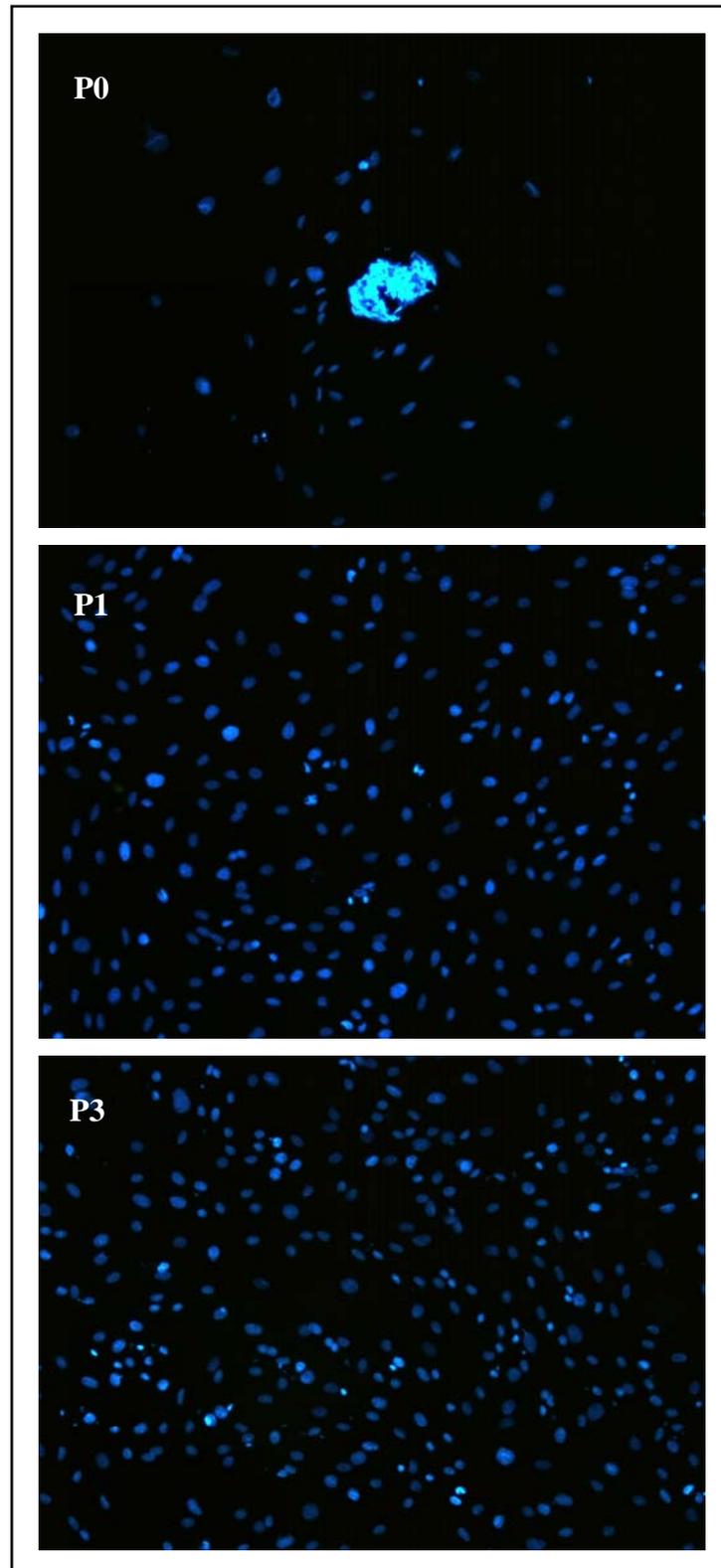


Abb. 13: Immunofluoreszenzfärbung mit einem primären Antikörper gegen Cytokeratin von PASMC aus Ratte der Passage 0 (P0), Passage 1 (P1) und Passage 3 (P3). Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-konjugierter Antikörper verwendet, der eine grüne Färbung bewirkte. Die Zellkerne sind durch die DAPI-Färbung blau gefärbt. Vergrößerung: x100.

3.1.3 Western-Blot

Für einen quantitativen Vergleich der Proteinmenge von SM- α -Aktin und SM-MHC für die verschiedenen Passagen der isolierten PASMC, wurden die PASMC von vier unterschiedlichen Zellisolierungen mittels eines Western-Blots untersucht. Da die Anzahl der Zellen bei P0, d.h. drei Tage nach Zellisolierung, für die Verwendung in einem Western-Blot zu gering war, wurde nur ein Vergleich zwischen P1 und P3 vorgenommen. Die quantitative Auswertung zeigte dabei sowohl für SM- α -Aktin als auch für SM-MHC keinen signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Passagen (zweiseitiger t-Test). Als Standard-Protein wurde β -Aktin verwendet. In Abb. 14 ist der Western-Blot einer Zellisolierung exemplarisch dargestellt.

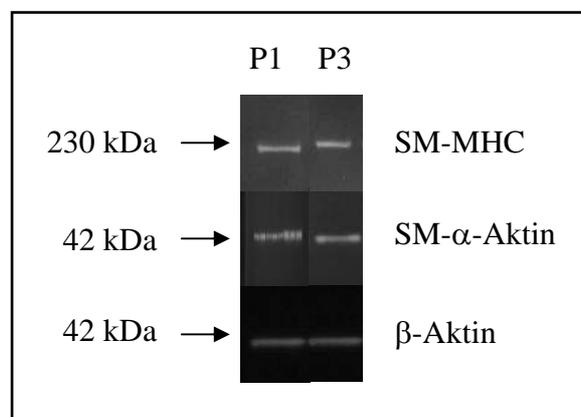


Abb. 14: Western-Blot mit PASMC der Passage 1 (P1) und Passage 3 (P3) der Ratte mit Antikörpern gegen die glattmuskulären Proteine SM-MHC und SM- α -Aktin. Als Standard-Protein wurde β -Aktin verwendet.

3.2 Messung der normobaren Sauerstoffkonzentration des hypoxischen Perfusats

Zur Untersuchung der HPV auf der Ebene der PASMC wurde für die Versuche unter Hypoxie das Perfusat mit Stickstoff begast und über eine temperierte Metallleitung zur Zellkammer geleitet. Ein zweites Glasgefäß enthielt unbegastetes Perfusat, das somit normoxisch war. Nach normoxischer Perfusion zu Versuchsbeginn wurde auf hypoxische Perfusion mittels eines Drei-Wege-Hahns umgestellt. In Abb. 15 ist die Kinetik der normobaren Sauerstoffkonzentration - nachfolgend als O_2 -Konzentration abgekürzt - nach Umstellung der Perfusion auf Hypoxie über einen Zeitraum von 20 Minuten dargestellt (n=3). Der Abfall der O_2 -Konzentration begann nach drei Minuten, unterschritt nach weiteren 6,5 Minuten den 5%-Wert und sank maximal auf 2,3%. Die Messung erfolgte mit einer Sauerstoff-Nadelelektrode direkt am Ausgang der Zellkammer, da die Kammer selbst geschlossen war und somit eine Messung direkt in der Kammer nicht ermöglichte. Deshalb ist beim zeitlichen Verlauf der O_2 -Konzentrationskurve zu beachten, dass eine geringe Zeitverzögerung zu den eigentlichen Werten in der Kammer vorhanden ist und somit die in Abb. 15 dargestellte Kinetik zu den jeweiligen Messzeitpunkten mindestens der Kinetik der O_2 -Konzentration direkt in der Zellkammer entspricht. Die Perfusion vom Ausgang der Zellkammer bis zur Sauerstoffelektrode dauerte etwa 1 Minute.

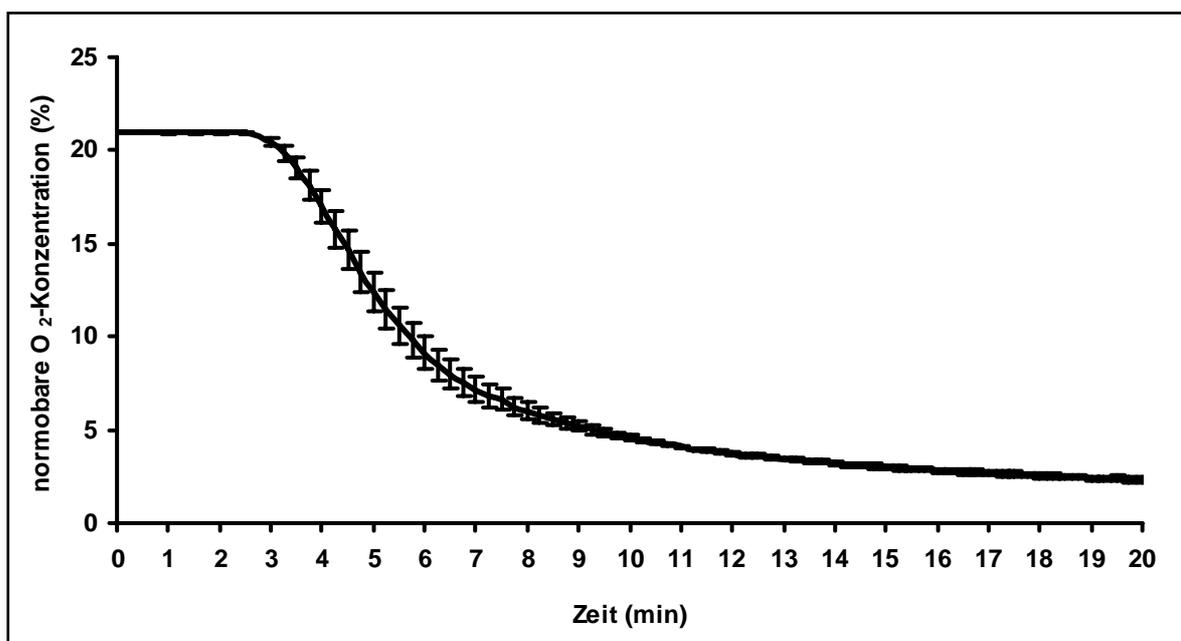


Abb. 15: Kinetik der normobaren Sauerstoff (O_2)-Konzentration (%) nach Wechsel von normoxischer zu hypoxischer Perfusion. Angegeben ist der Mittelwert (\pm SEM) (n=3).

3.3 Messung der Kontraktion der PASMC der Ratte

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode zur Untersuchung des Mechanismus der HPV auf der Ebene der PASMC etabliert werden. Da die HPV in vivo eine durch alveoläre Hypoxie induzierte Kontraktion der glatten Muskelzellen der präkapillären Gefäße bewirkt, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob sich die Messung der Kontraktion für diese Anwendung eignet. Dafür wurden die PASMC auf Kollagen-beschichtete Deckgläser ausgesät und die Änderung der Zellfläche bei verschiedenen Versuchsbedingungen über die Zeit analysiert.

In einem ersten Schritt wurden PASMC aus verschiedenen Passagen hinsichtlich ihrer Reaktion auf ET-1 als einen Kontroll-Kontraktionsstimulus zur Optimierung der zu verwendenden Zellpassage untersucht. In einem zweiten Schritt wurden dann Versuche unter Hypoxie durchgeführt, wobei gleichzeitig auch der Einfluß von FCS im Zellkulturmedium 24 Stunden vor Versuchsbeginn auf die zelluläre Hypoxieantwort untersucht wurde.

3.3.1 Effekt von ET-1 auf die PASMC

Zur Optimierung der Messung der Kontraktion wurde mit 10 nM ET-1 als vasokonstriktiv wirkenden Stimulus untersucht, ob es ein passagenabhängiges Optimum bei der Reaktion der PASMC auf ET-1 besteht. Dabei wurde ein Vergleich zwischen drei unterschiedlichen Passagen, d.h. P0 (3 Tage nach Zellisolierung), P1 und P3, vorgenommen. In Kontrollversuchen wurde die entsprechende Konzentration des Lösungsmittels von ET-1 verwendet. Abb. 16 zeigt, dass ET-1 bei allen drei Passagen keine Kontraktion der PASMC bewirkte, da kein signifikanter Unterschied zwischen der Reaktion auf ET-1 und den Kontrollversuchen bestand. Bei den ET-1-Versuchen betrug die Zellfläche bei P0 $106 \pm 2,3\%$ (n=40), bei P1 $99 \pm 0,9\%$ (n=67) und bei P3 $101 \pm 1,9\%$ (n=59). Dabei unterschied sich auch die Änderung der Zellfläche bei den ET-1-Versuchen der drei unterschiedlichen Passagen nicht signifikant voneinander. Bei den Kontrollversuchen betrug die Zellfläche bei P0 $100\% \pm 1,8\%$ (n=48), bei P1 $101\% \pm 1\%$ (n=58) und bei P3 $104\% \pm 2,1\%$ (n=61). Die PASMC von P0 stammten aus drei und die von P1 und P3 jeweils aus vier verschiedenen Zellisolierungen. Für die statistische Auswertung wurde der Student-Newman-Keuls-post-hoc-Test verwendet.

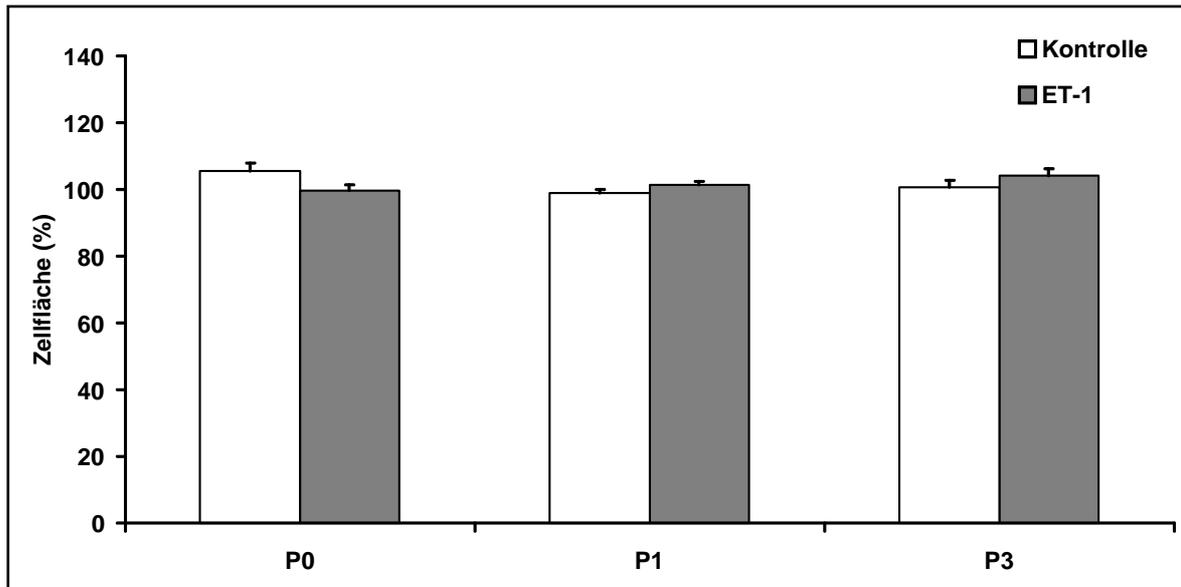


Abb. 16: Vergleich der Änderung der Zellfläche der PASMC der Ratte 30 Minuten nach Applikation von 10 nM Endothelin-1 (ET-1) zwischen Passage 0 (P0, n=40), Passage 1 (P1, n=67) und Passage 3 (P3, n=49). In den Kontrollexperimenten wurde das Lösungsmittel von ET-1 in entsprechender Konzentration appliziert (P0: n=48, P1: n=58, P3: n=61). Die Balken repräsentieren den Mittelwert (+ SEM). Statistisch zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

3.3.2 Effekt von Hypoxie auf die PASMC

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen Assay zu etablieren, mit dem eine zelluläre Hypoxieantwort gemessen werden konnte. Obwohl die PASMC der drei untersuchten Passagen keine Reaktion auf ET-1 zeigten (Kapitel 3.3.1), wurden trotzdem Versuche unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt, da die Kontraktion von PASMC unter Hypoxie in der Literatur beschrieben ist^{64, 107, 126}. Auch wurde in einem weiteren Versuchsansatz die FCS-Konzentration im Zellkulturmedium 24 Stunden vor Versuchsbeginn von 10% auf 0,2% reduziert, da FCS die Proliferation von Zellen bewirkt, was einen Einfluss auf die Reaktionsfähigkeit der Zellen und damit auch auf die Hypoxieantwort haben kann. Die FCS-Reduzierung hingegen bewirkt einen Arrest der Proliferation^{75, 124}.

Um eine Reaktion der PASMC auf Hypoxie festzustellen, wurde der Vergleich der Änderung der Zellfläche zwischen Normoxie und Hypoxie vorgenommen. Zur Schaffung der hypoxischen Bedingung für die PASMC in der geschlossenen Zellkammer, wurde hypoxisches Perfusat durch die Zellkammer perfundiert. Nähere Angaben zur Kinetik der O₂-Konzentration des Perfusats in der Zellkammer nach Umstellung von normoxische auf hypoxische Perfusion sind in Kapitel 3.2 zu finden.

Zum Kultivieren der PASMCM wurde dem Medium grundsätzlich 10% FCS zugesetzt. Da sich die Zellen durch FCS in der Proliferationsphase befinden und dies einen Einfluß auf den funktionellen Zustand und damit auch auf die Reaktionsfähigkeit der Zellen haben kann, wurde für einen Vergleich der FCS-Anteil im Medium 24 Stunden vor dem Versuch auf 0,2% reduziert, um die Zellproliferation zu stoppen^{75, 124}. Wie in Abb. 17 zu sehen ist, bewirkte die 24-stündige FCS-Reduzierung auf 0,2% FCS ebenso wie die Verwendung des Zellkulturmediums mit 10% FCS keinen signifikanten Unterschied in der Änderung der Größe der Zellfläche zwischen Normoxie und Hypoxie. Für die statistische Auswertung wurde der Student-Newman-Keuls-post-hoc-Test verwendet. Der Mittelwert der Zellfläche betrug dabei bei 10% FCS unter Normoxie $98 \pm 0,7\%$ (n=84) und unter Hypoxie $96,2 \pm 0,9\%$ (n=73) und bei 0,2% FCS unter Normoxie $99,9 \pm 0,6\%$ (n=33) und unter Hypoxie $99,3 \pm 0,5\%$ (n=36). Die PASMCM stammten jeweils aus zwei Zellisolierungen.

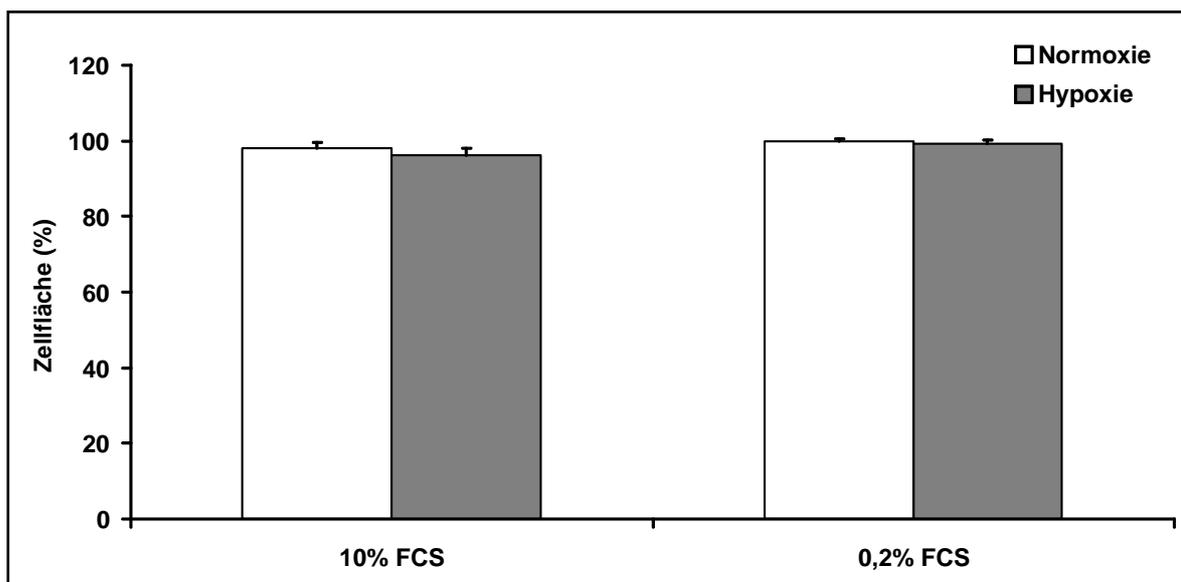


Abb. 17: Vergleich der Änderung der Zellfläche der PASMCM der Ratte zwischen Normoxie (10% FCS: n=84, 0,2% FCS: n=33) und Hypoxie (10% FCS: n=73, 0,2% FCS: n=36) nach 30 Minuten Versuchszeit. Zur Kultivierung der PASMCM in den letzten 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurde entweder Zellkulturmedium mit 10% FCS oder mit 0,2% FCS verwendet. Der Wert der Zellfläche bei Versuchsbeginn wurde auf 100% normiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (+ SEM). Die statistische Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Normoxie und Hypoxie für die beiden untersuchten Versuchsbedingungen (0,2% FCS und 10% FCS) sowie zwischen 10% FCS und 0,2% FCS unter Normoxie und unter Hypoxie.

3.4 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in PASMC der Ratte

Wie aus Kapitel 3.3 zu schließen ist, erwies sich die direkte Messung der Kontraktion über eine Zellflächenverkleinerung mittels eines Kontraktionsassays nicht als geeignet für die Bestimmung der Hypoxieantwort von PASMC der Ratte. Da die Kontraktion der glatten Muskelzellen aber auch mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ verknüpft ist, wurde im Rahmen der Etablierung einer geeigneten Methode zur Untersuchung der HPV auf der Ebene der PASMC neben der Messung der Kontraktion auch die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ herangezogen. Für die Etablierung der Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mit PASMC der Ratte mittels ET-1 wurden die Messungen auch hinsichtlich der zu verwendenden Zellpassage optimiert. Nach dieser Optimierung wurde die Verwendung des bereits für die Messung der Kontraktion eingesetzten Perfusionssystems für die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ etabliert.

3.4.1 Einfluß der Zellpassage auf die ET-1-Antwort

Für die Optimierung der Messung der $[Ca^{2+}]_i$ hinsichtlich der Zellpassage wurde ET-1 verwendet, da diese Substanz in vivo einen vasokonstriktiven Effekt auslöst, der mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ verknüpft ist. Der Vergleich fand zwischen P0 (d.h. drei Tage nach Zellisolierung), P1 und P3 statt. Abb. 18 zeigt den zeitlichen Verlauf der Reaktion der PASMC auf 10 nM ET-1 (P0: n=46, P1: n=17, P3: n=33), bzw. in den Kontrollexperimenten auf die entsprechende Konzentration des Lösungsmittels (P0: n=33, P1: n=15, P3: n=19), das in beiden Fällen nach 50 Sekunden Versuchszeit für einen Zeitraum von 10,5 Minuten appliziert wurde. ET-1 bewirkte bei allen drei Passagen einen transienten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in Form eines Peaks, gemessen als Quotient (F340/F380), mit einem nachfolgenden Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ auf einen Wert, der oberhalb der Basislinie lag. Im Vergleich dazu bewirkte in den Kontrollversuchen die Zugabe des Lösungsmittels von ET-1 keinen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Die Kurven von Abb. 18 stellen den Mittelwert (+SEM) aus den jeweiligen Einzelkurven dar. Für P1 der ET-1-Versuche wurden PASMC aus zwei verschiedenen Zellisolierungen und für P0 und P3 der ET-1-Versuche und P0, P1 und P3 der Kontrollversuche wurden jeweils PASMC aus drei verschiedenen Zellisolierungen verwendet.

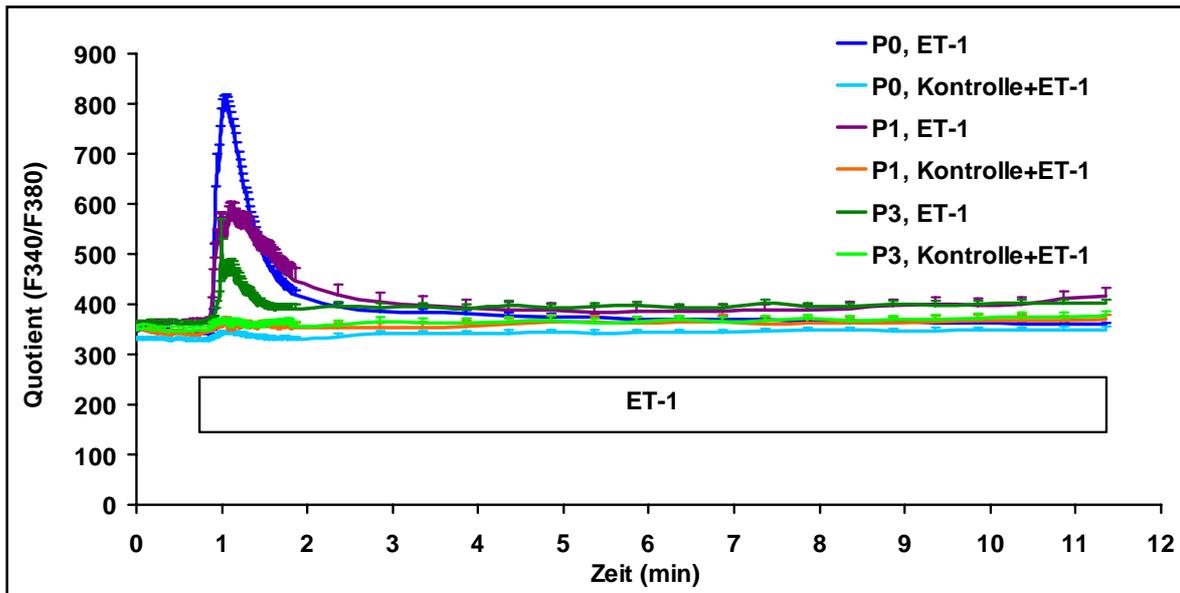


Abb. 18: Zeitlicher Verlauf der Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, gemessen als Quotient (F340/F380), für die Untersuchung der Reaktion der PASMC der Ratte auf 10 nM Endothelin-1 (ET-1) für Passage 0 (P0, n=46), Passage 1 (P1, n=17) und Passage 3 (P3, n=33). In den Kontrollexperimenten wurde das Lösungsmittel von ET-1 in entsprechender Konzentration appliziert (P0: n=33, P1: n=15, P3: n=19). Die Kurven repräsentieren den Mittelwert (+ SEM). Die statistische Auswertung der Peakwerte, d.h. der maximalen Werte des Quotients (F340/F380), ist in Abb. 19 dargestellt.

