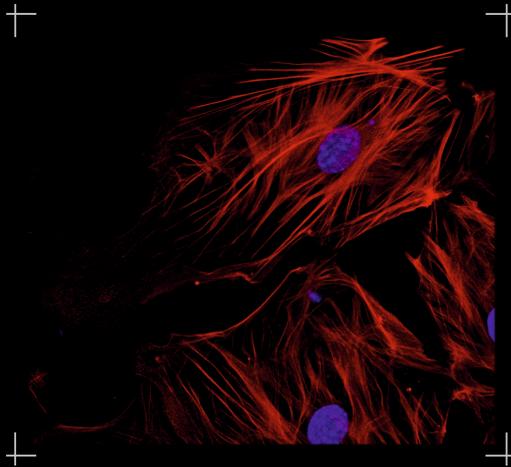


RUTH CHARLOTTE DARTSCH

Charakterisierung des genetisch kodierten
Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Sensors
„Mermaid“ zur Messung einer Änderung des
Plasmamembranpotentials pulmonalarterieller glatter
Muskelzellen unter hypoxischen Bedingungen



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

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2019

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2019

© 2019 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Charakterisierung des genetisch kodierten Förster-
Resonanzenergietransfer (FRET)-Sensors „Mermaid“ zur
Messung einer Änderung des Plasmamembranpotentials
pulmonalarterieller glatter Muskelzellen unter
hypoxischen Bedingungen**

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von

Dartsch, Ruth Charlotte
aus Lauterbach (Hessen)

Gießen 2018

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Medizinischen Klinik und Poliklinik II,
unter der Leitung von Prof. Dr. Werner Seeger,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof Dr. Norbert Weißmann
2. Gutachter: PD Dr. Muhammad Aslam

Tag der Disputation: 04.12.2018

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Die Atmung.....	1
1.2	Anatomie und Physiologie der humanen Lunge	1
1.3	Der Gasaustausch.....	2
1.4	Der pulmonale Kreislauf und das Blutgefäßsystem.....	3
1.5	Die Hypoxische Pulmonale Vasokonstriktion (HPV)	4
1.5.1	Physiologie.....	4
1.5.2	Bedeutung der HPV beim Menschen.....	5
1.6	Zelluläre Mechanismen der HPV	6
1.6.1	Die Kontraktion glatter Muskelzellen.....	6
1.6.2	Die Reaktion der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) auf Hypoxie.....	7
1.6.3	Der <i>classical transient receptor potential</i> (TRPC) 6 - Ionenkanal.....	7
1.6.4	Aktivierung von TRPC6 mittels Diacylglycerol	8
1.7	Förster-Resonanzenergietransfer (FRET).....	9
1.7.1	Grundlagen.....	9
1.7.2	Prinzip der Messung des Energietransfers.....	10
1.7.3	Messung der Membranspannung mittels des FRET-Sensors <i>Mermaid</i> ...	12
1.8	Viren als Vektorsystem.....	14
1.8.1	Lentiviren.....	14
1.8.2	Lentivirale Vektoren	14
1.8.2.1	Produktion viraler Vektoren	15
1.8.2.2	Aufbau des Vektorsystems	15
1.9	Zielsetzung dieser Arbeit.....	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Material.....	18
2.1.1	Zellisolierung und Zellkultur	18
2.1.2	Immunfluoreszenzfärbung.....	19
2.1.3	Mikrobiologie	20
2.1.4	Virenproduktion.....	20

2.1.5	Live Cell Imaging	21
2.1.5.1	Reagenzien	21
2.1.5.2	Geräte	22
2.1.5.3	Software	23
2.1.6	Herstellung von Lösungen, Puffern und Festmedien	23
2.1.6.1	Mikrobiologie	23
2.1.6.2	Virenproduktion	24
2.1.6.3	Live Cell Imaging	25
2.2	Zellisolierung und Zellkultur	26
2.2.1	Isolierung der PASMNC	26
2.2.2	Kultivierung der PASMNC	28
2.2.3	Kultivierung der humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293T)	29
2.2.4	Einfrieren und Auftauen der HEK 293T-Zellen	29
2.3	Immunfluoreszenzfärbung	30
2.4	Mikrobiologie	31
2.4.1	Plasmide zur Produktion viraler Vektoren	31
2.4.2	Plasmidvervielfältigung und Aufreinigung	32
2.5	Virenproduktion und Infektion der PASMNC	33
2.5.1	Verwendetes Vektorsystem	33
2.5.2	Calciumphosphatpräzipitation und Virenernte	33
2.5.3	Infektion der primären PASMNC	36
2.5.4	Darstellung der <i>Mermaid</i> -Expression in PASMNC	37
2.6	Live Cell Imaging	38
2.6.1	Allgemeiner Versuchsaufbau der Fluoreszenzmikroskopie	38
2.6.2	Mangan-Quenching mittels Fura-2 AM	38
2.6.2.1	Messprinzip	38
2.6.2.2	Versuchsaufbau	40
2.6.2.3	Versuchsablauf	41
2.6.2.4	Auswertung der Daten	42
2.6.3	FRET-Messungen mit <i>Mermaid</i>	43
2.6.3.1	Versuchsaufbau	43
2.6.3.2	Versuchsablauf	44
2.6.3.2.1	Stimulierung mit KCl	44
2.6.3.2.2	Stimulierung mit OAG	45

2.6.3.2.3	Versuche unter hypoxischen Bedingungen.....	45
2.6.3.3	Auswertung der Daten	46
2.6.3.3.1	Stimulierung mit KCl.....	48
2.6.3.3.2	Stimulierung mit OAG.....	49
2.6.3.3.3	Versuche unter hypoxischen Bedingungen.....	49
2.7	Messung des normobaren Sauerstoffpartialdrucks der hypoxischen Perfusionslösung	50
2.8	Statistik	51
3	Ergebnisse	52
3.1	Zellisolierung und Charakterisierung der PASMC.....	52
3.1.1	Zellisolierung der PASMC	52
3.1.2	Charakterisierung der PASMC	52
3.2	Mangan-Quenching	53
3.3	FRET-Messungen mit <i>Mermaid</i>.....	55
3.3.1	<i>Mermaid</i> -Expression.....	55
3.3.2	Charakterisierung von <i>Mermaid</i>	58
3.3.3	Stimulierung mit KCl.....	59
3.3.3.1	Auswertung der gesamten Zelle	59
3.3.3.2	Auswertung der Zellmembran	60
3.3.4	Stimulierung mit OAG.....	63
3.3.4.1	Auswertung der gesamten Zelle	63
3.3.4.2	Auswertung der Zellmembran	65
3.3.5	Versuche unter hypoxischen Bedingungen.....	68
3.3.5.1	Auswertung der gesamten Zelle	68
3.3.5.2	Auswertung der Zellmembran	70
3.4	Messung des normobaren Sauerstoffpartialdrucks der hypoxischen Perfusionslösung	73
4	Diskussion	75
4.1	Charakterisierung der PASMC mittels Immunfluoreszenzfärbung.....	75
4.2	Mangan-Quenching	75
4.3	FRET-Messungen mit <i>Mermaid</i>.....	77

4.3.1	Membranspannungsmessung mit dem FRET-Sensor <i>Mermaid</i>	77
4.3.2	Die Ratio-basierte FRET-Messung.....	78
4.3.3	Messeigenschaften von <i>Mermaid</i>	78
4.3.4	<i>Mermaid</i> in PASMCM	80
4.3.5	Stimulierung mit KCl.....	80
4.3.6	Quantifizierung von intensitätsbasierten FRET-Messungen	82
4.3.7	Stimulierung mit OAG.....	83
4.3.8	Versuche unter hypoxischen Bedingungen.....	84
4.3.9	Vergleich der Auswertungen – gesamte Zelle versus Zellmembran	87
5	Zusammenfassung.....	89
6	Summary	90
7	Abkürzungsverzeichnis.....	91
8	Abbildungsverzeichnis	94
9	Formel- und Tabellenverzeichnis	97
10	Literaturverzeichnis.....	98
11	Publikationsverzeichnis	108
12	Ehrenwörtliche Erklärung	109
13	Danksagung.....	110

1 Einleitung

1.1 Die Atmung

Sauerstoff als Bestandteil der aeroben Energiegewinnung ist ein unverzichtbares Element zellulärer Stoffwechselfvorgänge und ist somit zur Aufrechterhaltung der Struktur und spezifischer Funktionen des menschlichen Körpers essentiell. Die Gewinnung der Energie – in Form von Adenosintriphosphat (ATP) als Energieträger – wird dabei hauptsächlich durch aeroben Stoffwechsel in der sogenannten oxidativen Phosphorylierung gewährleistet. Sauerstoff ist dabei ein Substrat dieser oxidativen Phosphorylierung [69]. Da die meisten Gewebe außer dem physikalisch gelösten Sauerstoff über keine Sauerstoffreserven verfügen, ist eine kontinuierliche Versorgung mit Sauerstoff zur Aufrechterhaltung der aeroben Energiegewinnung – und letztendlich der langfristigen Gewährleistung von Stoffwechselprozessen – essentiell [69]. Die Sauerstoffaufnahme wird im menschlichen Körper durch die Lunge gewährleistet und dort auf die Erythrozyten, die Transporteure des Sauerstoffs in den Blutgefäßen, übertragen. Der Sauerstoff steht nach dem Aufnahme- und Transportprozess den Zellen zur sogenannten inneren Atmung – der Zellatmung – für intrazelluläre Stoffwechselfvorgänge und der Bereitstellung von ATP, vor allem durch die oxidative Phosphorylierung, zur Verfügung [69]. Die Lunge spielt somit als Atmungsorgan des Menschen eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung aller aeroben Stoffwechselprozesse.

1.2 Anatomie und Physiologie der humanen Lunge

Das menschliche Atmungsorgan besteht aus zwei Lungenhälften, Pulmo dexter und Pulmo sinister, welche sich im Inneren des Brustkorbes, in der Pleurahöhle, befinden [11]. Die Luftwege der beiden Lungenhälften unterteilt man anhand ihres anatomischen Aufbaus, welcher durch die Verzweigungen des Bronchialbaumes – also der luftleitenden Strukturen – bestimmt wird [11]. Die anatomische Gliederung der Atemwege unterscheidet die oberen und unteren Atemwege. Zu den oberen Atemwegen gehören Nasenhöhle und Rachen und zu den unteren gehören Kehlkopf, Luftröhre, der sich dichotom verzweigende, luftleitende Bronchialbaum sowie der gasaustauschende Abschnitt der Lunge.

Die Luftröhre (Trachea) teilt sich im Brustkorb in zwei Hauptbronchien, den rechten und linken Bronchus principalis, welche jeweils die rechte bzw. linke Lungenhälfte mit Luft versorgen. Die Hauptbronchien teilen sich rechts in drei, links in zwei Lappenbronchien und bestimmen die Gliederung der Lunge in die nächstkleinere Organisationseinheit, die Lungenlappen. Der rechte Lungenflügel gliedert sich in einen Ober-, Mittel- und Unterlappen, wohingegen der linke Lungenflügel nur aus zwei Lappen, dem Ober- und Unterlappen besteht [11]. Analog der Verzweigung der Luftwege werden die einzelnen Abschnitte der Lunge in immer kleinere Organisationseinheiten unterteilt: die Lungensegmente, welche die Lungenlappen bilden und sich in Lungenläppchen unterteilen, bis hin zu den Endaufzweigungen der Bronchioli terminales, den Acini pulmonis [11].

Funktionell wird dann der konduktive (luftleitende) von dem distal gelegenen tatsächlich gasaustauschenden Abschnitt unterschieden [11]. Der konduktive Teil umfasst neben der Trachea alle Aufzweigungen des Bronchialbaumes von den Hauptbronchien über die Lappen- und Segmentbronchien und deren Aufzweigungen bis hin zu den Bronchioli terminales. Der eigentliche Gasaustausch beginnt in den nachfolgenden Bronchioli respiratorii, in deren Wand bereits einzeln gelegene oder gruppierte Alveolen liegen können und die in die vollständig aus Alveolen bestehenden Ductuli alveolares übergehen. Gemeinsam mit ihrer Endstrecke, den Sacculi alveolares, bilden die von einem Bronchiolus terminalis ausgehenden Ductuli alveolares einen Acinus pulmonis, als Ort des Gasaustausches. Die Alveolen werden dabei von einem ausgedehnten Netzwerk aus Kapillaren umgeben, sodass 80 % bis 90 % der alveolären Oberfläche von Blut umflossen werden [71]. Die am Gasaustausch beteiligte Fläche hat beim Menschen eine Größe von 70 - 140 m² [11].

1.3 Der Gasaustausch

Die Abgabe von Kohlendioxid und die Aufnahme von Sauerstoff zwischen Luft und Blut wird als Gasaustausch bezeichnet und findet in den luftgefüllten Alveolen statt [71]. Der Übergang der Gase wird durch Diffusion gewährleistet, die von den Partialdruckgradienten von Sauerstoff und Kohlendioxid zwischen Alveolarraum und Blut angetrieben wird [11, 69, 71]. Der Kohlendioxidpartialdruck im venösen Blut beträgt 46 mmHg, im Alveolarraum 40 mmHg. Beim Sauerstoffpartialdruck verhält es sich umgekehrt. Der normale alveoläre Sauerstoffpartialdruck beträgt ca. 100 mmHg, im

venösen – entsättigten – Blut dagegen nur 40 mmHg [71]. Während das Blut die Kapillaren passiert, gleichen sich die Partialdrücke an, sodass das vormals venöse Blut nun Sauerstoff aufnimmt und Kohlendioxid abgibt [71]. Mit umgekehrt gerichteten Partialdruckgradienten findet dann die Abgabe von Kohlendioxid und die Aufnahme von Sauerstoff in den Zellen des Körpers statt [71].

Zusätzlich zu den Partialdruckunterschieden der entsprechenden Gase ist eine kurze Diffusionsstrecke zwischen Luft und Blut für einen effektiven Gasaustausch wichtig. Diese Diffusionsstrecke besteht aus Alveolarepithelzellen Typ I mit ihrer Basalmembran, einer dünnen Schicht interstitiellen Bindegewebes mit Fortsätzen von Bindegewebszellen sowie den kapillären Endothelzellen mit ihrer Basalmembran [11]. Nach erfolgtem Gasaustausch wird das oxigenierte Blut dann über die Lungenvenen (Venae pulmonales) zum linken Herz geleitet und wird von hier über die Aorta in den systemischen Kreislauf verteilt, um die Organe und Gewebe des Körpers mit Sauerstoff zu versorgen.

1.4 Der pulmonale Kreislauf und das Blutgefäßsystem

Das Kreislaufsystem, das der Lunge Blut zuführt ist dem systemischen Blutkreislauf nachgeschaltet und wird als kleiner oder pulmonaler Kreislauf bezeichnet. Dieser führt das sauerstoffarme Blut aus dem venösen System vom rechten Herz über die Lungenarterien (Arteriae pulmonales) in die Lunge. Die Arteria pulmonalis und ihre Aufzweigungen folgt dabei den Aufzweigungen der Bronchien und verläuft parallel in engster Nachbarschaft zu diesen jeweils im Zentrum der anatomischen Einheit bis zum Ende der Bronchioli respiratorii. Als Arteriolen verlaufen sie dann zwischen den Ductuli alveolares und bilden anschließend das ausgedehnte Alveolen-umgebende Kapillarnetz [11]. Die Kapillaren stellen die kleinsten Gefäße des Gefäßsystems mit einer mittleren Weite von nur 7 µm dar. Diese bestehen lediglich aus einer Endothelzellschicht, der dazugehörigen Basallamina sowie Perizyten und stellen mit einer sehr kurzen Diffusionsstrecke und einem langsamen Blutfluss den Ort des Stoff- und Gasaustausches dar [50].

Je nach Körperregion und Abschnitt des Gefäßsystems bestehen variierende Anforderungen an die Gefäße. Trotzdem lassen die verschiedenen Arten von Blutgefäßen Gemeinsamkeiten in ihrer Bauweise erkennen [50]. So sind die meisten Gefäße gekennzeichnet durch eine Dreischichtung ihrer Wand in – vom Lumen beginnend – eine einschichtige Endothelzellschicht, der Tunica intima, dann der Schicht aus glatter

Muskulatur, Tunica media, sowie der aus Bindegewebe bestehenden Tunica adventitia [50]. Zwischen den Schichten kann sich je nach Größe bzw. Art des Gefäßes eine elastische Lamelle, Membrana elastica interna bzw. externa befinden.

Arterien müssen im Vergleich zum venösen System einem deutlich höheren mittleren arteriellen Blutdruck standhalten und zeichnen sich durch eine im Vergleich zu Venen dickere Muskelschicht aus. Zudem regulieren die kleinsten Arterien (100 - 500 µm Durchmesser) gemeinsam mit den zur Endstrombahn gehörenden Arteriolen (< 100 µm) durch Veränderung ihrer Weite den peripheren Widerstand im Gefäßsystem [50].

Venen zeigen grundsätzlich eine den Arterien ähnliche Dreischichtung ihrer Wand. Aufgrund einer variableren Muskelschicht ist die Gefäßwanddicke in der Regel jedoch geringer im Vergleich zu Arterien.

1.5 Die Hypoxische Pulmonale Vasokonstriktion (HPV)

1.5.1 Physiologie

Sauerstoff ist als Substrat der oxidativen Phosphorylierung von essentieller Bedeutung für die dauerhafte aerobe Energiegewinnung [69]. Zur Verhinderung eines Abfalls der Sauerstoffkonzentration des arteriellen Blutes aufgrund eines Abfalls des alveolären Sauerstoffpartialdrucks – beispielweise aufgrund einer lokalen Minderbelüftung in einzelnen Lungenbereichen – greift ein spezieller physiologischer Mechanismus als Besonderheit des pulmonalen Gefäßbettes [73]. Von Euler und Liljestrand beschrieben bereits 1946 die Umverteilung der pulmonalen Perfusion in Abhängigkeit von der Belüftung der Lunge [23]. Eine pulmonale Vasokonstriktion, die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) oder auch von Euler-Liljestrand-Mechanismus genannt, führt durch eine Reduktion des Blutflusses in Regionen niedrigen alveolären Sauerstoffangebotes zu einer Umverteilung in besser ventilerte Bereiche der Lunge. Diese Anpassung von Perfusion an Ventilation gewährleistet dann eine ausreichende Oxigenierung des arteriellen Blutes [60]. Beschrieben und untersucht wurde die HPV seither bereits in einer Vielzahl von Spezies [73, 78]. Beim Mensch zeigt sich die essentielle physiologische Bedeutung der HPV bereits im fetalen Kreislauf: Sie ist an der Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstandes zur Aufrechterhaltung eines Rechts-Links-Shunts beteiligt, welcher das oxigenierte Blut unter Aussparung der Lunge in die Aorta und damit den systemischen Kreislauf leitet [28]. Die Vermittlung der

Vasokonstriktion im reifen Kreislauf geschieht dabei über präkapilläre pulmonalarterielle Gefäße [36, 75, 78] und zeigt meist eine biphasische Kinetik: ein erster, akuter Anstieg mit konsekutivem Abfall sowie ein folgender, erneuter Anstieg bei prolongierter Hypoxie [94]. Diese Charakteristik des Mechanismus ist speziesübergreifend [78] wie beispielsweise Untersuchungen der isolierten, perfundierten Lunge der Maus [92] und Kaninchen [94] oder in vivo am Mensch [79] zeigen konnten.

1.5.2 Bedeutung der HPV beim Menschen

Betrifft ein niedriges alveoläres Sauerstoffangebot die gesamte Lunge, so ergibt sich infolge der Vasokonstriktion ein Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks als Ausdruck eines gesteigerten pulmonalvaskulären Widerstandes. Bereits 1947 zeigten Motley et al. den Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks als Reaktion auf alveoläre Hypoxie auch beim Menschen [56]. Vor allem im Rahmen chronischer Lungenerkrankungen kommt der HPV eine tragende Rolle zur Optimierung der Oxygenierung zu: Bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD; *chronic obstructive pulmonary disease*) führt sie zu einer Verbesserung des Ventilations-Perfusionsverhältnisses [1, 4, 9, 78, 99] und dadurch zu einer verbesserten Oxygenierung des Blutes [9]. Auch bei anderen Lungenerkrankungen wie dem Asthma bronchiale optimiert die HPV den Gasaustausch [3] [13] [78] [99]. Des Weiteren kann sie im Rahmen eines akuten Lungenversagens, manifest als ALI (*acute lung injury*) [8] oder ARDS (*acute respiratory distress syndrome*), das Ventilations-Perfusions-*Matching* verbessern [78]. Bei einer lokalisierten bronchialen Okklusion mit alveolärer Hypoxie, beispielsweise hervorgerufen durch endobronchiales Tumorwachstum, vermindert die HPV lokal die Perfusion des entsprechenden Lungenabschnittes und optimiert die arterielle Oxygenierung [31]. Im Rahmen thoraxchirurgischer Eingriffe mit Einlungenbeatmung ist die HPV ein wichtiger Mechanismus zur Umverteilung des pulmonalen Blutflusses aus der nicht ventilierten Lunge zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden systemischen Oxygenierung [51].

Neben diesen positiven Effekten kann die HPV aber auch entscheidend zur Entstehung von Erkrankungen beitragen. Bedingt durch chronische alveoläre Hypoxie entwickelt sich in 23 - 91 % der Fälle bei moderater bis schwerer COPD eine pulmonale Hypertonie, zu deren komplexen Pathomechanismus die HPV bei globaler Hypoxie durch Vasokonstriktion mit einem Anstieg des pulmonalen Widerstandes beiträgt [97].

Des Weiteren geht der Aufenthalt in großer Höhe – aufgrund des niedrigeren Sauerstoffpartialdrucks – mit einer Hypoxämie einher und kann, abhängig von verschiedenen Faktoren und genetischer Prädisposition, unter maßgeblicher Beteiligung der HPV ein Höhenlungenödem hervorrufen [7]. Zusammenfassend ist die HPV ein essentieller physiologischer Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Oxygenierung des Blutes bei diversen Lungenerkrankungen, trägt aber auch entscheidend zur Entstehung von Lungenerkrankungen wie dem Höhenlungenödem oder der pulmonalen Hypertonie bei.

1.6 Zelluläre Mechanismen der HPV

Die Voraussetzung für die Verengung der pulmonalarteriellen Gefäße als Reaktion auf eine verminderte Sauerstoffkonzentration in bestimmten Lungenarealen ist eine Kontraktion bzw. Tonuserhöhung der glatten Muskelzellen dieser pulmonalarteriellen Gefäße. Dabei wurde bereits gezeigt, dass die pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) sowohl als Sensor des Sauerstoffabfalls als auch als Effektor fungieren [78].