Für einen statistischen Vergleich der Reaktion der PASMC auf ET-1 zwischen den verschiedenen Passagen und in Bezug auf die Kontrollexperimente, wurde jeweils der Mittelwert der Peakwerte der Einzelkurven berechnet. Dabei wurde der größte Wert innerhalb der ersten dreißig Sekunden nach ET-1-Zugabe ausgewertet. Für die Kontrollversuche wurde jeweils der Messwert von dem Zeitpunkt ausgewertet, der sich als zeitlicher Mittelwert der Peaks der ET-1-Versuche der jeweiligen Passage ergab. Außerdem wurde eine statistische Untersuchung des Peakwertes in Bezug auf den Wert vor Zugabe von ET-1 bzw. des Lösungsmittels vorgenommen. Wie aus dem Mittelwert (+SEM) in Abb. 19 zu sehen ist, stieg der Quotient (F340/F380) nach ET-1-Zugabe auf einen Peakwert, und zwar bei P0 von 342 ± 4 auf 870 ± 29 , bei P1 von 365 ± 8 auf 633 ± 52 und bei P3 von 363 ± 6 auf 535 ± 60 . Für die Kontrollversuche betrug der Quotient (F340/F380) vor Zugabe des Lösungsmittels für P0 328 ± 5 , für P1 347 ± 8 und für P3 348 ± 10 und nach Zugabe des Lösungsmittels für P0 341 ± 5 , für P1 352 ± 8 und für P3 359 ± 11 .

Die statistische Analyse mit dem Student-Newman-Keuls-post-hoc-Test zeigte, dass der Peakwert der ET-1-Versuche bei allen drei Passagen signifikant sowohl zu dem Wert vor ET-1-Zugabe als auch zu dem Wert des Kontrollversuches ist. Die Werte der drei Passagen vor ET-1-Zugabe unterschieden sich dabei nicht signifikant voneinander, aber nach ET-1-Zugabe lag der Peakwert von P0 signifikant höher als der von P1 und P3. Außerdem war der Peakwert von P1 signifikant größer als der Peakwert von P3. Bei den Kontrollversuchen bestand kein signifikanter Unterschied des Quotients (F340/F380) zwischen den Zeitpunkten vor und nach Zugabe des Lösungsmittels. Die Quotientwerte der drei Passagen nach der Lösungsmittel-Zugabe unterschieden sich ebenfalls nicht voneinander.

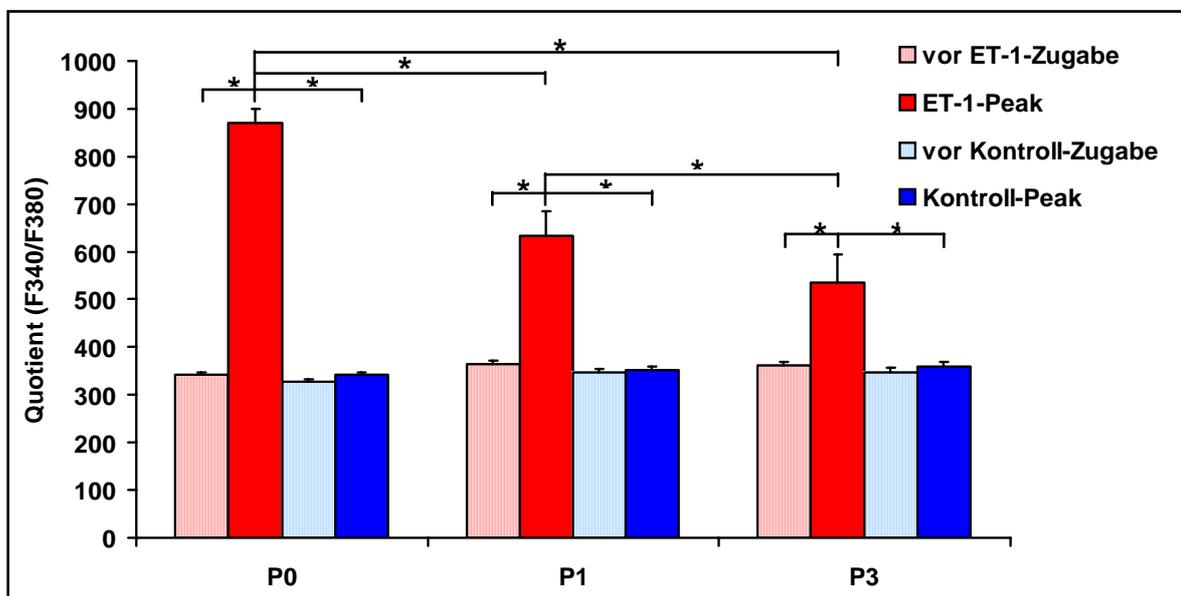


Abb. 19: Vergleich der Peakwerte, d.h. der maximalen Werte des Quotients (F340/F380), der in Abb. 18 dargestellten Daten für PASMC der Ratte nach Applikation von 10 nM Endothelin-1 (ET-1) zwischen Passage 0 (P0, n=46), Passage 1 (P1, n=17) und Passage 3 (P3, n=33). In den Kontrollexperimenten wurde das Lösungsmittel von ET-1 in entsprechender Konzentration appliziert (P0: n=33, P1: n=15, P3: n=19). Die Balken repräsentieren den Mittelwert (+ SEM). * bezeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Da die Signalantwort für P0 am stärksten war, wurden alle nachfolgenden Experimente mit PASMC dieser Passage durchgeführt.

3.4.2 Etablierung des Perfusionssystems

Das Ziel der Messung der $[Ca^{2+}]_i$ war die Anwendung dieser Messmethode unter hypoxischen Bedingungen. Dafür wurde ein Perfusionssystem verwendet, mit dessen Hilfe hypoxisches Perfusat über die PASMC, die sich in einer geschlossenen Zellkammer befanden, geleitet wurde. Zur Etablierung des Perfusionssystems für die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde die Reaktion der PASMC der Ratte auf die Perfusion von 10 nM ET-1 in HEPES-Ringer-Lösung bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 0,5 ml/min überprüft. Abb. 20 zeigt den zeitlichen Verlauf dieses Experiments. Nach 5,5 Minuten erreichte ET-1 die PASMC in der Zellkammer und löste einen kurzzeitigen Anstieg des Quotients (F340/F380), und damit der $[Ca^{2+}]_i$, aus, während es in den Kontrollversuchen zu keinem Anstieg kam. Für die ET-1-Versuche wurden PASMC aus drei verschiedenen Zellisolierungen (n=35) und für die Kontrollversuche aus vier verschiedenen Zellisolierungen (n=24) verwendet.

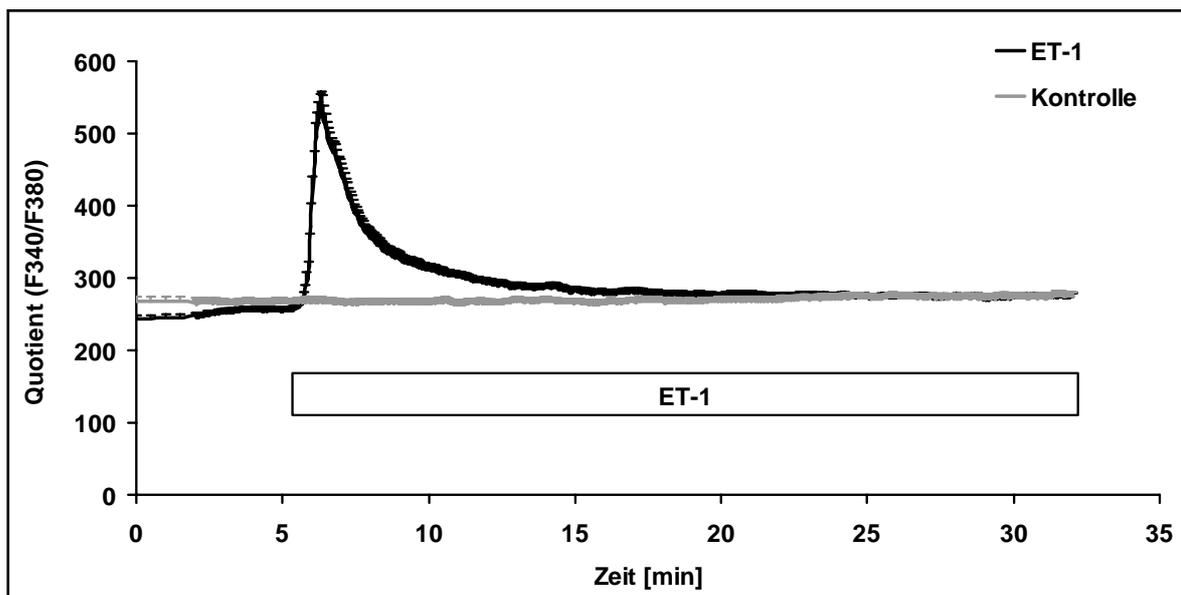


Abb. 20: Zeitlicher Verlauf der Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, gemessen als Quotient (F340/F380), in Untersuchung der Reaktion der Passage 0 von PASMC der Ratte auf 10 nM Endothelin-1 (ET-1) unter Verwendung eines Perfusionssystems (n=35). Im Kontrollexperiment wurde Perfusat ohne ET-1 verwendet (n=24). Die Kurven repräsentieren den Mittelwert (+ SEM). Die statistische Auswertung des Peakwertes, d.h. des maximalen Werte des Quotients (F340/F380), ist in Abb. 21 dargestellt.

Für die statistische Auswertung der Versuche aus Abb. 20 wurde der Mittelwert der Peakwerte des ET-1-Signals aus den Einzelkurven ausgewertet und mit dem Mittelwert vor der ET-1-Antwort, d.h. 5,35 Minuten nach Versuchsbeginn, verglichen. Für die Kontrollversuche ohne ET-1 wurde der Zeitpunkt ausgewertet, der sich aus dem zeitlichen Mittelwert der ET-1-Peaks ergab. Wie in Abb. 21 dargestellt ist, stieg der Quotient (F340/F380) im Zuge der Perfusion von 10 nM ET-1 signifikant von 255 ± 5 auf 631 ± 22 . Dieser Anstieg des Quotients (F340/F380) auf einen Peakwert war dagegen in den Kontrollversuchen, d.h. in Experimenten ohne ET-1, nicht zu sehen (Veränderung von 266 ± 6 auf 268 ± 6). Der Peakwert von ET-1 unterschied sich somit auch signifikant von dem entsprechenden Kontrollwert. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Student-Newman-Keuls-post-hoc-Test durchgeführt.

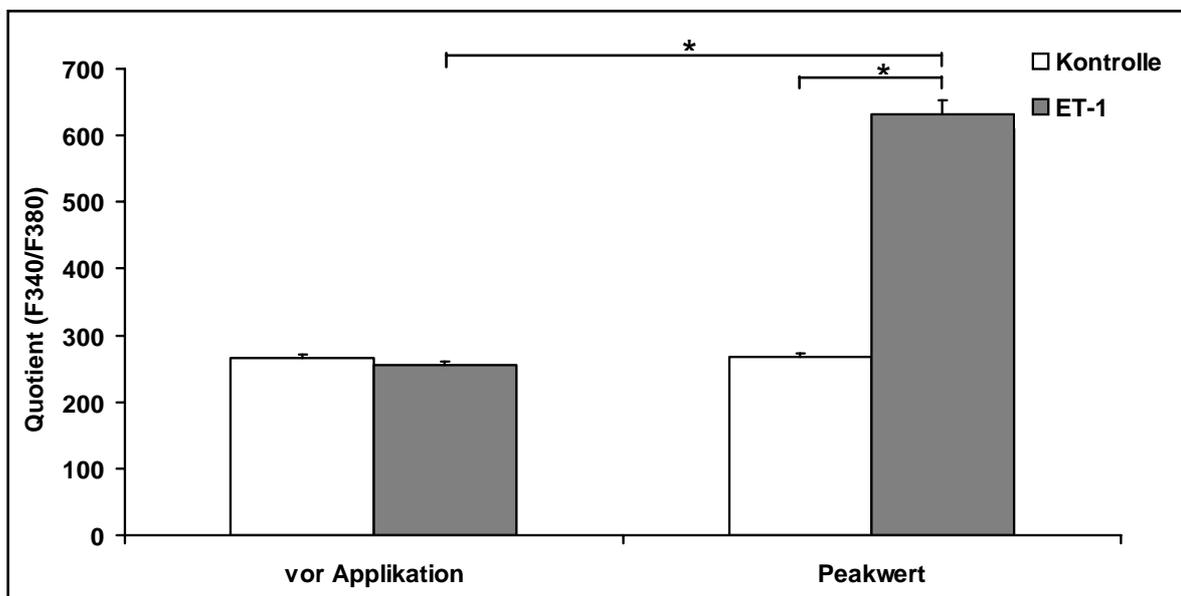


Abb. 21: Vergleich der Peakwerte, d.h. des maximalen Wertes des Quotients (F340/F380), der Daten aus Abb. 20 für Passage 0 der PASMCM der Ratte nach Applikation von 10 nM Endothelin-1 (ET-1) zum Wert vor ET-1-Zugabe (n=35). Im Kontrollexperiment wurde Perfusat ohne ET-1 verwendet (n=24). Die Balken repräsentieren den Mittelwert (+ SEM). * bezeichnet signifikante Unterschiede (p<0,05).

3.5 Untersuchungen zur Hypoxie-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in PASMC der Maus

Nach Etablierung der Isolierung der PASMC aus der Ratte und der Etablierung einer Methode zur Messung der $[Ca^{2+}]_i$ war das Ziel die Übertragung der Zellisolierungs- und der Messmethodik (d.h. der Messung der $[Ca^{2+}]_i$) auf die Maus, da dies die Verwendung von gendefizienten Mäusen ermöglichte.

Der passagenabhängige Vergleich der Reaktionsfähigkeit der PASMC der Ratte auf ET-1 als positiven Stimulus im Zuge der Optimierung der Versuchsbedingungen für die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ zeigte für die PASMC von P0 einen signifikant stärkeren Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ als für P1 und für P3 (Kapitel 3.4.1). Nach dieser Optimierung wurde in allen nachfolgenden Experimenten - und somit auch bei denen mit PASMC der Maus - nur noch PASMC der Passage 0 verwendet.

Wenn nicht anders erwähnt wurden bei allen Experimenten PASMC von mindestens drei verschiedenen Zellisolierungen verwendet.

3.5.1 Immunofluoreszenzfärbung der PASMC der Maus

Die Immunofluoreszenzfärbung bei den PASMC der Maus erfolgte ausschließlich mit Zellen von P0, da nur Zellen dieser Passage für die Experimente mit PASMC aus Mäusen verwendet wurden. Grundsätzliche Hinweise zur Immunofluoreszenzfärbung sind in Kapitel 3.1.2 zu finden. An dieser Stelle soll nur erwähnt werden, dass die FITC-markierte Fluoreszenzfärbung gegen verschiedene Proteine nach entsprechender Exzitation grün und die Kernfärbung mittels DAPI blau erschien. In den Abb. 22 bis 25 sind teilweise auch die Gefäßstückchen, aus denen in Kultur die Zellen wuchsen, zu sehen.

Abb. 22 zeigt die Fluoreszenzfärbung der PASMC der Maus gegen Vimentin, die als positive Kontrolle durchgeführt wurde, und die dazugehörige negative Kontrolle, d.h. ohne Verwendung eines primären Antikörpers. Die Färbung gegen SM- α -Aktin war positiv und ist zusammen mit der negativen Kontrolle in Abb. 23 dargestellt. Abb. 24 zeigt die positive Färbung der Zellen gegen SM-MHC mit der dazugehörige negativen Kontrolle. Zum Ausschluß von Endothelzellen im Zuge der Isolierung der Zellen wurde eine Färbung gegen ein für Endothelzellen typisches Protein, den von Willebrand Faktor, durchgeführt. Wie Abb. 25 zeigt, konnte dieses Protein in den isolierten Zellen nicht nachgewiesen werden, so dass nur die Färbung der Zellkerne zu sehen ist.

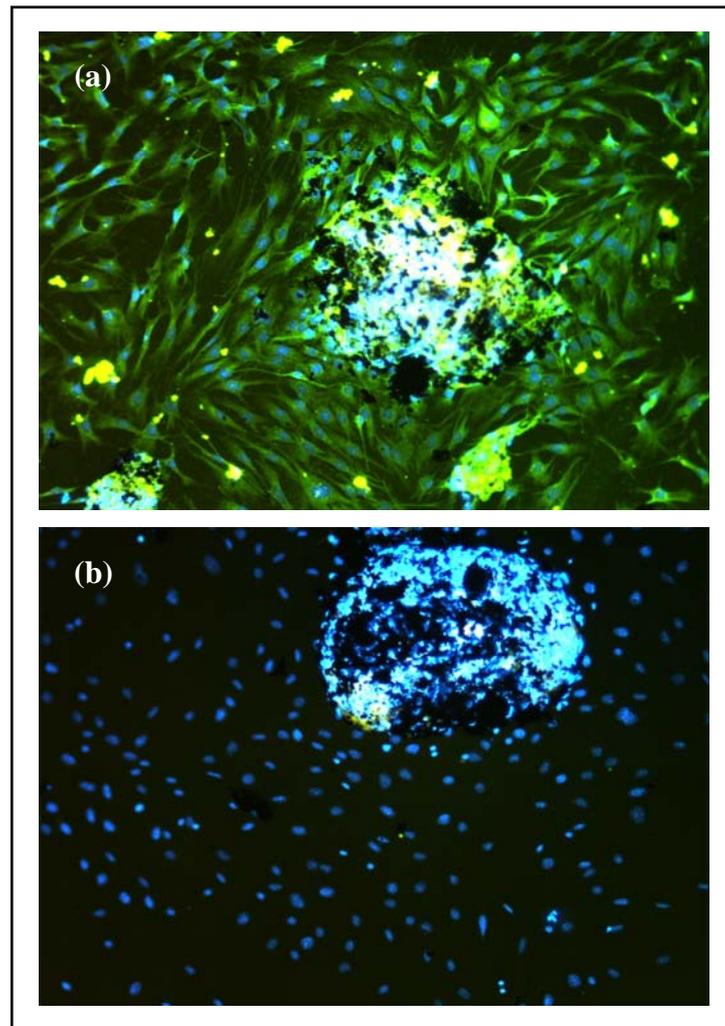


Abb. 22: Immunofluoreszenzfärbung mit einem primären Antikörper gegen Vimentin (a) und dazugehörige negative Kontrolle, d.h. ohne primären Antikörper (b) von PASMC aus Maus der Passage 0 (P0). Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-konjugierter Antikörper verwendet, der eine grüne Färbung bewirkte. Die Zellkerne sind durch die DAPI-Färbung blau gefärbt. Vergrößerung: x100.

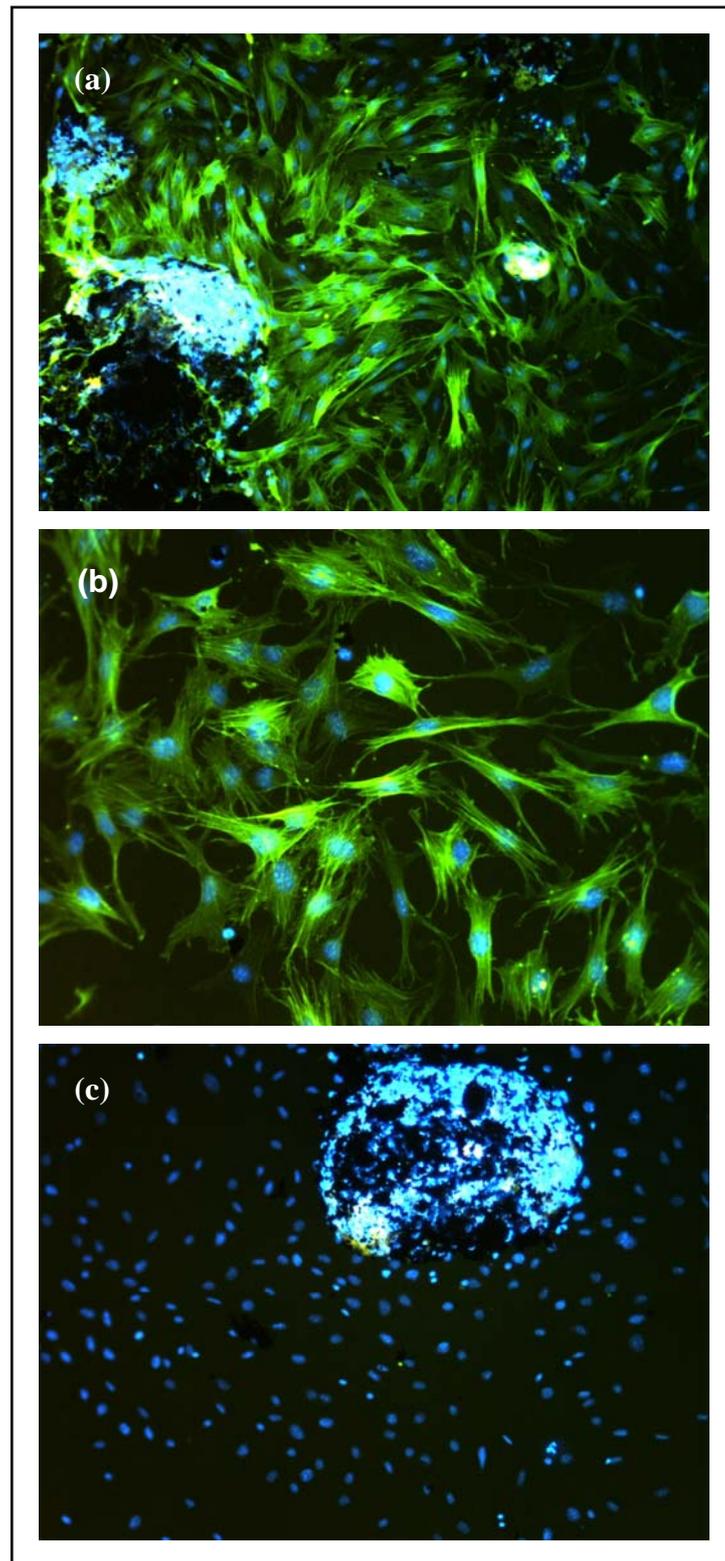


Abb. 23: Immunofluoreszenzfärbung mit einem primären Antikörper gegen das glattmuskuläre α -Aktin (SM- α -Aktin) (a) und (b) und dazugehörige negative Kontrolle, d.h. ohne primären Antikörper (c) von PASMC aus Maus der Passage 0 (P0). Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-konjugierter Antikörper verwendet, der eine grüne Färbung bewirkte. Die Zellkerne sind durch die DAPI-Färbung blau gefärbt. Vergrößerung: (a) und (c) x100, (b) x400.

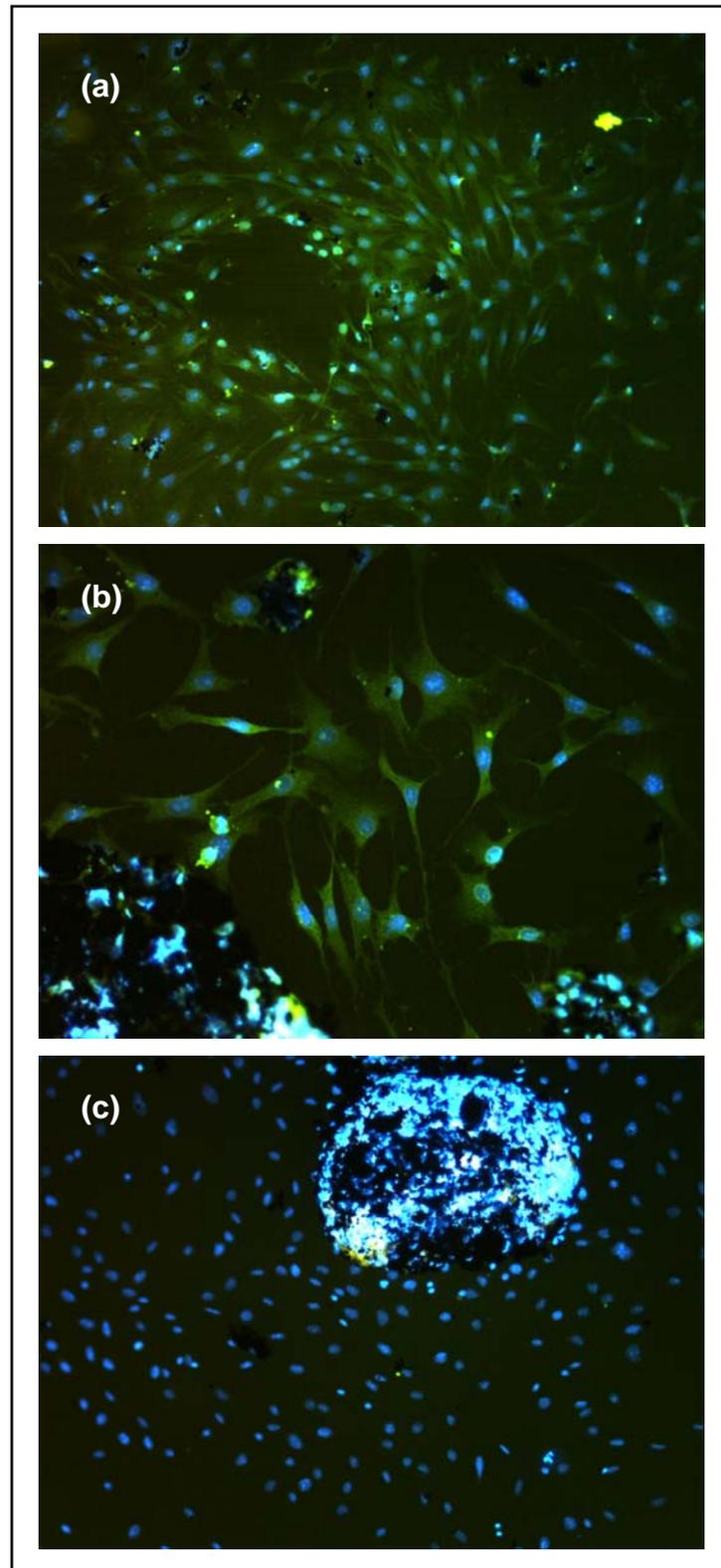


Abb. 24: Immunofluoreszenzfärbung mit einem primären Antikörper gegen die glattmuskulären schweren Ketten des Myosins (SM-MHC) (a) und (b) und dazugehörige negative Kontrolle, d.h. ohne primären Antikörper (c) von PASMC aus Maus der Passage 0 (P0). Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-konjugierter Antikörper verwendet, der eine grüne Färbung bewirkte. Die Zellkerne sind durch die DAPI-Färbung blau gefärbt. Vergrößerung: (a) und (c) x100, (b) x400.

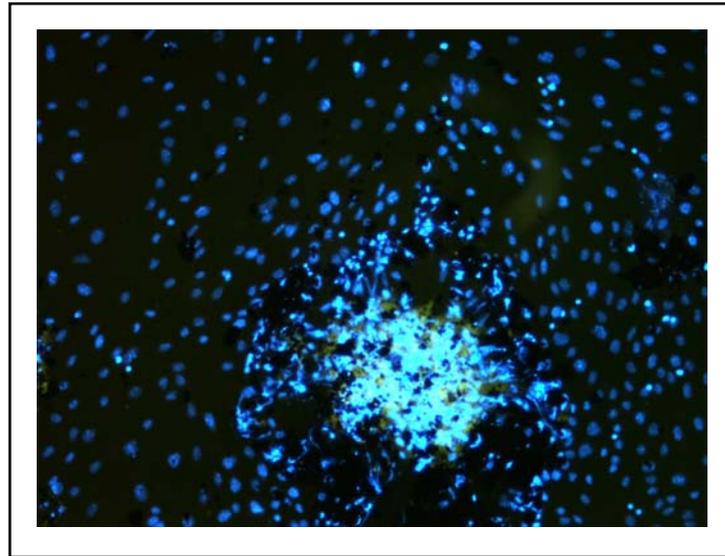


Abb. 25: Immunofluoreszenzfärbung mit einem primären Antikörper gegen den von Willebrand Faktor (vWF) von PASMC aus Maus der Passage 0 (P0). Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-konjugierter Antikörper verwendet, der eine grüne Färbung bewirkte. Die Zellkerne sind durch die DAPI-Färbung blau gefärbt. Vergrößerung: x100.

3.5.2 Reaktion der PASMC auf ET-1¹

Zunächst wurde die Signalantwort der PASMC auf 20 nM ET-1 als Kontrolle für eine grundsätzliche Reaktionsfähigkeit der Zellen auf einen positiven Stimulus mit PASMC einer Zellisolierung überprüft. Dabei zeigte sich, dass $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von ET-1 von $50 \pm 8,7$ nM ausgehend auf einen Maximalwert von $214 \pm 48,4$ nM anstieg und dann wieder kontinuierlich abfiel (n=13). Dies ist in Abb. 26 dargestellt. Die ET-1-Applikation erfolgte direkt in die offene Zellkammer.

¹ Die Durchführung der Messung der $[Ca^{2+}]_i$ der Maus PASMC und aortalen SMC erfolgte zu gleichen Teilen mit Herrn H. Kalwa (Arbeitsgruppe von PD Dr. A. Dietrich am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg (Direktor: Prof. Dr. T. Gudermann)) und sind z.T. auch Bestandteil seiner Dissertationsschrift.

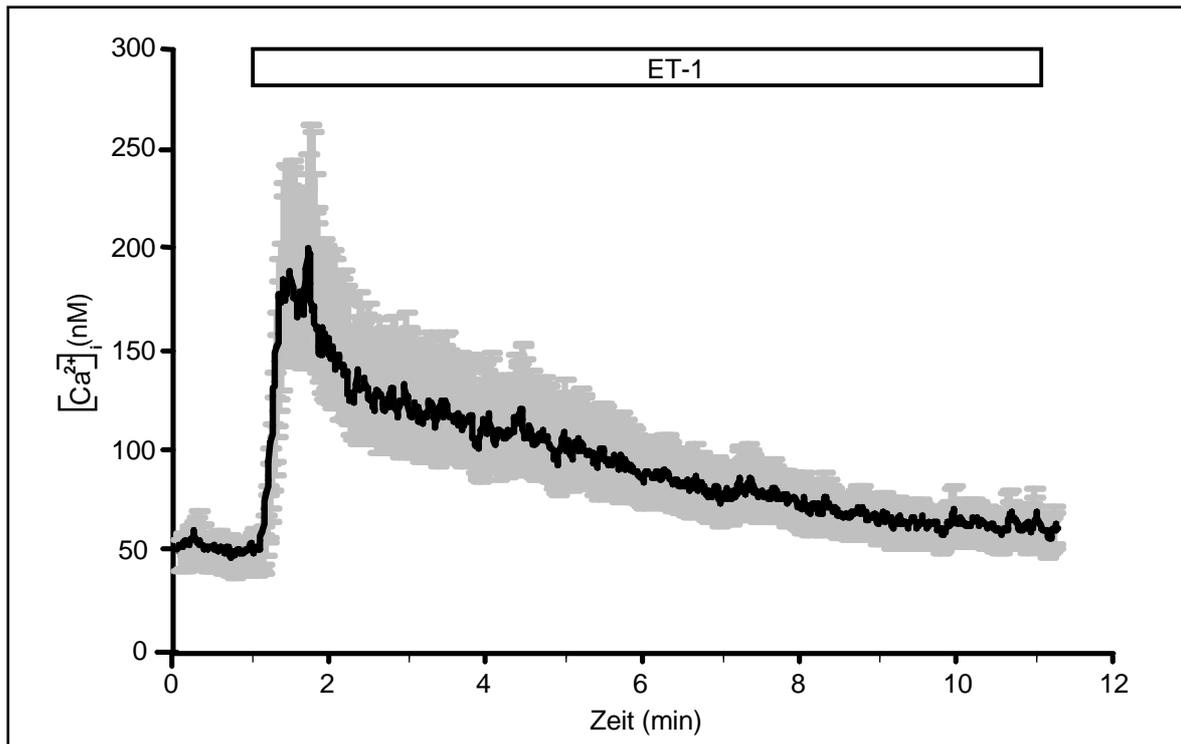


Abb. 26: Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) für Maus PASMC nach Applikation von 20 nM ET-1. Die ET-1-Zugabe erfolgte 1 Minute nach Versuchsbeginn direkt in die offene Zellkammer und bewirkte einen kurzzeitigen Anstieg mit nachfolgendem kontinuierlichen Abfall von $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die Kurve stellt den Mittelwert (\pm SEM) dar (n=13).

3.5.3 Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter Hypoxie und der Einfluß des TRPC6-Kanals auf die Hypoxieantwort

Wie in Abb. 27 zu sehen ist, führte die hypoxische Inkubation der PASMC nicht zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (n=27 aus 2 Zellisolierungen). Da in der Literatur mehrfach beschrieben ist, dass die PASMC für eine Hypoxieantwort zuerst „geprimt“ wurden^{88, 99, 108}, wurde in einem zweiten Ansatz kontinuierlich 4 nM ET-1 appliziert (Abb. 28). Nach hypoxischer Perfusion zeigte sich dabei ein kontinuierlicher Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, welcher bei 85 ± 9 nM beginnend schließlich auf einem Plateau endete (266 ± 5 nM, n=15). Als Kontrolle wurde derselbe Versuchsablauf unter normoxischen Bedingungen durchgeführt. In diesem Experiment war kein entsprechender Anstieg zu sehen (n=42). Nur nach anfänglicher Applikation des ET-1 reagierten die PASMC sowohl unter hypoxischen als auch unter normoxischen Bedingungen mit einem kurzzeitigen, im Vergleich zum Hypoxiesignal sehr geringen Anstieg (bei Hypoxie um 12 nM, bei Normoxie um 29 nM) und einem anschließendem sofortigem Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Erst danach begann die Hypoxiephase.

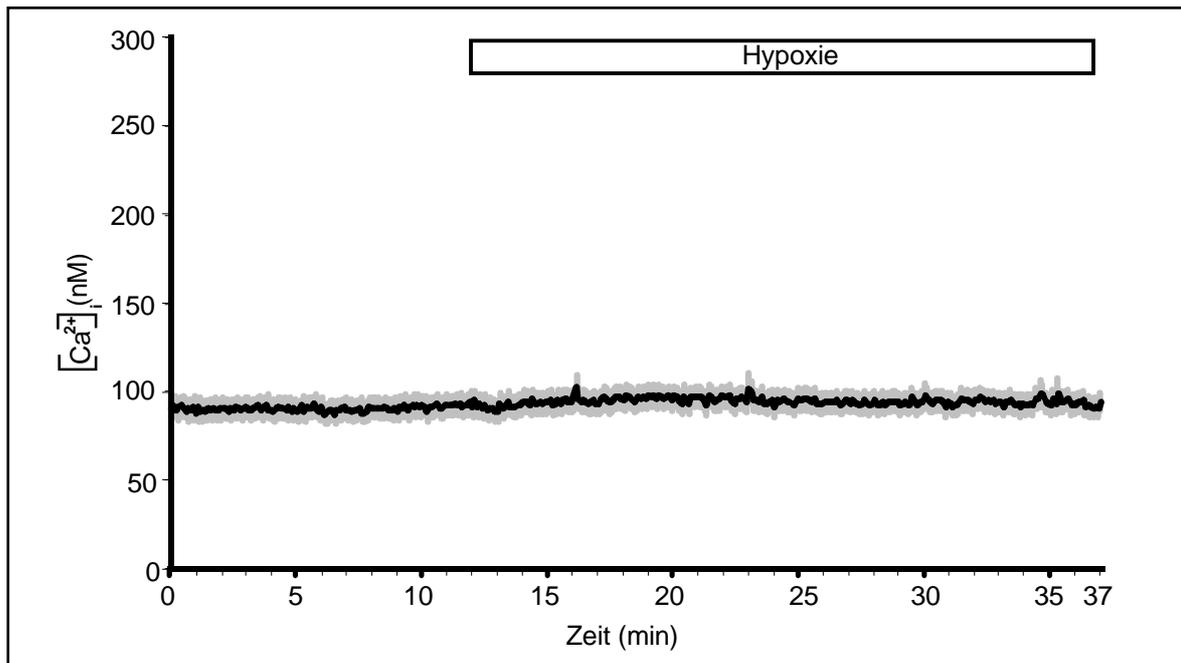


Abb. 27: Untersuchung der Reaktion der PASMOC auf Hypoxie. Dabei zeigt sich keine Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Die Hypoxiephase begann, nach anfänglicher Normoxie, 12 Minuten nach Versuchsbeginn. Die Kurve stellt den Mittelwert (\pm SEM) dar ($n=27$).

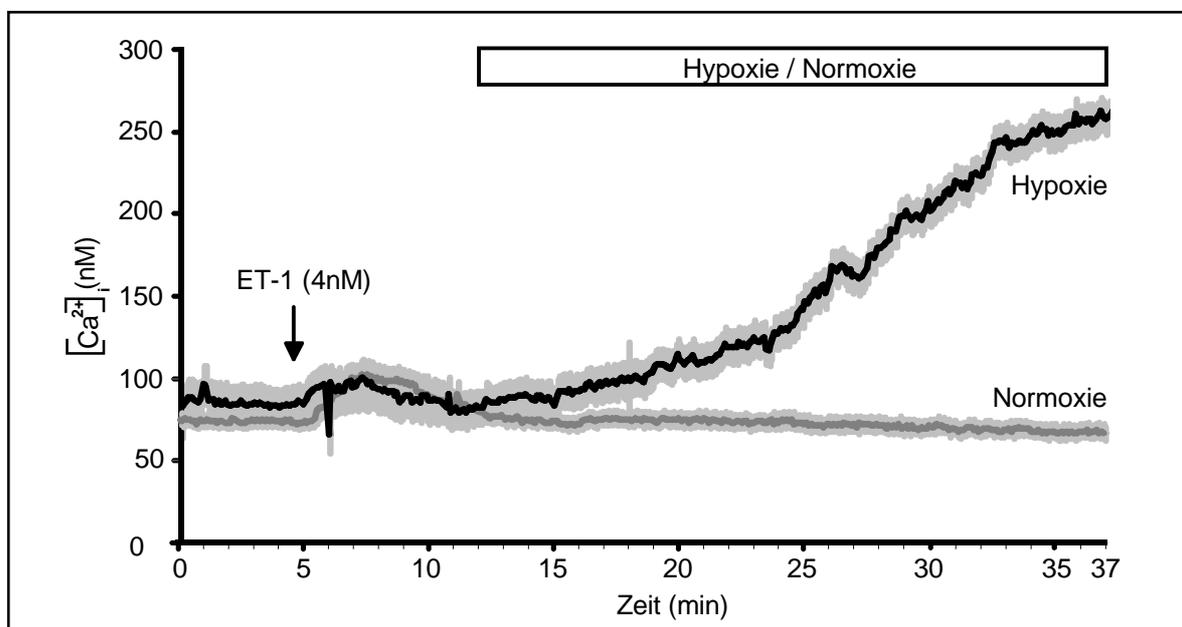


Abb. 28: Hypoxie-induzierte Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) für PASMOC nach Endothelin-1-Applikation (ET-1, 4 nM). Der kontinuierliche Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf ein Plateau war nur unter Hypoxie ($n=15$), aber nicht unter Normoxie ($n=42$) zu verzeichnen. Die Applikation von ET-1 wurde 4,5 Minuten nach Versuchsbeginn durchgeführt, und die Hypoxiephase begann nach weiteren 7,5 Minuten. Die Kurven stellen jeweils den Mittelwert (\pm SEM) dar.

Da die PASMC nur nach ET-1-,„Priming“ auf Hypoxie reagierten, wurden alle folgenden Versuche zur Untersuchung der HPV mit einem ET-1-,„Priming“ durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle der TRPC6-Kanäle für die HPV-Signaltransduktionskaskade untersucht werden, weshalb auch PASMC aus TRPC6^{-/-}-Mäusen verwendet wurden. Dabei zeigten die PASMC der TRPC6^{-/-}-Mäuse zwar genauso wie die PASMC der WT-Mäuse einen transienten und geringen Anstieg der [Ca²⁺]_i zu Beginn des ET-1-,„Primings“, aber keinen deutlichen Anstieg der [Ca²⁺]_i nach hypoxischer Perfusion (Abb. 29, n=55) wie die WT-PASMC. Als Rekonstitutions-Experiment wurden PASMC der TRPC6^{-/-}-Mäuse mit einem adeno-assoziierten Virus, dessen Expressionskassette für TRPC6-GFP kodierte, infiziert. Diese PASMC zeigten einen Anstieg der [Ca²⁺]_i auf Hypoxie, der in Abb. 29 in Form eines Balkendiagramms dargestellt ist (weißer Balken: vor Hypoxie, schwarzer Balken: nach Hypoxie, n=6).

Die Expression des TRPC6-GFP Kanals in den infizierten TRPC6^{-/-}-PASMC wurde durch eine Immunfluoreszenz-Untersuchung sichergestellt (Abb. 30).

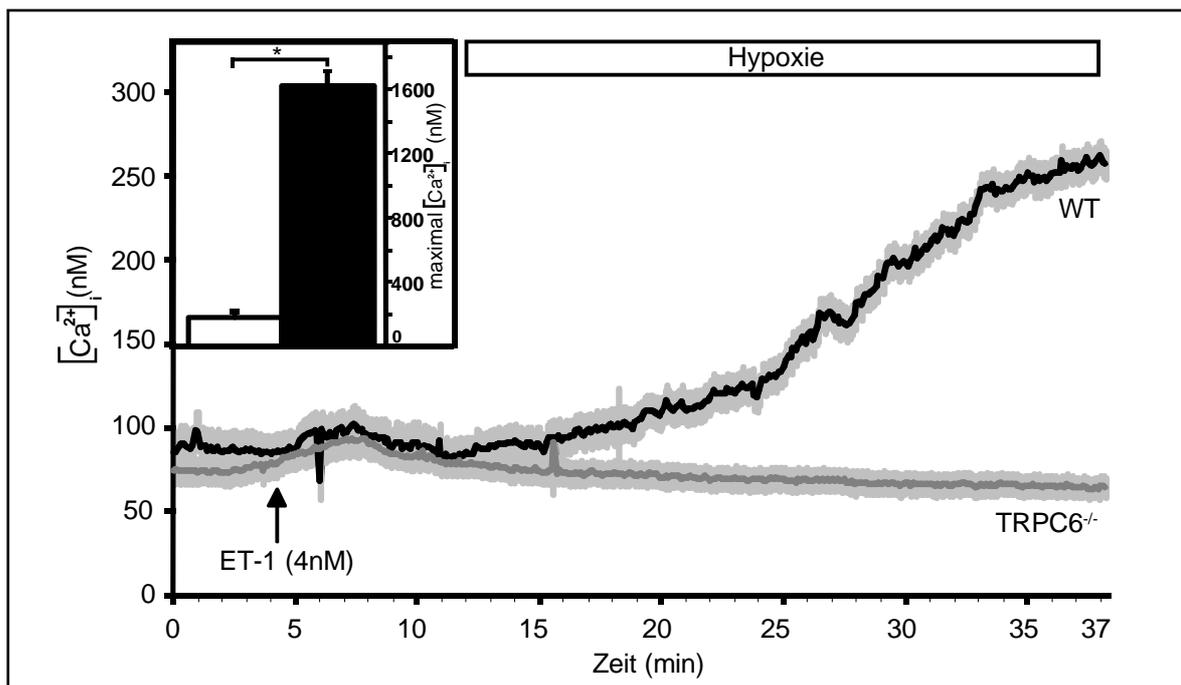


Abb. 29: Hypoxie-induzierte Änderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i) in PASMC nach Endothelin-1-,„Priming“ (ET-1, 4 nM). Der kontinuierliche Anstieg der [Ca²⁺]_i auf ein Plateau war nur bei Wildtyp (WT) (n=15), aber nicht bei TRPC6^{-/-} PASMC (n=55) zu sehen. Die Applikation von ET-1 wurde 4,5 Minuten nach Versuchsbeginn durchgeführt, und die Hypoxiephase begann nach weiteren 7,5 Minuten. Die Kurven stellen jeweils den Mittelwert (± SEM) dar.

Eingesetztes Diagramm: Rekonstitution des Anstiegs der [Ca²⁺]_i nach Infizierung der PASMC von TRPC6^{-/-}-Mäusen mit adeno-assoziierten Viren, deren Expressionskassette für TRPC6-GFP kodierte (weißer Balken: vor Hypoxie, schwarzer Balken: nach Hypoxie, n=6).

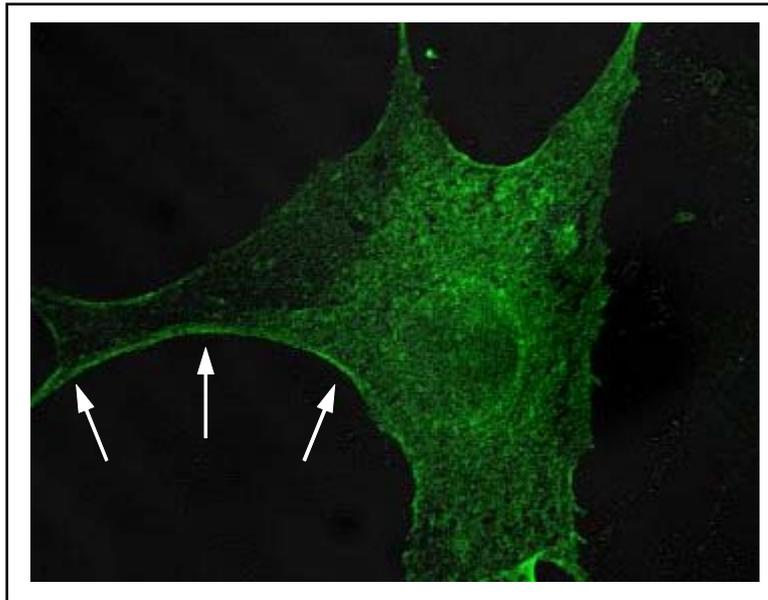


Abb. 30: Die Abbildung zeigt eine pulmonalarterielle glatte Muskelzelle (PASMC) aus TRPC6^{-/-}-Mäusen, die mittels adeno-assoziierten Viren, die ein Konstrukt für TRPC6-GFP enthielten, infiziert wurden. Die grün leuchtende Zellmembran zeigt die plasmamembranäre Lokalisation der TRPC6-Kanäle in den PASMC (Pfeile). Die Bildaufnahme erfolgte mittels eines konfokalen Laserscanning Mikroskops.

3.5.4 Untersuchung der Ursache für den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ unter Hypoxie

Wie in Kapitel 3.5.3 dargestellt wurde, reagierten die PASMC nach einem ET-1-„Priming“ auf Hypoxie mit einem deutlichen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Dabei stellte sich die Frage nach der Quelle dieser Ca^{2+} -Ionen, d.h. einer Freisetzung aus intrazellulären Speichern oder einem Einstrom aus dem Extrazellulärraum. Um die Bedeutung der extrazellulär vorhandenen Ca^{2+} -Ionen für die Hypoxieantwort zu untersuchen, wurde als Perfusat Hepes-Ringer-Lösung ohne Ca^{2+} -Ionen bei gleichzeitiger Anwesenheit von EGTA als Ca^{2+} -Chelator verwendet. Nach dem Wechsel zum Perfusat ohne Ca^{2+} -Ionen wurde zunächst ET-1 appliziert, bevor dann die Hypoxie gestartet wurde. Wie in Abb. 31 zu sehen ist, stieg $[Ca^{2+}]_i$ unter dieser Bedingung nicht an (n=45).

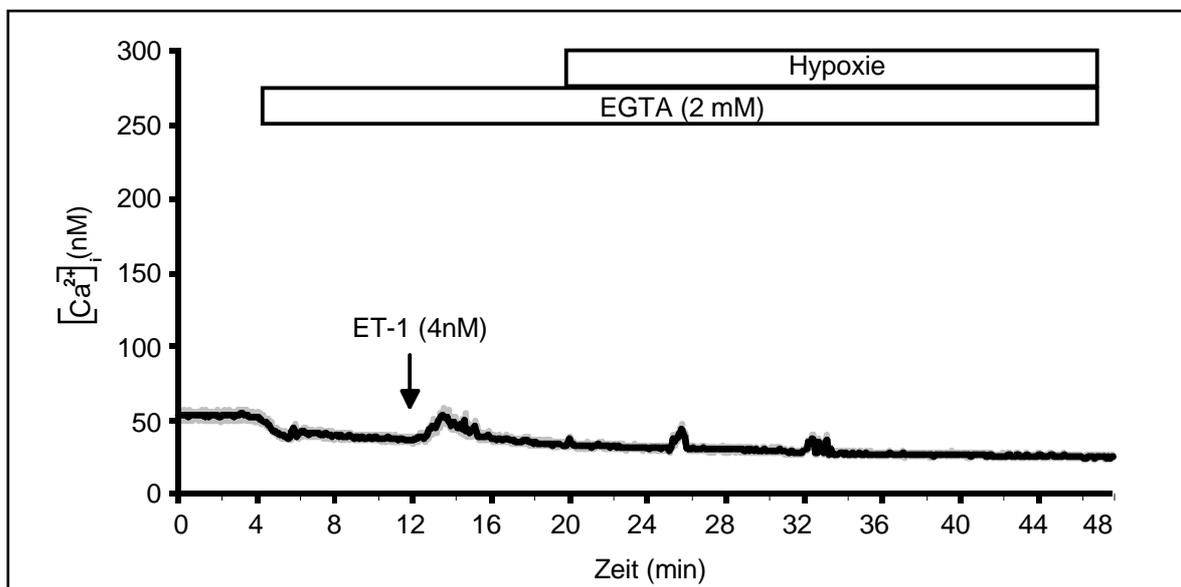


Abb. 31: Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in PASMC unter Hypoxie in Ca^{2+} -freiem extrazellulärem Perfusat (2 mM EGTA). Der Wechsel zum Ca^{2+} -freien Perfusat erfolgte vier Minuten nach Versuchsbeginn. Unter dieser Bedingung wurde kein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ unter Hypoxie (ab der 20. Minute) beobachtet. Die Applikation von Endothelin-1 (ET-1, 4 nM) wurde 12 Minuten nach Versuchsbeginn durchgeführt. Die Daten zeigen den Mittelwert (\pm SEM) von n=45 PASMC.

Um zu zeigen, dass die PASMC auch ohne extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ durch Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern reagieren können, wurde 20 nM ET-1 als positive Kontrolle unter Ca^{2+} -Ionen-freier Bedingung im extrazellulärem Medium appliziert. Abb. 32 zeigt, dass die PASMC sowohl der WT- als auch der TRPC6^{-/-}-Mäuse mit einem transienten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ reagierten (WT: n=9, KO: n=11, aus zwei Zellisolierungen).

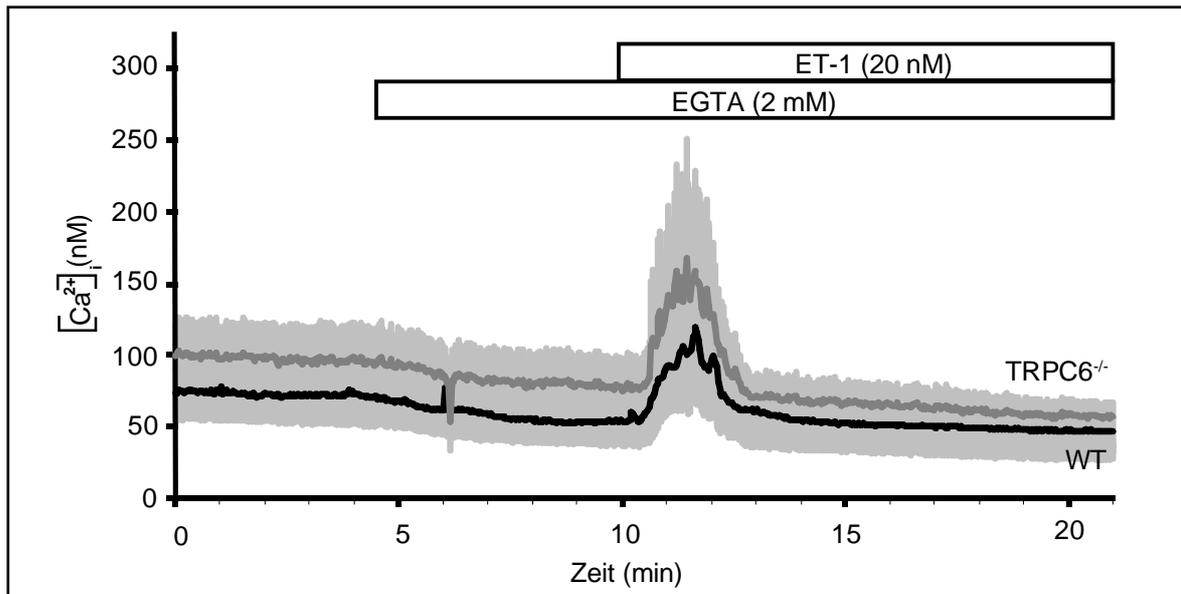


Abb. 32: Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in Wildtyp (WT) und $\text{TRPC6}^{-/-}$ PASMC nach Endothelin-1-Applikation (ET-1, 20 nM) unter der Bedingung des Ca^{2+} -freien extrazellulären Perfusats mit 2 mM EGTA. Der Wechsel zum Ca^{2+} -freien Perfusat wurde vier Minuten nach Versuchsbeginn vorgenommen. Nach weiteren sechs Minuten erfolgte die Applikation von ET-1, die einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sowohl bei WT ($n=9$) als auch bei $\text{TRPC6}^{-/-}$ PASMC ($n=11$) bewirkte. Die Kurven stellen den Mittelwert (\pm SEM) dar.