1.6.1 Die Kontraktion glatter Muskelzellen

Die Kontraktion glatter Muskelzellen wird durch zwei Komponenten reguliert: die intrazelluläre Calcium (Ca^{2+})-Homöostase mit Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) als Schlüsselement sowie die Ca^{2+} -Sensitivität (Empfindlichkeit gegenüber freiem Ca^{2+}) der Myofilamente [41]. Nach Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bindet Ca^{2+} an das regulatorische Protein Calmodulin mit Bildung eines Ca^{2+} -Calmodulin-Komplexes. Dieser lagert sich an die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK, *myosin light chain kinase*) an und aktiviert diese dadurch [69, 78]. Die resultierende Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten am Kopf des Myosins ermöglicht die zyklische Querbrückentätigkeit des Myosins und somit das Ineinandergleiten der Aktin- und Myosinfilamente [69] als mechanischem Korrelat der Kontraktion. Entscheidend für die Ca^{2+} -Sensitivität ist der Phosphorylierungsstatus der MLCK [41]. Durch Phosphorylierung kommt es zu einer geringeren Bindung des Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex und letztendlich geringeren Querbrückentätigkeit des Myosins.

1.6.2 Die Reaktion der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) auf Hypoxie

In PASMC bewirkt akute Hypoxie einen konzentrationsabhängigen [89] Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ [68, 80, 88, 89, 93], welcher über zwei Mechanismen gewährleistet sein kann: Ein Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum sowie eine Freisetzung aus intrazellulären Speichern [26, 41, 80]. Für den Einstrom über die Plasmamembran werden mindestens drei unterschiedliche Ca^{2+} -permeable Transmembrankanäle unterschieden: Rezeptor-gesteuerte Kanäle (*receptor operated channels*, ROC), welche infolge einer Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aktiviert werden, Speicher-gesteuerte Kanäle (*store operated channels*, SOC), die nach Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, wie zum Beispiel dem sarkoplasmatischen Retikulum, einen Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran hervorrufen – auch kapazitativer Ca^{2+} -Einstrom genannt – sowie spannungsabhängige L-Typ- und T-Typ-Calciumkanäle (*voltage dependent calcium channels*, VDCC), die bei Plasmamembran-Depolarisation ihre Öffnungswahrscheinlichkeit erhöhen [26, 80].

In PASMC wurde eine Kombination des Ca^{2+} -Einstroms von extrazellulär mit > 30 % Beteiligung intrazellulärer Speicher von Tang et al. beschrieben [80]. Wang et al. beschrieben eine Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern sowie einen SOC-getriggerten Ca^{2+} -Einstrom als essentiell [88]. Zudem sind spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle neben Speicher-gesteuerten Kanälen an der $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung beteiligt [91]. Als ROC wurde für den *classical transient receptor potential* (TRPC) 6 - Ionenkanal eine essentielle Rolle für den Hypoxie-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg gezeigt [93]. Die Aktivierung von TRPC6 führte nach Einstrom von Kationen zur Membrandepolarisation und schließlich zur Öffnung der VDCC. Der gesamte Signalmechanismus sowohl des Sauerstoffsensings sowie die detaillierte Vermittlung des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs als Reaktion auf Hypoxie sind derzeit jedoch noch nicht komplett entschlüsselt [74].

1.6.3 Der *classical transient receptor potential* (TRPC) 6 - Ionenkanal

Die klassischen oder kanonischen *transient receptor potential* (TRPC)-Kanäle bilden eine Gruppe nicht-selektiver Kationenkanäle, bestehend aus 7 Mitgliedern (TRPC1-7) [15]. Die Kanäle werden anhand der Homologien ihrer Aminosäurestruktur in Untergruppen unterteilt [15]. TRPC3, TRPC6 und TRPC7 bilden eine Untergruppe und weisen strukturelle sowie funktionelle Gemeinsamkeiten auf, unter anderem die Aktivierung durch den *second messenger* Diacylglycerol. Eine weitere Untergruppe

bilden TRPC4 und 5, wohingegen TRPC1 eine einzigartige Aminosäurestruktur zeigt [15]. Aus der TRPC-Familie sind in präkapillären PASMCMC vorrangig TRPC1 sowie TRPC6 exprimiert [93]. Weißmann et al. zeigten im Modell der isolierten, perfundierten und ventilerten Lunge das Fehlen des akuten, Hypoxie-induzierten pulmonalarteriellen Druckanstieges in TRPC6^{-/-}-Mäusen [93]. In Übereinstimmung damit konnte auch an isolierten PASMCMC aus TRPC6^{-/-}- Mäusen ein Fehlen des Hypoxie-induzierten Anstiegs der [Ca²⁺]_i im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen gezeigt werden [93]. Weitere Evidenz lieferten Mayer et al. mithilfe des TRPC6-Kanal-Blockers SAR7334 durch eine Aufhebung der akuten Phase der HPV in Wildtyp-Lungen der Maus [54]. Auf zellulärer Ebene wurde eine Verminderung des Ca²⁺-Einstroms nach direkter TRPC6-Aktivierung bei gleichzeitiger TRPC6-Kanal-Blockade mit SAR7334 in TRPC6-exprimierenden HEK-Zellen beobachtet [54]. Gleiches ergab sich auch nach dem *Knockdown* von TRPC6 in humanen PASMCMC und der Aktivierung von TRPC6 mittels OAG (1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol) – einem membranpermeablen Diacylglycerolanalogon – [80]. TRPC6 scheint somit zusammenfassend eine essentielle Rolle für die akute Phase der HPV zu spielen.

1.6.4 Aktivierung von TRPC6 mittels Diacylglycerol

TRPC6 wird durch Diacylglycerol (DAG), einem *second messenger*, der durch die Phospholipase C (PLC) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) produziert wird, aktiviert [37]. Eine direkte Aktivierung von TRPC6 durch Hypoxie konnte widerlegt werden [93]. In der isolierten, perfundierten und ventilerten Lunge der Maus bewirkte OAG eine pulmonale Vasokonstriktion, welche in TRPC6^{-/-}-Mäusen fehlte [27]. Auf zellulärer Ebene fehlt zudem eine OAG-induzierte Zunahme von Ionenströmen in TRPC6^{-/-}-PASMCMC der Maus [93]. Des Weiteren wurde unter hypoxischen Bedingungen eine Akkumulation von DAG an der Plasmamembran gesehen, unter normoxischen Bedingungen ist DAG im Zytosol lokalisiert [93].

Eine mögliche Hypothese zur intrazellulären Signaltransduktion der PASMCMC ist die Aktivierung der Phospholipase C durch akute Hypoxie, die zur Produktion von DAG führt. DAG akkumuliert dann an der Plasmamembran [93] und induziert einen TRPC6-vermittelten Natriumeinstrom mit nachfolgender Depolarisation, Aktivierung spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanäle und letztendlich Kontraktion der PASMCMC [22, 34, 72].

Der letztendliche Sauerstoffsensor ist aktuell Gegenstand der Diskussion. Gute Evidenz besteht für reaktive Sauerstoffspezies als Vermittler der Hypoxie-induzierten Signaltransduktion, wobei konträre Hypothesen zur Regulation unter Hypoxie – einer Erhöhung oder Verminderung – sowie der genauen Quelle – Mitochondrien oder nicht-phagozytische NADPH-Oxidasen – bestehen [74, 87].

1.7 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

Hypoxie bewirkt eine Depolarisation der Plasmamembran in präkapillären PASMIC [35, 52, 61, 100] und geht mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ einher [68, 89]. Zur weiteren Aufschlüsselung der Hypoxie-induzierten Signaltransduktionskaskade in PASMIC bietet sich die Messung einer Änderung der Plasmamembranspannung als *Readout* an, da dies im direkten Zusammenhang zum aktivierten TRPC6-Kanal steht. Ein möglicher Ansatz zur Messung der Depolarisation isolierter PASMIC stellt die Verwendung von genetisch kodierten Membranspannungssensoren auf der Basis von Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) dar.

1.7.1 Grundlagen

Der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), benannt nach dem deutschen Physikochemiker Theodor Förster, beschreibt einen strahlungsfreien, d. h. nicht Photonen-basierten Energietransfer zwischen zwei Molekülen bzw. Fluorophoren [25]. Befinden sich zwei unterschiedliche Fluorophore in unmittelbarer Nähe zueinander, so kann unter definierten Umständen bei Anregung des einen Fluorophors (Donor) mit Licht spezifischer Wellenlänge ein strahlungsfreier Energietransfer auf das zweite Fluorophor (Akzeptor) stattfinden [32, 40, 64, 65]. Dieser strahlungsfreie Energietransfer kann jedoch nicht direkt gemessen werden. Sind Donor und/oder Akzeptor Fluorophore, kann die Messung der Energieübertragung allerdings indirekt über die Detektion der emittierten Fluoreszenz erfolgen [64]. Die Anregung des Donors geschieht dabei durch Photonen, welche ihre Energie an ein Valenzelektron in der Hülle des Donor-Fluorophors übertragen, wodurch dieses von seinem Grundzustand kurzfristig auf ein höheres Energieniveau angehoben wird [40][47]. Bei guter Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors kann der nun angeregte Donor durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung Energie auf den Akzeptor übertragen [32, 40, 65]. Aufgrund der Energieabgabe nimmt gleichzeitig die detektierbare Emissionsintensität des Donors ab. Der Akzeptor emittiert schließlich die übertragene Energie als Licht

niedrigerer Energie – also mit längerer Wellenlänge. Die Änderungen der Intensitäten des emittierten Fluoreszenzlichtes von Donor und Akzeptor können dann gemessen werden.

Für das tatsächliche Stattfinden des Energietransfers sind grundlegende Voraussetzungen zu erfüllen: Die beiden Fluorophore müssen sich in unmittelbarer Nähe – in weniger als 10 nm Distanz – zueinander befinden [40, 64, 65]. Entscheidend sind zudem die Überlappung der Spektren von Donor-Emission und Akzeptor-Absorption [40]. Die FRET-Effizienz ist definiert als das Verhältnis von transferierter Energie zur gesamten, vom Donor absorbierten Energie [32, 64] und ist abhängig von der Distanz von Donor und Akzeptor sowie dem Förster-Radius R_0 [32, 64, 65]. Der Förster-Radius R_0 beschreibt dabei die spezifische Distanz des Donor-Akzeptor-Paares, bei welcher die Effizienz der Energieübertragung 50 % beträgt [32, 40, 65] und ist unter anderem abhängig von den spektralen Charakteristika und dem Winkel zwischen den Fluorophoren [40, 64, 65]. Der effektive Bereich der Energieübertragung ergibt sich bei Distanzen der Fluorophore zwischen 3 - 8 nm. Die FRET-Effizienz liegt in diesem Bereich bei 5 % - 95 % [32]. Bei Distanzen $< R_0$ strebt die Effizienz gegen den maximalen Wert, für Distanzen $> R_0$ geht die Effizienz gegen 0.

1.7.2 Prinzip der Messung des Energietransfers

Fluorophor- bzw. Fluoreszenz-basierte FRET-Sensoren können zur Messung unterschiedlichster physiologischer Prozesse und Interaktionen genutzt werden, wie beispielsweise der Messung von Protein-Protein-Interaktionen. Je nach experimenteller Fragestellung können Donor- und Akzeptor-Fluorophor an unterschiedliche Moleküle (intermolekularer FRET) oder an nur ein Molekül (intramolekularer FRET) gekoppelt sein [65]. Kommt es im Falle des intermolekularen FRET zur Annäherung der Moleküle bzw. bei intramolekularem FRET zu Konformationsänderungen des Trägermoleküls, verstärkt sich durch die resultierende Veränderung der räumlichen Orientierung und Nähe der Fluorophore die Energieübertragung und somit das FRET-Signal [32, 40].

Zur indirekten, Fluoreszenz-basierten Messung des Energietransfers stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Die am besten etablierten Methoden sind Fluoreszenzintensitäts-basierte Messungen (Ratio-basierte Messungen sowie *sensitized emission*), spektrale FRET-Messungen (beispielsweise das *acceptor photobleaching*), die *fluorescence lifetime imaging microscopy* (FLIM) und die Messungen der Anisotropie

[64]. In dieser Arbeit wurde die Ratio-basierte Messung – oder auch Ratio-Imaging genannt – (Bildung des Verhältnisses der Intensität von Akzeptor- und Donor-Emission nach Anregung des Donor-Fluorophors [62]) verwendet [32, 40, 65]. Ein Vorteil der Ratio-Bildung ist es, dass unbekannte Störvariablen sowohl Akzeptor als auch Donor betreffen und somit sowohl im Zähler der Ratio (Intensität der Akzeptor-Emission) als auch im Nenner der Ratio (Intensität der Donor-Emission) auftauchen und sich deshalb „wegkürzen“. Der Donor wird mit seiner spezifischen Anregungswellenlänge angeregt und die Intensität der Fluoreszenzemission von Donor und Akzeptor werden detektiert [32, 64, 65]. Abbildung 1-1 zeigt schematisch die Funktionsweise eines intramolekularen FRET-Sensors.

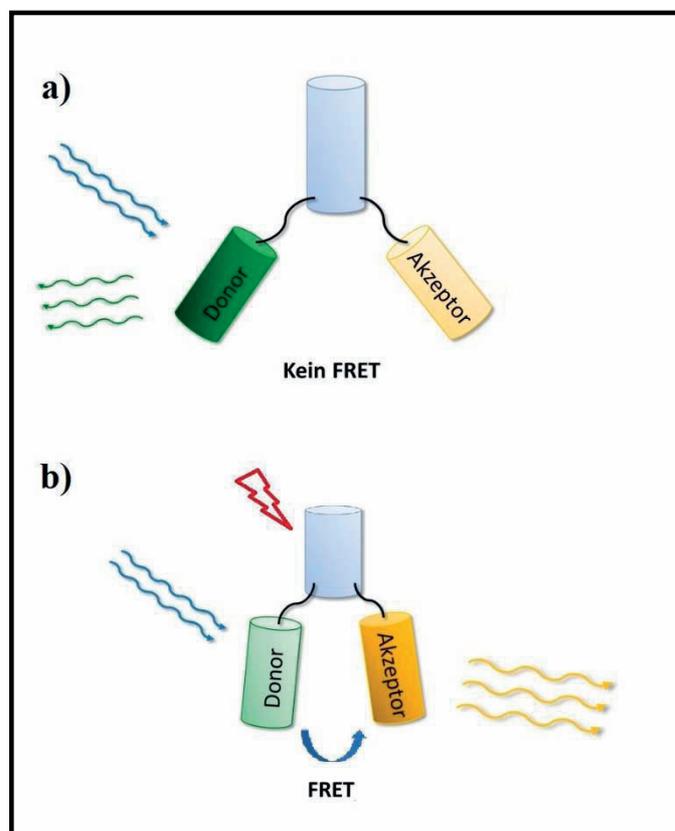


Abbildung 1-1 Schematische Funktionsweise eines intramolekularen FRET-Sensors.

a) In Ruhestellung des Sensors ohne Stimulierung zeigt der Donor (grün) bei Exzitation (gewundene blaue Linien) eine hohe Fluoreszenzintensität (gewundene grüne Linien). Eine Energieübertragung findet nicht statt. b) Nach Stimulus (roter Pfeil) ermöglicht die Konformationsänderung des Trägerproteins die Energieübertragung durch Annäherung von Donor und Akzeptor. Gelbe gewundene Linien: Fluoreszenzintensität des Akzeptors.

Findet ein Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor statt, ergibt sich eine Zunahme der Intensität der Fluoreszenzemission des Akzeptors bei gleichzeitiger Abnahme der Intensität der Fluoreszenz des Donors [32]. Die Ratio, oder sogenannte FRET-Ratio, entsteht dann durch Bildung des Quotienten beider detektierter Emissionsintensitäten:

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Akzeptoremission}}{\text{Donoremission}}$$

Formel 1-1 Berechnung der FRET-Ratio von Donor- und Akzeptoremission.

1.7.3 Messung der Membranspannung mittels des FRET-Sensors *Mermaid*

Die Funktionsweise intramolekularer FRET-Sensoren kann unter anderem zur Messung von Änderungen der Plasmamembranspannung durch Kopplung der Fluorophore an membranständige, spannungsabhängige Proteine genutzt werden. Die Entdeckung der Phosphatase (Ci-VSP) der Schlauchascidie (*Ciona intestinalis*), die eine spannungssensitive Domäne (VSD, *voltage sensing domain*) enthält, durch Murata et al. im Jahre 2005 [57] führte zur Entwicklung einer Generation von FRET-basierten Membranspannungssensoren mit guter Expression in der Plasmamembran [17, 63]. Auf Grundlage der spannungssensitiven Domäne von Ci-VSP entwickelten Tsutsui et al. 2008 den genetisch kodierten Förster-Resonanzenergietransfer-Sensor *Mermaid* [85]. Als Ausgangspunkt der Entwicklung verwendeten Tsutsui et al. mUKG, ein aus der Lederkoralle *Sarcophyton* isoliertes, von Tsutsui et al. durch Einfügen von Mutationen modifiziertes, grün-emittierendes Protein, sowie eine von Tsutsui et al. modifizierte Variante des orange-emittierenden Kusabira orange (mKOκ) [85]. *Mermaid* besteht aus einer Kopplung der als Donor und Akzeptor dienenden Fluorophore mUKG und mKOκ in Tandem an die spannungssensitive Domäne VSD [85] (Abbildung 1-2).

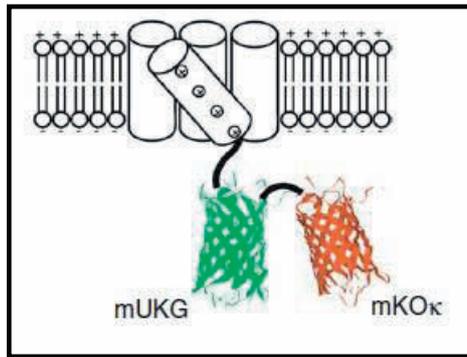


Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der Struktur des FRET-basierten Membranspannungssensors *Mermaid* in einer Zellmembran. Die spannungssensitive Domäne der Phosphatase aus der Schlauchascidie (*Ciona intestinalis*) ist mit mUKG als Donor- und mKOκ als Akzeptor-Fluorophor in Tandem gekoppelt [aus [85]]. Genutzt mit Genehmigung von H. Tsutsui.

Die Überlappung des Emissionsspektrums von mUKG (grüne durchgehende Linie) mit dem Absorptionsspektrum von mKOκ (orange gepunktete Linie) zeigt Abbildung 1-3 (aus [85]).

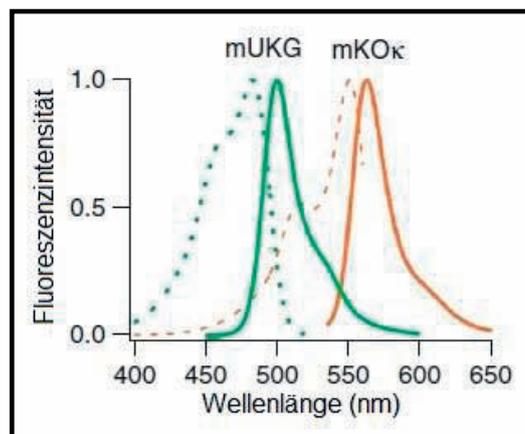


Abbildung 1-3 Emissionsspektren (durchgehende Linien) sowie Absorptionsspektren (gepunktete Linien) des Donors (mUKG; grün) sowie Akzeptors (mKOκ; orange) des FRET-Sensors *Mermaid* [aus [85]]. Genutzt mit Genehmigung von H. Tsutsui.

Mermaid fand bereits Anwendung in unterschiedlichen primär isolierten Zellen und Zelllinien sowie *in vivo*. Tsutsui et al. zeigten die Expression des Sensors in der Plasmamembran von Neuro 2A-Zellen, einer Neuroblastomzelllinie der Maus, in kultivierten kortikalen Neuronen [85] und neben Tian et al. auch in Kardiomyozyten der Ratte [82, 85]. Von Benedetti et al. wurde *Mermaid* zur Messung spontaner Potentialänderungen in Neuronen eines intakten spinalen Netzwerkes in Embryonen

eines Zebrafisch-Modells der Amyotrophen Lateralsklerose verwendet [5]. In vivo sind des Weiteren sowohl die spezifische myokardiale Expression von *Mermaid* in einem transgenen Zebrafischmodell [84] sowie in einem transgenen Mausmodell mit kardialer *Mermaid*-Expression beschrieben [43].

1.8 Viren als Vektorsystem

Der Transfer genetischen Materials in Zielzellen – wie beispielsweise eines genetisch kodierten FRET-Sensors – kann mithilfe lentiviraler Gentransfersysteme erfolgen.

1.8.1 Lentiviren

Lentiviren sind RNA-Viren und gehören zur Gruppe der Orthoretrovirinae, eine Unterfamilie der Familie der Retroviridae [55]. Ihr Genom besteht aus linearer (+)-Einzelstrang-RNA und liegt diploid, d. h. in doppelter Ausführung im Viruspartikel vor [55]. Aufgrund eines speziellen viralen Enzyms, der Reversen Transkriptase, sind sie in der Lage, ihr aus RNA bestehendes Genom in doppelsträngige DNA umzuschreiben und mithilfe der Integrase in das Genom der Wirtszelle zu integrieren [55, 67]. Im Virion ist die RNA vom Viruskapsid, bestehend aus viralen Kapsidproteinen, und im Falle der Retroviren, auch von einer Virushülle umgeben. Letztere leitet sich von der Plasmamembran der Wirtszelle, der die Viren entstammen, ab. Die Virushülle enthält ein transmembranes sowie ein externes virales Glykoprotein, die der Bindung der Viren an zelluläre Oberflächenrezeptoren und somit der Aufnahme in die Zielzellen dienen [55]. Die verschiedenen viralen Strukturproteine und Enzyme werden dabei von drei Hauptkomponenten des Virusgenoms, *Gag*, *Pol* und *Env*, kodiert: *Gag* kodiert die gruppenspezifischen Antigenen, die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine, *Pol* die Enzyme, Protease, Integrase und Reverse Transkriptase sowie *Env* die Glykoproteine der Virushülle [46, 55]. Zusätzlich finden sich unter anderem beim HI-Virus mehrere akzessorische Gene, die für akzessorische und regulatorische Proteine kodieren [46, 55].