Da die PASMC der WT-Mäuse ohne extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen keine Reaktion auf Hypoxie trotz vorheriger ET-1-Applikation zeigten, wies dies auf einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum im Zuge der Hypoxieantwort der PASMC hin. Da die L-Typ Ca^{2+} -Ionenkanäle bei einem Ca^{2+} -Einstrom durch die Membran oft eine wichtige Rolle spielen, wurde ihre Bedeutung für die Hypoxieantwort untersucht. Dafür wurde Nicardipin, ein L-Typ Ca^{2+} -Ionenkanal-Blocker, appliziert, was zu einem Verlust der Hypoxieantwort führte ($n=101$). Das Ergebnis ist in Abb. 33 dargestellt.

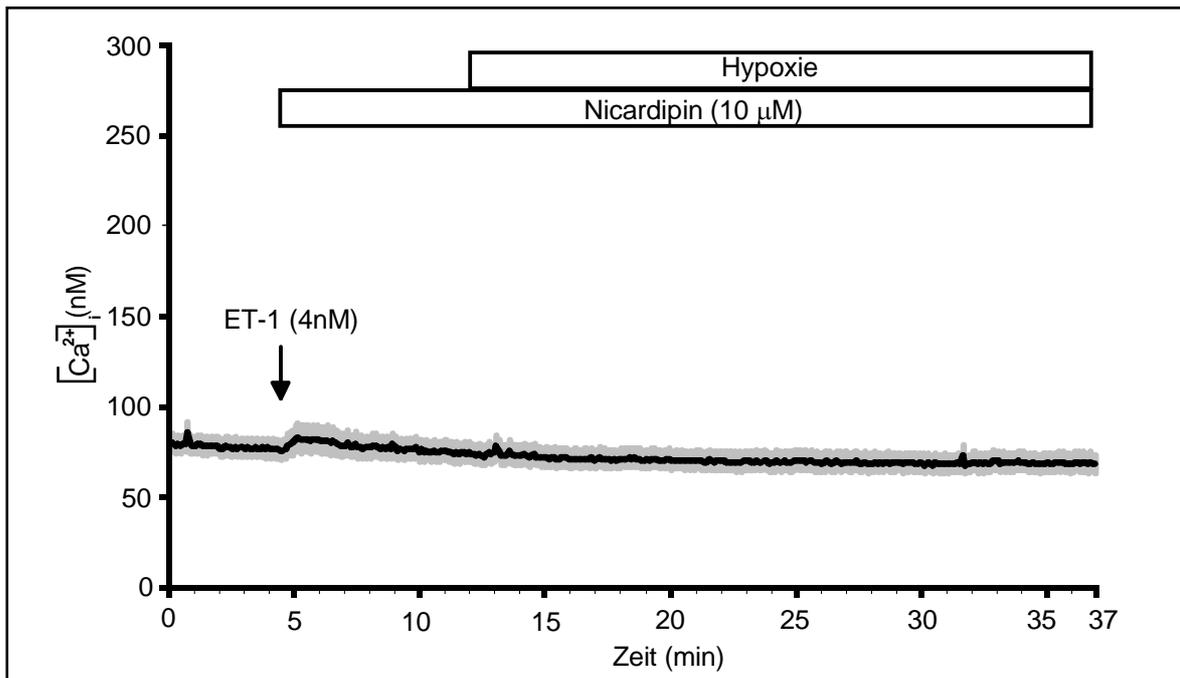


Abb. 33: Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) bei Wildtyp PASMC unter Hypoxie in Anwesenheit des spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Blockers Nicardipin. Die Nicardipin-Applikation bei gleichzeitigem Beginn der Endothelin-1-Applikation (ET-1, 4 nM) erfolgte 4,5 Minuten nach Versuchsstart und verhinderte einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter Hypoxie (ab 12. Minute). Die Daten zeigen den Mittelwert (\pm SEM) von $n=101$ PASMC.

Da Ca^{2+} -Ionen auch durch nicht-selektive TRPC6-Kationenkanäle aus dem Extrazellulärraum in die glatten Muskelzellen der pulmonalen Strombahn einströmen können, wurde im Rahmen dieser Arbeit im weiteren auf diesen Ionenkanal näher eingegangen.

Wie in Abb. 29 bereits dargestellt wurde, zeigten PASMC von Mäusen, denen dieser Kanal fehlte, keine Hypoxie-induzierte Ca^{2+} -Antwort mehr. Zur näheren Untersuchung des Kanals wurde daher die Mn^{2+} -Quench-Methode verwendet, bei der eine direkte Messung des Mn^{2+} -Ioneneinstroms durch TRPC6-Kationenkanäle aus dem Extrazellulärraum durch Quenchen der Fluoreszenzemission von Fura-2 nach Exzitation bei einer Wellenlänge von 360 nm, dem isosbestischen Punkt, erfolgt. Das Ergebnis ist in Abb. 34 dargestellt und zeigt eine signifikant stärkere Mn^{2+} -Quench-Rate unter Hypoxie bei PASMC aus WT-Mäusen ($n=4$) im Vergleich zu PASMC aus TRPC6^{-/-}-Mäusen ($n=4$). Die Mn^{2+} -Quench-Rate aller gemessenen Zellen betrug für WT- PASMC 0,031%/Sekunde ($n=12$) und für TRPC6^{-/-}-PASMC 0,007%/Sekunde ($n=22$).

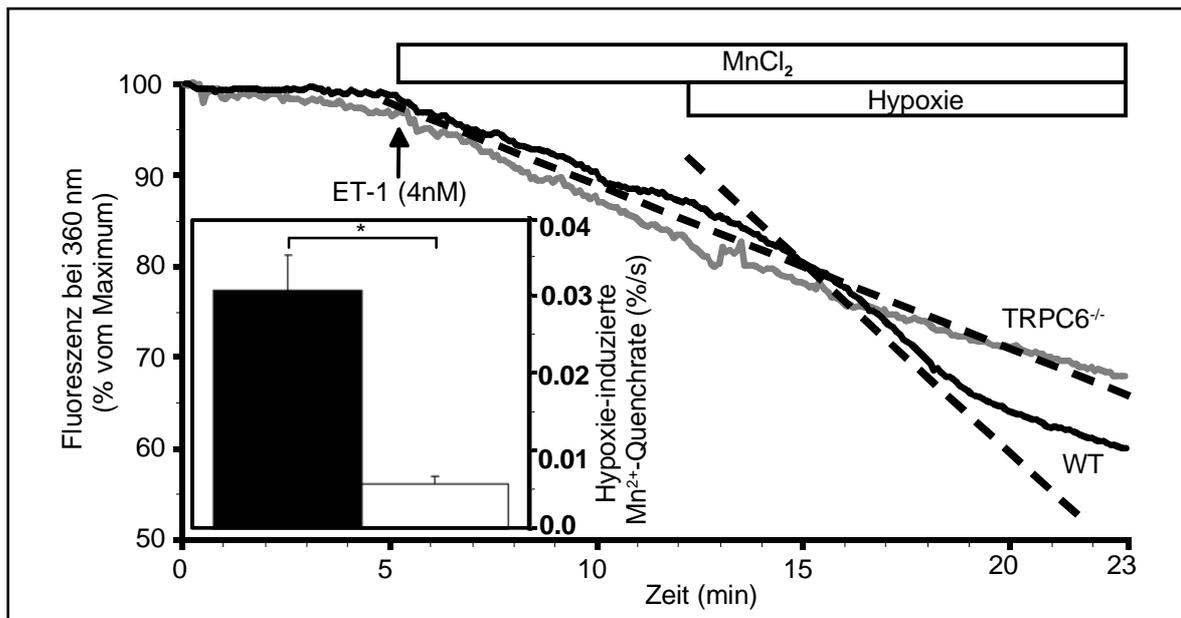


Abb. 34: Hypoxie-induzierter Mn^{2+} -Ioneneinstrom bei Wildtyp (WT) PASC im Gegensatz zu $TRPC6^{-/-}$ PASC. Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzemission von Fura-2 nach Exzitation bei einer Wellenlänge von 360 nm, dem Ca^{2+} -Ionen-unabhängigen isosbestischen Punkt, wobei der Basalwert als 100% definiert wurde. Die $MnCl_2$ ($300 \mu M$) wurde gleichzeitig mit Endothelin-1 (ET-1, 4 nM) 4,5 Minuten nach Versuchsbeginn gestartet. Die Hypoxiephase begann für die PASC 12,0 Minuten nach Versuchsbeginn. Die Kurven stellen den Mittelwert ($\pm SEM$) dar (jeweils $n=4$).

Eingesetztes Diagramm: Auswertung der Mn^{2+} -Quench-Experimente. Die Mn^{2+} -Quench-Rate in (%/s) nach Applikation von Hypoxie war bei WT PASC (schwarzer Balken, $n=12$) signifikant stärker als für $TRPC6^{-/-}$ PASC (weißer Balken, $n=22$), $p < 0,05$.

3.5.5 Untersuchungen zur TRPC6-Kanalaktivierung

Im folgenden sollte untersucht werden, ob der TRPC6-Kanal direkt durch Hypoxie aktiviert werden kann und auf diese Weise $[Ca^{2+}]_i$ erhöht wird. Dazu wurden HEK 293-Zellen, die heterolog TRPC6-GFP exprimierten, nach einem sog. „Priming“ mit Carbachol (10 nM) einem hypoxischen Signal ausgesetzt. Analog zum ET-1, das zum „Primen“ der PASMC verwendet wurde, wirkt Carbachol auch über den G-Protein-gekoppelten Signalweg⁸⁷. Es zeigte sich unter Hypoxie jedoch kein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (n=45, Abb. 35).

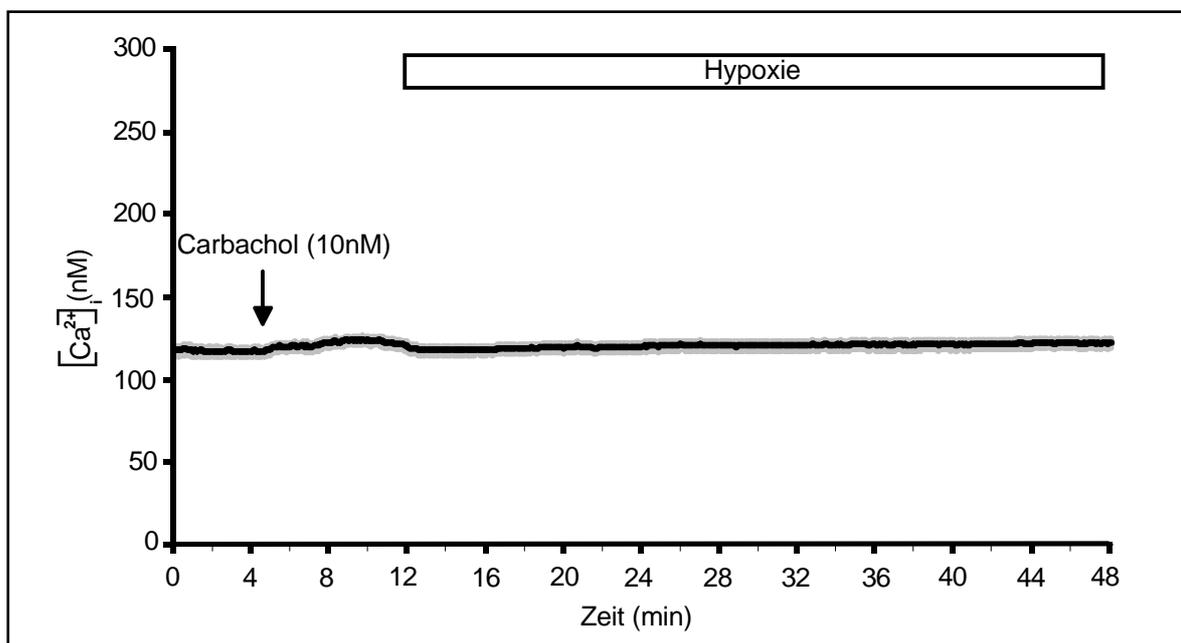


Abb. 35: Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in HEK 293-Zellen, die heterolog TRPC6-GFP exprimierten, unter Hypoxie. Es wurde kein Hypoxie-induzierter Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet. Die Carbachol-Applikation (10 nM) erfolgte 4,5 Minuten nach Versuchsstart. Die Kurve stellt den Mittelwert (\pm SEM) dar (n=45).

Da sich nach heterologer Expression von TRPC6 in HEK 293-Zellen keine direkte Aktivierung von TRPC6 durch Hypoxie nachweisen lies, wurde nun versucht weitere Moleküle der Signaltransduktionskaskade zu identifizieren. Hierzu wurde einerseits der Einfluß von DAG und andererseits der Einfluß von reaktiven Sauerstoffspezies in Form des tertiären Butylhydroperoxids (t-BHP) auf den TRPC6-Kanal untersucht.

Die Untersuchung des Einflusses von DAG auf die Hypoxie-induzierte Erhöhung erfolgte durch die Applikation des DAG-Kinase Inhibitors R59949, der den DAG-Abbau durch DAG-Kinasen blockiert, wodurch sich DAG in der Plasmamembran anreichert (unveröffentlichtes Ergebnis der Arbeitsgruppen von Herrn PD Dr. N. Weißmann, Justus-Liebig-Universität Gießen, und von Herrn PD Dr. A. Dietrich, Philipps-Universität Marburg). Wie Abb. 36 zeigt, induzierte dies nur in den PASMCM aus WT-Mäusen (n=25), aber nicht in den PASMCM aus TRPC6^{-/-}-Mäusen (n=75) einen Anstieg der [Ca²⁺]_i. Ebenso bewirkte auch t-BHP nur einen Ca²⁺-Einstrom bei PASMCM aus WT-Mäusen (n=71), aber nicht bei PASMCM aus TRPC6^{-/-}-Mäusen (n=119), das in Abb. 37 zu sehen ist.

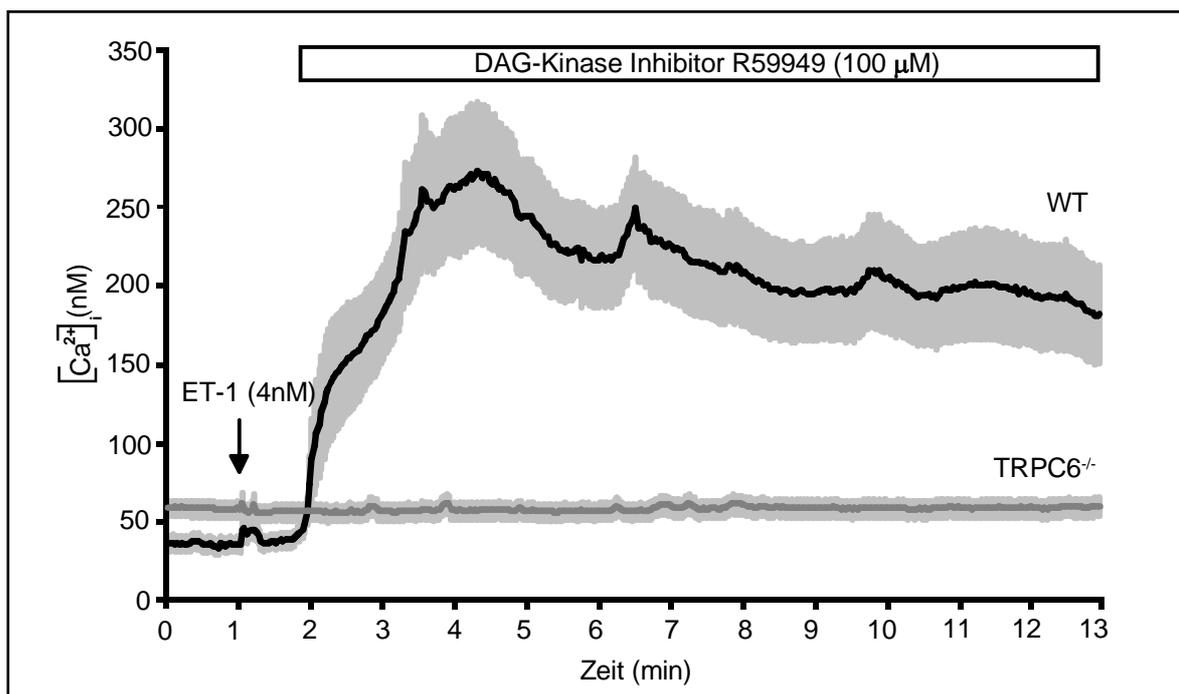


Abb. 36: Effekt des Diacylglycerol (DAG)-Kinase Inhibitors R59949 (100µM) auf die intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i) von Wildtyp (WT) und TRPC6^{-/-} PASMCM. Der DAG Kinase Inhibitor induzierte einen Anstieg der [Ca²⁺]_i in WT (n=5), aber nicht in TRPC6^{-/-} PASMCM (n=75). Die Applikation von Endothelin-1 (ET-1, 4 nM) begann eine Minute und die Applikation des DAG-Kinase Inhibitors zwei Minuten nach Versuchsbeginn. Die Kurven stellen den Mittelwert (±SEM) dar.

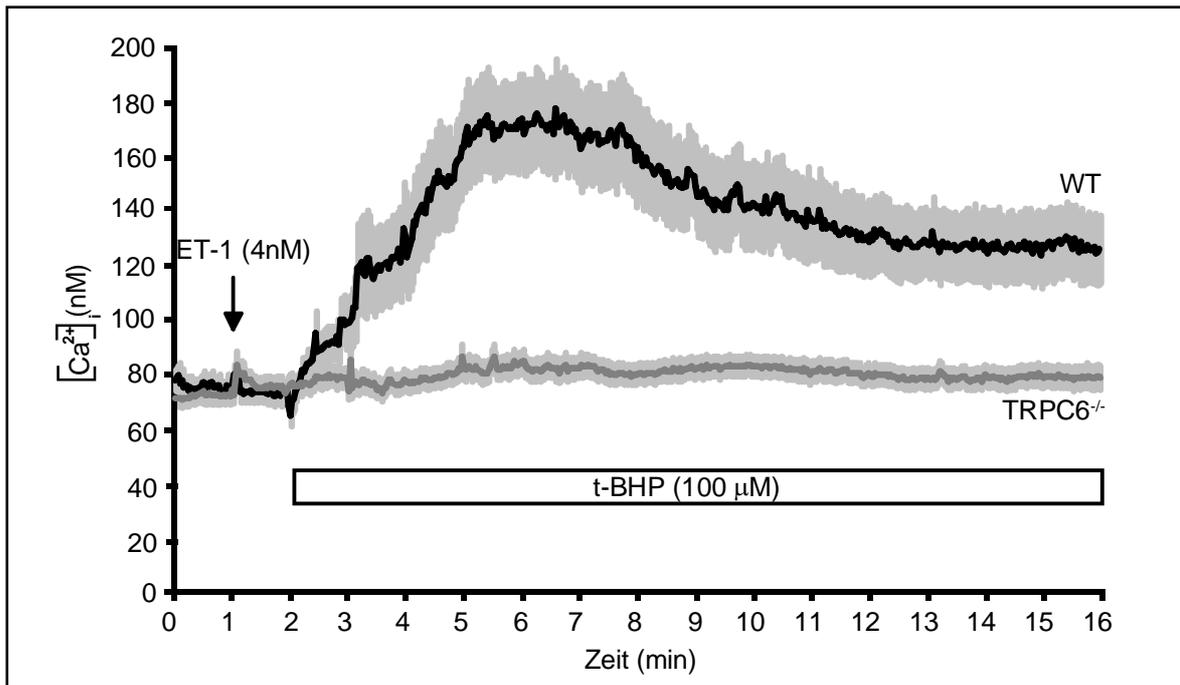


Abb. 37: Effekt von tertiärem Butyl-Wasserstoffperoxid (t-BHP, 100 μ M) auf die intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) bei Wildtyp (WT) versus TRPC6^{-/-} PSMC. T-BHP wurde zwei Minuten nach Versuchsbeginn appliziert und induzierte einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in WT (n=71), aber nicht in TRPC6^{-/-} PSMC (n=119). ET-1 (4 nM) wurde eine Minute nach Versuchsbeginn appliziert. Die Kurven stellen den Mittelwert (\pm SEM) dar.

3.5.6 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ aortaler SMC unter Hypoxie

Da die PASMC nach ET-1-„Priming“ mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ auf Hypoxie reagierten (s. Kapitel 3.5.3), stellte sich die Frage, ob diese Hypoxieantwort für die SMC der pulmonalen Strombahn spezifisch ist oder ob in dieser Weise auch SMC der systemischen Gefäßen reagieren. Deshalb wurden aortale SMC aus Mäusen nach demselben Versuchsschema wie für die PASMC untersucht. Dabei zeigte sich nach ET-1-„Priming“ unter Hypoxie kein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (n=72 aus zwei Zellisolierungen, Abb. 38).

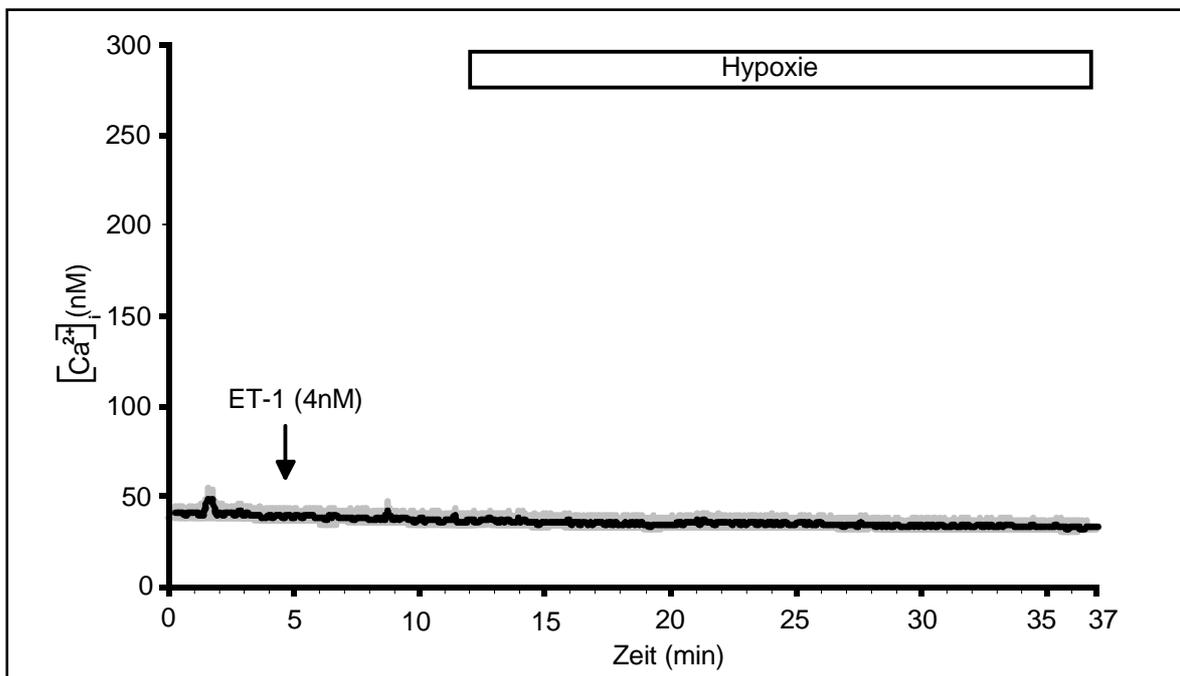


Abb. 38: Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in aortalen SMC unter Hypoxie nach Endothelin-1-Applikation (ET-1, 4 nM). Die Applikation von ET-1 wurde 4,5 Minuten nach Versuchsbeginn durchgeführt, und die Hypoxiephase begann nach weiteren 7,5 Minuten. Dabei zeigte sich unter Hypoxie kein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Die Kurven stellen jeweils den Mittelwert (\pm SEM) dar (n=72).

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur Isolierung von PASMC besonders aus dem präkapillären Bereich und eine Methode zur Untersuchung der HPV auf zellulärer Ebene mittels PASMC der Ratte etabliert. Da Untersuchungen an Mäusen auch die Verwendung von gendefizienten Tieren ermöglichte, wurde in einem zweiten Schritt die etablierte Zellisolierungs- und Messmethodik auf die Maus übertragen und der Mechanismus der HPV genauer untersucht. Das Ziel dabei war insbesondere die Untersuchung der Rolle des TRPC6-Kanals bei der Hypoxie-induzierten Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in den isolierten PASMC.