1.8.2 Lentivirale Vektoren

Lentiviren können aufgrund ihrer Zugehörigkeit zur Familie der Retroviren ihr eigenes Genom in das Genom der Wirtszelle integrieren und bieten so die Möglichkeit, eine stabile und langfristige Expression des gewünschten genetischen Materials zu ermöglichen [12, 59]. Im Gegensatz zu anderen Retroviren liegt der besondere Vorteil

von Lentiviren als Vektoren in ihrer Fähigkeit auch ruhende, sich nicht teilende Zellen zu infizieren [46, 67].

1.8.2.1 Produktion viraler Vektoren

Eine herkömmliche Methode zur Herstellung lentiviraler Vektoren stellt die transiente Transfektion spezieller Zelllinien, wie beispielsweise HEK 293T (humane embryonale Nierenzellen) dar. HEK 293T-Zellen stellen dabei eine Zelllinie humaner Epithelzellen dar, die 1977 von Graham et al. mithilfe von Adenovirus 5-DNA immortalisiert wurde [29]. Diese exprimieren das große T-Antigen des Simian-Virus 40 (SV40) und verstärken damit die Expression von Plasmiden mit SV40-Replikationsursprung [18, 53]. Die zur Virusproduktion benötigte DNA wird dabei in Form von Plasmiden mittels Transfektion in die HEK 293T-Zellen eingebracht.

Um einen funktionsfähigen, jedoch replikationsinkompetenten Viruspartikel produzieren zu können, benötigt die Wirts- bzw. Produzentenzelle mehrere genetische Komponenten, die aus Sicherheitsaspekten zur Vermeidung der Entstehung replikationskompetenter Viren separiert und auf mehrere Plasmide verteilt sind [12, 67]. Durch die Verteilung auf mehrere Plasmide wären zum einen mehrere Rekombinationsschritte zur Entstehung eines replikationskompetenten Virus nötig, zum anderen wird so die Expression viraler Proteine in der Zielzelle vermieden [67]. Den Grundstein zur Nutzung von Lentivirus-basierten Vektoren beschrieben Naldini et al. im Jahre 1996. Sie entwickelten das erste HIV-1 basierte virale Vektorsystem, mit welchem sowohl die Infektion sich nicht in Teilung befindender Zellen *in vitro* sowie die Infektion ausdifferenzierter Neurone *in vivo* gelang [59]. Durch die seitdem stattfindende stetige Weiterentwicklung der Vektorsysteme konnte eine stetige Verbesserung der Expression und Erhöhung der Sicherheit erreicht werden.

1.8.2.2 Aufbau des Vektorsystems

Der Aufbau des Vektorsystems basiert je nach Generation des Systems auf 3 bzw. 4 Plasmiden. Das System der 2. Generation besteht aus einem Transfer-Plasmid, welches das Transfer-Gen trägt, einem *Envelope*-Plasmid, welches die speziellen Glykoproteine der Hülle kodiert, sowie ein Verpackungs- oder *Packaging*-Plasmid, auf dem sich *Gag/Pol*, kodierend für Enzyme und Strukturproteine sowie die Sequenzen *Tat* und *Rev* befinden [12]. *Rev* kodiert ein Protein zur Bindung an *RRE* (*Rev responsive element*), eine RNA-Sequenz, welche durch Bindung des *Rev*-Proteins den bevorzugten Export der

transkribierten RNA aus dem Kern ins Zytoplasma ermöglicht [12, 46, 55]. Die vom Gen *Tat* (Transaktivator der Transkription) kodierte Proteine dienen der Verstärkung der Transkription [12, 55]. Das System der 3. Generation beruht auf einem Packaging-Plasmid mit nur *Gag* und *Pol*. *Tat* wird in diesem Plasmid nicht benötigt und *Rev* befindet sich auf einem zusätzlichen, vierten Plasmid. Letzteres bewirkt eine höhere Sicherheit [12, 19].

Da HIV-1 als Prototyp der lentiviralen Vektoren eine Beschränkung auf CD4-positive Zellen als Zielgewebe vorgibt, wurde der Tropismus der viralen Vektoren durch Pseudotypisierung, d. h. durch Ersatz der ursprünglichen Hüllproteine durch die Glykoproteine eines anderen Virus erweitert, beispielsweise mit dem Glykoprotein des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV), VSV-G genannt [12, 19, 46, 67]. Und da VSV-G die Aufnahme des Virus durch Endozytose bedingt, erlaubt es den Wegfall eines weiteren akzessorischen Proteins und erhöht somit weiter den Rekombinationsschutz [12, 46]. Neben dem Vorteil des deutlich erweiterten Spektrums an Zielgeweben erhöht sich auch die Stabilität der Viren. Dadurch wird die Aufkonzentrierung der produzierten Viren mittels Ultrazentrifugation ermöglicht [67].

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des FRET-basierten Membranspannungssensors *Mermaid* für Messungen in primär isolierten PASMC der Maus unter hypoxischen Bedingungen, wie sie bei der HPV auftreten. Als etablierte Vergleichsmethode diente das Mangan-Quenching, das auf der Messung der Fluoreszenzlöschung des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 AM durch Manganionen bei einer spezifischen Anregungswellenlänge basiert und die Messung einer Hypoxie-induzierten Aktivierung von TRPC6-Kanälen durch Einstrom von Manganionen ermöglicht [93]. Der Transfer von *Mermaid* in die PASMC sollte mithilfe von Lentiviren erfolgen. Im ersten Schritt sollte die Virenproduktion und Expression des Sensors in PASMC etabliert werden. Dann folgte die Grundcharakterisierung mit Kaliumchlorid in verschiedenen Konzentrationen, um Abstufungen in der Änderung der Plasmamembranspannung feststellen zu können. In einem nächsten Schritt sollte die Stimulierung mit OAG, einem direkten Aktivator von TRPC6, in verschiedenen Konzentrationen erfolgen. Nach Aktivierung von TRPC6 kommt es zu einem Kationeneinstrom, welcher schließlich eine Membrandepolarisation hervorruft [22, 34,

34, 72, 93]. OAG wurde als Stimulus ausgewählt, da die Messung der Membrandepolarisation mit *Mermaid* über die vorliegende Arbeit hinaus für die Aufschlüsselung des Signaltransduktionsweges der HPV dienen sollte und die Aktivierung von TRPC6 als eine Schlüsselkomponente bereits gezeigt wurde [93]. Des Weiteren sollte dann ein Vergleich der Membranspannung unter hypoxischen Bedingungen mit normoxischen Bedingungen, jeweils mit *Priming* durch 4 nM Endothelin-1 (ET-1), stattfinden. In vorhergehenden Untersuchungen wurde dieser Ansatz mit *Priming* durch 4 nM Endothelin-1 und Hypoxie bereits für die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ etabliert. Dem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ ging dabei eine Membrandepolarisation und Öffnen der VDCC voraus [93].

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellisolierung und Zellkultur

Agarose Type VII (niedrig schmelzend)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Deckgläser rund, Ø 18 mm sowie Ø 30 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DPBS	PAN Biotech, Aidenbach
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Eisen (II,III)-Oxid, Pulver	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetales Kälber Serum (FCS)	PAA, Cölbe
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm	ratiopharm, Ulm
Inkubator HeraCell	Thermo Scientific, Dreieich
Isotone Natriumchloridlösung (0,9 %)	B.Braun, Melsungen
Ketamin 10 % (10 mg / ml)	bela-pharm, Vechta
Kollagenase Typ IV von Clostridium histolyticum	Sigma, Steinheim
Kryogefäß (Cryo.S Reaktionsgefäß)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Magnetkonzentrierer MPC	Invitrogen, De Shelp, Niederlande
Mauslinie C57Bl6/J	Charles River, Sulzfeld
Medium 199 (M199)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Mikroskop Leica DMIL	Leica, Wetzlar
Minimum Essential Medium (MEM)	Invitrogen, Karlsruhe
PA Katheter (<i>Perfusion Cannulae for mouse pulmonary Artery</i>)	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten

Parafilm	Bemis, Neenah, USA
Penicillin / Streptomycin (P/S)	PAN Biotech, Aidenbach
Petrischalen (100 x 15 mm)	Falcon, Corning, USA
Reaktionsgefäße (5 - 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Rompun 2 % Injektionslösung	Bayer, Leverkusen
Serologische Pipetten (5 – 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
<i>Smooth Muscle Cell Growth Medium 2</i>	PromoCell, Heidelberg
Spritze (2 ml mit Luer-Ansatz)	BD Plastipak, Heidelberg
Sterilfilter, Porengröße 0,22 µm	Millipore, Schwalbach
Trypsin / EDTA (10 x)	PAN Biotech, Aidenbach
Zellkulturplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

2.1.2 Immunfluoreszenzfärbung

4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>8-Well Chamber Slide</i>	BD Falcon, Heidelberg
<i>α-smooth muscle actin (Cy3™)</i> (monoklonal, Maus)	Sigma-Aldrich, München
Aceton-Methanol-Gemisch	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAKO <i>fluorescent mounting medium</i>	Dako cytomation, Hamburg
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
HP xw8600 Workstation	Hewlett-Packard, Böblingen
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop TCS SP5 X	Leica Microsystems, Wetzlar

2.1.3 Mikrobiologie

Ampicillin	Sigma, Steinheim
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Eppendorf Reagiergefäß (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Glycerol (Glycerin 85 %)	Merck, Darmstadt
Kompaktschüttler KS-15 mit Inkubationshaube TH-15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Lennox L Agar (LB Agar)	Invitrogen, Karlsruhe
Lysogeny broth (LB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Mermaid</i> in pWPXL (Addgene Plasmid # 12257)	Dr. T. Mayer sowie Prof. Dr. A. Dietrich, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, München
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym, Hessisch Oldendorf
pMD2.G (Addgene Plasmid # 12259)	Didier Trono, Tronolab, Lausanne, Schweiz
psPAX2 (Addgene Plasmid # 12260)	Didier Trono, Tronolab, Lausanne, Schweiz
Reaktionsgefäße (50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
S.O.C.-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Tischzentrifuge Mikro 200R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

2.1.4 Virenproduktion

293 T <i>Human embryonic kidney cells</i> (HEK)	DSMZ, Braunschweig
---	--------------------

CASY® Cell Counter + Analyser Model TT	Innovatis AG, Bielefeld
<i>DNEasy Blood and Tissue Kit</i>	Qiagen, Hilden
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Steinheim
Gefrierschrank HERAFreeze Top	Thermo Scientific, Dreieich
HB101 <i>E. coli</i> competent cells	Promega, Madison, USA
HeraCell 150	Thermo Scientific, Dreieich
JM109 <i>E. coli</i> competent cells	Promega, Madison, USA
Kalziumchlorid (CaCl ₂ *2H ₂ O)	Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim
Mikroskop Leica DMIL	Leica, Wetzlar
PCR MykoplasmaTest Kit I/C	Promokine, Heidelberg
Polybrene (Hexadimethrinbromid)	Millipore, Schwalbach
Reinstwasseranlage Milli-Q®	Millipore, Schwalbach
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Waage Mettler Toledo PL 303	Mettler Toledo, Schweiz
Waage TE 313S	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

2.1.5 Live Cell Imaging

2.1.5.1 Reagenzien

1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG)	Calbiochem, Darmstadt
D(+) Glucose anhydrans	Fluka, Steinheim
Endothelin-1 (ET-1)	Calbiochem, Darmstadt
Fura-2 pentakis(acetoxymethyl)-ester (Fura-2 AM)	Sigma, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe

Kalziumchlorid (CaCl ₂ *2H ₂ O)	Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂ *6H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat (MnCl ₂ *4H ₂ O)	Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Stickstoff (4.5; gasförmig)	Linde, München

2.1.5.2 Geräte

<u>Exzitationsfilter</u>	AHF Analystechnik, Tübingen
Olympus U-MF 2 Filtermodul für BX2	
HC Strahlenteiler BS 495	
Anregungsfilter BrightLine HC 472/30	
<u>Emissionsfilter</u>	AHF Analystechnik, Tübingen
BrightLine HC 520/35	
BrightLine HC 585/40	
<u>Beamsplitter der Emissionsbereiche</u>	AHF Analystechnik, Tübingen
Optical insights Multispec 565	
Gas-undurchlässige Perfusionschläuche, Tygon Lab Tubing	Cole Parmer Instruments Company, Vernon Hills, Illinois, USA
Heating Insert P	PeCon, Erbach
SensiCam	PCO, Kehlheim, Deutschland
Labor-pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Licox CMP <i>Tissue oxygen pressure monitor</i>	GMS Advanced Tissue Monitoring, Mielkendorf
Mikroskop Olympus IX-71	Olympus, Hamburg

Monochromator Polychrome V mit 150 W Xenon Lampe	TILL Photonics, Gräfelfing
Perfusionskammer POCmini	PeCon, Erbach
Personal Computer, OPTIPLEX GX620	DELL, Frankfurt/Main
Rollerpumpe Reglo Analog	Ismatec, Wertheim
Temperaturkontrolle Tempcontrol 37-2 digital	PeCon, Erbach

2.1.5.3 Software

ImageJ (Java-basiertes Bildbearbeitungsprogramm)	National Institutes of Health, Bethesda, USA
GraphPad Prism 5 for Windows	GraphPad Software, La Jolla, USA
Microsoft Excel 2013, Microsoft Office 365 University	Microsoft, Redmond, USA
TILLvisION	TILL Photonics, Gräfelfing
Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF)	Leica Microsystems, Wetzlar

2.1.6 Herstellung von Lösungen, Puffern und Festmedien

2.1.6.1 Mikrobiologie

LB-Medium

20 g Lysogeny broth (LB)-Puder wurde in 1 l Aqua dest. gelöst. Die Lösung wurde dann für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt. Es erfolgte der Zusatz von 1 ml Ampicillin auf 1 l LB-Medium.

Agarplatten

32 g Lennox L (LB)- Agar wurde in 1 l Aqua dest. gelöst und für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Es wurde 1 ml / l Ampicillin zugesetzt und die Lösung in warmem, flüssigen

Zustand unter einer Sicherheitswerkbank in Petrischalen gegossen. Nach Auskühlung wurden diese bei 4 °C aufbewahrt.

2.1.6.2 Virenproduktion

HBS-Lösung (2-fach)

Es erfolgte der Ansatz von 100 ml 2-facher HBS-Lösung in Aqua dest. einer Reinstwasseranlage (Milli-Q) (Tabelle 2-1) gefolgt von einer sterilen Filterung durch einen Sterilfilter mit Porengröße 0,22 µm sowie der exakten Einstellung des pH-Wertes auf 7,05. Dieser wurde direkt vor Einsatz nochmals überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert und 4 Wochen nach Ansatz verworfen.

Substanz	Konzentration [mM]	Masse in 100 ml Lösung
NaCl	140	0,818 g
Na ₂ HPO ₄	1,5	0,027 g
Hepes	50	1,191 g

Tabelle 2-1 Zusammensetzung der HBS-Lösung (2-fach). Ansatz in Aqua dest. einer Reinstwasseranlage.

TE-Puffer (0,1-fach)

Es erfolgte der Ansatz von 1 l 0,1-fachem TE-Puffer in Aqua dest. einer Reinstwasseranlage gefolgt von einer sterilen Filterung durch einen Sterilfilter mit Porengröße 0,22 µm sowie der exakten Einstellung des pH-Wertes auf 7,6. Dieser wurde direkt vor Einsatz nochmals überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert und 4 Wochen nach Ansatz verworfen.

Substanz	Konzentration [mM]	Masse in 1 l Lösung
Tris	1	0,121 g
EDTA	0,1	0,029 g

Tabelle 2-2 Zusammensetzung des TE-Puffers (0,1-fach). Ansatz in Aqua dest. einer Reinstwasseranlage.

CaCl₂ (2,5 M)

Für 100 ml einer 2,5 M CaCl₂-Lösung wurden 36,752 g CaCl₂ in Aqua dest., gewonnen aus einer Reinstwasseranlage, gelöst. Die Lösung wurde durch einen Sterilfilter mit Porengröße 0,22 µm steril filtriert, in sterile 2 ml Eppendorffgefäße aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.1.6.3 Live Cell Imaging

Hepes-Ringer-Stocklösung

Die Hepes-Ringer-Lösung wurde als 20-fach konzentrierte Stocklösung in Aqua dest. einer Reinstwasseranlage angesetzt (Tabelle 2-3). Die Verdünnung zum Ansatz der gebrauchsfertigen Lösung erfolgte durch Zugabe von 50 ml Stocklösung zu 950 ml Aqua dest. einer Reinstwasseranlage. Der pH-Wert der angesetzten Lösung wurde jeweils bei Ansatz sowie frühestens am Vortag der Versuche unter kontinuierlichem Rühren mit 4-5 ml 5 M NaOH unter Benutzung eines pH-Meter auf einen pH-Wert von $7,4 \pm 0,01$ eingestellt. Die Stocklösung wurde in 50 ml Portionen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Substanz	Konzentration [mM]	Masse in 1 l Lösung	Masse in 1 l Stocklösung (20-fach)
KCl	5,6	418 mg	8,360 g
NaCl	136,4 (+ 4,6 NaOH)	7,970 g	159,400 g
MgCl ₂ *6H ₂ O	1	203,300 mg	4,066 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	2,2	323,400 mg	6,468 g
Glucose	11	2,180 g	43,600 g
Hepes	10	2,380 g	47,600 g

Tabelle 2-3 Zusammensetzung der Hepes-Ringer-Lösung/-Stocklösung. Ansatz in Aqua dest. einer Reinstwasseranlage.

2.2 Zellisolierung und Zellkultur

2.2.1 Isolierung der PASMIC

Für die Isolierung der PASMIC wurden Mäuse des Stammes C57BL/6J verwendet. Alle Schritte der Isolierung bis zur Tiertötung (AktENZEICHEN der Anzeigen nach Tierschutzgesetz: V54-19c 20/15c GI 20/10 Nr.A 28/2009 sowie V54-19c 2015(1) GI 20/10 Nr.A 34/2011) wurden von Frau Karin Quanz durchgeführt. Die Mäuse wurden mittels intraperitonealer Injektion einer Lösung (200 µl), bestehend aus Ketamin (Ketamin 10 % (10 mg/ml)) und Xylazin (Rompun 2 %) in Natriumchlorid-Lösung (0,9 %) im Verhältnis 1:1:2, narkotisiert. Zur Antikoagulation wurden zusätzlich 100 µl Heparin (25000 I. E./5 ml) mit physiologischer Natriumchlorid-Lösung (0,9 %) 1:10 verdünnt und intraperitoneal appliziert. Der Exitus des Tieres erfolgte durch Kreislaufstillstand nach Thorakotomie in Vollnarkose durch Unterbinden der zentralen Gefäße. Die Maus wurde in Rückenlage auf einer Gummimatte fixiert und das Fell von distal in Höhe des Bauches nach proximal bis zum Hals mit Hilfe einer Schere eröffnet. Nachfolgend wurden die Speicheldrüse sowie die Halsmuskulatur zum Sichtbarmachen der Trachea entfernt. Es wurde eine Fadenligatur um die Trachea gelegt, diese dann oberhalb der Ligatur von ventral eröffnet, der Trachealtubus eingeführt sowie die Ligatur um die Trachea und den innenliegenden Tubus fest verschlossen. Im nächsten Schritt wurde der Bauchraum von ventral eröffnet, um das Diaphragma vorsichtig von distal in Höhe des Sternums zu punktieren, den im Thorax herrschenden Unterdruck zu entlasten und ein Kollabieren der Lunge zu bewirken. Dabei wurde darauf geachtet, dass bei der Inzision die noch entfaltete Lunge nicht verletzt wurde. Der knöcherne Thorax wurde entlang des Sternums mithilfe eines medianen Längsschnitts komplett eröffnet und beide Thoraxhälften jeweils seitlich umgeklappt und mittels Nadeln auf der Unterlage fixiert. Als nächstes wurde der Thymus stumpf entfernt sowie eine lockere Schlinge um Aorta und Pulmonalarterie gelegt. Der linke und rechte Ventrikel wurden nun mittels Querinzision eröffnet, um das Einführen des Katheters (*Perfusion Cannulae for mouse pulmonary Artery*) in den rechten Ventrikel bzw. den Abfluss der Flüssigkeit, die im Weiteren zum Durchspülen der Lunge verwendet wurde, aus dem linken Ventrikel zu gewährleisten. Der in einer Halterung fixierte und grob positionierte Katheter wurde über eine kurze Schlauchverbindung mit einer leichtgängigen 2-3 ml-Spritze (mit Luer-Ansatz), die mit DPBS-Lösung (*without Ca and Mg*) gefüllt war, verbunden und durchgespült. Es war darauf zu achten, dass die DPBS-Lösung in der Spritze sowie dem

Schlauch luftblasenfrei war, um im Weiteren eine Luftembolie in der pulmonalen Strombahn zu vermeiden. Der Katheter wurde vorsichtig durch die Querinzision des rechten Ventrikels in die Pulmonalarterie vorgeschoben, ohne diese dabei zu verletzen. Nach korrekter Positionierung des Katheters wurde die Ligatur um Pulmonalarterie und Aorta geschlossen, um die Dichtigkeit des Systems beim Durchspülen der Lunge mittels DPBS-Lösung zu gewährleisten. Die Spritze wurde luftblasenfrei durch Abklemmen des Plastikschauches gegen eine Spritze mit 3 ml DPBS-Lösung ausgetauscht, und die Lunge wurde dann langsam mit 3 ml DPBS gespült, um eine Blutleere zu erreichen. Im nächsten Schritt wurden 2-3 ml eines 40 °C warmen, bereits vorher bei 75 °C für ca. 10 Minuten erhitzten Agarose-Eisenpartikel-Gemisches, das 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 Units Penicillin / ml, 10 mg Streptomycin / ml), 0,5 % Eisen-(II,III)-Oxid sowie 0,5 % Agarose (Type VII niedrig schmelzend) in Medium 199 enthielt, in die Lunge instilliert. Hierbei wurde das Gemisch direkt vor dem Wechseln der Spritze nochmals geschwenkt, um eine gleichmäßigere Verteilung der Eisenpartikel im Gemisch herbeizuführen. Nach Instillation des Gemisches konnte die Akkumulation der Eisenpartikel in der Lunge beobachtet werden. Die aus dem linken Herz herausfließende Lösung enthielt keine Eisenpartikel, da die Eisenpartikel die Kapillaren aufgrund ihrer Größe nicht passieren konnten und somit besonders in den präkapillaren Gefäßen akkumulierten. In einem nächsten Schritt wurde eine 40 °C warme, 1 %ige Agarose-Lösung in Medium 199, die 1 % Penicillin/Streptomycin enthielt und ebenfalls zuvor für ca. 10 Minuten bei 75 °C erhitzt worden war, über den Trachealtubus in die Lunge instilliert. Dieser Schritt erfolgte, damit die Lunge sich im Weiteren besser zerkleinern ließ. Herz und Lunge wurden nach Durchtrennung der Trachea oberhalb der Ligatur sowie des Ösophagus, der Aorta und der Hohlvenen dorsal freipräpariert und aus dem Thorax entnommen. Nach Überführung in eiskalte DPBS-Lösung wurde das Herz-Lungen-Paket in dieser für 20 Minuten gekühlt. Das Abkühlen bewirkte ein Festwerden der Agarose mit Fixierung der Eisenpartikel vor allem in den präkapillaren Gefäßen. Danach wurde das sich in der DPBS-Lösung befindende Herz-Lungen-Paket in eine *Laminar Flow* Werkbank transferiert, um bei der nachfolgenden weiteren Zellisolierung sterile Umgebungsverhältnisse zu ermöglichen. Die beiden Lungenflügel wurden von Ösophagus, Herz und anhängenden Gefäßen getrennt sowie in ihre Lungenlappen aufgetrennt. Diese wurden in ein weiteres, mit ca. 2 ml sterilem DPBS gefülltes Falcon-Gefäß überführt und intensiv zerkleinert (ca. 1 mm große Stücke). Um die Eisenpartikel-enthaltenden Gewebestücke von Gewebestücken ohne Eisenpartikel zu trennen, wurden

die Eisenpartikel-enthaltenden Gewebestücke mit Hilfe eines Magnetkonzentrierers (MPC) am Rand des Falcon-Röhrchens separiert, sodass die restliche Flüssigkeit mit den Gewebestücken ohne Eisenpartikel abgesaugt werden konnte. Das Falcon-Gefäß wurde wieder aus dem Magnetkonzentrierer entfernt und die Eisenpartikel-enthaltenden Gewebestücke in 10 ml steriler DPBS-Lösung resuspendiert. Nach dreimaliger Wiederholung dieses Waschschrattes wurde das Gewebe in 37° C-warmem Medium 199 mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 80 U / ml Kollagenase Typ IV resuspendiert, in eine Petrischale (100 x 15 mm) überführt und für 50 Minuten in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid inkubiert, um das hauptsächlich aus Bindegewebe bestehende Gewebe, das sich um die Gefäße befand, zu entfernen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Gemisch in ein neues, steriles Falcon-Röhrchen überführt und mithilfe einer 10 ml Spritze zunächst durch eine 15 Gauge (G)- Kanüle, und nachfolgend durch eine 18 G-Kanüle mehrfach hoch-und runtergezogen, um das angedaute, aus Bindegewebe bestehende Gewebe von den Gefäßen zu entfernen. Um den Kollagenase-Verdauungsschritt zu stoppen, wurde das Gewebe mit Hilfe des Magnetkonzentrierers in einem erneuten Waschschratt mit 37 °C warmem Medium 199, das 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % Fötale Kälberserum (FCS) enthielt, dreimal gewaschen. Die nachfolgende Aussaat der selektierten, Eisenpartikel-enthaltenden Gefäßstückchen erfolgte auf sechs Deckgläser (rund, Ø 30 mm, Stärke 0,13 - 0,16 mm), die sich in den *wells* einer 6 *well*-Zellkulturplatte befanden, jeweils mit 2 ml *Smooth Muscle Cell*-Medium (SMC-Medium; Smooth Muscle Cell Growth Medium 2) mit 1 % Penicillin-Streptomycin und 15 % FCS.

2.2.2 Kultivierung der PASMCM

Die Kultivierung der gewonnenen Eisenpartikel-enthaltenden Gefäßstückchen und der daraus wachsenden PASMCM erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid. Als Zellkulturmedium wurde das bereits erwähnte SMC-Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 15 % FCS verwendet. Für die *Live Cell Imaging*-Versuche sowie für die Immunfluoreszenzfärbung wurden ausschließlich PASMCM der Passage 0, d. h. ohne weiteres Passagieren mittels Trypsin verwendet. Das SMC-Medium wurde alle 2-3 Tage durch neues ersetzt, um eine ausreichende Nährstoffversorgung der PASMCM sowie die Entfernung von Stoffwechselprodukten zu gewährleisten.

2.2.3 Kultivierung der humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293T)

Die humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293T-Zellen) wurden kultiviert und zur Produktion der lentiviralen Vektoren verwendet. HEK 293T-Zellen stellen eine mit Adenovirus 5-DNA immortalisierte Zelllinie humaner Epithelzellen dar [29]. Die HEK 293T-Zellen wurden auf Zellkulturplatten bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid im Inkubator kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde MEM (Minimum Essential Medium) mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet und alle 2-3 Tage erneuert. Auf Grund der sehr geringen Haftung der HEK 293T-Zellen auf der Zellkulturplatte war bei Passagierung ein Ablösen dieser Zellen mittels Trypsin nicht notwendig. Das Lösen der HEK 293T-Zellen erfolgte lediglich durch Abspülen der Zellen mittels des auf der Zellkulturplatte vorhandenen Zellkulturmediums sowie in einem zweiten Schritt mit DPBS. Das Zellkulturmedium sowie das DPBS wurden dann in einem 50 ml Falcontube gemeinsam aufgenommen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 1200 rpm zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde abgenommen und in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Auf Grund des raschen Wachstums erfolgte die Splittung in einem Verhältnis von 1:9.

2.2.4 Einfrieren und Auftauen der HEK 293T-Zellen

Zur dauerhaften Lagerung wurden die HEK 293T-Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu wurden die Zellen mittels des auf der Zellkulturplatte befindlichen Zellkulturmediums abgelöst und für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 1200 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 500 µl Medium I (bestehend aus MEM mit 10 % FCS sowie 10 % HEPES (0,2 M)) resuspendiert, dann wurden 500 µl Medium II (bestehend aus 80 % Medium I und 20 % DMSO (Dimethyl sulfoxide)) zugefügt und in ein Kryogefäß pipettiert. Dann wurden die Zellen über 24 Stunden bei -80 °C gelagert, um anschließend zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt zu werden. Zum Auftauen der Zellen wurden diese nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff unmittelbar in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt, um ein möglichst rasches Auftauen zu gewährleisten. Die aufgetaute Zellsuspension wurde nachfolgend auf eine Zellkulturplatte mit bereits auf 37 °C vorgewärmten Zellkulturmedium, MEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin, pipettiert. Durch vorsichtiges Schwenken der Zellkulturplatte sollte eine Verteilung der Zellen erreicht werden. Am darauffolgenden Tag wurde zur Entfernung des DMSO-haltigen Mediums ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.3 Immunfluoreszenzfärbung

Die Charakterisierung der PASMC zum qualitativen Nachweis dieser primär isolierten Zellen erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung. Bei dieser Methode wird das Zielprotein mithilfe eines Fluorophor-markierten Antikörper markiert. Nach Anregung des Fluorophors mittels Licht einer spezifischen Wellenlänge wird das vom Fluorophor emittierte Licht mithilfe eines Mikroskops über eine Kamera und einen Personal Computer digitalisiert.

Zum Nachweis glatter Muskelzellen diente das glattmuskuläre α -Aktin als Zielprotein, das Bestandteil des kontraktiven Apparates der glatten Muskelzellen ist. Eingesetzt wurde ein spezifischer *α -smooth muscle actin-Cy3TM*-gekoppelter, monoklonaler Antikörper. Direkt nach Zellisolierung wurden die Eisenpartikel-enthaltenden Gefäßstückchen auf einem Objektträger mit acht Kammern ausgesät und mit SMC-Medium versorgt. Die Färbung wurde am 6. Tag nach sichtbarem Wachstum der PASMC aus den Eisenpartikel-enthaltenden Gefäßstückchen heraus durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das vorhandene SMC-Medium entfernt und jede Kammer des Objektträgers zweimal mit 500 μ l DPBS gewaschen. Für die darauffolgende Fixierung der PASMC wurden pro Kammer jeweils 250 μ l eines -20 °C kalten Aceton-Methanol-Gemisches im Mischungsverhältnis 1:1 appliziert und mit einer Einwirkdauer von 5 Minuten auf den PASMC belassen. Nach der Fixierung folgten 5 Waschschrte mit jeweils 500 μ l DPBS pro Kammer, um das Aceton-Methanol-Gemisch möglichst vollständig zu entfernen. Unspezifische Bindungsstellen wurden dann mit jeweils 300 μ l 3 %igem bovinem Serumalbumin (BSA) in DPBS pro Kammer für 45 Minuten abgesättigt. Danach folgten erneut 3 Waschschrte mit DPBS und anschließend die Zugabe des Cy3TM-gekoppelten Antikörpers gegen *α -smooth muscle actin*. Dieser wurde in 0,1 % BSA in DPBS im Verhältnis 1:400 verdünnt. Zum Schutz des Fluorophors wurden diese Schritte in einem abgedunkelten Raum durchgeführt und die 1,5 ml-Eppendorfgefäße mit der Antikörperverdünnung mit Aluminiumfolie umhüllt. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte mit je 100 μ l pro Kammer für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer lichtundurchlässigen Box. Nachfolgend wurden die Rückstände dieser Inkubationslösungen mit 5 Waschschrten mit DPBS entfernt. Die nun folgende Kernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) wurde mit einer Endkonzentration von 1 μ M bei einer Verdünnung von 1:100 in 1 % BSA in DPBS vorgenommen. Die Inkubation erfolgte mit je 100 μ l pro Kammer abgedunkelt für

8 Minuten. Dann wurde der Objektträger eingedeckt. Hierzu wurden die auf dem Objektträger fixierten Kammern vorsichtig manuell entfernt, 5-6 Tropfen DAKO *fluorescent mounting medium* aufgetragen und ein Deckglas der Größe 24 x 36 mm luftblasenfrei aufgebracht. Die Lagerung erfolgte in einer lichtundurchlässigen Box bei 4 °C.

Von den gefärbten Zellen wurden Bilder mittels eines konfokalen Laserscanning-Mikroskopsystems (TCS SP5 X) und mithilfe der *Leica Application Suite Advanced Fluorescence* (LAS AF) und einem Personalcomputer (HP xw8600 Workstation) aufgenommen. Das Cy3™ - Fluorophor wurde mit der Laserlinie 546 nm angeregt. Die Emission des Fluorophors wurde als Fluoreszenzsignal detektiert und im digitalisierten Bild in roter Farbe dargestellt. DAPI wurde mit der Laserlinie 405 nm angeregt und das emittierte Fluoreszenzsignal im digitalisierten Bild in blauer Farbe dargestellt. Abschließend erfolgte die Überlagerung der beiden gewonnenen Bilder.

2.4 Mikrobiologie

2.4.1 Plasmide zur Produktion viraler Vektoren

Zur Produktion der Lentiviren der zweiten Generation wurde die Kombination eines *packaging*-Plasmids (psPAX2), eines VSV-G kodierenden envelope-Plasmids (PMD2.G) sowie des Transfer-Plasmids pWPXL mit dem FRET-Sensor *Mermaid* verwendet. Die Arbeiten erfolgten nach Anzeige und Genehmigung unter dem Aktenzeichen IV44-53r30.03 UGI125.13.01 nach Gentechnik-Sicherheitsverordnung. Der FRET-Sensor *Mermaid* in pWPXL wurde im Rahmen einer Kooperation von Herrn Prof. A. Dietrich zur Verfügung gestellt (Arbeitsgruppe Prof. A. Dietrich, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, München). Herr Dr. Tim Mayer klonierte *Mermaid* aus dem ursprünglichen Plasmid pCS2+ [85], bereitgestellt von H. Tsutsui, in pWPXL. Diese Klonierung ist Bestandteil von Herr Dr. Tim Mayers Dissertationsschrift. Mit den Enzymen BamHI und EcoRI wurde die Sequenz durch Restriktionsverdau ausgeschnitten und an die Stelle des GFP (Base 3547 bis 4260) zwischen die Restriktionsschnittstellen PmeI (Position 3490) und SmaI (Position 4323) des pWPXL-Plasmids eingefügt. Die Komponenten des Vektorsystems sind im Kapitel 2.5.1 näher beschrieben.

2.4.2 Plasmidvervielfältigung und Aufreinigung

Zur Vervielfältigung der Plasmide wurden *JM109 E. coli competent cells* bzw. *HB101 E. coli competent cells* verwendet. Bei den nachfolgend beschriebenen Schritten wurde grundsätzlich mit gestopften Pipettenspitzen gearbeitet, um eine Kontamination der Plasmide durch Fremd-DNA zu vermeiden. Das Einbringen der Plasmide in die Bakterien wurde mittels *Heatshock* durchgeführt. Die vorliegenden Plasmide wurden jeweils mit sterilem Wasser auf eine Konzentration von 100 ng / μ l runter verdünnt, die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und kurz gemischt. 100 μ l der entsprechenden *E. coli* Bakterien wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt, 4 μ l des Plasmids wurden hinzu pipettiert und die Bakterien-Plasmid-Mischung wurde für 10 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße für 50 Sekunden in einem 42 °C warmen Wasserbad erwärmt und sofort im Anschluss für 2 Minuten auf Eis gelagert. Dann wurden 950 μ l S.O.C.-Medium zur Steigerung der Transformationseffizienz zugegeben und für 1 Stunde bei 37 °C und 225 rpm gerüttelt. Nachfolgend wurden die Plasmide mittels einer Tischzentrifuge herunterzentrifugiert.

Das Plattieren auf Agarplatten (hergestellt aus LB Agar) erfolgte unter der Atmosphäre einer Sicherheitswerkbank. 600 μ l des Überstandes wurde auf eine Agarplatte pipettiert, das Pellet wurde im restlichem Überstand resuspendiert und dieser auf eine zweite Agarplatte pipettiert. Das Ausstreichen des Pellets sowie des Überstandes erfolgte dann mithilfe eines Streichbügels, welcher vorher kurz in der Flamme eines Bunsenbrenners erhitzt und wieder erkalten gelassen wurde. Hierbei wurde jeweils zuerst die Agarplatte mit dem resuspendierten Pellet und danach der Überstand auf der Platte ausgestrichen. Die Platten wurden dann über Nacht in einem Wärmeschrank bei 37 °C zur Kultivierung gelagert. Am darauffolgenden Tag wurde bei positivem Bewuchs der Platte eine Kultur zum Wachstum der Bakterien angesetzt. Hierzu wurde von der weniger dicht bewachsenen Platte eine Kolonie mithilfe einer Pipettenspitze aufgenommen. Die Kolonie wurde in einen sterilisierten, 500 ml-fassenden Glaskolben mit 100 ml LB-Medium durch mehrfaches Pipettieren in das Medium eingebracht und anschließend die Pipettenspitze im Medium abgeworfen. Diese Kultur wurde über Nacht in einem Rüttler bei 37 °C und einer Drehzahl von 250 - 300 / Minute inkubiert. Der Glaskolben wurde mittels Alufolie verschlossen, wobei die Alufolie an einer Seite minimal angehoben wurde, um eine Luftzirkulation mit der Raumluft zu gewährleisten. Am darauffolgenden Tag wurde bei Eintrübung der Kultur die Aufreinigung des Plasmids mithilfe des

EndoFree Plasmid Maxi Kits gemäß den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Zur dauerhaften Lagerung der Bakterienkultur wurde zudem eine Glycerol-Stocklösung wie folgt angesetzt: 500 µl der angesetzten Bakterienkultur wurden unter sterilen Bedingungen mit 500 µl Glycerol (Glycerin 85 %) in einem 1,5 ml fassenden Eppendorfgemisch und bei -20 °C eingefroren. Nach der Aufreinigung wurden die erhaltenen Plasmide auf Eis gelagert und die Konzentration mithilfe eines Spektrofotometers gemessen. Zur späteren Verwendung erfolgte die Lagerung der Plasmide bei -20 °C.

2.5 Virenproduktion und Infektion der PASMIC

2.5.1 Verwendetes Vektorsystem

In der vorliegenden Arbeit kam ein aus drei Plasmiden bestehendes Vektorsystem zum Einsatz (Aktenzeichen der Genehmigung nach Gentechniksicherheits-Verordnung: IV44-53r30.03 UGI125.13.01). Es bestand aus dem Transfer-Plasmid pWPXL mit der kodierenden Sequenz für den Förster-Resonanzenergietransfer-Sensor *Mermaid*, dem *Packaging*-Plasmid psPAX2 sowie dem *Envelope*-Plasmid pMD2.G. Die Klonierung der Sequenz erfolgte wie unter 2.4.1 beschrieben von Herrn Dr. Tim Mayer (Arbeitsgruppe Prof. A. Dietrich, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, München) und ist Bestandteil seiner Dissertationsschrift. psPAX2 stellt ein *Packaging*-Konstrukt der 2. Generation dar, bei welchem alle akzessorischen Gene mit Ausnahme von *Tat* und *Rev* deletiert wurden. Zur Sicherung eines breiten Zelltropismus wurde die Pseudotypisierung des Virus mit VSV-G (Glykoprotein des Vesicular-Stomatitis-Virus) durch Verwendung von pMD2.G durchgeführt.

2.5.2 Calciumphosphatpräzipitation und Virenernte

Die Viren wurden mithilfe der bereits beschriebenen Plasmide pMD2.G, psPAX2 und des *Mermaid* enthaltenden pWPXL-Plasmids produziert. Die Plasmide wurden durch transiente Transfektion in HEK 293T-Zellen eingeschleust, die als Produzenten der Viren dienten. Die von den HEK 293T-Zellen produzierten Viren konnten dann durch Sammeln des Zellkulturmediums geerntet werden. Als Transfektionsmethode wurde die Calciumphosphatpräzipitation anhand des Protokolls *Production of lentivectors by Calcium phosphate in 293T cells* von Tronolab EPFL aus dem Jahr 2007 durchgeführt. Grundlage dieser erstmals im Jahr 1973 von Graham et al. beschriebenen Technik [30]

ist die Bildung von Calciumphosphat-Kopräzipitaten unter Einbezug der DNA in übersättigter Lösung [42]. Das beschriebene Protokoll kam im Rahmen dieser Arbeit in leicht modifizierter Form zur Anwendung: Aufgrund mangelnder Präzipitatbildung (visuelle Kontrolle mittels Mikroskop) wurden der pH-Wert der 2-fachen HBS-Lösung sowie des 0,1-fachen TE-Puffers wie folgt angepasst. Der pH-Wert der 2-fachen HBS-Lösung wurde auf 7,05 eingestellt sowie der pH-Wert des 0,1-fachen TE-Puffers auf 7,6. Diese Modifikationen wurden einem Protokoll nach Zhang et al. entnommen [101]. Eine Präzipitatbildung konnte daraufhin beobachtet werden. Die Rezepturen der Puffer sind in Kapitel 2.1.6.2 bereits näher beschrieben worden.

Am Spätnachmittag des Vortages der geplanten Transfektion wurden auf fünf Zellkulturplatten mit 15 cm Durchmesser jeweils 11×10^6 HEK 293T-Zellen ausgesät. Als Zellkulturmedium wurde DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Vor Passagieren der HEK 293T-Zellen wurde dabei eine Probe des verbrauchten Zellkulturmediums zur Durchführung eines Mykoplasmentests entnommen. Für die DNA-Extraktion wurde das *DNEasy Blood & Tissue Kit* verwendet, für die Testung auf Mykoplasmen DNA das *PCR MykoplasmaTest Kit I/C*, jeweils nach Protokollangaben des Herstellers. Bei nachgewiesener Mykoplasmenfreiheit wurden die HEK 293T-Zellen am darauffolgenden Tag in eine Gentechnische Anlage der Sicherheitsstufe 2 überführt. Die im Folgenden beschriebenen Arbeiten zur Produktion des viralen Vektorsystems fanden in der Gentechnischen Anlage der Sicherheitsstufe 2 statt. Die Transfektion wurde gemäß Protokoll bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 70 % durchgeführt. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Zellkulturmedium durch 22,5 ml vorgewärmtes DMEM mit 2 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin pro Zellkulturplatte ersetzt. Da für die Transfektion eine Zeitdauer von 14-16 Stunden benötigt wurde, wurde die Transfektion am frühen Abend begonnen. Die Transfektionslösung wurde hierbei in einem 50 ml-Falcon-Röhrchen wie in Tabelle 2.4 beschrieben vorbereitet. Wichtige Einflussfaktoren der Präzipitatbildung stellen – neben den Calcium- und Phosphatkonzentrationen der Transfektionslösung – der pH-Wert, die Temperatur, die DNA-Konzentration sowie der Serumgehalt des Transfektionsmediums dar [42]. Auch die Volumina der Lösungen sowie die Geschwindigkeit der Zugabe der 2-fachen HBS-Lösung beeinflussen die Kopräzipitation [42]. Besonders wichtig war die exakte Einstellung des pH-Wertes, insbesondere der 2-fachen HBS-Lösung, sowie die langsame, tropfenweise Zugabe der HBS-Lösung, um die Bildung der

Calciumphosphatkristalle zu ermöglichen [42]. Der eingestellte pH-Wert wurde vor Virenproduktion nochmals überprüft und gegebenenfalls auf den exakten Wert korrigiert. Das doppelt destillierte, sterile H₂O wurde einer Reinstwasseranlage entnommen, nach Entnahme autoklaviert, steril filtriert (0,22 µm) und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert. Nach dem letzten Schritt der Herstellung der Transfektionslösung, dem tropfenweisen Zugabe der 2-fachen HBS-Lösung, wurde 5 Minuten gewartet. Die Transfektionslösung befand sich dabei bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 2,25 ml der Transfektionslösung tropfenweise unter kreuzweisem Schwenken der Zellkulturplatte auf jede Platte getropft. Die Zellkulturplatten wurden danach im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre gelagert. 1-2 Stunden nach Transfektion wurde die Bildung der Calciumphosphatkristalle mittels Mikroskop überprüft (Abbildung 2-1).

Schritt	Volumen bzw. Masse	Bestandteil	Zusammensetzung
1	Vorgelegt wurde in einem 50 ml Falcon-Röhrchen		
	3,3 ml	0,1-facher TE-Puffer	1 mM Tris 0,1 mM EDTA pH 7,6
2	Dann wurde hinzupipettiert:		
	112,5 µg	<i>Mermaid</i> in pWPXL	
	39,5 µg	pMD2G	
	73 µg	psPAX2	
	1,75 ml	doppelt destilliertes, steriles H ₂ O	
	565 µl	2,5 M CaCl ₂	
3	Dieser Ansatz wurde kurz gemixt, dann wurden tropfenweise unter vortexen hinzugegeben:		
	5,7 ml	2-fache HBS-Lösung	140 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM HEPES pH 7,05

Tabelle 2-4 Protokoll zur Transfektion von HEK 293T-Zellen mittels Calciumphosphatpräzipitation.