4.1 Charakterisierung der PASMC der Ratte

Für die Untersuchung der HPV auf der Ebene der PASMC werden häufig proximale PASMC der Hauptpulmonalarterie oder der ersten Abzweigung hinter der Hauptpulmonalarterie verwendet, da dies eine direkte Isolierung der Media (SMC-Schicht) ermöglicht, aus denen nach Zerkleinerung in kleinere Gewebestückchen in Kultur PASMC wachsen^{44,126, 123}. Bei der Verwendung von PASMC ist dabei aber zu berücksichtigen, dass die PASMC aus dem proximalen und distalen Bereich unterschiedlich stark auf Hypoxie reagieren. Denn Untersuchungen haben gezeigt, dass PASMC aus dem distalen Bereich (200 bis 700 μM Gefäßinnendurchmesser) stärker auf Hypoxie oder andere vasokonstriktiv wirkende Substanzen mit einer Kontraktion reagieren als PASMC aus dem proximalen Bereich (>800 μm bzw. 5-10 mm Gefäßinnendurchmesser)^{51, 88}. Interessanterweise konnte in einigen Untersuchungen sogar eine Dilatation der proximalen bzw. großen Pulmonalarterien als Reaktion auf Hypoxie gezeigt werden^{3, 50}. Da die PASMC aus dem distalen Bereich eine größere Reaktionsfähigkeit zeigten als PASMC aus dem proximalen Bereich, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur Isolierung von PASMC insbesondere aus dem präkapillären Bereich, der nach derzeitigem Kenntnisstand den physiologischen Ort der HPV darstellt¹¹⁴, verwendet. Die Methode zur Zellisolierung wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Schumacker der Universität von Chicago mit PASMC der Ratte erlernt¹⁰⁷. Zur Kontrolle der Isolierungsmethode der PASMC wurden eine immunohistochemische Untersuchung, Immunofluoreszenzfärbungen und der Western-Blot verwendet, deren Ergebnisse im folgenden jeweils diskutiert werden.

4.1.1 Immunohistochemische Untersuchung zur Isolierung der PASMIC

Das Ziel der Zellisolierungsmethodik der PASMIC war, Eisenpartikel in den intrapulmonalen Gefäßen anzureichern, um diese Gefäße schließlich mit Hilfe magnetischer Kräfte für die Gewinnung von PASMIC in Kultur isolieren zu können. Die immunohistochemische Untersuchung diente dabei der Kontrolle, ob sich die Eisenpartikel tatsächlich nur in den Gefäßen der Lunge befanden oder ob bei der Isolierungstechnik die Gefäßwand zerstört wird, so dass die Eisenpartikel in das umliegende Gewebe durchdringen können. Darüberhinaus konnte gleichzeitig auch untersucht werden, welchen Durchmesser die Gefäße besaßen, in denen sich die Eisenpartikel befanden. Ein intaktes Gewebe während der Zellisolierung war essentiell, damit nur Gefäßstückchen über einen Magneten selektiert werden konnten. In der immunohistochemischen Untersuchung zeigte sich, dass sich die Eisenpartikel nur in kleinen Gefäßen und dabei besonders in den Gefäßen mit einem Durchmesser von 30-150 µm sammelten. Letzteres erklärt sich vor allem dadurch, dass durch die fortlaufende Aufzweigung der Gefäße sowohl die Gesamtquerschnittsfläche als auch die Anzahl der Gefäße bis zu den Kapillaren drastisch zunimmt²⁵.

4.1.2 Immunofluoreszenzfärbung der PASMIC

Zur Charakterisierung der isolierten Zellen aus der Ratte diente die Immunofluoreszenzfärbung der PASMIC mit Antikörpern gegen Proteine, die für glattmuskuläre (SM) Zellen spezifisch sind: SM- α -Aktin und die schweren Ketten des Myosins (SM-MHC). Zur Identifizierung von kontaminierenden Endothelzellen wurde ein Antikörper gegen von Willebrand Faktor (vWF) und für Epithelzellen ein Antikörper gegen Cytokeratin verwendet. Als negative Kontrolle wurde statt des primären Antikörpers der Puffer verwendet, mit dem die Antikörper verdünnt wurden. Die Färbung gegen Vimentin diente als positive Kontrolle. Da Vimentin in allen Zellen mesodermalen Ursprungs und somit auch in PASMIC vorkommt², sollte gezeigt werden, dass das verwendete Protokoll zur Fluoreszenzfärbung geeignet ist.

Die drei untersuchten Passagen (P0, P1, P3) der primären Zellen aus der Ratte zeigten eine positive Färbung gegen Vimentin, SM- α -Aktin und SM-MHC. Eine genaue quantitative Aussage hinsichtlich der Signalintensität ist mit dieser Methode nicht möglich. Die positive Färbung gegen SM- α -Aktin und SM-MHC zeigt, dass es sich bei den isolierten Zellen um glatte Muskelzellen handelt, deren zellulärer Zustand hinsichtlich der untersuchten Proteine auch in Kultur erhalten bleibt. Allerdings ist aus der Literatur

bekannt, dass vaskuläre glatte Muskelzellen in Kultur ihre Morphologie und auch die Zusammensetzung ihrer zellulären Organellen ändern können, so dass sie vom „kontraktilen“ zum „synthetischen“ Phänotyp modulieren, der durch Proliferation, Proteinsynthese und Sekretion von extrazellulärer Matrix gekennzeichnet ist^{65, 92, 121}. Dazu gehört eine Änderung der Expressionsrate kontraktiler und zytoskeletaler Proteine. So wird die Expression von SM- α -Aktin, SM-MHC, Calponin und Desmin, die für die glatte Muskelzelle spezifisch sind, vermindert, während nicht-muskuläre Varianten der genannten Proteine zunehmend exprimiert werden¹²¹. Andere Autoren hingegen konnten zeigen, dass die Kontraktionsfähigkeit der PASMC und somit auch der „kontraktilen“ Phänotyp auch bei länger anhaltender Kultivierung und wiederholtem Passagieren der PASMC erhalten bleibt⁶⁵. Es ist schwierig, dabei ein einheitliches Bild zu erhalten, da in den Untersuchungen der verschiedenen Autoren PASMC aus unterschiedlichen Spezies, unterschiedlichen Zellisolierungsmethoden und Kultivierungsbedingungen verwendet wurden. Außerdem wurden in den verschiedenen Untersuchungen auch unterschiedliche Methoden für die Charakterisierung des Zellzustandes der PASMC gewählt, so dass die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar sind^{65, 121}.

Die Färbung gegen vWF und gegen Cytokeratin in der vorliegenden Arbeit war bei allen drei Passagen der PASMC der Ratte negativ, so dass eine Verunreinigung der PASMC durch Endothel- oder Epithelzellen ausgeschlossen werden konnte.

4.1.3 Western-Blot

Wie im Kapitel 4.1.2. bereits erwähnt wurde, besteht bei kultivierten glatten Muskelzellen die Gefahr, dass sie vom „kontraktilen“ zum „synthetischen“ Phänotyp wechseln. Deshalb wurde die Expression der SM- α -Aktin und SM-MHC Proteine, die für den „kontraktilen“ Phänotyp kennzeichnend sind, untersucht. Da mittels der Immunofluoreszenzfärbung keine genaue quantitative Aussage getroffen werden kann, wurde die Untersuchung mittels des Western-Blots durchgeführt. Dabei konnten keine PASMC von Passage 0 (P0), d.h. drei Tage nach Zellisolierung, verwendet werden, weil zu diesem Zeitpunkt die Zellzahl für einen Western-Blot zu gering war. Ein Expressionsvergleich fand also nur zwischen Zellen aus P1 und P3 statt und zeigte keine signifikant unterschiedliche Expression der beiden untersuchten Proteine. Da SM- α -Aktin und SM-MHC für den „kontraktilen“ Phänotyp typisch sind, lässt sich daraus schließen, dass die kultivierten PASMC ihren „kontraktilen“ Phänotyp beibehielten. Untersuchungen primärer Kulturen aortaler SMC¹²¹ zeigten allerdings, dass die Expression der kontraktilen Proteine SM- α -Aktin und SM-MHC in

Passage 2-3 im Vergleich zu den SMC vom ersten und dritten Tag nach Zellisolierung reduziert war, was in diesem Fall für einen Wechsel der SMC vom „kontraktilen“ zum „synthetischen“ Phänotyp spricht. Außerdem zeigte sich für PASMC der Passage 2-3 eine Zunahme der Expression des Zytoskelettproteins nichtmuskuläres β -Aktin, das eine wichtige Funktion bei der Adhäsion der Zellen ausübt¹²¹. Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig es ist, nicht-passagierte Zellen oder nur Zellen der Passage 1 für entsprechende physiologische Untersuchungen heranzuziehen. Wie oben bereits erwähnt, konnten in den eigenen Untersuchungen mit dem Western-Blot keine PASMC von P0 verwendet werden.

4.2 Messung der Kontraktion der PASMC der Ratte

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine Methode zur Untersuchung der HPV auf der Ebene der PASMC etabliert werden. Da in der Literatur gezeigt wurde, dass isolierte PASMC unter Hypoxie einerseits mit einer Kontraktion und andererseits mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ reagierten^{44, 64, 65, 107, 108, 126}, wurden zwei verschiedene Messungen - die der Kontraktion und die der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration - miteinander verglichen. Im vorliegenden Kapitel werden die Ergebnisse der Messung der Kontraktion diskutiert, während auf die Ergebnisse der Messung der $[Ca^{2+}]_i$ im nächsten Kapitel eingegangen wird. Die Messung der Kontraktion wurde aus der Veröffentlichung von Prof. Dr. P. Schumacker der Universität von Chicago übernommen¹⁰⁷ und sollte für eigene Untersuchungen etabliert werden. Dabei wurden PASMC der Ratte verwendet, weshalb die Etablierung der Messung der $[Ca^{2+}]_i$ im Rahmen dieser Arbeit auch mit PASMC der Ratte durchgeführt wurde. Zunächst wurde zur Optimierung der zu verwendenden Zellpassage ein Vergleich der Reaktion drei unterschiedlicher Zellpassagen (P0 (d.h. 3 Tag nach Zellisolierung), P1 und P3) auf ET-1, ein aus 21 Aminosäuren aufgebautes Peptid, das in vivo vom vaskulären Endothel produziert wird und auf vaskuläre glatte Muskelzellen über ET_A - und ET_B -Rezeptoren vasokonstriktiv wirkt^{53, 85, 89}, untersucht. Aus der Literatur ist bekannt, dass PASMC durch das Kultivieren ihren Zellzustand und damit auch ihre Reaktionsfähigkeit ändern können¹²¹. Allerdings reagierten die PASMC der drei untersuchten Passagen nicht mit einer Kontraktion auf ET-1. Auch unter hypoxischen Bedingungen war kein Unterschied in der Reaktion der PASMC im Vergleich zu normoxischen Bedingungen festzustellen, obwohl unter Hypoxie der Wert der O_2 -Konzentration am Ausgang der Kammer nach dem Wechsel von Normoxie zu Hypoxie auf 2,3% sank. Ein Vergleich des gemessenen Wertes der O_2 -Konzentration mit der Stärke

der Hypoxie in Versuchen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls die Kontraktion von Zellen untersuchten, zeigt, dass die Voraussetzung für die Messung unter Hypoxie in den eigenen Versuchen erfüllt war (2%¹⁰⁷, 3%⁶⁴, 5%⁵²). Auch für die Untersuchung der Änderung des Gefäßtonus kleinerer intrapulmonalarterieller Gefäße in folge einer Kontraktion unter hypoxischen Bedingungen wurde von anderen Arbeitsgruppen eine O₂-Konzentration in demselben bereits genannten Bereich verwendet (2%¹⁵, 2,4%⁸⁰ oder 4%⁴⁶).

Eine Reduktion des FCS-Gehaltes im Zellkulturmedium auf 0,2% 24 Stunden vor Versuchsbeginn konnte auch keine Reaktion der PASMC auf Hypoxie bewirken, so dass die Ursache nicht in dem Proliferationszustand der PASMC liegen kann, da eine FCS-Reduzierung einen Arrest der Proliferation bewirkt^{75, 124}.

Insgesamt erwies sich der Ansatz für die Messung einer Kontraktion mittels dieses Kontraktionsassays nicht als geeignet, um die Hypoxieantwort der PASMC zu bestimmen. Die Tatsache, dass die PASMC nicht mit einer Kontraktion reagierten, kann mit der Beschichtung der Deckgläser im Zusammenhang stehen, da andere Arbeitsgruppen gezeigt haben, dass die Beschichtung für die Kontraktionsfähigkeit der PASMC eine wichtige Rolle spielt. In der Literatur wurde beschrieben, dass die Stärke der Kontraktion proportional zur steigenden Konzentration von Fibronectin zunahm. Dies zeigt, dass die extrazelluläre Matrix und dadurch auch die Wechselwirkung der PASMC mit der extrazellulären Matrix die Kontraktionsfähigkeit der PASMC beeinflusst^{44, 76}. Andere Autoren zeigten hingegen unterschiedliche Reaktionen der PASMC je nach Art der Beschichtung. So bewirkte Fibronectin bei PASMC einen Wechsel vom „kontraktilen“ zum „synthetischen“ Phänotyp, während Laminin und Kollagen (Typ IV) die PASMC im „kontraktilen“ Phänotyp hielten⁹⁸. Grundsätzlich ist aber auch anzumerken, dass gerade Untersuchungen mit kultivierten Zellen vielen Einflüssen ausgesetzt sind, da sowohl die Gewinnung der Zellen als auch die verwendete Messmethodik in ihrer Ausführung spezifischen Bedingungen unterlegen sind. Deshalb besteht die Schwierigkeit, einheitliche Ergebnisse zu erzielen.

Außer der direkten Messung der Kontraktion durch Messung der Länge bzw. Fläche der PASMC ist in der Literatur auch die Messung einer Änderung in der Faltung und Drehung einer Oberfläche aus polymerisiertem Polydimethyl Siloxane, die durch die bei einer Kontraktion auftretenden Zugkräfte verursacht werden, beschrieben worden. Dabei wurden die PASMC direkt auf die flexible Oberfläche ausgesät^{64, 65}. Da diese Methode keine Verwendung von frisch isolierten PASMC, d.h. P0, erlaubt, aber auch diese aufgrund der

möglichen Änderung des Zellzustandes von passagierten Zellen untersucht werden sollten, wurde sie nicht für eigene Untersuchungszwecke herangezogen. In der Literatur wird außerdem ein Ansatz beschrieben, bei dem sich eine größere Anzahl PASMC in einem dickeren Gelkissen aus Kollagen befanden, das in der Kulturschale frei beweglich war ⁴⁴. Als Maß für eine Kontraktion diente dabei eine Verkleinerung des gesamten Durchmessers des Gelkissens. Diese Methode hat allerdings den Nachteil, dass nicht eine Untersuchung einzelner Zellen möglich ist.

Für eine genauere Untersuchung der Ursache für das Nicht-Kontrahieren der kultivierten PASMC in den eigenen Versuchen müsste außer der Expression der SM- α -Aktin und SM-MHC Proteine (Kap. 3.1.2) auch die Expression weiterer Proteine untersucht werden, die an dem Kontraktionsvorgang beteiligt sind. So spielt die Myosinkinase (MLCK) eine wichtige Rolle bei der Auslösung einer Kontraktion, da sie durch Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins (MLC) eine Wechselwirkung zwischen Aktin und Myosin induziert ⁷⁶. Darauf wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen, da sich beim Vergleich zwischen der Messung der Kontraktion und der Messung der $[Ca^{2+}]_i$ die letztere Methode als eine geeignetere Methode für die Untersuchung der HPV auf der Ebene der PASMC herausstellte, so dass eine Etablierung der Messung der Kontraktion nicht weiter verfolgt wurde.

4.3 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in PASMC der Ratte

Zur Etablierung einer Methode zur Untersuchung der HPV auf der Ebene der PASMC wurde neben der in Kapitel 4.2 diskutierten Messung der Kontraktion auch die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in PASMC der Ratte herangezogen, da bekannt ist, dass die HPV mit einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in PASMC verknüpft ist ^{105, 108, 126}. Die Ursache für die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ unter Hypoxie wird im Kapitel 4.4 diskutiert. Nach Untersuchung des Einflusses der Zellpassage auf die ET-1-Antwort und der daraus resultierenden Optimierung der Messmethodik hinsichtlich der zu verwendenden Passage wurde ein Perfusionssystem etabliert, das für weitere Versuche mit PASMC der Maus zur Messung unter hypoxischen Bedingungen verwendet werden sollte. Sowohl bei der Untersuchung des Einflusses der Zellpassage auf die ET-1-Antwort als auch bei der Etablierung der Messmethodik für die Verwendung eines Perfusionssystems wurde ET-1 eingesetzt, da diese Substanz einen Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ in PASMC bewirkt ³⁹.

4.3.1 Einfluß der Zellpassage auf die ET-1-Antwort

Zur Optimierung der Messung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde ein Vergleich unterschiedlicher Passagen (P0, P1 und P3) bezüglich der Reaktion auf ET-1 vorgenommen, da Zellen durch das Kultivieren möglicherweise ihren Zellzustand und damit auch ihre Reaktionsfähigkeit ändern¹²¹. Dabei reagierten die PASMC von P0 am stärksten auf ET-1 mit einem transienten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Die Ca^{2+} -Antwort der PASMC von P1 war auch größer als die von P3. Bei allen drei Passagen erfolgte der dem transienten Anstieg folgende Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ auf ein Plateau, das oberhalb der Basislinie verlief. Die Ursache der passagenabhängigen Abnahme in der Stärke des transienten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ liegt offensichtlich in einer zellkulturbedingten Veränderung der PASMC. Denn wie bereits in den Kapiteln 4.1.2, 4.1.3 und 4.2 diskutiert wurde, können PASMC in Kultur ihren Zellzustand ändern, das sich dann in ihrer veränderten Reaktionsfähigkeit äußert. Der Unterschied beruht bei den PASMC wahrscheinlich jedoch nicht auf einer veränderten Expression der SM- α -Aktin und SM-MHC Proteine der PASMC, da die quantitative Untersuchung dieser beiden Proteine für P1 und P3 mittels des Western-Blots keine signifikanten Unterschiede zeigte. Eine mögliche Ursache könnte beispielsweise in einer verringerten ET-1-Rezeptor-Dichte mit steigender Passage liegen. Allerdings wurden keine tiefergehenden Untersuchungen zur Ergründung der Ursache vorgenommen, da die Untersuchung der Ca^{2+} -Antwort der unterschiedlichen Passagen nur zur Optimierung der Messmethodik diente und eine verringerte Ca^{2+} -Antwort mit steigender Passage plausibel ist. Da die Ca^{2+} -Antwort auf ET-1 bei PASMC von P0 am stärksten war, wurde diese Passage für alle weiteren Versuche verwendet.

Der transiente Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ der PASMC der Ratte zeigte sich auch bei PASMC aus Kaninchen, bei denen sogar die Höhe des Anstiegs konzentrationsmäßig abnahm³⁹. Zwei Publikationen berichten von einem länger anhaltendem transienten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ mit anschließendem Abfall auf einen erhöhten Plateauwert^{23, 90}. Andere Arbeitsgruppen zeigten darüberhinaus eine Oszillation der $[Ca^{2+}]_i$ als Antwort auf einen ET-1-Stimulus^{39, 127}, wobei Frequenz und Amplitude der Ca^{2+} -Peaks konzentrationsabhängig zunahm¹²⁷. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind vermutlich auf Unterschiede bei der Isolierung und Kultivierung der PASMC und bei den verwendeten Spezies zurückzuführen.

Der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ folgt aus der den ET-Rezeptoren nachgeschalteten Signalkaskade. Deshalb wird an dieser Stelle auf die Ergebnisse aus der Literatur verwiesen, aus der bekannt ist, dass ET-1 einen G-Protein gekoppelten Signalweg auslöst^{39, 83, 91}. Dabei ist es unklar, ob das ET-1-Signal über die ET_A - oder ET_B -Rezeptoren vermittelt wird, da es für

beides Hinweise gibt. Die Bindung von ET-1 an den Rezeptor löst eine G-Protein vermittelte Aktivierung der Phospholipase C aus, die eine Spaltung von Phosphatidylinositol-bis-phosphat (PIP₂) in Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) bewirkt. IP₃ wirkt dabei auf den IP₃-Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum, während DAG zur Aktivierung von spannungsabhängigen L-Typ Ca²⁺-Kanälen, rezeptorvermittelten Ca²⁺-Kanälen oder nicht-selektiven Ionenkanälen beitragen kann. Ob die Ca²⁺-Ionen aus den internen Speichern oder aus dem Extrazellulärraum kommen, ist noch ungeklärt. Auch eine Inhibition der ATP-sensitiven Kaliumkanäle oder eine konzentrationsabhängige Zu- bzw. Abnahme der Aktivität der Ca²⁺-aktivierbaren Kaliumkanäle werden diskutiert^{46,91}.

4.3.2 Etablierung des Perfusionssystems

Nach der Optimierung der Zellpassage für die Messung der [Ca²⁺]_i wurde ein Perfusionssystem etabliert, das für die Messungen unter hypoxischen Bedingungen verwendet werden sollte. Dabei wurde zum einen untersucht, ob der Perfusionsfluß von 0,5 ml/min für diese Anwendung geeignet ist, d.h. ob dieser per se einen Anstieg der [Ca²⁺]_i auslöst, da vaskuläre glatte Muskelzellen in vivo keinem direkten Scherstreß durch den Blutfluß ausgesetzt sind. Zum anderen wurde die Reaktionsfähigkeit der PASMC auf perfundiertes ET-1 als positiven Stimulus überprüft. Aus den Versuchen ergab sich, dass ET-1 einen kurzzeitigen Anstieg mit einem nachfolgenden Abfall der [Ca²⁺]_i bewirkte. In den Kontrollversuchen hingegen reagierten die PASMC nicht mit einem Anstieg der [Ca²⁺]_i. Dies zeigte zum einen, dass die Perfusionsrate von 0,5 ml/min für diese Messung geeignet ist, und zum anderen, dass die PASMC auch unter Perfusion zu einer Signalantwort fähig sind. Auch Civelek et al.⁹ konnte zeigen, dass PASMC sogar bei 25 dyn/cm² nicht mit einer Änderung der [Ca²⁺]_i auf Scherstress reagierten.

Zur Etablierung des Perfusionssystems wurde auch die Kinetik des Abfalls der O₂-Konzentration erfasst. Dabei ergab sich, dass 6,5 Minuten nach dem Wechsel von Normoxie zu Hypoxie die O₂-Konzentration direkt hinter der Zellkammer den 5%-Wert unterschritt und dann langsam bis auf 2,3% sank. Wie bereits im Kapitel 4.2 für die Messung einer Kontraktion unter Hypoxie diskutiert wurde, liegt der gemessene Wert der O₂-Konzentration auch für die Messung der [Ca²⁺]_i unter hypoxischen Bedingungen in dem gleichen von anderen Arbeitsgruppen verwendeten O₂-Konzentrationsbereich (1,5%¹⁰⁸, 1,8%⁶⁹, 4,2%¹⁰³ und 5%⁸⁸). Somit war die Voraussetzung für die Messung unter Hypoxie erfüllt.

4.4 Untersuchungen zur Hypoxie-induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in PASMC der Maus

Die hypoxische Inkubation der PASMC bewirkt einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Hypoxie sowohl in isolierten PASMC als auch in Arterien eine dauerhafte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ hervorruft, manchmal auch erst nach einem vorausgegangen transienten Ca^{2+} -Anstieg¹⁰⁵. Somit konnte bisher sowohl eine mono- als auch eine bisphasische Hypoxieantwort beobachtet werden¹⁰⁶.

Die Untersuchungen zum Mechanismus der HPV wurden mit PASMC der Maus durchgeführt, da dies auch die Verwendung von PASMC aus gendefizienten Mäusen ermöglichte und im Rahmen dieser Arbeit auch PASMC aus TRPC6^{-/-}-Mäusen untersucht werden sollten. Deshalb wurde sowohl die etablierte Methode zur Isolierung der PASMC als auch die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ von der Ratte auf die Maus übertragen. Die Etablierung erfolgte mit Ratten, da hierbei die Isolierungs- und Präparationsprozedur wesentlich einfacher war und in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Schumacker der Universität Chicago anfänglich erlernt wurde.

4.4.1 Immunfluoreszenzfärbung der PASMC der Maus

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode zur Isolierung von intrapulmonalen PASMC der Ratte wurde in einem zweiten Schritt auf die Maus übertragen. Die isolierten Zellen wurden mit Hilfe der Immunfluoreszenzmethode charakterisiert und zeigten eine positive Färbung gegen Vimentin, SM- α -Aktin und SM-MHC sowie eine negative Färbung gegen vWF und in der negativen Kontrolle (d.h. ohne primären Antikörper). Die Färbungen weisen zusammen mit der SMC-typischen Morphologie die Identität der gewonnenen Zellen als PASMC nach. Somit konnte gezeigt werden, dass die für Rattenzellen etablierte Methode zur Isolierung der glatten Muskelzellen aus der pulmonalen Strombahn auch für die Isolierung der PASMC aus Mäusen geeignet ist.

4.4.2 Reaktion der PASMC auf ET-1

In Analogie zu den Experimenten mit Ratten PASMC wurde die Reaktion der Maus PASMC auf ET-1 als positiven Stimulus überprüft. Dabei zeigte sich nach Applikation des ET-1 ein rascher Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ mit einem nachfolgenden langsameren Abfall. Dies bestätigte zunächst die grundsätzliche Reaktionsfähigkeit der PASMC der Maus, mit

einem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg zu reagieren. Die Ursache für den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ wurde bereits im Kapitel 4.3.1 diskutiert, worauf deshalb an dieser Stelle verwiesen wird.

4.4.3 Einfluß des ET-1-, „Primings“ auf die Hypoxieantwort

Für die Untersuchung der HPV wurde das Perfusat mindestens 30 Minuten mit Stickstoff begast und dann mit einer Perfusionsrate von 0,5 ml/min über die PASMCM geleitet. Die PASMCM der Maus reagierten dabei nicht mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, obwohl die normobare Sauerstoffkonzentration -nachfolgend als O_2 -Konzentration abgekürzt- direkt nach dem Ausgang der Zellkammer 2,3% betrug und somit -wie bereits in Kapitel 4.3.2 diskutiert- in dem auch von anderen Arbeitsgruppen für die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ unter hypoxischen Bedingungen verwendeten Bereich lag. Allerdings konnte auch ein Zusammenhang zwischen dem O_2 -Konzentrationswert und der Stärke der Hypoxieantwort, d.h. dem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ gezeigt werden^{69, 88}. Ein Vergleich zwischen mäßiger Hypoxie (5%) und Anoxie (0%) bei PASMCM der 4.-6. Generation von Ratten zeigte einen stärkeren Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ bei einer O_2 -Konzentration von 0% ($[Ca^{2+}]_i = 512,1$ nM) als bei einer O_2 -Konzentration von 5% ($[Ca^{2+}]_i = 184,5$ nM). Bei 10% O_2 -Konzentration war schließlich kein Anstieg mehr nachweisbar⁶⁹. Dahingegen ergab sich in Untersuchungen von Sham et al. für distale PASMCM bei mäßiger Hypoxie (5%) noch kein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, sondern erst bei Anoxie (0%), der aber dann auch nur ca. 20 nM betrug⁸⁸. Dies zeigt zum einen den Einfluß der Hypoxiestärke auf die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$, aber auch die inkonsistenten Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen hinsichtlich einer Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ bei Vergleich desselben O_2 -Konzentrationswertes.