Der erste Wechsel des Kulturmediums, das sich in den Zellkulturplatten befand, erfolgte nach 14-16 Stunden, wobei das Zellkulturmedium entsorgt und durch 22,5 ml frisches Kulturmedium pro Zellkulturplatte ersetzt wurde. Das Sammeln des Viren-enthaltenden Kulturmediums begann 12 Stunden später und erfolgte zwei bis drei Mal im 12 Stunden-Rhythmus. Dabei wurde das Kulturmedium gesammelt, bei 4 °C gelagert und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Das gesammelte Zellkulturmedium der verschiedenen Zeitpunkte wurde dabei gepoolt. Nach dem letzten Sammeln des Mediums wurde der Pool für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand mithilfe eines 0,22 µm-Filter filtriert, um im Zellkulturmedium befindliche Zelltrümmer zu entfernen. Die Überstände wurden entweder direkt zur Infektion von primären PSMC herangezogen oder aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

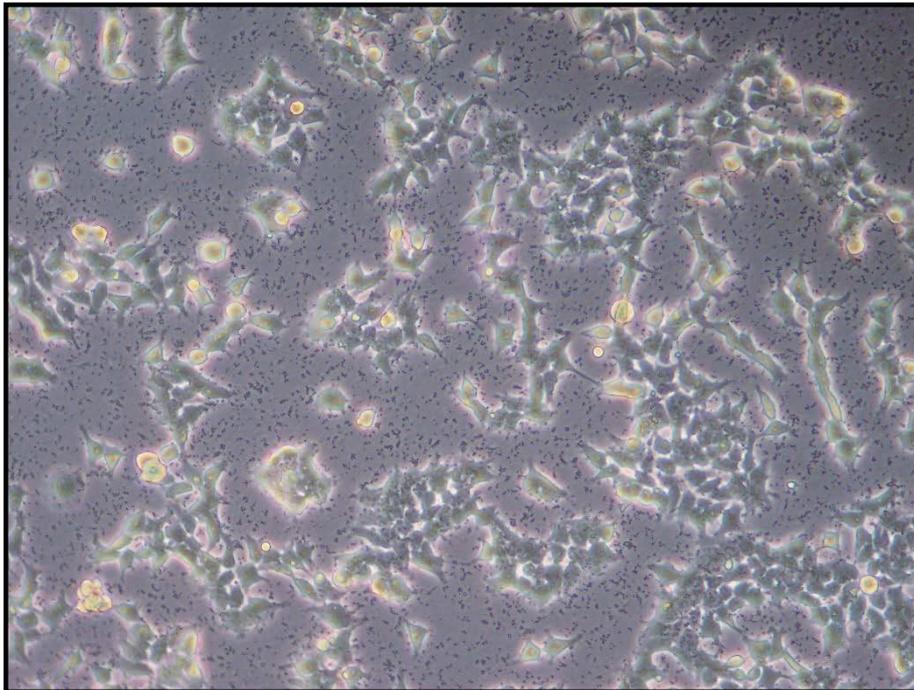


Abbildung 2-1 HEK 293T-Zellen mit Calciumphosphatpräzipitaten. Lichtmikroskopische Aufnahme der HEK 293T-Zellen mit Präzipitaten 2 Stunden nach Zugabe der Transfektionslösung. 100-fache Vergrößerung.

2.5.3 Infektion der primären PSMC

Die Infektion der primären PSMC erfolgte je nach Wachstum 5-6 Tage nach Isolierung und wurde mit unkonzentrierten, Viren-enthaltenden Überständen durchgeführt. Diese wurden, falls nicht direkt nach Produktion verwendet, am Tag der Infektion auf Eis oder

über Nacht vor der Infektion bei 4 °C aufgetaut. Zur Infektion wurden die PASMC in die Gentechnische Anlage der Sicherheitsstufe 2 transferiert. Zunächst wurde das Zellkulturmedium entfernt und für die Infektion jeweils 4 ml Viren-enthaltender Überstand pro *well* einer 6 *well* Zellkulturplatte verwendet. Zusätzlich wurde Polybrene (Endkonzentration 8 µg / ml Überstand) in den Viren-enthaltenden Überstand der *wells* pipettiert und die Zellkulturplatten kreuzförmig geschwenkt. Polybrene (Hexadimethrinbromid), ein kationisches Polymer mit einem Molekulargewicht von 3,6 kDa, steigert die Transduktionseffizienz, indem es durch die Maskierung von negativer Ladung der Zelloberfläche der PASMC die Abstoßung der Viruspartikel von der Zelloberfläche reduziert [14]. Die Zellkulturplatten mit den infizierten PASMC wurden dann für 6 Stunden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten. Es wurde ein Zeitraum von 6 Stunden gewählt, da eine längere Infektionsdauer zwar eine bessere Sensorexpression in den PASMC, jedoch auch eine stärkere Veränderung der Zellmorphologie bewirkt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Überstände entfernt und durch 2 ml frisches *Smooth Muscle Cell*- Medium mit 15 % FCS sowie 1 % Penicillin/Streptomycin ersetzt. Vor Überführung der PASMC in eine Gentechnische Anlage der Sicherheitsstufe 1 wurden die PASMC drei Mal mit erwärmtem DPBS (DPBS *without Ca and Mg*) gewaschen, um Viren-Rückstände zu entfernen. Die PASMC wurden am dritten Tag nach Infektion für die Versuche verwendet.

2.5.4 Darstellung der *Mermaid*-Expression in PASMC

Zur hochauflösenden Darstellung der *Mermaid*-Expression wurden Aufnahmen mithilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops angefertigt (TCS SP5 X). Die Aufnahmen erfolgten mit fixierten PASMC, die mit *Mermaid* infiziert waren. Die Fixierung, der nachfolgende Waschschrift sowie das Eindecken mit DAKO *fluorescent mounting medium* erfolgte wie bereits in Kapitel 2.3 beschrieben. Zur Anregung des Donors wurde ein Argonlaser (Anregungswellenlänge 458 nm) verwendet und das emittierte Fluoreszenzlicht im Bereich von 470-540 nm detektiert. Für die direkte Anregung des Akzeptors wurde ein Weißlichtlaser verwendet (Anregungswellenlänge 551 nm) und das emittierte Fluoreszenzlicht wurde im Bereich von 568-587 nm detektiert. Als Software diente die *Leica Application Suite Advanced Fluorescence* (LAS AF) auf einem Personalcomputer (HP xw8600 Workstation).

2.6 Live Cell Imaging

Für alle nachfolgend beschriebenen Versuchsprotokolle wurden PASMC verwendet, die sich auf runden Deckgläsern mit einem Durchmesser von 18 mm befanden. Als Zellkulturmedium diente SMC-Medium mit 15 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin.

2.6.1 Allgemeiner Versuchsaufbau der Fluoreszenzmikroskopie

Für die nachfolgend in den Kapiteln 2.6.2 sowie 2.6.3 beschriebenen Versuche wurde ein inverses Mikroskop (Olympus IX-71) mit einem Monochromator Polychrome V mit einer 150 W Xenon-Lampe verwendet. Nach Anregung der PASMC mit der jeweils notwendigen Anregungswellenlänge passierte das emittierte Fluoreszenzlicht zunächst den Strahlteiler und die entsprechenden Emissionsfilter und wurde schließlich von einer CCD Kamera detektiert und digitalisiert. Das von der Kamera digitalisierte Signal wurde dann an einen Personalcomputer mit der Software TILLvision weitergeleitet. Die Details der Filtersätze und Anregungswellenlängen sind in den jeweiligen Kapiteln beschrieben. Für die Versuche mit Perfusion wurde ein geschlossenes Zellkammer-System verwendet und für die Versuche mit direkter Zugabe von Stimulanzen wurde eine offene Zellkammer verwendet (jeweils POCmini).

2.6.2 Mangan-Quenching mittels Fura-2 AM

2.6.2.1 Messprinzip

Fura-2 AM ist ein membrangängiges Derivat des Ca^{2+} -Chelators Fura-2, welcher zur Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verwendet werden kann [33]. Das Absorptionsspektrum ist abhängig von der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Erfolgt die Anregung mit den Wellenlängen 340 nm sowie 380 nm, ändert sich in Abhängigkeit von der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die Intensität der jeweiligen emittierten Fluoreszenz. Mit zunehmender $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nimmt die Fluoreszenzintensität nach Anregung mit 340 nm zu während sie nach Anregung mit 380 nm abnimmt. Folglich ist der Quotient (Ratio) aus beiden Intensitäten (F_{340}/F_{380}) proportional zu $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

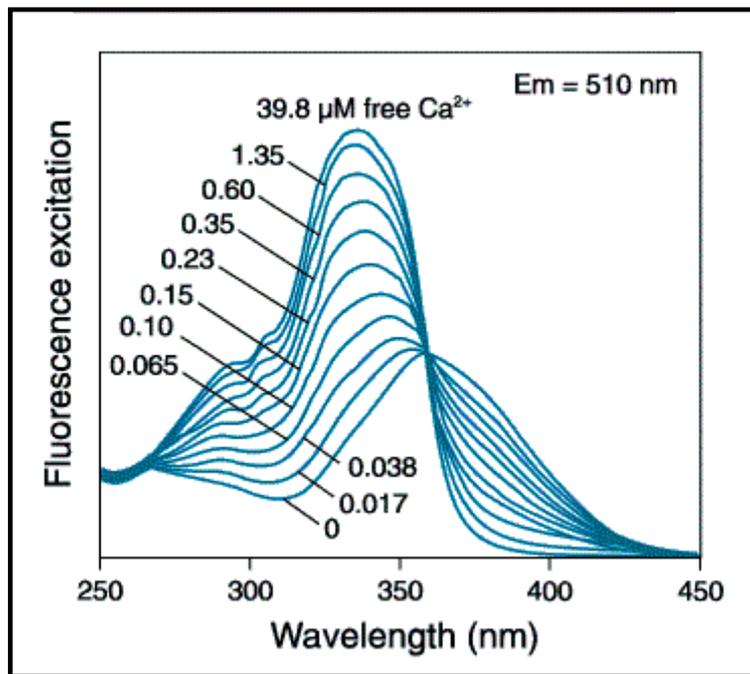


Abbildung 2-2 Fluoreszenzexcitationsspektrum des Ca²⁺-Indikators Fura-2 [aus [81]]. Binden Calciumionen an den fluoreszierenden Calciumchelator Fura-2, nimmt die emittierte Fluoreszenzintensität nach Anregung mit 340 nm zu und nach Anregung mit 380 nm ab, und zwar bei fast identischem Emissionsspektrum. Der isosbestische Punkt, an welchem die Intensität der emittierten Fluoreszenz unabhängig von einer Änderung der [Ca²⁺]_i ist, liegt bei einer Anregungswellenlänge von 358-362 nm. Genutzt mit Genehmigung von Thermo Fisher Scientific copyrighted 2018. Used with permission from Thermo Fisher Scientific copyrighted 2018.

Am sogenannten isosbestischen Punkt (bei 360 nm Anregungswellenlänge) ist die Intensität der Fluoreszenzemission allerdings unabhängig von der [Ca²⁺]_i. Neben einer hohen Selektivität für Calciumionen kann Fura-2 auch andere divalente Kationen wie beispielsweise Mangan binden [33]. Versetzt man das extrazelluläre Medium mit Mangan und kommt es durch einen Stimulus zum Öffnen von Ionenkanälen und damit zum Einstrom von Manganionen in den Intrazellularraum, kann dieses an Fura-2 binden. Es resultiert dann ein Quenching-Effekt, d. h. die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts von Fura-2 sinkt. Eine Abnahme der Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts ist somit ein Maß für den Manganeinstrom. Dadurch kann die Aktivierung eines nicht-selektiven Kationenkanals untersucht werden. Als konkretes Beispiel kann diese Methode zur funktionellen Charakterisierung der Hypoxie-induzierten Aktivierung des nicht-selektiven TRPC6-Kationenkanals in PSMC der Maus [93] verwendet werden.

2.6.2.2 Versuchsaufbau

Für die Durchführung der Perfusionsversuche wurden die PASMCS, die sich in einer geschlossenen Zellkammer befanden, mittels eines Perfusionssystems mit einer Manganchlorid (MnCl_2)-Lösung, die 4 nM ET-1 enthielt, perfundiert. Als Grundlage für die MnCl_2 -Lösung diente Hepes-Ringer-Lösung, wobei MnCl_2 in einer Endkonzentration von $100 \mu\text{M}$ in der Lösung vorlag. Zur Herstellung wurden eine 30 mM MnCl_2 -Stocklösung sowie eine $200 \mu\text{M}$ ET-1-Stocklösung verwendet. Der pH-Wert der verwendeten Hepes-Ringer-Lösung wurde jeweils am Tag der Versuche, frühestens jedoch am Vortag, unter kontinuierlichem Rühren mit 4-5 ml einer 5 M NaOH-Lösung unter Verwendung eines pH-Meters auf einen pH-Wert von $7,4 \pm 0,01$ eingestellt. Das Rezept der Stocklösung ist in Kapitel 2.1.6.3 näher beschrieben. Im Versuch wurde das Perfusat zunächst in doppelwandigen Glasgefäßen mittels umströmendem, $33 \text{ }^\circ\text{C}$ -warmem Wasser im Gegenstromprinzip auf $33 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt. Das Perfusat wurde dann mithilfe einer Schlauchpumpe über ein ebenfalls im Gegenstromprinzip mit Wasser beheiztes, aus Metall bestehendes Leitungssystem sowie gasdichte Schläuche zur Zellkammer des Mikroskops geleitet (Abbildung 2-3)

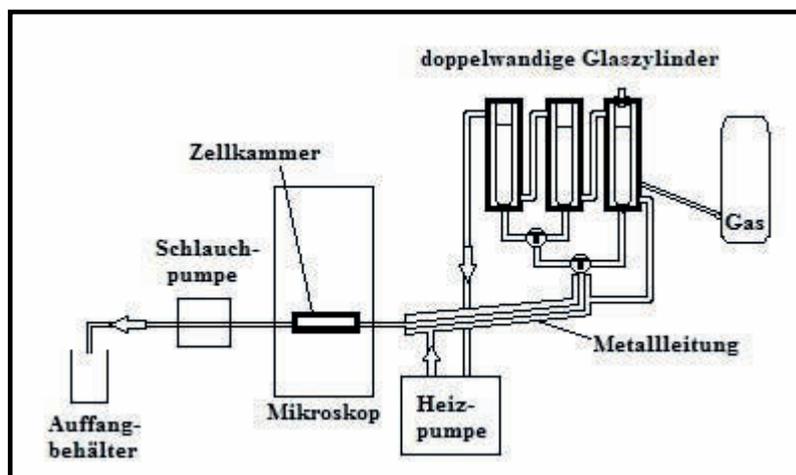


Abbildung 2-3 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Perfusionsversuche. Das Perfusat wurde in doppelwandigen Glasgefäßen im Gegenstromprinzip erwärmt und per Schlauchpumpe durch die Zellkammer geleitet.

Die Zellkammer besaß einen metallenen Einlass sowie Auslass, sodass das Perfusat gut in die geschlossene Zellkammer ein- sowie ausgeleitet werden konnte. Eine konstante Perfusion von $0,5 \text{ ml / Minute}$ wurde mithilfe einer Schlauchpumpe gewährleistet,

welche dem ausleitenden, abführenden Perfusatschlauch der geschlossenen Zellkammer nachgeschaltet war. Zur Erhaltung der Versuchstemperatur wurden der Mikroskopisch sowie die darauf eingespannte Zellkammer über einen integrierten Heizmechanismus auf 33 °C beheizt. Für Versuche unter hypoxischen Bedingungen wurde das Perfusat vor Versuchsbeginn für mindestens 60 Minuten mit 100 % Stickstoff begast. Hierfür wurde das doppelwandige Glasgefäß, in das ein Begasungsanschluss integriert war, mit einem Gummistopfen mit Auslass für die entweichende Luft verschlossen. Der Stickstoff wurde im unteren Drittel des Glasgefäßes über den integrierten Anschluss eingeleitet. Für normoxische Bedingungen zur Durchführung der Kontrollversuche wurde die $MnCl_2$ -Lösung im offenen Glaszylinder unter Raumatmosphäre wie oben beschrieben erwärmt. Insgesamt wurden für den Versuchsaufbau drei Glaszylinder mit Perfusat benötigt: ein Zylinder für das normoxische Medium ohne $MnCl_2$, ein Zylinder für das normoxische Medium mit $MnCl_2$ und 4 nM ET-1 sowie ein Zylinder für das hypoxische, mit $MnCl_2$ und 4 nM ET-1 versetzte Medium. Die Zylinder waren über zwei metallene 3-Wege-Hähne verbunden, sodass das Perfusat durch Umschalten des entsprechenden 3-Wege-Hahns während des Versuchs ohne Unterbrechung der Perfusion gewechselt werden konnte.

2.6.2.3 Versuchsablauf

Die Eisenpartikel-enthaltenden Gefäßstückchen wurden nach Isolierung auf sterilisierte Deckgläser (Ø 30 mm) ausgesät und mit *Smooth Muscle Cell*-Medium überschichtet. Je nach Wachstum wurden die PASMC nach 5-7 Tagen für den Versuch verwendet. Vor Versuchsbeginn wurden die PASMC jeweils zweimal mit warmer HEPES-Ringer-Lösung gewaschen, um sie anschließend mit 5 µM Fura-2 AM zu beladen. Die Zusammensetzung der Inkubationslösung lautete wie folgt: 5 µl Fura-2 AM Stocklösung (1 mM, gelöst in DMSO) und 100 µl BSA (1 % in HEPES-Ringer-Lösung) wurden pro ml HEPES-Ringer-Lösung zugesetzt. Zur Beladung der PASMC wurden diese mit der Fura-2-Inkubationslösung versetzt und für 1 Stunde lichtgeschützt bei 37 °C im Wärmeschrank gelagert. Vor Versuchsbeginn wurde die Fura-2 AM Lösung entfernt, indem die PASMC zweimal mit warmer HEPES-Ringer-Lösung gewaschen wurden. Nach dem Waschen und Einsetzen des Deckglases in die Zellkammer sowie Verschließen derselben mit einem weiteren sterilisierten Deckglas (Ø 18 mm) wurde die Zellkammer in das Perfusionssystem eingebracht. Danach erfolgte eine 10-minütige Ruhephase, bevor mit dem Versuch begonnen wurde. Nach Festlegung der zu messenden PASMC im

Bildausschnitt der Software wurde die Messung mit einer Aufnahme­frequenz von 0,16 Hz (10 Aufnahmen / Minute) gestartet. Die Exzitation erfolgte mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 360 nm. Die Emission wurde nach Passieren des Strahlteilers sowie eines Emissionsfilters gemessen. Als Emissionsfilter diente ein Langpassfilter (> 515 nm). Während der ersten Minute des Versuchsprotokolls erfolgte die Perfusion für beide Versuchsansätze (Normoxie- und Hypoxie-Versuch) ausschließlich mit Hepes-Ringer-Lösung, d. h. ohne weitere Zusätze. Die Perfusion wurde dann in beiden Versuchsansätzen nach einer Minute auf eine Perfusion mit Hepes-Ringer-Lösung mit 4 nM ET-1 sowie 100 µM MnCl₂ umgestellt. Die Generierung hypoxischer Bedingungen erfolgte nach 6 Minuten durch Umstellung der Perfusion auf die mit mindestens seit 1 Stunde mit Stickstoff begasten Hepes-Ringer-Lösung supplementiert mit 4 nM ET-1 sowie 100 µM MnCl₂. Die Versuchsdauer betrug insgesamt 35 Minuten. Der Versuchsablauf ist in Tabelle 2-5 als Übersicht dargestellt:

Zeitpunkt	Normoxie-Versuch	Hypoxie-Versuch
Zu Beginn	Hepes-Ringer-Lösung	Hepes-Ringer-Lösung
Zur 1. Minute	Hepes-Ringer-Lösung mit – 100 µM MnCl ₂ – 4 nM ET-1	Hepes-Ringer-Lösung mit – 100 µM MnCl ₂ – 4 nM ET-1
Zur 6. Minute		Hypoxische Hepes-Ringer-Lösung mit – 100 µM MnCl ₂ – 4 nM ET-1
Zur 35. Minute	– Ende	– Ende

Tabelle 2-5 Versuchsablauf der Mangan-Quenching-Versuche. Angegeben sind die Zeitpunkte der Umstellung auf die jeweilige Perfusionslösung, jeweils für den normoxischen bzw. hypoxischen Versuchsansatz.

2.6.2.4 Auswertung der Daten

Die Rohdaten wurden nach Abschluss der Messung aus der Software TILLvisION extrahiert und jeweils die gemessene Hintergrundfluoreszenz subtrahiert. Es erfolgte daraufhin die sogenannte Normalisierung des jeweils ersten Messwertes jeder Zelle auf den Wert 100 %, worauf dann alle Messwerte der jeweiligen Zelle bezogen wurden. Die Messwerte der PASMC zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden schließlich als

Mittelwert in einem Graph dargestellt. Zur Bestimmung der Mangan-Quenching-Rate für jede Messreihe wurde die Steigung der Messkurve von der 16.-17. Minute berechnet: jeweils 3 aufeinander folgende Messzeitpunkte um die 16. und 17. Minute (d. h. bei 16. Minute: 15:54, 16:00 und 16:06, und bei 17. Minute: 16:54, 17:00 und 17:06) wurden gemittelt und die Steigung zwischen den gemittelten Messwerten der 16. und 17. Minute berechnet (siehe Formel 2-1 und Tabelle 2-6).

	16. Minute [Zeitpunkt in Minuten: Sekunden]	17. Minute [Zeitpunkt in Minuten: Sekunden]
Messzeitpunkte	15:54 16:00 16:06	16:54 17:00 17:06

Tabelle 2-6 Messzeitpunkte zur Berechnung der Mangan-Quenching-Rate. Zur Berechnung der Steigung wurden jeweils 3 aufeinander folgende Messzeitpunkte um die Minute 16 sowie Minute 17 gemittelt. Angabe der Zeitpunkte in Minuten: Sekunden.

Die Mangan-Quenching-Rate wurde jeweils für Versuche unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen in ‰/Sekunde mit folgender Formel berechnet (Formel 2-2).

$$m = \frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{y_{\text{gemittelt}} (17. \text{ Minute}) - y_{\text{gemittelt}} (16. \text{ Minute})}{60 \text{ sec.}}$$

Formel 2-1 Formel zur Steigungsberechnung bei den Mangan-Quenching-Versuchen. Gemittelt bedeutet die Bildung des Mittelwertes der 3 aufeinanderfolgenden Messzeitpunkte um die 16. und 17. Minute.

$$\text{Mangan-Quenching-Rate} = m * 100 * (-1)$$

Formel 2-2 Formel zur Berechnung der Mangan-Quenching-Rate.