Wie bereits erwähnt, war in den eigenen Versuchen unter Hypoxie kein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ zu erzielen. Da in der Literatur vielfach beschrieben ist, dass zur Untersuchung der HPV auf zellulärer Ebene die PASMCM im Sinne einer Sensibilisierung der Zellen mit einer geringen Dosis einer vasokonstriktiv wirkenden Substanz wie ET-1⁸⁸, Angiotensin II¹⁰⁸ oder Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ⁹⁹ „geprimt“ werden, wurden in einem zweiten Schritt Versuche unter Hypoxie mit ET-1 als „Priming“-Substanz durchgeführt. Grundsätzlich wird das „Priming“ aber nicht nur für Untersuchungen mit PASMCM, sondern auch für Untersuchungen mit isolierten intrapulmonalarteriellen Gefäßen^{46, 80} oder der isolierten Lunge¹⁰² verwendet.

In den eigenen Versuchen stieg die $[Ca^{2+}]_i$ nach dem „Priming“ mit ET-1 unter Hypoxie sigmoidal auf ein Plateau an, was in einem parallelen Ansatz unter Normoxie nicht der Fall war. Ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ unter Hypoxie ergab sich auch in Untersuchungen anderer

Arbeitsgruppen^{15, 69, 88, 108}. Im Unterschied dazu zeigte Robertson et al.⁸⁰ in seinen Untersuchungen einen schnellen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ mit einem anschließendem Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ auf ein Plateau, das oberhalb der Basislinie verlief.

Da ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ unter Hypoxie in den eigenen Versuchen nur nach einem „Priming“ mit ET-1 erfolgte, könnte dies zwar auf eine Rolle von ET-1 für die HPV hinweisen, der allerdings in der Literatur umstritten ist. Denn in einigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Entfernung des Endothels die HPV teilweise oder sogar komplett verhinderte^{34, 41, 79, 82}, während in anderen Untersuchungen die Entfernung des Endothels keinen oder nur einen kleinen Effekt auf die HPV hatte^{7, 68, 125}. Obwohl Untersuchungen zeigten, dass PASMC sowohl Sensor- als auch Effektorzelle im Zusammenhang mit der HPV darstellen^{5, 114}, scheint es doch eine gewisse Abhängigkeit der HPV vom Endothel zu geben. Dabei zeigte sich aber die akute Phase der HPV als eine endothelunabhängige Reaktion^{15, 80}, während die protrahierte Phase der HPV sehr stark oder sogar komplett von einem intakten Endothel abhängig ist^{1, 15, 80}. Diese Endothelabhängigkeit der protrahierten Phase der HPV könnte durch eine Hypoxie-induzierte Hemmung der Freisetzung vasodilatatorischer Faktoren hervorgerufen werden⁸⁰, was sich auf die Beobachtung gründet, dass vom Endothel abgeleitete Vasodilatoren wie Prostacyclin und NO die Hypoxieantwort modulierten⁴⁹. Allerdings scheint die Endothelabhängigkeit vielmehr in der Freisetzung eines vasokonstriktiven Faktors aus dem Endothel begründet zu liegen^{1, 80}. Dabei stellt besonders ET-1 einen möglichen Kandidaten dar, da Kourembanas et al. gezeigt haben, dass die Synthese und die Freisetzung von ET-1 aus den pulmonalarteriellen Endothelzellen durch Hypoxie induziert werden kann⁴⁰. Darüberhinaus konnte die HPV auch durch ET-1 Rezeptor-Antagonisten in intakten Tieren inhibiert werden⁹⁷. Allerdings bewirkten ET-1-Antagonisten in anderen Untersuchungen dahingegen keinen Effekt auf die HPV⁸⁰.

Interessanterweise scheint ET-1 auch im Zuge der chronischen Hypoxie an der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie beteiligt zu sein, da Patienten mit einer primären oder sekundären pulmonalen Hypertonie gegenüber Kontrollpatienten einen erhöhten ET-1-Spiegel im zirkulierenden Blut aufweisen⁹⁴. Bei Ratten konnte sogar eine kontinuierliche Behandlung mit dem ET-1-Rezeptor Antagonisten BQ-123 zwei Wochen nach Hypoxiebeginn den pulmonalarteriellen Druck signifikant senken und eine fortschreitende Verschlimmerung der Rechtsherzhypertrophie verhindern. Somit konnte ein ET_A-Rezeptor-Antagonist die physiologischen und morphologischen Änderungen der pulmonalen Gefäße der Ratte, die bei chronischer Hypoxie auftreten, verhindern oder

aufhalten. Allerdings ist die genaue Rolle von ET-1 bei der Pathogenese der pulmonalen Gefäßerkrankungen genauso wie für die Entwicklung der akuten HPV noch ungewiß und teilweise auch umstritten⁷⁴.

Im Zusammenhang mit der Untersuchung des Einflusses des ET-1-„Primings“ auf die HPV stellt sich auch die Frage nach dem zugrundeliegenden Mechanismus. Eine mögliche Hypothese ist die Inhibition der spannungsabhängigen Kaliumkanäle (K_V -Kanal), wobei es unklar ist, ob die K_V -Kanäle direkt inhibiert werden oder das Membranpotential leicht depolarisiert wird. Alternativ dazu könnte der „Priming“-Effekt von ET-1 auch mit einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit der Ca^{2+} -Kanäle unabhängig vom Membranpotential im Zusammenhang stehen. Dies könnte dann einen größeren Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle nach Hypoxie-induzierter Membrandepolarisation bewirken. Es wird auch diskutiert, ob ET-1 die Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktile Apparates ändert, da gezeigt werden konnte, dass ET-1 eine Änderung der Ca^{2+} -Sensitivität der Kontraktion des pulmonal-vaskulären glatten Muskels hervorruft. Der zugrundeliegende Mechanismus für die gesteigerte Sensitivität des kontraktile Apparates gegenüber Ca^{2+} bleibt dabei jedoch ungelöst^{49, 89, 97}.

Da es nicht Ziel der vorliegenden Arbeit war, den genauen Mechanismus des „Priming“-Effekts zu untersuchen und die Ca^{2+} -Antwort der eigenen Untersuchungen der akuten Phase der HPV entsprach, die sich in der Literatur -wie bereits erwähnt- vorwiegend als eine endothelunabhängige Reaktion zeigte, wurde dieser Fragestellung nicht weiter nachgegangen. Vielmehr scheint das ET-1-„Priming“ die PASMC zu sensibilisieren, da Sham et al.⁸⁸ gezeigt haben, dass das „Primen“ mit ET-1 die Kontraktion von Myozyten unter hypoxischen Bedingungen um das achtfache verstärkte. Da die PASMC auf Hypoxie nur nach „Priming“ mit ET-1 reagierten, wurden die nachfolgenden Hypoxieversuche immer mit ET-1-„Priming“ durchgeführt.

4.4.4 Die Rolle der Ca^{2+} -Kanäle und des TRPC6-Kanals für die Hypoxieantwort

Ca^{2+} -Kanäle spielen im Zusammenhang mit der HPV eine wichtige Rolle, da durch Hypoxie ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ induziert wird. Dabei stellt sich die Frage, ob die Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden oder aus dem extrazellulären Raum stammen. Neben einem Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanäle als Resultat der Inhibition der K_V -Kanäle wird auch die Rolle von Speicher-aktivierten Ca^{2+} -Kanälen und einem dadurch bedingtem kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom für die Regulation der HPV diskutiert^{55, 95, 103}. Ein kapazitiver Ca^{2+} -Einstrom ist dabei auch durch nicht-

selektive Kationenkanäle möglich. Dabei kommt besonders den TRP-Proteinen sowohl bei den Speicher-aktivierten Ca^{2+} -Kanäle als auch bei den nicht-selektive Kationenkanäle eine wichtige Bedeutung zu¹⁰⁵.

4.4.4.1 Einfluß des TRPC6-Kanals auf die Hypoxieantwort

Der in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckte TRP (transient receptor potential)-Ionenkanal ist das erste Mitglied einer neuen Großfamilie von TRP Kanälen, die auch in Säugetieren vorkommen. Insgesamt sind inzwischen sechs TRP-Familien in Säugetieren identifiziert worden. So gibt es neben der TRPC-Familie (C steht für „classical“ or „canonical“), die die größte Homologie zu den *Drosophila* trp-Kanälen aufweist, noch die TRPM (M steht für Melastatin), TRPV (V steht für Vanilloid), TRPP (P steht für „polycystic kidney disease“), TRPA (A steht für Ankyrin Domäne) und die TRPML (ML steht für Mucolipin) Familie^{67, 78}. Dabei bestehen die TRPC-Ionenkanäle aus sieben Mitgliedern (TRPC1-TRPC7), die sowohl beim Speicher-aktivierten als auch beim Rezeptor-operierten Ca^{2+} -Einstrom eine wichtige Rolle bei der Regulation und Proliferation von Zellen spielen. Phylogenetische Untersuchungen zeigen, dass die TRPCs in zwei Subfamilien TRPC1/4/5 und TRPC3/6/7 unterteilt werden können. Die tetrameren TRP-Ionenkanäle können aus gleichen (homotetramer) oder aus unterschiedlichen (heterotetramer) Monomeren aufgebaut sein, wobei zunächst nur die Mitglieder innerhalb einer Subfamilie heterotetrameren Kanal bilden können^{12, 45, 67, 78}. Neuerdings wurden allerdings auch tetramere Kanalkomplexe beschrieben in denen drei verschiedene Monomere aus unterschiedlichen Subfamilien identifiziert wurden⁹⁶. Die genaue physiologische Rolle der meisten Mitglieder der TRPC-Familie ist im Gegensatz zu Mitgliedern der anderen TRP-Familien noch unbekannt. Einzig der glatten systemischen Gefäßmuskulatur konnte bisher eine Funktion nachgewiesen werden. Einige Untersuchungen zeigen aber, dass TRPC6 eine essentielle Komponente der Rezeptor-operierten Ca^{2+} -durchlässigen nicht-selektiven Kationenkanäle in den glatten Muskelzellen ist^{12, 13, 14}.

Darüber hinaus wird diskutiert, dass TRPC6 eine wichtige Rolle in der Genese der pulmonalen Hypertonie zukommt^{45, 122}. Da im Zusammenhang mit der HPV außerdem die Beteiligung eines Kanalabhängigen Ca^{2+} -Einstroms als essentiell für die Signaltransduktion der HPV diskutiert wird¹⁰⁶, sollte im Rahmen dieser Arbeit besonders die Bedeutung des TRPC6-Kanals für die HPV untersucht werden.

Als molekularer Zugang für diese Fragestellung wurde daher die Hypoxieantwort der PASMC von TRPC6^{-/-}-Mäusen untersucht. Dabei wurde ebenfalls mit ET-1 „geprimt“. Im Gegensatz zu PASMC aus WT-Mäusen zeigte sich bei den PASMC aus TRPC6^{-/-}-Mäusen kein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Dies wies auf eine Rolle der TRPC6-Kanäle für die Hypoxieantwort hin. Um dieses Ergebnis zu manifestieren, wurde die Hypoxieantwort von PASMC aus TRPC6^{-/-}-Mäusen untersucht, die zuvor mit einem adeno-assoziierten Virus, der für TRPC6-GFP kodierte, infiziert wurden. In diesen Rekonstitutions-Experimenten reagierten die PASMC tatsächlich wieder mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ bei gleichzeitigem ET-1-„Priming“. Diese Untersuchungen zeigen, dass TRPC6 essentiell für den Hypoxie-induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ ist. Dieses Ergebnis konnte durch Untersuchungen der HPV an intakten Lungen, die nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren, bestätigt werden (N. Weissmann, persönliche Mitteilung). In diesen Untersuchungen zeigten Lungen aus TRPC6^{-/-}-Mäusen keine akute HPV mehr.

4.4.4.2 Die Rolle der internen Ca^{2+} -Speicher für die Hypoxieantwort

Im vorhergehenden Kapitel wurde gezeigt, dass die TRPC6-Kanäle und somit auch extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen für die akute Hypoxieantwort essentiell sind. Obwohl es sich bei den TRPC6-Kanälen um Rezeptor-operierte Kanäle handelt, wurden in der Literatur auch Speicher-aktivierte Ca^{2+} -Kanäle und ein kapazitiver Ca^{2+} -Einstrom für die Regulation der HPV vorgeschlagen^{55, 103, 110}. Im Zusammenhang mit der HPV wurde auch gezeigt, dass Hypoxie in der pulmonalarteriellen glatten Muskulatur von Ratte, Kaninchen und Hund eine Ca^{2+} -Freisetzung aus Ryanodin-sensitiven Speichern verursachte, wobei bei PASMC vom Hund sogar die gleichzeitige Ca^{2+} -Freisetzung sowohl aus Ryanodin- als auch IP_3 -sensitiven Speichern für die Aktivierung des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms notwendig war¹⁰⁵.

Der Ca^{2+} -Freisetzung aus Ryanodin- bzw. IP_3 -sensitiven Speichern liegen unterschiedliche Mechanismen zugrunde. Für die Ca^{2+} -Freisetzung aus Ryanodin-sensitiven Ca^{2+} -Speichern wurde vorgeschlagen, dass diese über den zellulären β -NADH-Spiegel reguliert wird. Dies soll dazu führen, dass vermehrt zyklische ADP-Ribose (cADPR) durch die ADP-Ribosylcyclase gebildet und gleichzeitig der Abbau von cADPR durch die cADP-Ribosehydrolase verhindert wird. cADPR bewirkt schließlich die Ca^{2+} -Freisetzung aus den Ryanodin-sensitiven Ca^{2+} -Speichern¹¹⁸. Neuere Untersuchungen erweiterten dieses Konzept und schlagen vor, dass es bei einer milden Hypoxie zu einer Inhibition der Elektronentransportkette in den Mitochondrien kommt und damit zu einem geringen Abfall

der ATP-Bildung. Dadurch ergibt sich ein Anstieg des Verhältnisses AMP/ATP, wodurch die AMP-aktivierte Proteinkinase Alpha 1 (AMPK) aktiviert, cADPR vermehrt gebildet und schließlich ebenso Ca^{2+} aus Ryanodin-sensitiven Ca^{2+} -Speichern freigesetzt wird¹⁹. Im Gegensatz zu diesem Konzept, das der weiteren Überprüfung bedarf, wird die Ca^{2+} -Freisetzung aus IP_3 -sensitiven Speichern durch IP_3 ausgelöst, das bei der PLC-vermittelten Hydrolyse von PIP_2 entsteht und im Kapitel 4.4.5 näher beschrieben wird.

Da die Rolle der internen Ca^{2+} -Speicher für die Hypoxieantwort umstritten ist, wurde die Bedeutung dieser Ca^{2+} -Speicher für den Hypoxie-induzierten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den PASMC der eigenen Untersuchungen überprüft. Dafür wurde Perfusat ohne Ca^{2+} -Ionen verwendet, das zusätzlich EGTA als Ca^{2+} -Chelator enthielt. Nach Applikation von Ca^{2+} -freiem extrazellulärem Medium stieg in den PASMC der WT-Mäuse unter Hypoxie mit ET-1-„Priming“ die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nicht an, obwohl sowohl die WT- als auch die $\text{TRPC6}^{-/-}$ -PASMC mit einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf einen ET-1-Stimulus reagierten. Dies bedeutet, dass eine Reaktionsfähigkeit möglich war, aber der Hypoxie-induzierte Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unabhängig von der Freisetzung aus internen Ca^{2+} -Speichern ist. Dies bedeutet außerdem, dass die internen Ca^{2+} -Speicher beider Zellen gefüllt waren und auch Rezeptor-operiert entleert werden konnten. Auch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass ohne extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen keine Antwort auf Hypoxie in PASMC's, in isolierten Pulmonalarterien sowie in isolierten Lungen und intakten Tieren zu verzeichnen war¹⁰³. Im Gegensatz dazu ergaben andere Untersuchungen eine wichtige Rolle intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher und einen kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom durch Speicher-aktivierte Ca^{2+} -Kanäle^{55, 103, 110} in isolierten PASMC. Diese Diskrepanzen können sich durch Unterschiede in den verwendeten Spezies, der Region der pulmonalarteriellen Strombahn für die Isolierung der PASMC (präkapilläre PASMC, PASMC der größeren Gefäße oder Hauptpulmonalarterie) oder den Zellkulturprotokollen¹⁰³ ergeben. In komplexeren Präparationen wie die isolierte Lunge sind außerdem auch noch andere Zellen außer PASMC vorhanden, die die HPV beeinflussen können¹¹⁰.

4.4.4.3 Die Rolle der membranständigen Ionenkanäle für die Hypoxieantwort

Die in Kapitel 4.4.4.2 diskutierten Ergebnisse der Versuche ohne extrazellulären Ca^{2+} -Ionen zeigten, dass die Hypoxieantwort nicht mit einer Ca^{2+} -Freisetzung aus internen Ca^{2+} -Speichern zusammenhängt. Dies bedeutet, dass der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter Hypoxie durch den Einstrom extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen verursacht wird, und die eigenen

Untersuchungen zeigten, dass die TRPC6-Kanäle eine entscheidende Rolle für die Hypoxieantwort spielen.

Allerdings wurde bereits publiziert, dass TRPC6 vorwiegend Na^+ -Ionen und nur zu einem geringen Anteil Ca^{2+} -Ionen in die Zelle einströmen lässt¹⁷, so dass die Möglichkeit besteht, dass andere Kanäle für den Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verantwortlich sind und vom Na^+ -Ioneneinstrom durch TRPC6-Kanäle aktiviert werden. So wurde z.B. auch ein Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (VOCC) als Folge der Inhibition der K_V -Kanäle und der damit in Verbindung stehenden Membrandepolarisation als Ursache des Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und der dadurch hervorgerufenen Kontraktion postuliert. Dabei blieb jedoch unklar wie die Änderung der K_V -Aktivität hervorgerufen wird^{5, 111}. Eine Möglichkeit ist eine Änderung des zellulären Redoxzustandes durch Änderung des Verhältnisses der Redoxpaare wie GSH/GSSG und NADH/NAD oder durch mitochondriale und / oder NAD(P)H-Oxidase-abhängige Sauerstoffradikalbildung (O_2^-), wobei die K_V -Kanäle allerdings dann nicht mehr die primären Sauerstoffsensoren sind, sondern am Ende des Signaltransduktionsweges stehen^{5, 111}. Eine weitere Möglichkeit zur Änderung der K_V -Aktivität könnte auch in dem Na^+ -Einstrom durch TRPC6-Kanäle bestehen²².

Zur Untersuchung der Rolle der VOCC für die Hypoxieantwort wurde in den eigenen Untersuchungen der VOCC-Inhibitor Nicardipin verwendet. Unter diesen Versuchsbedingungen zeigten die PASMC keinen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, was auf eine bedeutende Rolle der VOCC für die Hypoxieantwort hinweist. Die VOCC scheinen einen wesentlichen Anteil an dem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum unter Hypoxie zu haben. Offen bleibt nun die Frage, welche Rolle der TRPC6-Kanal dann für die Hypoxieantwort spielt. Denn wie bereits in Kapitel 4.4.4.1 beschrieben wurde, war bei PASMC aus TRPC6^{-/-}-Mäusen keine Reaktion auf Hypoxie zu sehen, so dass der TRPC6-Kanal für die Hypoxieantwort von essentieller Bedeutung ist. Um diese Frage weiter aufzuschlüsseln, wurde die Aktivität des TRPC6-Kanals in den PASMC näher untersucht. Da die VOCC im Gegensatz zu den TRPC6-Kanälen nicht für Mn^{2+} -Ionen durchlässig sind, wurde als Maß für die Aktivität der TRPC6-Kanäle der Mn^{2+} -Einstrom unter Hypoxie mittels der Mn^{2+} -Quench-Methode gemessen. Denn Mn^{2+} -Ionen besitzen die Eigenschaft, das Fluoreszenzlicht von Fura-2 am isosbestischen Punkt (bei ca. 360 nm) Ca^{2+} -unabhängig zu quenchen, so dass eine Abnahme des Fluoreszenzlichtes proportional zur Kanalaktivität ist. Bei den PASMC von WT-Mäusen zeigte sich dabei ein durch Hypoxie-induzierter Mn^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum, der als Anstieg der Mn^{2+} -

Quench-Rate bei 360 nm nach Applikation von Hypoxie gemessen wurde. Diese Mn^{2+} -Quench-Rate war bei TRPC6^{-/-}-Mäusen signifikant niedriger. Das bedeutet, dass unter Hypoxie ein Ionen-Einstrom durch die TRPC6-Kanäle stattfindet, der aber nicht zu einem bedeutsamen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führt. Somit muß ein Einstrom von nicht- Ca^{2+} -Ionen stattfinden. In der Literatur wurde für TRPC6-Kanäle beschrieben, dass die Ca^{2+} -Ionen in Anwesenheit von extrazellulären Na^+ -Ionen nur zu einem kleinen Prozentsatz (~4%) zum Strom der ganzen Zelle beitragen, so dass der Ionen-Einstrom im wesentlichen durch Na^+ -Ionen bestimmt wird¹⁷. Nach diesen Arbeiten führt der Na^+ -Einstrom durch die TRPC6-Kanäle schließlich zur Membrandepolarisation und zur Aktivierung der VOCC^{17, 30, 93}. Für den Hypoxie-induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ käme also folgende Signaltransduktionskaskade in Frage: Hypoxie führt direkt oder indirekt zu einem Na^+ -Einstrom durch TRPC6-Kanäle, der neben einer Membrandepolarisierung möglicherweise auch die K_V -Kanäle inhibiert, das die Membrandepolarisierung weiter verstärkt und schließlich die VOCC aktiviert. Dies führt dann zu einem Ca^{2+} -Einstrom und damit auch zum Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$.

4.4.5 Untersuchungen zur TRPC6-Kanalaktivierung

Im folgenden sollte untersucht werden, ob der TRPC6-Ionenkanal direkt oder indirekt durch Hypoxie aktiviert wird. Dazu wurden HEK 293-Zellen, die heterolog TRPC6-GFP exprimierten, nach einem sog. „Priming“ mit Carbachol (10 nM) einem hypoxischen Signal ausgesetzt. Da HEK 293-Zellen den muskarinischen Azetylcholin-Rezeptor exprimieren, wurde Carbachol zum „Primen“ verwendet, das wie ET-1 über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor wirkt⁸⁷. Allerdings reagierten die transfizierten HEK 293-Zellen nicht mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ auf Hypoxie, so dass eine direkte Aktivierung des TRPC6-Kanals ausgeschlossen werden kann. In einem nächsten Schritt wurde daher ein indirekter Aktivierungsmechanismus untersucht. In der Literatur wurde beschrieben, dass die Aktivierung der TRPC6-Kanäle durch einen PLC-Inhibitor gehemmt werden kann. Grundsätzlich führt in allen Eukaryoten eine Aktivierung von PLC-gekoppelten Membranrezeptoren zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Denn die PLC bewirkt die Hydrolyse von PIP_2 , wodurch IP_3 und DAG entsteht. DAG bewirkt die Aktivierung der PKC, während durch IP_3 zunächst eine Ca^{2+} -Freisetzung aus IP_3 -sensitiven intrazellulären Speichern verursacht wird, worauf ein Einstrom von Kationen aus dem Extrazellulärraum durch aktivierte TRP und andere noch unbekannte Kanäle folgt. Zur Zeit werden besonders zwei Mechanismen diskutiert, mit denen PLC-gekoppelte Rezeptoren den Ca^{2+} -Einstrom

durch die Plasmamembran aktivieren können: Speicher-aktivierter Ca^{2+} -Einstrom und Rezeptor-operierter Ca^{2+} -Einstrom. Untersuchungen des TRPC6-Kanals zeigten, dass dieser ein Rezeptor-aktivierter Kationenkanal mit einer minimalen Basalaktivität ist^{12, 14}. Die Beobachtung, dass der TRPC6-Kanal speicherunabhängig aktiviert wird, stimmt mit den eigenen Untersuchungen überein, da die PASMCM ohne extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen nicht mit einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf Hypoxie reagierten und somit der TRPC6-Kanal nicht durch Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern aktiviert wird.

Es ist bekannt, dass TRPC6-Kanäle durch DAG stimuliert werden konnten, allerdings unabhängig von einer PKC-Aktivierung, denn eine DAG-vermittelte PKC-Aktivierung kann zu einer TRPC6-Inhibition führen^{12, 14}. Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluß von DAG auf die Aktivierung des TRPC6-Kanals in PASMCM untersucht, indem der DAG-Abbau durch die Applikation des DAG-Kinase-Inhibitors R59949 verhindert wurde. Die PASMCM der WT-Mäuse zeigten dabei einen Ca^{2+} -Einstrom, allerdings nicht die PASMCM der TRPC6^{-/-}-Mäuse. Dies weist auf eine Schlüsselrolle von DAG für die Aktivierung des TRPC6-Kanals hin. Im Hinblick auf den Mechanismus der HPV könnte dies bedeuten, dass Hypoxie die TRPC6-Kanäle mittels DAG aktiviert. Dies führt zu einem Einstrom von Na^+ -Ionen und folglich auch zur Membrandepolarisation, die nach einer möglichen Inhibition der K_V -Kanäle weiter verstärkt werden kann und schließlich den Ca^{2+} -Einstrom durch VOCC aktiviert.

Auf Basis dieser Untersuchungen stellt sich nun die Frage, wie die DAG-Akkumulation durch Hypoxie reguliert ist. In der Literatur werden besonders Mitochondrien und NADPH-Oxidasen als O_2 -Sensor diskutiert, die die HPV über eine ROS-Bildung vermitteln sollen.

In Mitochondrien wird zur Energiegewinnung der größte Teil des im Körper vorhandenen Sauerstoffs verbraucht. Dabei werden Elektronen von NADH und FADH entlang eines Redoxgradienten der Elektronentransportkette (ETC), die aus vier Komplexen (I bis IV) besteht, auf molekularen Sauerstoff übertragen. Die bei der Oxidation freiwerdende Energie wird dann in Form von ATP gespeichert. Neben der Weitergabe der Elektronen entlang der ETC kann jedoch auch eine 1-Elektronenübertragung auf molekularen Sauerstoff auftreten, wodurch ein Superoxidradikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$) entsteht. Dieses kann durch Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) weiterreagieren, das durch die Mitochondrienmembran in das Zytosol diffundieren kann^{48, 119}. Alternativ wurde gezeigt, dass $\text{O}_2^{\cdot-}$ auch durch einen Anionenkanal in das Zytosol gelangen kann^{32, 107}. Die Bedeutung der Mitochondrien als Sauerstoffsensoren zeigte sich bei Untersuchungen an

isolierten Lungen und Pulmonalarterien, in denen Inhibitoren der mitochondrialen ETC die HPV hemmten^{57, 107, 113}. Darüber hinaus zeigten PASMC ohne eine funktionierende ETC keine Hypoxie-spezifische Antwort mehr⁸⁴. Für die Rolle der Mitochondrien bei der HPV gibt es zwei verschiedene Theorien. Die eine postuliert einen Abfall in der Produktion mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), der den zellulären Redoxzustand zu einem mehr reduzierten Zustand hin verschiebt und dadurch eine Inhibition der K_V-Kanäle bewirkt^{58, 63}. Die andere Theorie beinhaltet einen ROS-Anstieg, der zu einer intrazellulären Ca²⁺-Freisetzung führt^{107, 109}.

Neben den Mitochondrien werden als weitere Sensoren die NADPH-Oxidasen diskutiert. NADPH-Oxidasen sind O₂⁻-produzierende Enzyme. Die klassische, in den Leukozyten vorkommende Form besteht aus zwei membranständigen (gp91phox und p22) und drei zytosolischen (p47phox, p67phox, p40phox) Untereinheiten. Die Phosphorylierung der p47phox-Untereinheit und die Aktivierung der Rac GTPase induzieren gemeinsam die Zusammenlagerung der zytosolischen Untereinheiten an die membranständigen, wodurch die NADPH-Oxidase aktiviert wird⁶. In den letzten Jahren wurden Isoformen der NADPH-Oxidase identifiziert, die eine geringere Menge an O₂⁻ produzieren als der phagozytäre Typ. Diese Isoformen sollen O₂⁻ nach intrazellulär und nicht in den Extrazellulärraum freisetzen^{26, 42}. Untersuchungen zur Rolle von NADPH-Oxidasen für die HPV-Regulation zeigten, dass der Flavoprotein-Inhibitor, und somit auch NADPH-Oxidase-Inhibitor, Diphenyleiodonium (DPI) die HPV in isoliert perfundierten Rattenlungen hemmte^{27, 126}. Darüberhinaus inhibierte in anderen Untersuchungen ein weiterer NADPH-Oxidase-Inhibitor, 4-(2-Aminoethyl)benzenesulphonyl fluorid (AEBSF), die Hypoxieantwort¹¹⁶. Dies wies auf die NADPH-Oxidase als möglichen Sauerstoffsensor bei der HPV hin. Allerdings ist der zugrundeliegende Mechanismus ungeklärt. Denn einerseits wurde gezeigt, dass die NADPH-Oxidase als Hypoxieantwort einen O₂⁻-Anstieg bewirkte^{52, 116}, andererseits wurde ein NADPH-Oxidoreduktase-vermittelter Abfall von O₂⁻ und H₂O₂ unter Normoxie vorgeschlagen, der die lösliche Guanylatzyklase stimuliert, die cGMP produziert und dadurch vasodilatierend wirkt. Hypoxie führt dann zu einem „Verlust der normoxischen Vasodilatation“¹²⁰.

Interessanterweise zeigten Weissmann et al.¹¹⁷ in neueren Untersuchungen eine besondere Rolle der nicht-phagozytären NADPH-Oxidase für die akute Phase der HPV, da nur diese Phase in p47phox-defizienten Mäusen abgeschwächt war, während ein starker Effekt des Mitochondrien-abhängigen Signalwegs auf die protrahierte Phase der HPV zu beobachten

war. Dies weist auf eine unterschiedliche Regulation der akuten Phase und der protrahierte Phase der HPV hin.

Da die Mitochondrien oder die NADPH-Oxidasen über einen ROS-Anstieg die HPV auslösen könnten und bekannt ist, dass ROS Kanäle der TRP-Familie aktivieren können^{28, 105}, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Bedeutung von ROS für die Regulation der TRPC6-Kanäle untersucht. Dafür wurde t-BHP (tertiäres Wasserstoffperoxid) verwendet, das ein stabiles H₂O₂-Analogon ist. Dabei ist aber zu beachten, dass t-BHP nicht direkt die TRPC6-Kanäle aktivieren kann (A. Dietrich, persönliche Mitteilung). T-BHP induzierte einen Anstieg der [Ca²⁺]_i in WT, aber nicht in TRPC6^{-/-} PASM. Dies stützt die Hypothese, dass die HPV über einen Anstieg der intrazellulären O₂⁻- und H₂O₂-Konzentration ausgelöst wird. Da die Inhibition der DAG-Kinase ebenfalls TRPC6-vermittelt zu einem Anstieg der [Ca²⁺]_i führte, könnte ROS durch eine zelluläre DAG-Akkumulation eine Hypoxie-induzierte Ca²⁺-Freisetzung auslösen. Eine Heraufregulation von DAG über eine vermehrte ROS-Bildung ist hypothetisch über eine Inhibition der DAG-Kinase möglich.

Allerdings muß auch noch erwähnt werden, dass neben ROS und DAG in der Literatur auch eine Sensitivität des TRPC6-Kanals gegenüber dem Arachidonsäuremetabolit 20-Hydroxyeicosatetraenoicssäure beschrieben wurde. Außerdem konnte auch ein stimulierender Einfluss auf die Kanalaktivität von TRPC6 durch Ca²⁺/Calmodulin bewirkt werden^{12, 14}. Beide Systeme sollten in weiterführenden Untersuchungen zur Hypoxie-induzierten Ca²⁺-Erhöhung mit einbezogen werden.

4.4.6 Messung der [Ca²⁺]_i aortaler SMC unter Hypoxie

Die PASM der Maus reagierten nach einem ET-1-„Priming“ mit einem Anstieg der [Ca²⁺]_i auf Hypoxie. Damit stellte sich die Frage, ob diese Hypoxieantwort für die SMC der pulmonalen Strombahn spezifisch ist oder ob in dieser Weise auch SMC der systemischen Gefäßen reagieren. Die Untersuchung aortaler SMC der Maus zeigten dabei keinen Anstieg der [Ca²⁺]_i, was mit Untersuchungen von Wang et al. übereinstimmt¹⁰³. Somit scheint die Reaktion der SMC auf Hypoxie für PASM spezifisch zu sein.

4.4.7 Zusammenfassende Abschlußbetrachtung zum Mechanismus der HPV

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TRPC6 eine zentrale Rolle für die Signaltransduktion im Rahmen der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion spielt. Die Aktivierung dieses Kanals ist dabei Ca^{2+} -speicherunabhängig, da PASMC ohne extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen keinen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zeigten. Auch eine direkte Aktivierung des in HEK 293-Zellen heterolog exprimierten TRPC6-Kanals durch Hypoxie führte zu keinem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Demgegenüber bewirkte der DAG-Kinase-Inhibitor R59949 einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in PASMC von WT-Mäusen, aber nicht von TRPC6^{-/-}-Mäusen. Dies weist auf eine Rezeptor-operierte Aktivierung des TRPC6-Kanals hin. Auch tertiäres Wasserstoffperoxid (t-BHP) als „stabiler“ ROS-Vertreter induzierte einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in WT-PASMC, aber nicht in TRPC6^{-/-}-PASMC. Neben dem TRPC6-Kanal spielen auch die spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (VOCC) für den Hypoxie-induzierten Ca^{2+} -Anstieg eine wichtige Rolle, da der Hypoxie-induzierte Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch den VOCC-Inhibitor Nicardipin, komplett inhibiert werden konnte. Dies stützt gleichzeitig den aus der Literatur bekannten Befund, dass der Kationeneinstrom durch TRPC6-Kanäle im wesentlichen durch Na^+ -Ionen und nur zu ca. 4% durch Ca^{2+} -Ionen bestimmt wird¹⁷.

Da ROS als Mediator für den Signaltransduktionsweg der HPV diskutiert werden, kann folgende Signaltransduktionskaskade zur Regulation des Hypoxie-induzierten Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ postuliert werden: Hypoxie bewirkt einen Anstieg der intrazellulären O_2^- -Konzentration, welches nach Inhibition der DAG-Kinase und der dadurch verursachten DAG-Akkumulation zur Aktivierung des TRPC6-Kanals führt. Der Nachweis und die genaue Bedeutung der DAG-Akkumulation für die TRPC6-Aktivierung im Zuge der Hypoxieantwort müsste in weiterführenden Untersuchungen weiter aufgeschlüsselt werden. Der aktivierte TRPC6-Kanal bewirkt einen Kationeneinstrom, der im wesentlichen durch einen Einstrom von Na^+ -Ionen bestimmt ist. Dieser Na^+ -Einstrom könnte neben einer Depolarisierung auch die Inhibition von K_v -Kanälen verursachen²², die zu einer Verstärkung der Depolarisierung führt, wodurch es schließlich zum Einstrom von Ca^{2+} -Ionen durch VOCC kommt. Eine schematische Darstellung der Hypothese zur HPV zeigt Abb. 39. Da der TRPC6-Kanal für den durch akute Hypoxie ausgelösten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg eine entscheidende Rolle spielt, könnte der Kanal eine mögliche pharmakologische Zielstruktur zur Beeinflussung des Gasaustausches darstellen.

Der TRPC6-Kanal scheint aber nicht nur bei der akuten, sondern auch bei der chronischen Hypoxie eine wichtige Rolle zu spielen, da die TRPC6-Expression unter chronischer

Hypoxie hochreguliert wird⁴⁵. Welche Rolle der TRPC6-Kanal in diesem Zusammenhang genau spielt, sollte in weiterführenden Untersuchungen aufgeschlüsselt werden.

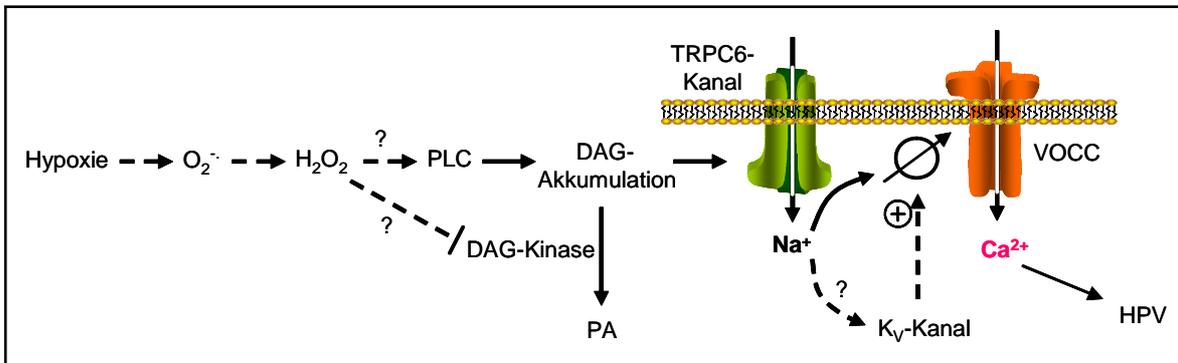


Abb.39 Schematische Darstellung der Hypothese zur Regulation der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) auf der Ebene der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen. $O_2^{\cdot-}$ = Superoxidradikale, H_2O_2 = Wasserstoff-peroxid, PLC = Phospholipase C, DAG = Diacylglycerin, PA = Phosphatidsäure, TRPC = klassischer „transient receptor potential“, K_V -Kanal = spannungsabhängiger Kaliumkanal, VOCC = spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanal

5 Literaturverzeichnis

- (1) Aaronson PI, Robertson TP, Ward JP. Endothelium-derived mediators and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Respir Physiol Neurobiol* 2002 August 22;132(1):107-20.
- (2) Affinity BioReagents.
<http://www.bioreagents.com/index.cfm/fuseaction/products.detail/CatNbr/OMA1-06001>.
- (3) Archer S, Michelakis E. The mechanism(s) of hypoxic pulmonary vasoconstriction: potassium channels, redox O₂ sensors, and controversies. *News Physiol Sci* 2002 August;17:131-7.
- (4) Archer SL, Souil E, nh-Xuan AT, Schremmer B, Mercier JC, El YA, Nguyen-Huu L, Reeve HL, Hampl V. Molecular identification of the role of voltage-gated K⁺ channels, Kv1.5 and Kv2.1, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. *J Clin Invest* 1998 June 1;101(11):2319-30.
- (5) Archer SL, Weir EK, Reeve HL, Michelakis E. Molecular identification of O₂ sensors and O₂-sensitive potassium channels in the pulmonary circulation. *Adv Exp Med Biol* 2000;475:219-40.
- (6) Bokoch GM, Knaus UG. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci* 2003 September;28(9):502-8.
- (7) Burke-Wolin T, Wolin MS. H₂O₂ and cGMP may function as an O₂ sensor in the pulmonary artery. *J Appl Physiol* 1989 January;66(1):167-70.
- (8) Chen YJ, Lin-Shiau SY. The role of endoplasmic reticular Ca²⁺ stores in cell viability and tumor necrosis factor- α production of the murine macrophage RAW 264.7 cell line. *J Biomed Sci* 2000 March;7(2):122-7.
- (9) Civelek M, Ainslie K, Garanich JS, Tarbell JM. Smooth muscle cells contract in response to fluid flow via a Ca²⁺-independent signaling mechanism. *J Appl Physiol* 2002 December;93(6):1907-17.
- (10) Cornfield DN, Stevens T, McMurtry IF, Abman SH, Rodman DM. Acute hypoxia increases cytosolic calcium in fetal pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993 July;265(1 Pt 1):L53-L56.
- (11) Dawson CA, Grimm DJ, Linehan JH. Influence of hypoxia on the longitudinal distribution of pulmonary vascular resistance. *J Appl Physiol* 1978 April;44(4):493-8.
- (12) Dietrich A, Kalwa H, Rost BR, Gudermann T. The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance. *Pflugers Arch* 2005 October;451(1):72-80.

- (13) Dietrich A, Mederos YS, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovskaja G, Obst M, Yildirim E, Salanova B, Kalwa H, Essin K, Pinkenburg O, Luft FC, Gudermann T, Birnbaumer L. Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol Cell Biol* 2005 August;25(16):6980-9.
- (14) Dietrich A, Schnitzler M, Kalwa H, Storch U, Gudermann T. Functional characterization and physiological relevance of the TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2005 April;371(4):257-65.
- (15) Dipp M, Nye PC, Evans AM. Hypoxic release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of pulmonary artery smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001 August;281(2):L318-L325.
- (16) Dumas JP, Bardou M, Goirand F, Dumas M. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Gen Pharmacol* 1999 October;33(4):289-97.
- (17) Estacion M, Sinkins WG, Jones SW, Applegate MA, Schilling WP. TRPC6 Forms Non-selective Cation Channels with Limited Ca²⁺ Permeability. *J Physiol* 2006 January 26.
- (18) Euler U, Liljestrand G. Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand* 1946;12:301-20.
- (19) Evans AM, Mustard KJ, Wyatt CN, Peers C, Dipp M, Kumar P, Kinnear NP, Hardie DG. Does AMP-activated protein kinase couple inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation by hypoxia to calcium signaling in O₂-sensing cells? *J Biol Chem* 2005 December 16;280(50):41504-11.
- (20) Faller A. *Der Körper des Menschen*. 12. Auflage ed. Thieme-Verlag: Stuttgart, New York; 1995.
- (21) Fishman AP. Hypoxia on the pulmonary circulation. How and where it acts. *Circ Res* 1976 April;38(4):221-31.
- (22) French RJ, Wells JB. Sodium ions as blocking agents and charge carriers in the potassium channel of the squid giant axon. *J Gen Physiol* 1977 December;70(6):707-24.
- (23) Gardner JP, Tokudome G, Tomonari H, Maher E, Hollander D, Aviv A. Endothelin-induced calcium responses in human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1992 January;262(1 Pt 1):C148-C155.
- (24) Ghofrani HA, Reichenberger F, Kohstall MG, Mrosek EH, Seeger T, Olschewski H, Seeger W, Grimminger F. Sildenafil increased exercise capacity during hypoxia at low altitudes and at Mount Everest base camp: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial. *Ann Intern Med* 2004 August 3;141(3):169-77.
- (25) Golenhofen K. *Physiologie*. 1. Auflage ed. Urban & Schwarzenberg: München, Wien, Baltimore; 1997.
- (26) Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000 March 17;86(5):494-501.

- (27) Grimminger F, Weissmann N, Spriestersbach R, Becker E, Rosseau S, Seeger W. Effects of NADPH oxidase inhibitors on hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Am J Physiol* 1995 May;268(5 Pt 1):L747-L752.
- (28) Groschner K, Rosker C, Lukas M. Role of TRP channels in oxidative stress. *Novartis Found Symp* 2004;258:222-30.
- (29) Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985 March 25;260(6):3440-50.
- (30) Gudermann T, Schnitzler M, Dietrich A. Receptor-operated cation entry--more than esoteric terminology? *Sci STKE* 2004 July 27;2004(243):e35.
- (31) Hambraeus-Jonzon K, Bindslev L, Mellgard AJ, Hedenstierna G. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in human lungs. A stimulus-response study. *Anesthesiology* 1997 February;86(2):308-15.
- (32) Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem* 2003 February 21;278(8):5557-63.
- (33) Hillier SC, Graham JA, Hanger CC, Godbey PS, Glenn RW, Wagner WW, Jr. Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules. *J Appl Physiol* 1997 April;82(4):1084-90.
- (34) Holden WE, McCall E. Hypoxia-induced contractions of porcine pulmonary artery strips depend on intact endothelium. *Exp Lung Res* 1984;7(2):101-12.
- (35) Inoue R, Okada T, Onoue H, Hara Y, Shimizu S, Naitoh S, Ito Y, Mori Y. The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha(1)-adrenoceptor-activated Ca(2+)-permeable cation channel. *Circ Res* 2001 February 16;88(3):325-32.
- (36) Jabr RI, Toland H, Gelband CH, Wang XX, Hume JR. Prominent role of intracellular Ca²⁺ release in hypoxic vasoconstriction of canine pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 1997 September;122(1):21-30.
- (37) Jeffery TK, Wanstall JC. Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther* 2001 October;92(1):1-20.
- (38) Kato M, Staub NC. Response of small pulmonary arteries to unilobar hypoxia and hypercapnia. *Circ Res* 1966 August;19(2):426-40.
- (39) Ko EA, Park WS, Ko JH, Han J, Kim N, Earm YE. Endothelin-1 increases intracellular Ca(2+) in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells through phospholipase C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005 October;289(4):H1551-H1559.
- (40) Kourembanas S, Marsden PA, McQuillan LP, Faller DV. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest* 1991 September;88(3):1054-7.

- (41) Kovitz KL, Aleskowitch TD, Sylvester JT, Flavahan NA. Endothelium-derived contracting and relaxing factors contribute to hypoxic responses of pulmonary arteries. *Am J Physiol* 1993 October;265(4 Pt 2):H1139-H1148.
- (42) Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003 August;285(2):R277-R297.
- (43) Leach RM, Robertson TP, Twort CH, Ward JP. Hypoxic vasoconstriction in rat pulmonary and mesenteric arteries. *Am J Physiol* 1994 March;266(3 Pt 1):L223-L231.
- (44) Lee KM, Tsai KY, Wang N, Ingber DE. Extracellular matrix and pulmonary hypertension: control of vascular smooth muscle cell contractility. *Am J Physiol* 1998 January;274(1 Pt 2):H76-H82.
- (45) Lin MJ, Leung GP, Zhang WM, Yang XR, Yip KP, Tse CM, Sham JS. Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca²⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. *Circ Res* 2004 September 3;95(5):496-505.
- (46) Liu JQ, Sham JS, Shimoda LA, Kuppusamy P, Sylvester JT. Hypoxic constriction and reactive oxygen species in porcine distal pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003 August;285(2):L322-L333.
- (47) Liu Q, Sham JS, Shimoda LA, Sylvester JT. Hypoxic constriction of porcine distal pulmonary arteries: endothelium and endothelin dependence. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001 May;280(5):L856-L865.
- (48) Löffler G. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. 5.Auflage ed. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg; 2003.
- (49) Madden JA. Focus on "Hypoxic constriction of porcine distal pulmonary arteries: endothelium and endothelin dependence". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001 May;280(5):L853-L855.
- (50) Madden JA, Keller PA, Kleinman JG. Changes in smooth muscle cell pH during hypoxic pulmonary vasoconstriction: a possible role for ion transporters. *Physiol Res* 2000;49(5):561-6.
- (51) Madden JA, Vadula MS, Kurup VP. Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1992 September;263(3 Pt 1):L384-L393.
- (52) Marshall C, Mamary AJ, Verhoeven AJ, Marshall BE. Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996 November;15(5):633-44.
- (53) McCulloch KM, Docherty C, MacLean MR. Endothelin receptors mediating contraction of rat and human pulmonary resistance arteries: effect of chronic hypoxia in the rat. *Br J Pharmacol* 1998 April;123(8):1621-30.

- (54) McCulloch KM, Docherty C, MacLean MR. Endothelin receptors mediating contraction of rat and human pulmonary resistance arteries: effect of chronic hypoxia in the rat. *Br J Pharmacol* 1998 April;123(8):1621-30.
- (55) McDaniel SS, Platoshyn O, Wang J, Yu Y, Sweeney M, Krick S, Rubin LJ, Yuan JX. Capacitative Ca(2+) entry in agonist-induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001 May;280(5):L870-L880.
- (56) McMurtry IF, Davidson AB, Reeves JT, Grover RF. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by calcium antagonists in isolated rat lungs. *Circ Res* 1976 February;38(2):99-104.
- (57) Michelakis ED, Hampl V, Nsair A, Wu X, Harry G, Haromy A, Gurtu R, Archer SL. Diversity in mitochondrial function explains differences in vascular oxygen sensing. *Circ Res* 2002 June 28;90(12):1307-15.
- (58) Michelakis ED, Rebeyka I, Wu X, Nsair A, Thebaud B, Hashimoto K, Dyck JR, Haromy A, Harry G, Barr A, Archer SL. O₂ sensing in the human ductus arteriosus: regulation of voltage-gated K⁺ channels in smooth muscle cells by a mitochondrial redox sensor. *Circ Res* 2002 September 20;91(6):478-86.
- (59) Molecular Probes. <http://probes.invitrogen.com/handbook/print/1902.html>. 2005.
- (60) Molecular Probes. <http://probes.invitrogen.com/handbook/figures/0554.html>. 2005.
- (61) Molecular Probes. <http://probes.invitrogen.com/servlets/structure?item=1201>. 2005.
- (62) Morio Y, McMurtry IF. Ca(2+) release from ryanodine-sensitive store contributes to mechanism of hypoxic vasoconstriction in rat lungs. *J Appl Physiol* 2002 February;92(2):527-34.
- (63) Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* 2005 January;98(1):390-403.
- (64) Murray TR, Chen L, Marshall BE, Macarak EJ. Hypoxic contraction of cultured pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990 November;3(5):457-65.
- (65) Murray TR, Marshall BE, Macarak EJ. Contraction of vascular smooth muscle in cell culture. *J Cell Physiol* 1990 April;143(1):26-38.
- (66) Ng LC, Wilson SM, Hume JR. Mobilization of sarcoplasmic reticulum stores by hypoxia leads to consequent activation of capacitative Ca²⁺ entry in isolated canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Physiol* 2005 March 1;563(Pt 2):409-19.
- (67) Nilius B. From TRPs to SOCs, CCEs, and CRACs: consensus and controversies. *Cell Calcium* 2003 May;33(5-6):293-8.
- (68) Ogata M, Ohe M, Katayose D, Takishima T. Modulatory role of EDRF in hypoxic contraction of isolated porcine pulmonary arteries. *Am J Physiol* 1992 March;262(3 Pt 2):H691-H697.

- (69) Olschewski A, Hong Z, Nelson DP, Weir EK. Graded response of K⁺ current, membrane potential, and [Ca²⁺]_i to hypoxia in pulmonary arterial smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002 November;283(5):L1143-L1150.
- (70) Oparil S, Chen SJ, Meng QC, Elton TS, Yano M, Chen YF. Endothelin-A receptor antagonist prevents acute hypoxia-induced pulmonary hypertension in the rat. *Am J Physiol* 1995 January;268(1 Pt 1):L95-100.
- (71) Orchard CH, Sanchez de LR, Sykes MK. The relationship between hypoxic pulmonary vasoconstriction and arterial oxygen tension in the intact dog. *J Physiol* 1983 May;338:61-74.
- (72) Osipenko ON, Evans AM, Gurney AM. Regulation of the resting potential of rabbit pulmonary artery myocytes by a low threshold, O₂-sensing potassium current. *Br J Pharmacol* 1997 April;120(8):1461-70.
- (73) Peake MD, Harabin AL, Brennan NJ, Sylvester JT. Steady-state vascular responses to graded hypoxia in isolated lungs of five species. *J Appl Physiol* 1981 November;51(5):1214-9.
- (74) Peng W, Michael JR, Hoidal JR, Karwande SV, Farrukh IS. ET-1 modulates KCa-channel activity and arterial tension in normoxic and hypoxic human pulmonary vasculature. *Am J Physiol* 1998 October;275(4 Pt 1):L729-L739.
- (75) Platoshyn O, Golovina VA, Bailey CL, Limsuwan A, Krick S, Juhaszova M, Seiden JE, Rubin LJ, Yuan JX. Sustained membrane depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000 November;279(5):C1540-C1549.
- (76) Polte TR, Eichler GS, Wang N, Ingber DE. Extracellular matrix controls myosin light chain phosphorylation and cell contractility through modulation of cell shape and cytoskeletal prestress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004 March;286(3):C518-C528.
- (77) Post JM, Gelband CH, Hume JR. [Ca²⁺]_i inhibition of K⁺ channels in canine pulmonary artery. Novel mechanism for hypoxia-induced membrane depolarization. *Circ Res* 1995 July;77(1):131-9.
- (78) Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 2006;68:619-47.
- (79) Robertson TP, Aaronson PI, Ward JP. Hypoxic vasoconstriction and intracellular Ca²⁺ in pulmonary arteries: evidence for PKC-independent Ca²⁺ sensitization. *Am J Physiol* 1995 January;268(1 Pt 2):H301-H307.
- (80) Robertson TP, Aaronson PI, Ward JP. Ca²⁺ sensitization during sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction is endothelium dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003 June;284(6):L1121-L1126.
- (81) Robertson TP, Hague D, Aaronson PI, Ward JP. Voltage-independent calcium entry in hypoxic pulmonary vasoconstriction of intrapulmonary arteries of the rat. *J Physiol* 2000 June 15;525 Pt 3:669-80.