Die Darstellung der Daten erfolgte soweit nicht anders angegeben als Mittelwert (MW) ± Standardfehler (SEM).

2.6.3 FRET-Messungen mit *Mermaid*

2.6.3.1 Versuchsaufbau

Nach Isolierung der PASMIC wurden diese jeweils nach 5-6 Tagen mit Viren, die das Transfer-Plasmid mit der Gensequenz von *Mermaid* enthielten, infiziert. Vor Beginn des

Versuchs wurde die Expression von *Mermaid* in den PASMIC mithilfe eines Mikroskops (Leica DMIL) überprüft und nur bei ausreichender Fluoreszenzintensität für den Versuch verwendet. Die Versuche wurden mit dem in Kapitel 2.6.1 beschriebenen System durchgeführt. Es wurde der Anregungsfilter BrightLine HC 472/30 (d.h. durchlässig für 457-487 nm) sowie der Strahlteiler BS 495 verwendet. Das von den PASMIC emittierte Fluoreszenzsignal passierte den Strahlteiler BS 495 und wurde dann mittels Strahlteilers (*Optical insights Multispec 565*) und zwei parallelen Emissionsfiltern (BrightLine HC 520/35 (502,5-537,5 nm) und BrightLine HC 585/40 (565-605 nm)) bei 565 nm in zwei Wellenlängenbereiche getrennt. Dies diente dazu, das Fluoreszenzsignal des Donor- sowie des Akzeptor-Fluorophors zu separieren. Zur Anregung des Donor-Fluorophors wurde monochromatisches Licht der Wellenlänge 460 nm verwendet und eine Exzitationsdauer von jeweils 50 ms gewählt. Alle im Versuch verwendeten Lösungen wurden auf 33 °C erwärmt, um zusätzliche Effekte auf die PASMIC und damit auf die Versuchsergebnisse durch Temperaturunterschiede zu vermeiden.

2.6.3.2 Versuchsablauf

2.6.3.2.1 Stimulierung mit KCl

Bei ausreichender *Mermaid*-Expression nach Kontrolle mittels eines Mikroskops wurden die PASMIC mit warmer Hepes-Ringer-Lösung mehrfach gewaschen und anschließend in die offene Zellkammer des Versuchssystems transferiert. Nachfolgend wurde jeweils 1 ml warme Hepes-Ringer-Lösung vorgelegt, die Kammer dann auf dem Mikroskoptisch eingesetzt und auf 33 °C beheizt. Nach einer zehnmütigen Pause wurde ein Bildausschnitt mit PASMIC auf dem PC-Bildschirm festgelegt. Der Versuch wurde gestartet und die Bildaufnahme mit einer Aufnahme Frequenz von 0,5 Hz (30 Aufnahmen / Minute) ausgeführt. Eine Minute nach Versuchsbeginn wurde 1 ml KCl-Lösung (gelöst in Hepes-Ringer-Lösung) in die offene Kammer pipettiert. Zur Charakterisierung der Sensorreaktion von *Mermaid* auf verschiedene KCl-Konzentrationen wurde KCl in einer Endkonzentration von 25 mM, 50 mM sowie 100 mM verwendet. Als Kontrolllösung diente Hepes-Ringer-Lösung ohne Zusätze. Zum Ansetzen der KCl-Lösung diente eine 2 M Stocklösung, die in Hepes-Ringer-Lösung gelöst war.

2.6.3.2.2 *Stimulierung mit OAG*

Die Versuche wurden analog der unter 2.6.3.2.1 bereits beschriebenen Versuche durchgeführt. 500 µl warme Hepes-Ringer-Lösung wurde vorgelegt. Die Zugabe von 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) in unterschiedlichen Konzentrationen erfolgte nach der 1. Minute des Versuchsablaufes, jeweils in 500 µl Hepes-Ringer-Lösung. Als Endkonzentrationen wurden 100 µM, 200 µM oder 500 µM gewählt. Als Kontrolllösung diente das Lösungsmittel von OAG, Dimethyl sulfoxide (DMSO) verdünnt in Hepes-Ringer-Lösung. Die Verdünnung entsprach dabei der Konzentration von DMSO im Versuchsansatz mit 500 µM OAG. Die OAG-Lösungen wurden jeweils direkt vor Versuchsbeginn angesetzt. Zusätzlich wurde zu Beginn der 6. Minute jeweils 500 µl KCl-Lösung (100 mM Endkonzentration, Stocklösung 3 M KCl in Hepes-Ringer-Lösung) appliziert, um eine grundsätzliche Reaktionsfähigkeit der PASMC festzustellen. Als Versuchsdauer wurden insgesamt jeweils 10 Minuten gewählt. Der Versuch wurde mit einer Aufnahmefrequenz von 0,33 Hz (20 Aufnahmen / Minute) ausgeführt.

2.6.3.2.3 *Versuche unter hypoxischen Bedingungen*

Die Versuche unter hypoxischen Bedingungen erfolgten mittels eines Perfusionssystems wie unter 2.6.2.2 beschrieben. Die Perfusionslösungen sowie der Versuchstisch des Mikroskops wurden auf 33 °C vorgeheizt und die Perfusion der Lösung erfolgte mit einer konstanten Rate von 0,5 ml / Minute. Als Perfusionslösung wurde wie unter 2.6.2.2 beschrieben, ebenfalls Hepes-Ringer-Lösung verwendet. Um einen zu starken Verlust der Fluoreszenzintensität durch engmaschige Exzitationen des Sensors bei einer Versuchsdauer von 35 Minuten zu vermeiden, wurde als Aufnahmefrequenz 0,125 Hz (7,5 Aufnahmen / Minute) gewählt. Während der ersten Minute des Versuchs kam die Hepes-Ringer-Lösung ohne Zusätze zum Einsatz. Nach einer Minute wurde die Perfusion auf Hepes-Ringer-Lösung supplementiert mit 4 nM ET-1 umgestellt. Der Einstrom von ET-1 in die Kammer begann zur 3. Minute. Ab der 6. Minute wurde die Perfusion für die Versuche unter hypoxischen Bedingungen auf Stickstoff-begaste Hepes-Ringer-Lösung supplementiert mit 4 nM ET-1 umgestellt, wobei der Abfall des Sauerstoffpartialdrucks 2,5 Minuten nach Umstellung der Perfusionslösung begann. Bei den Kontrollversuchen, d. h. unter normoxischen Bedingungen, wurde die Perfusion mit unbegaster Hepes-Ringer-Lösung supplementiert mit 4 nM ET-1 beibehalten. Die Gesamtdauer der Experimente betrug jeweils 35 Minuten.

2.6.3.3 Auswertung der Daten

Die Rohdaten der FRET-Messungen wurden mit der Software TILLvisION erfasst und für die Auswertung exportiert. Die Auswertung der Daten erfolgte zunächst mithilfe der Software ImageJ und im Weiteren mit Hilfe von Microsoft Excel 2013.

Die folgenden Schritte beschreiben detailliert die Auswertung mit ImageJ:

1. Die Rohbilder wurden über die Funktion *Import* als Bildsequenz (*Image sequences*) importiert und in eine 32-bit Formatierung überführt.
2. Im nächsten Schritt wurden Helligkeit und Kontrast über die Funktion *Brightness/Contrast* eingestellt.
3. Zum Aufteilen – *Splitten* – der Bilder in die Einzelkanäle (Donor- und Akzeptoremissionssignal) wurde das *Plugin* „OIcut RGBmerge“ verwendet. Die einzelnen Teile wurden für die weitere Auswertung gespeichert.
4. Aufgrund eines geringen Bildversatzes wurde über die Funktion *transform* und *translate* eine Translation (Verschiebung in horizontale sowie vertikale Richtung) vorgenommen, um eine exakte Bildübereinstimmung für die Bildung der Ratio zu erreichen. Hierbei wurde der Donor-Kanal translatiert. Diese Translation wurde dann über eine Bildberechnung verifiziert (Subtraktion des Akzeptor-Kanals vom Donor-Kanal unter der Funktion *Image Calculator*).
5. Im nächsten Schritt erfolgte die Hintergrundkorrektur mithilfe des Makros *BG Subtraction from ROI*. Nach Markierung eines Hintergrundareals (*region of interest* (ROI)) wurde diese Hintergrundfluoreszenz mithilfe des Makros jeweils von dem entsprechenden Bild des Bildstapels subtrahiert. Diese Hintergrundkorrektur wurde jeweils entsprechend für den Donor- und für den Akzeptorkanal vorgenommen.
6. Zur entsprechenden Ratioberechnung wurde der Schwellenwert der Fluoreszenzintensität der beiden Bildserien über *Image* und *Adjust Threshold* angepasst. Der Schwellenwert wurde so gewählt, dass nur PSMC als

entsprechendes Intensitätssignal erkannt wurden. Die Hintergrundfluoreszenz wurde über *Set background pixels to NaN* herabgesetzt.

7. Die Ratiobildung erfolgte durch Division der Fluoreszenzemissionen über *Process* und dann *Image calculator*. Die Bildserie „mKOK“ wurde in Relation gesetzt zu „mUKG“ über die Operation *divide*.

Die weiteren Schritte beschreiben nun die Generierung eines Fluoreszenzbildes mit alleiniger Abbildung des Zellrandes.

8. Das berechnete Ratio-Bild wurde über eine Randerosion dreimal verkleinert und von der initial berechneten Ratio subtrahiert (Abbildung 2-4). Hierfür wurde die Bildserie unter *Image* und dann mit *duplicate* dupliziert und als „1“ bezeichnet. Zur Erstellung einer Randvorlage wurde der Schwellenwert des Duplikates angepasst: der obere Grenzwert wurde auf maximal gesetzt, die untere Grenze so angepasst, dass die PASMIC als Intensitätssignal erkannt wurden (nur die PASMIC werden rot dargestellt). Die Hintergrundfluoreszenz wurde nicht über *Set background pixels to NaN* herabgesetzt, jedoch der Hintergrund über *black background* angepasst.
9. Dieses so angepasste Duplikat wurde zur Erstellung einer Rand-Vorlage erneut dupliziert („1-1“) und dieses zweite Duplikat über die Funktion *Process* und dann *binary* und über *erode* durch Randerosion insgesamt dreimal verkleinert.
10. Zur letztendlichen Randbildung wurde dann das verkleinerte Duplikat („1-1“) vom 1. Duplikat („1“) subtrahiert (Funktion *Image Calculator* und dann *Subtract*).
11. Der letztendlich auszuwertende Rand der Zellmembran der eigentlichen Messserie wurde über die Funktion *Image Calculator* und dann *Multiply* berechnet, indem die Randschablone mit dem unter Schritt 5 erstellten Ratiobild multipliziert wurde.

Zur weiteren Analyse wurden die Messwerte der Fluoreszenzintensität über die Funktion *Stacks* und dann *plot z-axis profile* in einer Tabelle dargestellt und zur weiteren Analyse in ein Excel-Datenblatt eingefügt.

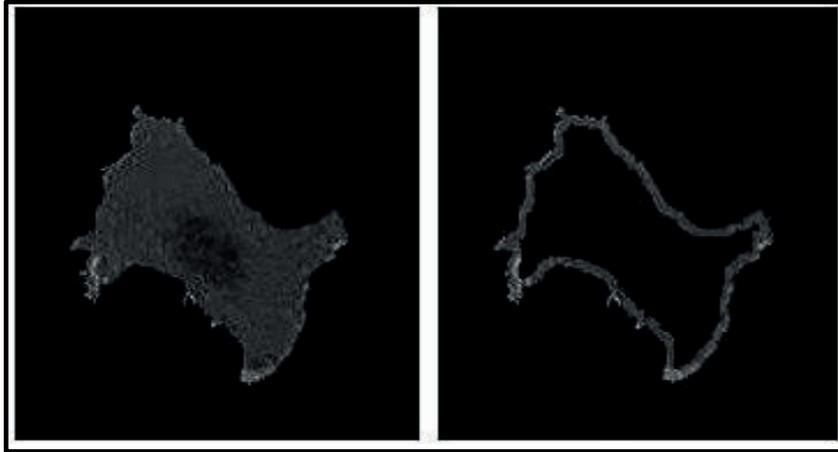


Abbildung 2-4 Auswertung der Versuche mit Mermaid-exprimierenden PASMIC mittels ImageJ. Die PASMIC wurden als gesamte Zellfläche (links) oder nur deren randständige Zellmembran (rechts) ausgewertet.

Zur Berechnung der Messwerte der verschiedenen PASMIC als Mittelwert \pm SEM erfolgte zunächst eine Normalisierung der einzelnen Messwerte, bezogen jeweils auf den ersten Messwert, der auf 100 % normalisiert wurde. Es wurden ausschließlich PASMIC ausgewertet, deren Fluoreszenzintensität des Donor-Fluorophors (mUKG) des exprimierten *Mermaids* mindestens eine dreifach höhere Fluoreszenzintensität verglichen mit dem Hintergrund aufwies. Ebenfalls wurde darauf geachtet, dass PASMIC, die einen Anstieg der Akzeptor-Fluoreszenzintensitäten zeigten, gleichzeitig auch einen Abfall der Donor-Fluoreszenzintensität aufwies. Ansonsten wurden die PASMIC, die einen Anstieg der Akzeptor-Fluoreszenzintensität aufwies, nicht ausgewertet.

2.6.3.3.1 Stimulierung mit KCl

Zur statistischen Auswertung der Änderung der FRET-Ratio von *Mermaid* zwischen den verschiedenen Konzentrationen wurden jeweils 5 aufeinanderfolgende Messwerte jeder einzelnen PASMIC direkt vor Zugabe des Stimulus (Messminute 0,8-0,9) sowie 5 aufeinanderfolgende Messwerte ab der 3. Minute (Messminute 3,0-3,1) des Versuchsablaufes als Mittelwert für jede gemessene PASMIC berechnet. Die Zugabe von KCl erfolgte 1 Minute nach Beginn der Messung. Der Wert nach Stimulierung (Mittelwert ab der 3. Messminute) wurde mithilfe des Mittelwertes vor Stimulierung normalisiert. Hierfür wurde mittels Dreisatz ein Normalisierungsfaktor auf 100 % anhand des Mittelwertes vor Stimulus-Zugabe berechnet. Die Intensitätsänderung der FRET-

Ratio wurde dann mittels Subtraktion berechnet indem 100 % vom Mittelwert nach KCl-Zugabe subtrahiert wurde. Die Angabe erfolgte als Mittelwert in $\% \pm \text{SEM}$. Die Auswertung ist schematisch in Abbildung 2-5 dargestellt.

2.6.3.3.2 *Stimulierung mit OAG*

OAG wurde 1 Minute nach Beginn der Messung appliziert. Zum Nachweis der Funktionalität von *Mermaid* wurde zur 6. Minute KCl appliziert. Die Mittelwertberechnung der Messwerte vor Stimulierung mit OAG (Minute 0,7-0,9) und zur 3. Minute (Minute 3,0-3,2) erfolgte wie unter 2.6.3.3.1 beschrieben. In gleicher Weise wurden jeweils 5 Messwerte vor KCl-Stimulierung (Minute 5,7-5,9) sowie zur 8. Minute (Minute 8,0-8,2) berechnet. Die Darstellung der Änderung der FRET-Ratio erfolgte jeweils als Mittelwert $\pm \text{SEM}$ in %. Die Auswertung ist schematisch in Abbildung 2-5 dargestellt.

2.6.3.3.3 *Versuche unter hypoxischen Bedingungen*

Für den Vergleich der Intensitätsunterschiede der FRET-Ratio unter hypoxischen bzw. normoxischen Bedingungen wurden jeweils 5 Messwerte ab Beginn der 16. Minute (Messzeitraum 16,0-16,5) pro PSMC gemittelt und als gemeinsamer Mittelwert $\pm \text{SEM}$ zusammengefasst und in % dargestellt. Die Auswertung ist schematisch in Abbildung 2-5 dargestellt.

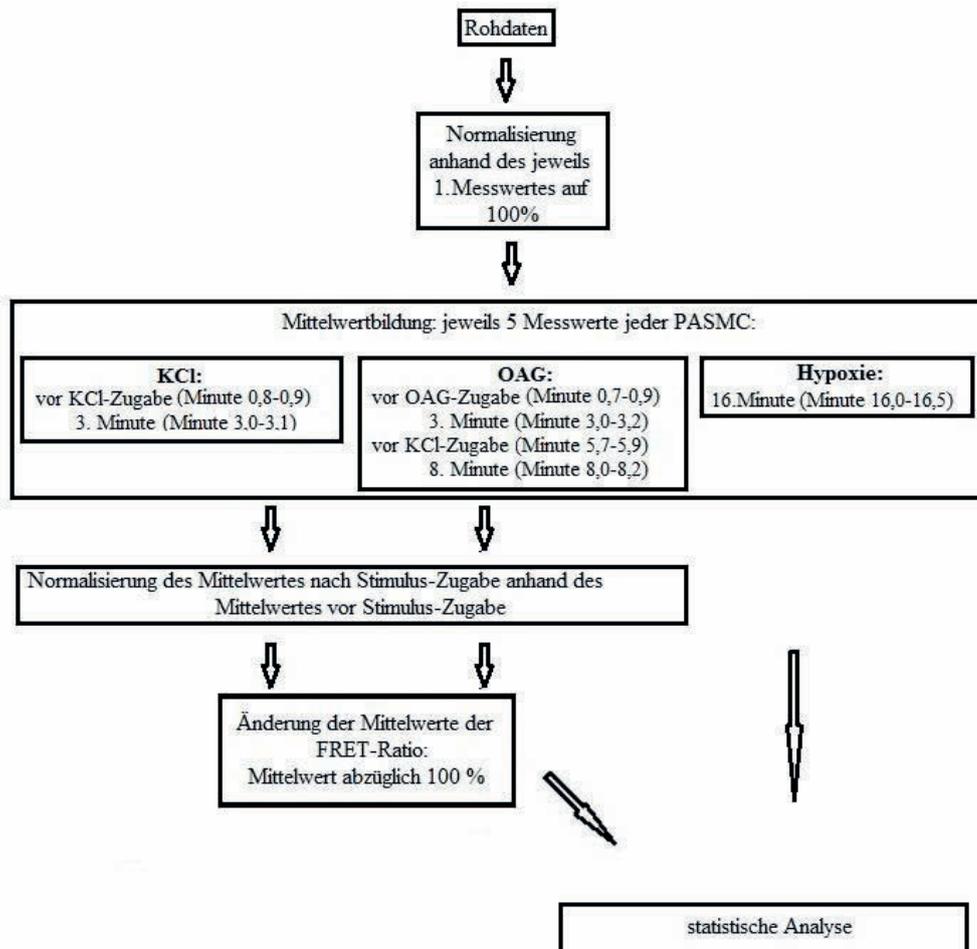


Abbildung 2-5 Schematische Darstellung der Auswertung der *Mermaid*-Versuche.

2.7 Messung des normobaren Sauerstoffpartialdrucks der hypoxischen Perfusionslösung

Zum Nachweis der hypoxischen Versuchsbedingungen der unter 2.6.2.2 sowie 2.6.3.2.3 beschriebenen Versuche, bei denen eine hypoxische Perfusionslösung über die sich in einer Zellkammer befindenden PASMIC geleitet wurde, wurde der normobare Sauerstoffpartialdruck der Perfusionslösung gemessen. Zur Messung und Aufzeichnung des normobaren Sauerstoffpartialdrucks mittels einer Sauerstoffsonde wurde ein Licox CMP *Tissue oxygen pressure monitor* verwendet. Da eine Messung des Sauerstoffpartialdrucks direkt in der geschlossenen Zellkammer nicht möglich war, wurde die Messelektrode in den Schenkel der abfließenden Perfusionslösung eingebaut.

Hierzu wurde in den Perfusatschlauch des abfließenden Schenkels ein T-Stück eingefügt, über welches die Elektrode vorsichtig bis zum Ausgang der Zellkammer vorgeschoben wurde. Die Versuchsbedingungen wurden, wie unter 2.6.2.2 sowie 2.6.3.2.3 beschrieben, hergestellt. Die Perfusionslösung wurde im Vorfeld mindestens für 60 Minuten mit 100 % Stickstoff begast sowie auf 33 °C erwärmt. Der Mikroskopisch wurde ebenfalls auf 33 °C erwärmt und die Perfusion erfolgte mit einer konstanten Rate von 0,5 ml / Minute. Die Erhebung der Messwerte erfolgte kontinuierlich alle 30 Sekunden über einen Zeitraum von 35 Minuten, wobei nach den ersten 3 Minuten mit normoxischer Perfusion auf hypoxische Perfusion mittels eines 3-Wege-Hahns umgeschaltet wurde. Die hypoxische Perfusion wurde dann bis zum Ende der Messung beibehalten. Die Aufzeichnung der Messwerte begann mit Umschalten des Perfusats auf hypoxisches Perfusat. Aufgrund der Platzierung der Elektrode am Ausgang der Zellkammer weist der Abfall des Sauerstoffpartialdrucks eine geringfügige zeitliche Verzögerung gegenüber des entsprechenden Abfalls in der Zellkammer auf.

2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism 5. Für die statistische Analyse mehrerer Versuchsgruppen wurde ein einfaktorieller ANOVA sowie der *Tukey's Multiple Comparison Test* verwendet. Für den Vergleich zweier Gruppen wurde der ungepaarte t-Test mit *Welch's correction* herangezogen. Soweit nicht anders angegeben erfolgten Berechnung und Darstellung als Mittelwert (MW) ± Standardfehler (SEM). Als signifikant wurden Unterschiede von $p < 0,05$ gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Zellisolierung und Charakterisierung der PASMC

3.1.1 Zellisolierung der PASMC

Die Isolierung der PASMC erfolgte mithilfe eines Agarose-Eisenpartikelgemisches, welches über die Pulmonalarterie in die Lungenflügel der Maus instilliert wurde. Nach Herausnehmen des Herz-Lungen-Blocks und Abkühlen, wodurch die Agarose fest wurde, wurden die Lungenlappen mechanisch zerkleinert und die extrazellulären Bindegewebsstrukturen sowie die Adventitia mittels Kollagenase verdaut und dadurch von den Gefäßstückchen abgelöst. Anschließend wurden die Gefäßstückchen, die die Eisenpartikel enthielten isoliert. Die Eisenpartikel-enthaltenden Gefäßstückchen wurden anschließend in Zellkulturmedium ausgesät, sodass ein Zellwachstum möglich war (Abbildung 3-1).

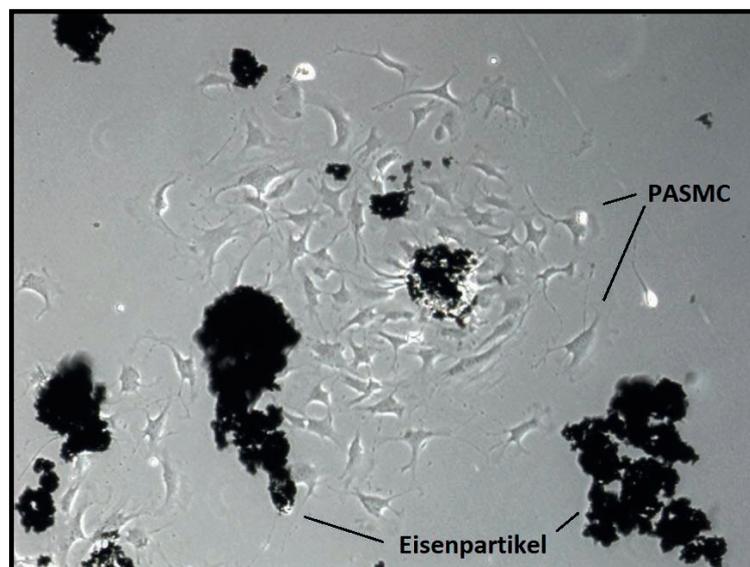


Abbildung 3-1 PASMC, die aus isolierten Eisenpartikel-enthaltenden Gefäßstücken der pulmonalarteriellen Gefäßstrombahn der Maus wuchsen. Aufnahme: 100-fache Vergrößerung.

3.1.2 Charakterisierung der PASMC

Zur Charakterisierung der isolierten PASMC erfolgte eine direkte Immunfluoreszenzfärbung mit einem für glattmuskuläres α -Aktin spezifischen, Cy3™ - gekoppelten Antikörper. Zusätzlich erfolgte eine Färbung der Zellkerne mit

DAPI. Beide Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit Exzitationslicht entsprechender Wellenlänge angeregt und jeweils ein Bild aufgenommen. Der gegen glattmuskuläres α -Aktin gerichtete Antikörper zeigte eine Fluoreszenz im roten Bereich und DAPI eine Fluoreszenz im blauen Bereich. Nach Aufnahme der beiden Bilder wurden diese übereinandergelegt, um den Zellkern sowie das glattmuskuläre α -Aktin gleichzeitig darzustellen (Abbildung 3-2).

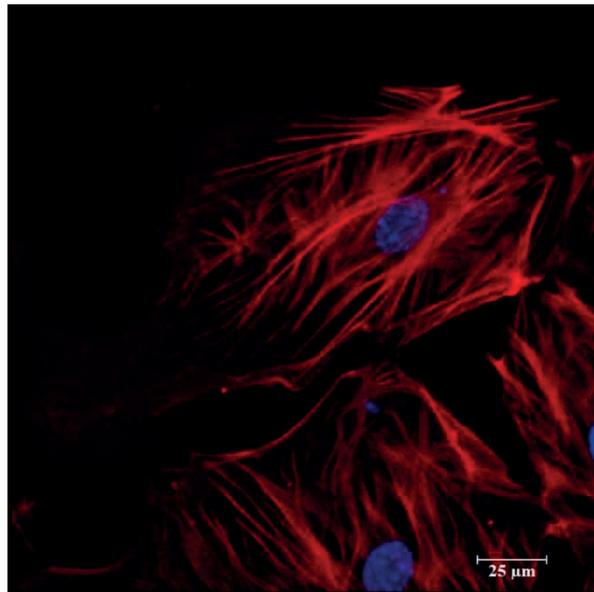


Abbildung 3-2 Direkte Immunfluoreszenzfärbung der PASMC aus der Maus. Das glattmuskuläre α -Aktin ist rot und die Kerne sind blau dargestellt. Maßstab: 25 μm .

3.2 Mangan-Quenching

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war die Etablierung eines Messsystems zur Detektion von Plasmamembranspannungsänderungen mittels *Mermaid* an primären PASMC unter hypoxischen Bedingungen. Als etablierte Vergleichsmethode zur indirekten Messung von Plasmamembranspannungsänderungen wurde das Mangan-Quenching durchgeführt. Extrazelluläre Manganionen gelangen nach Aktivierung von nicht-selektiven Kationenkanälen in die PASMC und *quenchen* das von Fura-2 AM emittierte Fluoreszenzlicht, das mit Licht der Wellenlänge von 360 nm angeregt wurde. In Abbildung 3-3 ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität von Fura-2 AM bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm (isosbestischer Punkt, d. h. calciumunabhängiger Punkt) unter hypoxischer bzw. normoxischer Perfusion dargestellt. Die initiale Perfusion

erfolgte mit Hepes-Ringer-Lösung ohne Zusätze. Nach 1 Minute wurde die Perfusion auf Hepes-Ringer-Lösung mit 4 nM ET-1 umgestellt. Zur 6. Minute erfolgte dann die Umstellung auf hypoxisches Perfusionsmedium, supplementiert mit 4 nM ET-1, bzw. normoxisches Perfusionsmedium, ebenfalls supplementiert mit 4 nM ET-1. Nach Umstellen auf hypoxisches Perfusat nahm die Fluoreszenzintensität im Vergleich mit normoxischem Perfusat stärker ab. Zur Auswertung eines Unterschiedes in der Abnahme des Fluoreszenzsignals zwischen hypoxischer und normoxischer Perfusion wurde die Mangan-Quenching-Rate ermittelt (Abbildung 3-4).

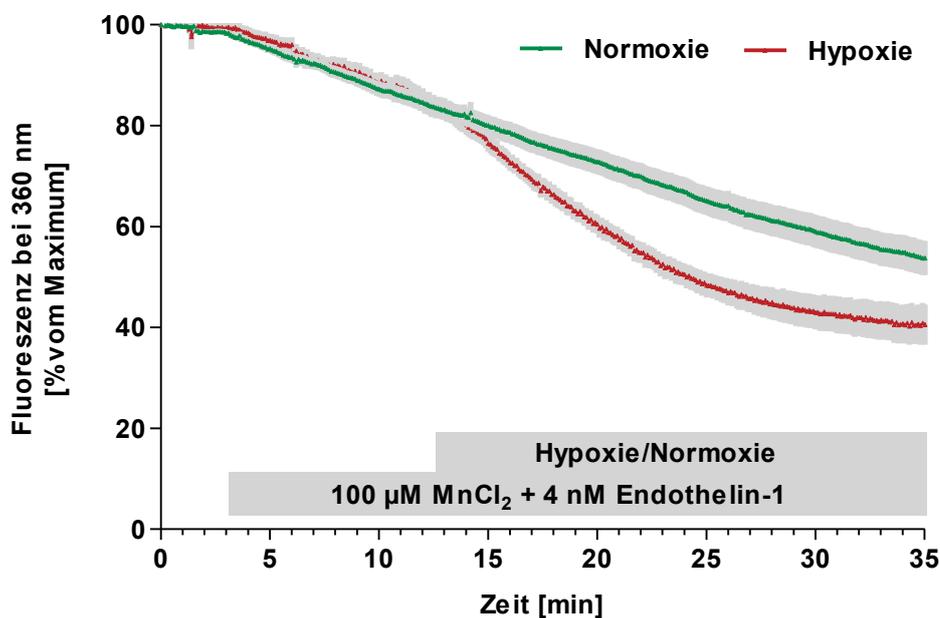


Abbildung 3-3 Mangan-Quenching in PASMCM unter hypoxischen sowie normoxischen Bedingungen. Abnahme der Fluoreszenzintensität von Fura-2 AM bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm. Jeweils der erste Messwert jeder Zelle wurde auf 100 % normalisiert. Die initiale Perfusion erfolgte mit Hepes-Ringer-Lösung ohne Zusätze, die Perfusion mit Manganchlorid (MnCl_2)-enthaltender Hepes-Ringer-Lösung wurde nach einer Minute umgestellt, wobei ab der 3. Minute das MnCl_2 -enthaltende Perfusat die Zellkammer erreichte. Das Perfusat wurde zur 6. Minute auf hypoxisches Perfusat umgestellt. Bei Minute 12,5 lag der pO_2 bei $41,3 \pm 5,0$ mmHg, zur 16. Minute lag der pO_2 im Mittel bei $25,5 \pm 2,7$ mmHg, siehe Kapitel 3.4. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. (Hypoxie $n = 7$, Normoxie $n = 15$, jeweils aus 3 verschiedenen Zellisolierungen).

Abbildung 3-4 stellt die Abnahme der Fluoreszenzintensität als Mangan-Quenching-Rate in $\text{‰}/\text{sec}$ dar. Die Mangan-Quenching-Rate unter hypoxischen Bedingungen zeigte eine signifikant stärkere Abnahme des Fluoreszenzsignals ($5,7 \pm 0,6 \text{ ‰} / \text{sec.}$) verglichen mit normoxischen Bedingungen ($2,9 \pm 0,2 \text{ ‰} / \text{sec.}$).

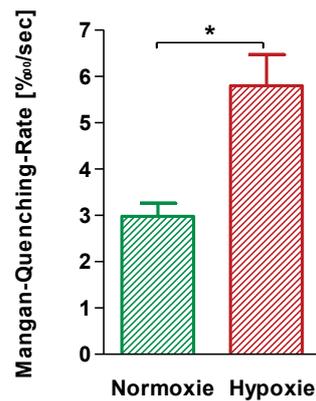


Abbildung 3-4 Mangan-Quenching-Rate in PASMCM unter hypoxischen sowie normoxischen Bedingungen. Dargestellt ist der Abfall der Mangan-Quenching-Rate als Mittelwert + SEM in %_{oo} / sec. (Hypoxie n = 7, Normoxie n = 15, jeweils aus 3 verschiedenen Zellisolierungen). * bezeichnet signifikante Unterschiede (p < 0,05).

3.3 FRET-Messungen mit *Mermaid*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der FRET-basierte Membranspannungssensor *Mermaid* für Messungen in primär isolierten PASMCM der Maus unter hypoxischen Bedingungen charakterisiert werden, um die zelluläre Signaltransduktionskaskade der HPV mit TRPC6 als Schlüsselkomponente weiter entschlüsseln zu können. Die primär isolierten PASMCM wurden mit *Mermaid*-kodierenden Lentiviren infiziert, um eine bessere Expression des Sensors im Vergleich zu einer Transfektion zu erreichen. Die Grundcharakterisierung wurde mit KCl in verschiedenen Konzentrationen zur Diskriminierung unterschiedlich stark depolarisierender Reize sowie mit OAG, einem direkten Aktivator von TRPC6, vorgenommen. Anschließend wurde die Membranspannungsänderung unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zu normoxischen Bedingungen, jeweils mit *Priming* durch 4 nM ET-1, gemessen.

3.3.1 *Mermaid*-Expression

Abbildung 3-5 zeigt exemplarisch *Mermaid*-exprimierende PASMCM. Dargestellt ist das emittierte Licht von Donor und Akzeptor nach spezifischer Anregung des jeweiligen Fluorophors. Abbildung 3-5 a zeigt das emittierte Licht von mUKG (Donor) nach Anregung mit 458 nm Wellenlänge. Das emittierte Licht wurde im Bereich von 470-540 nm detektiert. Das Emissionsmaximum liegt bei 499 nm [85] und somit im grünen Bereich des sichtbaren Lichts. Der Akzeptor mKOK wurde direkt mit 551 nm

Wellenlänge angeregt und die Fluoreszenzemission im Bereich von 568-587 nm detektiert (Abbildung 3-5 b). Das Emissionsmaximum liegt bei 563 nm [85] und somit im roten Bereich des Spektrums sichtbaren Lichts.

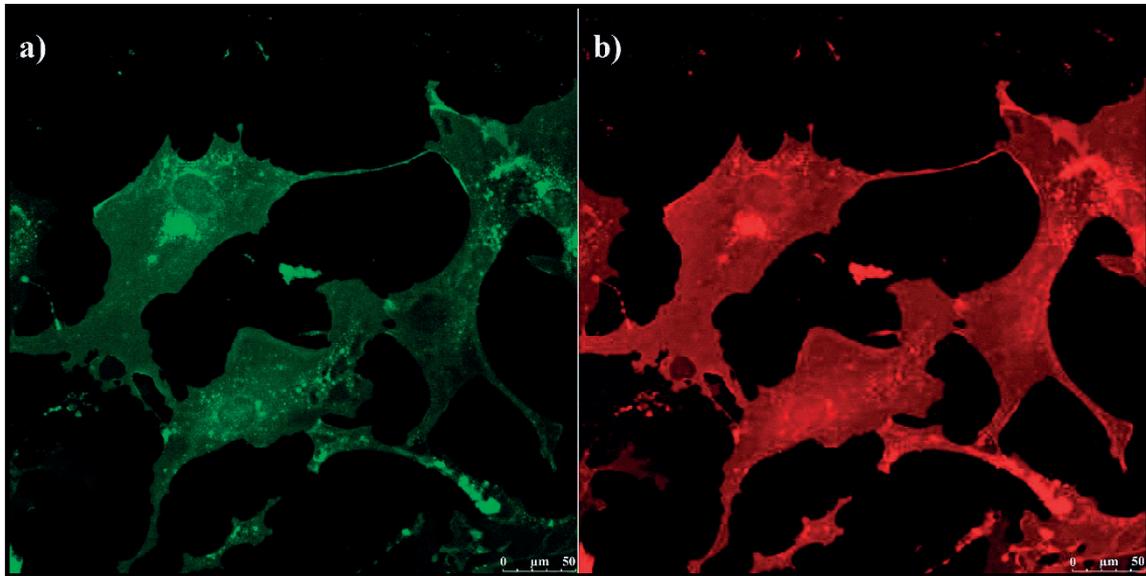


Abbildung 3-5 *Mermaid*-exprimierende PASMC, aufgenommen mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops. a) Emittierte Donorfluoreszenz nach Anregung bei 458 nm; Bereich der Fluoreszenzemission: 470-540 nm. b) Emittierte Akzeptorfluoreszenz nach Anregung bei 551 nm; Bereich der Fluoreszenzemission: 568-587 nm. Maßstab: 50 µM.

Zur Expression des FRET-Sensors *Mermaid* wurden die PASMC mit *Mermaid*-kodierenden Viren infiziert. Abbildung 3-6 zeigt infizierte PASMC im *Live Cell Imaging*-Setup nach Anregung des Donors mUKG mittels Licht einer Wellenlänge von 460 nm. Durch Aufteilung des emittierten Fluoreszenzlichts mithilfe eines Strahlteilers wird das emittierte Licht von Donor (mUKG) und Akzeptor (mKOκ) getrennt dargestellt. Die Farbe Blau repräsentiert eine niedrige, grün eine mittlere, sowie gelb eine höhere Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts.

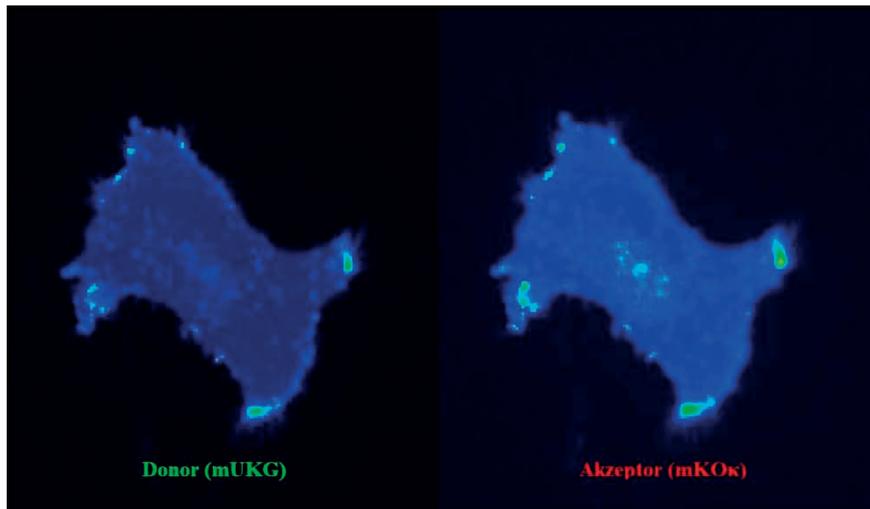


Abbildung 3-6 Exemplarische Darstellung von Donor- (mUKG) sowie Akzeptorfluoreszenz (mKOk) nach Aufteilung des emittierten Fluoreszenzlichtes in Donor- sowie Akzeptorkanal mithilfe eines Strahlteilers. Angeregt wurde der Donor (mUKG) mit 460 nm. Detektierter Emissionsbereich von mUKG: 502,5-537,5 nm; detektierter Emissionsbereich von mKOk: 565-605 nm. Farbkodierung: Blau (niedrige Intensität), grün (mittlere Inensität), gelb (höhere Intensität). 400-fache Vergrößerung.

Abbildung 3-7 stellt exemplarisch das emittierte Fluoreszenzlicht des Donors (mUKG), des Akzeptors (mKOk) sowie der entsprechenden FRET-Ratio für die Stimulierung mit unterschiedlichen Konzentrationen von KCl sowie die Kontrollmessung mit Hapes-Ringer-Lösung dar. Bei den verschiedenen KCl-Konzentrationen nimmt nach Applikation von KCl die Emissionsintensität des Donors ab und die des Akzeptors zu. Die Ratio von Akzeptor/Donor zeigt einen entsprechenden Anstieg.

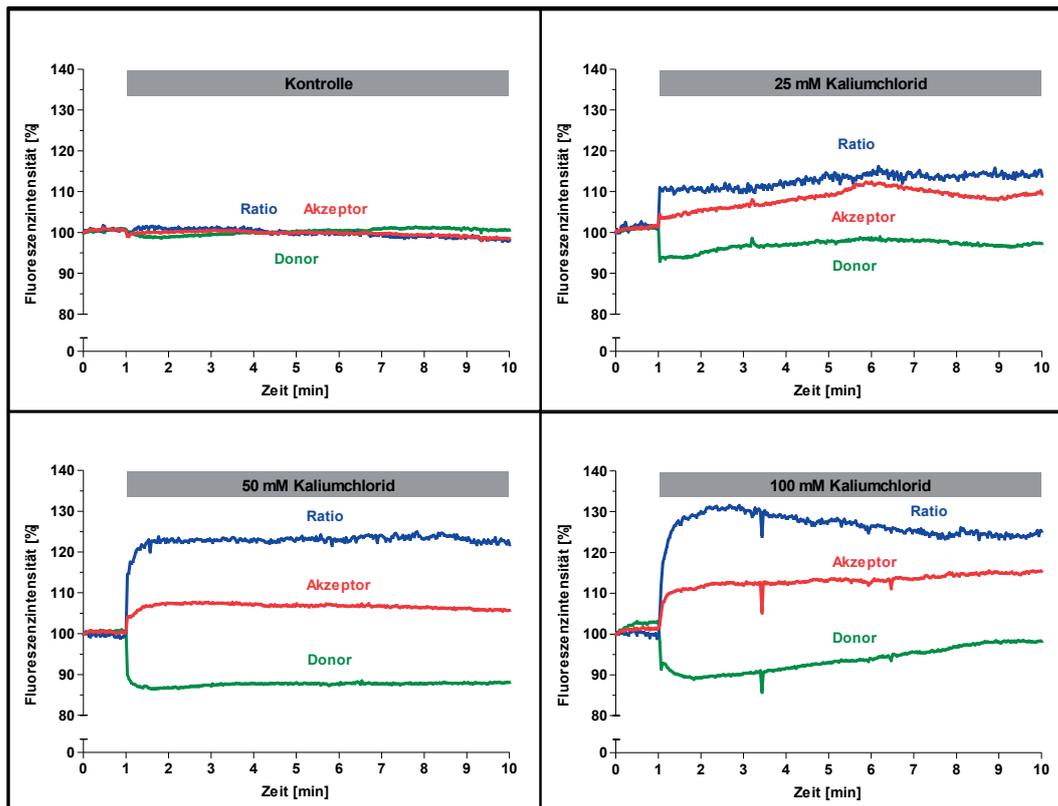


Abbildung 3-7 Exemplarische Darstellung der Donor- und Akzeptoremission sowie der FRET-Ratio einer PASMIC ohne Stimulierung mit KCl (Kontrolllösung) sowie nach Stimulierung mit unterschiedlichen Konzentrationen an KCl (25 mM, 50 mM, 100 mM KCl). Darstellung der Fluoreszenzintensität in %, Normalisierung des ersten Messwertes auf 100 %.

3.3.2 Charakterisierung von *Mermaid*

Im Folgenden wird die Stimulierung der PASMIC mit verschiedenen Konzentrationen der verwendeten Stimuli zur Charakterisierung der Reaktion des FRET-basierten Membranspannungssensors *Mermaid* beschrieben. Bei der Auswertung wurden zwei Ansätze für die Etablierung miteinander verglichen. Die gesamte Zellfläche der im Messbereich dargestellten PASMIC sowie ein nur randständiger Saum der Zellmembran der jeweiligen PASMIC. Denn Tian et al. beschrieben eine nicht ausschließlich exklusive Lokalisation von *Mermaid* an der Plasmamembran: 17 % der Fluoreszenz rührt von Strukturen her, welche nicht mit der Plasmamembran verbunden sind, sodass diese nicht zu spannungsabhängigen Veränderungen des *Mermaid*-Signals, die durch Reaktionen der Plasmamembran verursacht wurde, beitragen [82].

3.3.3 Stimulierung mit KCl

Eine erste Charakterisierung der Änderung des FRET-Signals von *Mermaid* durch einen allgemeinen Plasmamembran-depolarisierenden Stimulus wurde mittels KCl in verschiedenen Konzentrationen (25 mM, 50 mM, 100 mM) vorgenommen. Als Kontrolllösung diente Hepes-Ringer-Lösung. Die PASMC befanden sich in einer offenen Zellkammer, damit die entsprechende Lösung appliziert werden konnte.

3.3.3.1 Auswertung der gesamten Zelle

Abbildung 3-8 zeigt die FRET-Ratio von *Mermaid* in PASMC nach Applikation verschiedener Konzentrationen von KCl (25 mM, 50 mM, 100 mM). Der erste Messwert jeder PASMC wurde jeweils auf 100 % normalisiert. Es zeigte sich, dass die FRET-Ratio von *Mermaid* konzentrationsabhängig zunahm.