- (82) Rodman DM, Yamaguchi T, O'Brien RF, McMurtry IF. Hypoxic contraction of isolated rat pulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 1989 March;248(3):952-9.
- (83) Rohrer DK, Kobilka BK. G protein-coupled receptors: functional and mechanistic insights through altered gene expression. *Physiol Rev* 1998 January;78(1):35-52.
- (84) Salvaterra CG, Goldman WF. Acute hypoxia increases cytosolic calcium in cultured pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol* 1993 March;264(3 Pt 1):L323-L328.
- (85) Sato K, Oka M, Hasunuma K, Ohnishi M, Sato K, Kira S. Effects of separate and combined ETA and ETB blockade on ET-1-induced constriction in perfused rat lungs. *Am J Physiol* 1995 November;269(5 Pt 1):L668-L672.
- (86) Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005 October;115(10):2811-21.
- (87) Schmidt M, Frings M, Mono ML, Guo Y, Weernink PA, Evellin S, Han L, Jakobs KH. G protein-coupled receptor-induced sensitization of phospholipase C stimulation by receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 2000 October 20;275(42):32603-10.
- (88) Sham JS, Crenshaw BR, Jr., Deng LH, Shimoda LA, Sylvester JT. Effects of hypoxia in porcine pulmonary arterial myocytes: roles of K(V) channel and endothelin-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000 August;279(2):L262-L272.
- (89) Shimoda LA, Sham JS, Liu Q, Sylvester JT. Acute and chronic hypoxic pulmonary vasoconstriction: a central role for endothelin-1? *Respir Physiol Neurobiol* 2002 August 22;132(1):93-106.
- (90) Shimoda LA, Sylvester JT, Sham JS. Mobilization of intracellular Ca(2+) by endothelin-1 in rat intrapulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000 January;278(1):L157-L164.
- (91) Shimoda LA, Sylvester JT, Sham JS. Inhibition of voltage-gated K+ current in rat intrapulmonary arterial myocytes by endothelin-1. *Am J Physiol* 1998 May;274(5 Pt 1):L842-L853.
- (92) Sjolund M, Madsen K, von der MK, Thyberg J. Phenotype modulation in primary cultures of smooth-muscle cells from rat aorta. Synthesis of collagen and elastin. *Differentiation* 1986;32(2):173-80.
- (93) Soboloff J, Spassova M, Xu W, He LP, Cuesta N, Gill DL. Role of endogenous TRPC6 channels in Ca2+ signal generation in A7r5 smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005 December 2;280(48):39786-94.
- (94) Stelzner TJ, O'Brien RF, Yanagisawa M, Sakurai T, Sato K, Webb S, Zamora M, McMurtry IF, Fisher JH. Increased lung endothelin-1 production in rats with idiopathic pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1992 May;262(5 Pt 1):L614-L620.

- (95) Stevens T. Is there a role for store-operated calcium entry in vasoconstriction? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001 May;280(5):L866-L869.
- (96) Strubing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J Biol Chem* 2003 October 3;278(40):39014-9.
- (97) Sylvester JT. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a radical view. *Circ Res* 2001 June 22;88(12):1228-30.
- (98) Thyberg J, Blomgren K, Roy J, Tran PK, Hedin U. Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin. *J Histochem Cytochem* 1997 June;45(6):837-46.
- (99) Turner JL, Kozlowski RZ. Relationship between membrane potential, delayed rectifier K⁺ currents and hypoxia in rat pulmonary arterial myocytes. *Exp Physiol* 1997 July;82(4):629-45.
- (100) Vadula MS, Kleinman JG, Madden JA. Effect of hypoxia and norepinephrine on cytoplasmic free Ca²⁺ in pulmonary and cerebral arterial myocytes. *Am J Physiol* 1993 December;265(6 Pt 1):L591-L597.
- (101) Voelkel NF. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am Rev Respir Dis* 1986 June;133(6):1186-95.
- (102) Voelkel NF, Allard JD, Anderson SM, Burke TJ. cGMP and cAMP cause pulmonary vasoconstriction in the presence of hemolysate. *J Appl Physiol* 1999 May;86(5):1715-20.
- (103) Wang J, Shimoda LA, Weigand L, Wang W, Sun D, Sylvester JT. Acute hypoxia increases intracellular [Ca²⁺] in pulmonary arterial smooth muscle by enhancing capacitative Ca²⁺ entry. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005 June;288(6):L1059-L1069.
- (104) Ward JP, Aaronson PI. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction: can anyone be right? *Respir Physiol* 1999 May 3;115(3):261-71.
- (105) Ward JP, Robertson TP, Aaronson PI. Capacitative calcium entry: a central role in hypoxic pulmonary vasoconstriction? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005 July;289(1):L2-L4.
- (106) Ward JP, Snetkov VA, Aaronson PI. Calcium, mitochondria and oxygen sensing in the pulmonary circulation. *Cell Calcium* 2004 September;36(3-4):209-20.
- (107) Waypa GB, Chandel NS, Schumacker PT. Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res* 2001 June 22;88(12):1259-66.
- (108) Waypa GB, Marks JD, Mack MM, Boriboun C, Mungai PT, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes. *Circ Res* 2002 October 18;91(8):719-26.

- (109) Waypa GB, Schumacker PT. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. *J Appl Physiol* 2005 January;98(1):404-14.
- (110) Weigand L, Foxson J, Wang J, Shimoda LA, Sylvester JT. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by antagonists of store-operated Ca²⁺ and nonselective cation channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005 July;289(1):L5-L13.
- (111) Weir EK, Archer SL. The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *FASEB J* 1995 February;9(2):183-9.
- (112) Weir EK, Lopez-Barneo J, Buckler KJ, Archer SL. Acute oxygen-sensing mechanisms. *N Engl J Med* 2005 November 10;353(19):2042-55.
- (113) Weissmann N, Ebert N, Ahrens M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Hanze J, Fink L, Rose F, Conzen J, Seeger W, Grimminger F. Effects of mitochondrial inhibitors and uncouplers on hypoxic vasoconstriction in rabbit lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003 December;29(6):721-32.
- (114) Weissmann N, Grimminger F, Olschewski A, Seeger W. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001 August;281(2):L314-L317.
- (115) Weissmann N, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W. Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Respir Physiol* 1995 May;100(2):159-69.
- (116) Weissmann N, Tadic A, Hanze J, Rose F, Winterhalder S, Nollen M, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Hypoxic vasoconstriction in intact lungs: a role for NADPH oxidase-derived H₂O₂? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000 October;279(4):L683-L690.
- (117) Weissmann N, Zeller S, Schafer RU, Turowski C, Ay M, Quanz K, Ghofrani HA, Schermuly RT, Fink L, Seeger W, Grimminger F. Impact of mitochondria and NADPH oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006 April;34(4):505-13.
- (118) Wilson HL, Dipp M, Thomas JM, Lad C, Galione A, Evans AM. Adp-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase act as a redox sensor. a primary role for cyclic ADP-ribose in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Biol Chem* 2001 April 6;276(14):11180-8.
- (119) Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 June;20(6):1430-42.
- (120) Wolin MS, Burke-Wolin TM, Mohazzab H. Roles for NAD(P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms. *Respir Physiol* 1999 April 1;115(2):229-38.
- (121) Worth NF, Rolfe BE, Song J, Campbell GR. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 2001 July;49(3):130-45.
- (122) Yu Y, Fantozzi I, Remillard CV, Landsberg JW, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno DD, Thistlethwaite PA, Rubin LJ, Yuan JX. Enhanced expression of transient

- receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 September 21;101(38):13861-6.
- (123) Yuan XJ, Goldman WF, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *Am J Physiol* 1993 February;264(2 Pt 1):L116-L123.
- (124) Yuan XJ, Goldman WF, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Ionic currents in rat pulmonary and mesenteric arterial myocytes in primary culture and subculture. *Am J Physiol* 1993 February;264(2 Pt 1):L107-L115.
- (125) Yuan XJ, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Contrasting effects of hypoxia on tension in rat pulmonary and mesenteric arteries. *Am J Physiol* 1990 August;259(2 Pt 2):H281-H289.
- (126) Zhang F, Carson RC, Zhang H, Gibson G, Thomas HM, III. Pulmonary artery smooth muscle cell $[Ca^{2+}]_i$ and contraction: responses to diphenylethylideneiodonium and hypoxia. *Am J Physiol* 1997 September;273(3 Pt 1):L603-L611.
- (127) Zhang WM, Yip KP, Lin MJ, Shimoda LA, Li WH, Sham JS. ET-1 activates Ca^{2+} sparks in PASMC: local Ca^{2+} signaling between inositol trisphosphate and ryanodine receptors. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003 September;285(3):L680-L690.

6 Zusammenfassung

Die Hypoxische Pulmonale Vasokonstriktion (HPV) ist eine physiologische Antwort der Lunge auf alveoläre Hypoxie, bei der die Perfusion des Blutes zur Optimierung des Gasaustausches an die Ventilation angepasst wird. Dieser erstmals 1946 durch von Euler und Liljestrand postulierte Regulationsmechanismus ist hinsichtlich Sauerstoffsensor- und Signaltransduktionsweg noch nicht umfassend geklärt. Untersuchungen an isolierten pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) zeigen einen Hypoxie-induzierten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) und eine darauf folgende Kontraktion. Dies weist auf eine Funktion der PASMC sowohl als Sensor- als auch als Effektorzelle für die HPV hin. Darüberhinaus wird aber auch eine Rolle des Endothels durch Freisetzung von vasokonstriktiv wirkenden Substanzen wie Endothelin-1 (ET-1) im Zusammenhang mit der HPV diskutiert. Dabei scheint die akute Phase der HPV (Dauer: Sekunden bis Minuten) endothelunabhängig und die protrahierte Phase der HPV (Dauer: Stunden) endothelabhängig zu sein.

Zur Untersuchung der HPV auf der Ebene der PASMC wurde in der vorliegenden Arbeit eine geeignete Zellisolierungs- und Meßmethodik für PASMC der Ratte etabliert. Die Zellen wurden dabei insbesondere aus dem präkapillären Bereich der intrapulmonalarteriellen Gefäße gewonnen. Bei der Charakterisierung der kultivierten Zellen mittels der Immunfluoreszenzmethodik zeigte sich für die Passagen P0, P1 und P3 eine positive Färbung für die für glatte Muskelzellen typischen Proteine α -Aktin und die schweren Ketten des Myosins. Endothelzellen konnten durch eine fehlende Färbung gegen den von Willebrand Faktor ausgeschlossen werden. Untersuchungen mittels des Western-Blots zeigten keinen Unterschied bezüglich der Menge des α -Aktins und der schweren Ketten des Myosins bei einem Vergleich zwischen P1 und P3, was auf einen Erhalt des kontraktile Zustands im Zuge der Kultivierung der PASMC hinwies. Als geeignete Messmethodik für die Untersuchung der Hypoxieantwort stellte sich die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mittels Fura-2 heraus. Ein Vergleich der Reaktion der PASMC von P0, P1 und P3 auf ET-1 als positiven Stimulus ergab eine Abnahme des transienten Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit zunehmender Passage. Deshalb wurden alle darauffolgenden Experimente mit nicht-passagierten PASMC (= Passage 0) durchgeführt. Zur Schaffung der hypoxischen Bedingungen für die Untersuchung der Hypoxieantwort der PASMC wurde ein Perfusionssystem etabliert.

In einem zweiten Schritt erfolgte die Übertragung der Zellisolierung und der $[Ca^{2+}]_i$ -Messtechnik von Ratten auf Maus PASMIC, da dies auch die Untersuchung von PASMIC aus gendefizienten Mäusen ermöglichte. Da frühere Untersuchungen auf eine wichtige Rolle der Rezeptor-aktivierbaren, nicht-selektiven klassischen „transient receptor potential“ TRPC-Kanäle für die Regulation des Tonus glatter Muskelzellen hinweisen und TRPC6 eine essentielle Komponente der Rezeptor-operierten Ca^{2+} -durchlässigen nicht-selektiven Kationenkanäle in den glatten Muskelzellen ist, wurde die Bedeutung der TRPC6-Kanäle für die Hypoxieantwort untersucht. Dabei zeigte sich, dass PASMIC von Wildtyp (WT)-Mäusen, aber nicht von TRPC6^{-/-}-Mäusen unter Hypoxie mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ reagierten. Alle Messungen erfolgten nach Sensibilisierung der PASMIC mit ET-1. Dieser Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ wurde im Wesentlichen durch den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum durch spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (VOCC) bewirkt, da die Inhibition derselben mittels Nicardipin einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ verhinderte.

Im Gegensatz zu den VOCC sind TRPC6-Kanäle auch für andere Kationen als Ca^{2+} durchlässig. Untersuchungen mittels der Mn^{2+} -Quench-Methode zeigten für PASMIC der WT-Mäuse einen größeren Hypoxie-induzierten Mn^{2+} -Einstrom als für PASMIC der TRPC6^{-/-}-Mäuse, das auf einen Hypoxie-induzierten Kationen-Einstrom durch TRPC6-Kanäle hinweist. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass in Anwesenheit von extrazellulären Na^+ -Ionen der Kationeneinstrom durch TRPC6-Kanäle hauptsächlich durch Na^+ -Ionen und nur zu einem geringen Prozentsatz (ca. 4%) durch Ca^{2+} -Ionen verursacht wird. Dies führt zu der Hypothese, dass die durch den Na^+ -Ioneneinstrom verursachte Membrandepolarisierung möglicherweise unter Inhibition von spannungsabhängigen Kalium (K_v)-Kanälen einen Ca^{2+} -Einstrom durch VOCC bewirkt. Da sowohl die Anreicherung von Diacylglycerol (DAG) durch Inhibition der DAG-Kinase mittels des DAG-Kinase Inhibitors R59949 als auch t-BHP (tertiäres Butyl-Wasserstoffperoxid) einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nur in WT, aber nicht in TRPC6^{-/-}-PASMIC unter Hypoxie bewirkte, und im Rahmen der HPV besonders ROS (Reaktive Sauerstoffspezies) wie $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 als Mediatoren diskutiert werden, scheint die TRPC6-Aktivierung unter Hypoxie durch eine ROS-vermittelte DAG-Akkumulation verursacht zu werden. Um dies genauer aufzuschlüsseln zu können, wäre einerseits die Messung der zellulären DAG-Konzentration und andererseits die Ermittlung der genauen Rolle von ROS unter Hypoxie ein wichtiges Ziel für weitere Untersuchungen.

Conclusion

Hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) is a physiological response of the lung to alveolar hypoxia that matches blood perfusion with ventilation to optimize pulmonary gas exchange. Although this mechanism was first described by von Euler and Liljestrand in 1946, the underlying oxygen sensing and signal transduction processes have not been fully elucidated. Investigations with isolated pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) have demonstrated that hypoxia induces an increase in the intracellular $[Ca^{2+}]_i$ of PASMC with subsequent cell contraction. This suggests that PASMC are the sensor as well as the effector cells of HPV. In addition, a role for the endothelium in HPV is discussed in the context of the release of vasoactive substances such as endothelin-1 (ET-1). However the acute phase of HPV (duration: seconds to minutes) seems to be endothelium-independent, while the sustained phase of HPV (duration: hours) is endothelium-dependent.

In the present study, a technique for investigation of HPV at the level of PASMC was developed. Cells were isolated from the precapillary region of the intrapulmonary arteries. The cultured cells from passages P0, P1 and P3 were characterized by immunofluorescence and exhibited positive staining for the typical smooth muscle proteins α -actin and myosin heavy chain. Endothelial cells were excluded by a negative staining for von Willebrand factor. Investigations by Western blot indicated no quantitative differences in α -actin and myosin heavy chain levels between P1 and P3, which pointed to a maintenance of the contractile state of the PASMC in culture. Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ using fura-2 proved to be a useful technique for the investigation of the response to hypoxia. A comparison of the response of PASMC from P0, P1 and P3 to ET-1 indicated a decrease in the transient elevations in $[Ca^{2+}]_i$ with the number of passages. Therefore, all experiments were performed with non-passaged PASMC (= passage 0). To ensure hypoxic conditions for the investigation of the PASMC response to hypoxia, a perfusion system was established.

In a second step, the cell isolation- and $[Ca^{2+}]_i$ -imaging-technique was transferred from rat to mouse cells, because PASMC from gene deficient mice could then be investigated. Since previous investigations suggested a possible role of receptor-operated non-selective classical "transient receptor potential" (TRP)-channels for the regulation of the tonus of smooth muscle cells, and TRPC6 as an essential component of receptor-operated non-selective cation-channels in smooth muscle cells, the importance of TRPC6-channels for

the response to hypoxia was investigated. Here PASMC from wild type (WT)-mice, but not from TRPC6^{-/-}-mice indicated an increase in $[Ca^{2+}]_i$ under hypoxic conditions. All measurements were performed after sensitization of the PASMC with ET-1. This increase in $[Ca^{2+}]_i$ was caused primarily by Ca^{2+} -entry from the extracellular space through voltage-dependent L-type Ca^{2+} -channels (VOCC), because the inhibition of VOCC by nicardipin prevented an increase in $[Ca^{2+}]_i$.

In contrast to VOCC, TRPC6-channels are also permeable for other cations other than Ca^{2+} . Investigation by Mn^{2+} -quenching indicated a larger hypoxia-induced Mn^{2+} influx for PASMC from WT-mice than for PASMC from TRPC6^{-/-}-mice, demonstrating a hypoxia-induced cation influx through TRPC6-channels. It is known from previous investigations, that in the presence of extracellular Na^+ -ions the cation inward-current through TRPC6-channels is mainly caused by Na^+ -ions and only for a small percentage (~ 4%) by Ca^{2+} . Thus it can be hypothesized that the membrane depolarization caused by Na^+ -influx results in a Ca^{2+} -entry through VOCC possibly involving the inhibition of voltage-dependent potassium (K_V)-channels. Since diacylglycerol (DAG) accumulation by DAG-kinase inhibition using the DAG-kinase inhibitor R59949 as well as tert-butylhydroperoxide (t-BHP) resulted in an increase of $[Ca^{2+}]_i$ in WT but not in TRPC6^{-/-} PASMC under hypoxia, and reactive oxygen species (ROS) like O_2^- and H_2O_2 are discussed as mediator of HPV, the activation of TRPC6 under hypoxia appears to be caused by a ROS-mediated DAG accumulation. In order to get more detailed information about this it would be necessary to measure the DAG-concentration and to investigate the concrete function of ROS under hypoxia.

Veröffentlichungen des Autors

Originalarbeiten:

Weissmann,N.; Kuzkaya,N.; Fuchs,B.; Tiyerili,V.; Schafer,R.U.; Schutte,H.; Ghofrani,H.A.; Schermuly,R.T.; Schudt,C.; Sydykov,A.; Egemnazarow,B.; Seeger,W.; Grimminger,F. Detection of reactive oxygen species in isolated, perfused lungs by electron spin resonance spectroscopy. *Respir Res* 2005 Jul 31;6(1):86.

Pullamsetti,S.; Krick,S.; Yilmaz,H.; Ghofrani,H.A.; Schudt,C.; Weissmann,N.; Fuchs,B.; Seeger,W.; Grimminger,F.; Schermuly,R.T. Inhaled tolafentrine reverses pulmonary vascular remodeling via inhibition of smooth muscle cell migration. *Respir Res* 2005 Nov 1;6:128.

eingereicht:

Weissmann,N.; Dietrich,A.; Fuchs,B.; Kalwa,H.; Ay,M.; Dumitrascu,R.; Olschewski,A.; Mederos y Schnitzler,M.; Ghofrani,H.A.; Schermuly,R.T.; Pinkenburg,O.; Seeger,W.; Grimminger,F.; Gudermann,T. Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange.

Abstracts:

N. Kuzkaya, B. Fuchs, H. Schütte, V. Tiyerili, C. Schäfer, H. A. Ghofrani, R. T. Schermuly, J. Hänze, F. Rose, L. Fink, W. Seeger, F. Grimminger, N. Weissmann. Spin trapping of reactive oxygen species by 1-hydroxy-3-carboxy-pyrrolidine (CP-H) in biological systems. 7th Symposium on spin trapping. 11th July 2002, Chapel Hill, USA; <http://epr.niehs.nih.gov/spintrapping2002/AbsPDF/KuzkN01AB.pdf>

N. Weißmann, N. Kuzkaya, B. Fuchs, V. Tiyerilli, H. Schütte, H.A. Ghofrani, R.T. Schermuly, A. Sydykov, W. Seeger, F. Grimminger. Detektion reaktiver Sauerstoffspezies in isoliert perfundierten Kaninchenlungen mittels Elektronenspinresonanzspektroskopie. *Med. Klinik* 99, 4: 96, 2004.

N. Weissmann, N. Kuzkaya, B. Fuchs, V. Tiyerili, H. Schütte, H. A. Ghofrani, R.T. Schermuly, A. Sydykov, W. Seeger, F. Grimminger. Detection of reactive oxygen species in isolated perfused rabbit lungs by electron spin resonance spectroscopy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169(7) A405, 2004.

N. Weissmann, N. Kuzkaya, B. Fuchs, V. Tiyerili, H. Schütte, H. A. Ghofrani, R.T. Schermuly, A. Sydykov, B. Egemnazarov, W. Seeger, F. Grimminger. Hypoxia-dependent release of reactive oxygen species (ROS) detected by electron spin resonance spectroscopy in isolated perfused rabbit lungs. *Eur. Respir. J.* 24, Suppl. 48: 329s, 2004.

N. Weissmann, N. Kuzkaya, B. Fuchs, V. Tiyerili, R. Schäfer, H. Schütte, H. A. Ghofrani, R. T. Schermuly, C. Schudt, A. Sydykov, B. Egemnazarow, W. Seeger and F. Grimminger. Detection of reactive oxygen species in isolated perfused lungs by electron spin resonance spectroscopy. *Respir. Res.* 6: 86, 2005.

S. Pullamsetti, S. Krick, H. Yilmaz, H. A. Ghofrani, C. Schudt, N. Weissmann, B. Fuchs, W. Seeger, F. Grimminger and R. T. Schermuly. Inhaled tolafentrine reverses pulmonary vascular remodeling via inhibition of smooth muscle cell migration. *Respir. Res.* 6:128, 2005.

H. Kalwa, B. Fuchs, N. Weissmann, A. Dietrich, T. Gudermann. Involvement of classical transient receptor potential channel 6 in the hypoxic vasoconstriction of pulmonary artery smooth muscle cells. 47th spring meeting der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz, 4.-6. April 2006

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Beate Fuchs
Geburtsdatum: 14. Februar 1978
Geburtsort: Dillenburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1984 – 1988 Grundsule Wissenbach
1988 – 1997 Wilhelm-von-Oranien-Schule, Gymnasium Dillenburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

09/1997 – 08/2001 Biomedizintechnik an der Fachhochschule Gießen-Friedberg
Abschluss: Diplom-Ingenieurin (FH)

Praktika

13 Wochen Grundpraktikum bei den Firmen
Rittal-Werk Rudolf Loh GmbH & Co. KG
Reich GmbH, Eschenburg
01.03. – 04.08.2000 Berufspraktisches Semester bei der Firma
Erich Jaeger GmbH, Höchberg

Beruf

09/2001 – 03/2003 Technische Angestellte (Dipl.-Ing.) im
Sonderforschungsbereich ‚Kardiopulmonales Gefäßsystem‘,
Medizinische Klinik II der Justus-Liebig-Universität Gießen
(Forschungsgruppe Prof. Dr. W. Seeger)
seit 04/2003 Doktorandin im Sonderforschungsbereich ‚Kardiopulmonales
Gefäßsystem‘,
Medizinische Klinik II der Justus-Liebig-Universität Gießen
(Forschungsgruppe Prof. Dr. W. Seeger)
04/2003 – 03/2006 Stipendiatin im Graduiertenkolleg 534
‚Biologische Grundlagen der vaskulären Medizin‘ des
Physiologischen Instituts der Justus-Liebig Universität Gießen

Sonstiges

Ausbilder-Eignungsvorbereitung für die gewerbliche Wirtschaft

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Seeger und Herrn PD Dr. N. Weißmann, Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität, für die Themenstellung der vorliegenden Arbeit, die Möglichkeit zur Durchführung der wissenschaftlichen Tätigkeit im Rahmen eines Projekts des Sonderforschungsbereiches „Kardiopulmonales Gefäßsystem“ sowie die hervorragende und engagierte Betreuung.

Herrn Prof. Dr. T. Gudermann und Herrn PD Dr. A. Dietrich, Institut „Medizinische Pharmakologie“ der Philipps-Universität Marburg, danke ich für die Ermöglichung der äußerst kooperativen Messungen zur Untersuchung der Hypoxieantwort der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) aus Mäusen. Auch danke ich beiden für die freundliche Aufnahme, die zahlreichen Hilfestellungen sowie die ergiebigen Diskussionen. Ganz besonders möchte ich Herrn H. Kalwa für die äußerst gute Zusammenarbeit bei der gemeinsamen Erarbeitung der Daten sowie Herrn Dr. O. Pinkenburg für die Bereitstellung der Viren zur Infizierung der PASMC danken.

Besonders möchte ich mich auch für die ausgezeichnete fachliche Unterstützung für die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und die tiefgehenden Diskussionen bei Frau Prof. Dr. A. Olschewski bedanken.

Herrn Prof. Dr. P. Schumacker und Herrn Dr. G. Waypa danke ich herzlich für die Möglichkeit zur Erlernung der Zellisolierungsmethodik und Messung der Kontraktion der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen in einer unkomplizierten und sehr angenehmen Weise während eines zweiwöchigen Aufenthaltes in der Universität Chicago.

Herrn Prof. Dr. W. Kummer, Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Gießen, möchte ich herzlich für die Bereitstellung der Messeinrichtung für die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration der PASMC aus Ratten danken.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. O. Eickelberg für die Möglichkeit der Nutzung seines Mikroskops zur Messung der Kontraktion der PASMC und dem hilfreichen Austausch über die damit ausgeführten Experimente.

Auch für die verschiedensten Hilfestellungen und Anregungen danke ich dem technischen Personal, besonders Frau C. Homberger, und den anderen Mitarbeitern des Labors.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Eltern und Geschwister für die moralische Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Erklärung

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und 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.“

Gießen, 29.06.2006

Beate Fuchs