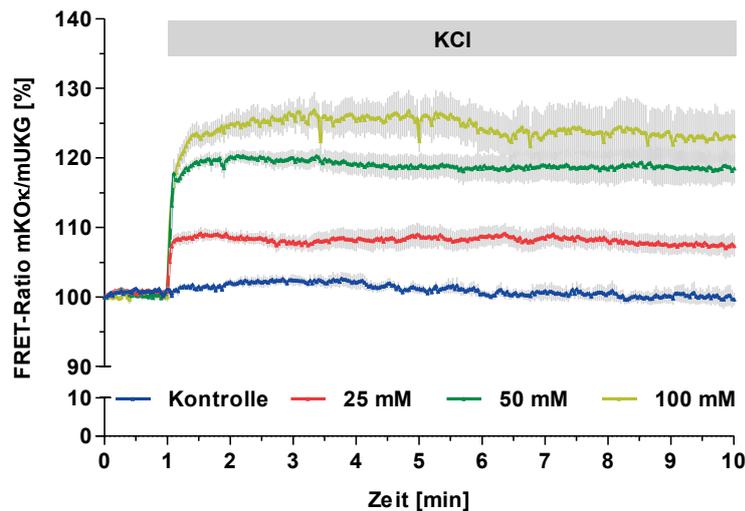


Abbildung 3-8 Messung der FRET-Ratio in *Mermaid*-exprimierenden PASMC mit Auswertung der gesamten Zelle nach Applikation verschiedener Konzentrationen von KCl. Die Konzentrationen betragen 25 mM (n = 7), 50 mM (n = 9), 100 mM (n = 8) neben der Kontrolle (n = 7). Die Applikation erfolgte nach einer Minute. Die Messwerte sind anhand des ersten Messwertes auf 100 % normalisiert, Darstellung als Mittelwert \pm SEM. Die PASMC entstammten jeweils aus mindestens 3 verschiedenen Mäusen.

In Abbildung 3-9 ist die Änderung der FRET-Ratio von *Mermaid* jeweils vom Zeitpunkt vor KCl-Zugabe zum Zeitpunkt nach Zugabe von KCl als Mittelwert \pm SEM zusammengefasst. Die Stimulierung mit KCl zeigte eine signifikante Zunahme der FRET-Ratio von *Mermaid* für 50 mM (Zunahme um $19,4 \% \pm 1,2 \%$) sowie für 100 mM

(Zunahme um $25,9\% \pm 2,1\%$). Die Applikation von 25 mM KCl zeigte zwar eine Tendenz für eine Zunahme der FRET-Ratio von *Mermaid* ($7,0\% \pm 1,0\%$) jedoch ohne statistische Signifikanz. Die Kontrollmessung (Zugabe von HEPES-Ringer-Lösung) ergab ebenfalls keine relevante Änderung der FRET-Ratio von *Mermaid* ($1,6\% \pm 0,7\%$). Der Vergleich der verschiedenen Konzentrationsstufen ergab einen jeweils signifikanten Anstieg der FRET-Ratio von *Mermaid* für 25 mM KCl im Vergleich zu 50 mM KCl sowie 25 mM im Vergleich zu 100 mM. Auch der Vergleich zwischen 50 mM und 100 mM zeigte einen signifikanten Anstieg der FRET-Ratio von *Mermaid*.

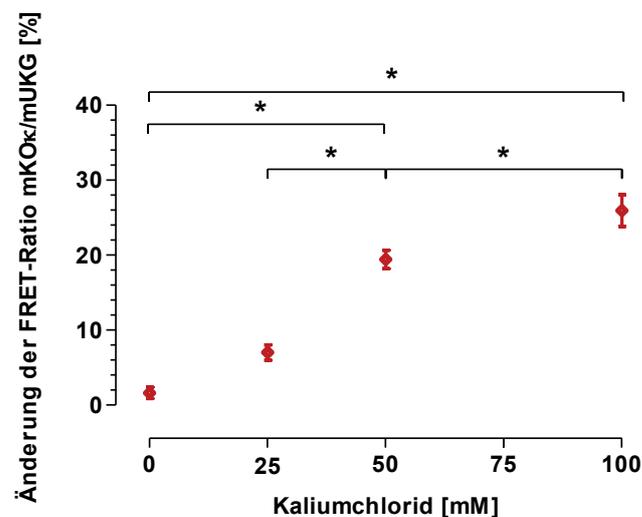


Abbildung 3-9 Änderung der FRET-Ratio von *Mermaid* in PASMC nach Stimulierung mit KCl in verschiedenen Konzentrationen: Die Konzentrationen betragen 25 mM (n = 7), 50 mM (n = 9), 100 mM (n = 8) neben der Kontrolle (n = 7). Es wurde die gesamte Zelle ausgewertet. Darstellung als Mittelwert \pm SEM. Die PASMC stammten aus jeweils mindestens 3 unterschiedlichen Mäusen. * bezeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

3.3.3.2 Auswertung der Zellmembran

Neben der Auswertung der gesamten Zelle wurde auch die randständige Zellmembran der PASMC für die Stimulierung mit KCl ausgewertet. Abbildung 3-10 zeigt die Änderung der FRET-Ratio von *Mermaid* in PASMC nach der Stimulierung mit 25 mM, 50 mM oder 100 mM KCl bzw. der Kontrolllösung. Der erste Messwert jeder PASMC wurde auf 100 % normalisiert. Die FRET-Ratio von *Mermaid* als Korrelat der Plasmamembranspannung nahm ebenfalls konzentrationsabhängig zu. Der Abfall der FRET-Ratio ab Minute 7 bei der Messreihe „25 mM“ ist auf eine messtechnische

Unschärfe der Messung eines Experimentes – beginnend zwischen der 6.-7. Minute des Versuchs – zurückzuführen.

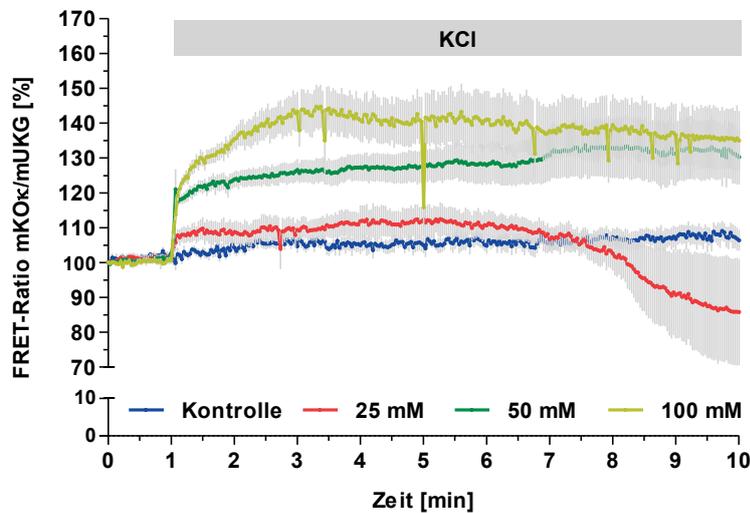


Abbildung 3-10 FRET-Ratio in *Mermaid*-exprimierenden PASC mit Auswertung der Zellmembran nach Applikation verschiedener Konzentrationen von KCl (25 mM (n = 7), 50 mM (n = 9), 100 mM (n = 8) neben der Kontrolle (n = 7)). Die Applikation erfolgte nach einer Minute. Die Messwerte sind anhand des ersten Messwertes auf 100 % normalisiert, Darstellung als Mittelwert \pm SEM. Die PASC entstammten jeweils mindestens 3 verschiedenen Mäusen.

Zum statistischen Vergleich wurden auch hier jeweils die Änderung der FRET-Ratio von *Mermaid* nach KCl-Stimulation berechnet (Abbildung 3-11). Die Kontrollmessung zeigte nach Zugabe von Hapes-Ringer-Lösung eine Änderung der FRET-Ratio um $3,0 \% \pm 1,4 \%$. Vergleichbar mit der Auswertung der gesamten Zelle zeigte sich auch mit der geringsten depolarisierenden Konzentration von 25 mM nur eine tendenzielle Zunahme der FRET-Ratio ohne statistische Signifikanz (Änderung der FRET-Ratio $8,7 \% \pm 2,0 \%$). Die FRET-Ratio als Korrelat der Membranspannungsänderung zeigte bei 50 mM KCl (Änderung der FRET-Ratio $24,7 \% \pm 2,7 \%$) sowie 100 mM KCl eine signifikante Zunahme (Änderung der FRET-Ratio $42,2 \% \pm 5,9 \%$) im Vergleich zur Kontrolllösung. Der Vergleich der verschiedenen Konzentrationsstufen ergab einen jeweils signifikanten Anstieg der FRET-Ratio für 25 mM KCl im Vergleich zu 50 mM KCl sowie 25 mM im Vergleich zu 100 mM. Auch der Vergleich zwischen 50 mM und 100 mM zeigte einen signifikanten Anstieg der FRET-Ratio von *Mermaid*.

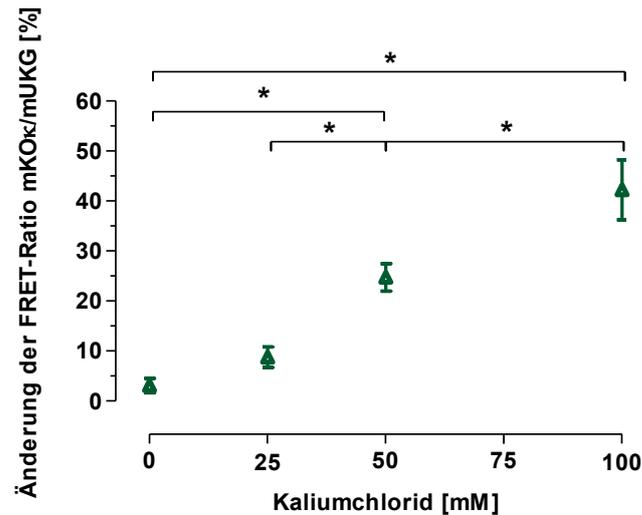


Abbildung 3-11 Änderung der FRET-Ratio von *Mermaid* in PASMC nach Stimulierung mit KCl in verschiedenen Konzentrationen: Die Konzentrationen betragen 25 mM (n = 7), 50 mM (n = 9), 100 mM (n = 8) neben der Kontrolle (n = 7). Es wurde die Zellmembran ausgewertet. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Die PASMC entstammten jeweils mindestens 3 verschiedenen Mäusen. * bezeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

In Tabelle 3-1 sind vergleichend die Mittelwerte sowie der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) für die Auswertung der gesamten Zelle sowie der Auswertung der Zellmembran ab der 3. Minute, entsprechend zwei Minuten nach Stimulierung mit KCl, aufgezeigt. Im direkten Vergleich zeigt die Auswertung der Zellmembran zwar insgesamt größere Mittelwerte der FRET-Ratio, insbesondere für die höheren Stimulierungen (50 mM und 100 mM KCl), zugleich zeigt sich aber insbesondere auch fast eine Verdopplung der SEM aller Konzentrationsstufen.

KCl	Änderung der FRET-Ratio von <i>Mermaid</i>	
	Gesamte Zelle (in % ± SEM)	Zellmembran (in % ± SEM)
Kontrolle	1,6 ± 0,7	3,0 ± 1,4
25 mM	7,0 ± 1,0	8,7 ± 2,0
50 mM	19,4 ± 1,2	24,7 ± 2,7
100 mM	25,9 ± 2,1	42,2 ± 5,9

Tabelle 3-1 Gegenüberstellung der KCl-induzierten Änderung der FRET-Ratio von *Mermaid* für die verschiedenen Konzentrationen bei Auswertung der gesamten Zelle bzw. der Zellmembran. Darstellung der Mittelwerte ± SEM in %.

3.3.4 Stimulierung mit OAG

Nach der Messung der konzentrationsabhängigen Änderung der FRET-Ratio der PASMIC durch den unspezifischen Stimulus KCl sollte die Reaktion auf OAG überprüft werden. OAG ist ein membranpermeables Analogon zu Diacylglycerol, einem *second messenger*, der TRPC6 direkt aktiviert. OAG wurde mit einer Konzentration von 100 µM, 200 µM sowie 500 µM (Endkonzentration) appliziert. 100 µM war dabei eine oftmals verwendete Konzentration des Stimulus zur Aktivierung von TRPC6 in Zellkulturexperimenten [37, 80, 90]. Als Kontrolllösung diente das Lösungsmittel von OAG, DMSO in HEPES-Ringer-Lösung. Die Verdünnung entsprach dabei der Konzentration von DMSO im Versuchsansatz von 500 µM OAG. Um eine grundsätzliche Reaktionsfähigkeit der PASMIC festzustellen, wurde 5 Minuten nach OAG-Applikation 100 mM KCl (Endkonzentration) appliziert. Ausgewertet wurden jeweils die gesamte Zelle sowie die Zellmembran.

3.3.4.1 Auswertung der gesamten Zelle

Abbildung 3-12 zeigt die Änderung der FRET-Ratio von *Mermaid* nach OAG - Stimulierung mit verschiedenen Konzentrationen. Die Zugabe von OAG führte in den verwendeten Konzentrationen zu keiner wesentlichen Änderung der FRET-Ratio von *Mermaid* als Korrelat der Plasmamembranspannung. Aufgrund der KCl-induzierten,

deutlichen Änderung der FRET-Ratio war von einer prinzipiellen Reaktionsfähigkeit der PASMC auszugehen.

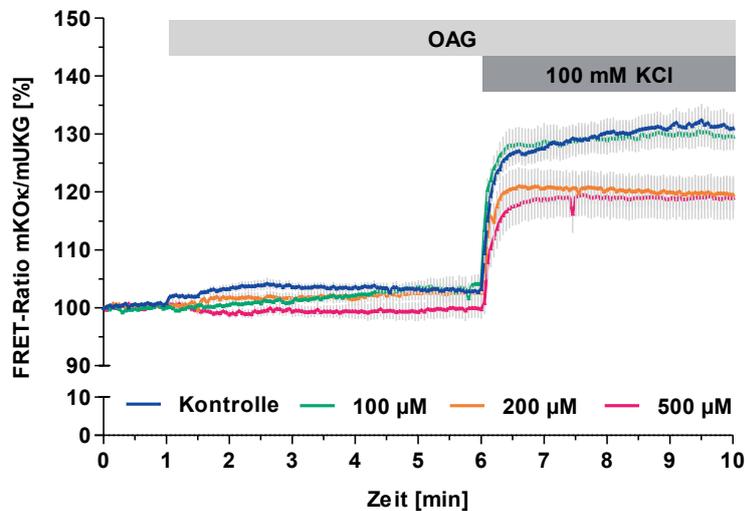


Abbildung 3-12 FRET-Ratio in *Mermaid*-exprimierenden PASMC mit Auswertung der gesamten Zelle nach Stimulierung mit OAG in verschiedenen Konzentrationen sowie nachfolgender Stimulierung mit 100 mM KCl. Die OAG-Konzentrationen betragen 100 μ M (n = 6), 200 μ M (n = 7), 500 μ M (n = 11) neben der Kontrolllösung (n = 9). OAG wurde nach einer Minute appliziert, KCl nach 6 Minuten. Die Messwerte sind anhand des ersten Messwertes auf 100 % normalisiert, Darstellung als Mittelwert \pm SEM. Die PASMC stammten aus jeweils mindestens 3 verschiedenen Mäusen.

In Abbildung 3-13 ist die Änderung der FRET-Ratio von *Mermaid* der getesteten OAG-Konzentrationen neben der Kontrolllösung als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Für die Berechnung der Signaländerung für OAG wurden für jede PASMC ein Mittelwert aus 5 Messpunkten ab der 3. Minute in Beziehung gesetzt zum jeweiligen Mittelwert (5 Messzeitpunkte) vor OAG-Zugabe. Analog erfolgte die Berechnung für KCl mit 5 Messwerten direkt vor KCl-Zugabe sowie 5 Messwerten ab der 8. Minute, entsprechend zwei Minuten nach OAG-Zugabe. Die verschiedenen Konzentrationen untereinander (100 μ M und 200 μ M; 100 μ M und 500 μ M sowie 200 μ M und 500 μ M) zeigten keine signifikante Änderung der FRET-Ratio von *Mermaid*. Im Vergleich zur Kontrolllösung findet sich bei Stimulation mit 500 μ M jedoch ein leichter Abfall mit Signifikanz. Die Änderung der FRET-Ratio nach KCl-induzierter Depolarisation lag dabei jeweils deutlich und signifikant oberhalb der Änderung des Signals nach OAG-Stimulierung und zeigte eine prinzipielle Reaktionsfähigkeit der PASMC. Tabelle 3-2 vergleicht gegenüberstellend die Auswertung der gesamten Zelle und der Zellmembran.

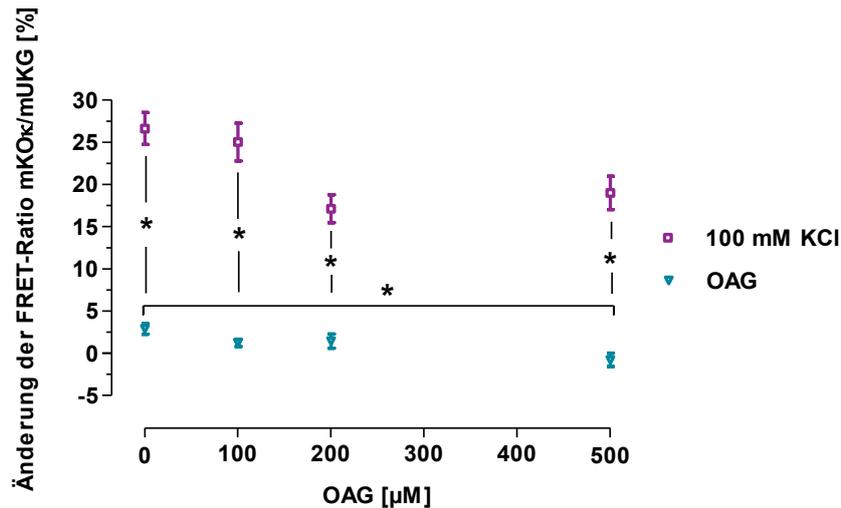


Abbildung 3-13 Änderung der FRET-Ratio von *Mermaid* in PASMC mit Auswertung der gesamten Zelle nach Stimulierung mit OAG in verschiedenen Konzentrationen sowie nachfolgender Stimulierung mit 100 mM KCl. Die OAG-Konzentrationen betragen 100 µM (n = 6), 200 µM (n = 7), 500 µM (n = 11) neben der Kontrolllösung (n = 9). Dargestellt ist die Änderung der FRET-Ratio jeweils als Mittelwert ± SEM. Die PASMC stammten aus jeweils mindestens 3 verschiedenen Mäusen. * bezeichnet signifikante Unterschiede (p < 0,05).

3.3.4.2 Auswertung der Zellmembran

Die Änderung der FRET-Ratio der Zellmembran nach OAG-Stimulierung ist in Abbildung 3-14 dargestellt, wobei auch diese Auswertung wie bereits die Auswertung der gesamten Zelle keine relevante Änderung der mit der Plasmamembranspannung korrelierenden FRET-Ratio von *Mermaid* in allen applizierten OAG-Konzentrationen ergab. Die deutliche Änderung der FRET-Ratio nach KCl-Zugabe spricht auch in dieser Auswertung für eine prinzipielle Reaktionsfähigkeit der PASMC.

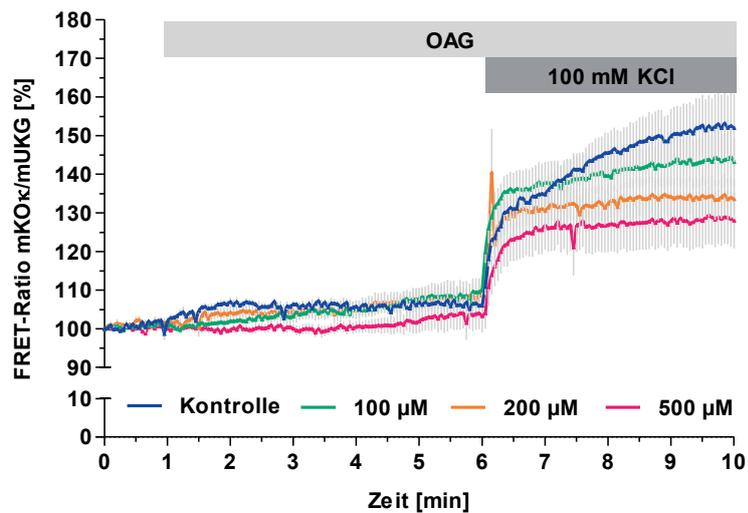


Abbildung 3-14 FRET-Ratio in *Mermaid*-exprimierenden PASCs mit Auswertung der Zellmembran nach Stimulierung mit OAG in verschiedenen Konzentrationen sowie nachfolgender Stimulierung mit 100 mM KCl. Die OAG-Konzentrationen betragen 100 μ M (n = 6), 200 μ M (n = 7), 500 μ M (n = 11) neben der Kontrolllösung (n = 9). OAG wurde nach einer Minute appliziert, KCl nach 6 Minuten. Die Messwerte sind anhand des ersten Messwertes auf 100 % normalisiert, Darstellung als Mittelwert \pm SEM. Die PASCs stammten aus jeweils mindestens 3 verschiedenen Mäusen.

Eine Zusammenfassung der Änderung der FRET-Ratio nach OAG-Applikation zeigt Abbildung 3-15. Die verschiedenen Konzentrationen untereinander (100 μ M und 200 μ M; 100 μ M und 500 μ M sowie 200 μ M und 500 μ M) zeigten auch in dieser Auswertung keine signifikante Änderung der FRET-Ratio von *Mermaid*. Der Vergleich zur Kontrolllösung ergibt auch hier einen leichten Abfall mit Signifikanz für 500 μ M OAG. Die Stimulierung mit KCl zum Nachweis einer adäquaten Reaktionsfähigkeit der PASCs zeigte durchweg einen deutlichen Anstieg der FRET-Ratio von *Mermaid* im Vergleich zum OAG-induzierten Signal. In Tabelle 3-2 sind die Mittelwerte \pm SEM in % für die jeweiligen Konzentrationsstufen bei OAG und KCl-induzierter Änderung der FRET-Ratio, jeweils für die Auswertung der gesamten Zelle im Vergleich mit der Auswertung der Zellmembran gegenübergestellt. Auch hier fallen – wie bereits im Vergleich der entsprechenden Messwerte der KCl-induzierten Änderung der FRET-Ratio gesehen – größere Standardfehler des Mittelwertes sowie größere Werte für die FRET-Ratio auf. Auffällig ist die Abnahme der Differenz zwischen den Auswertungen mit steigender Konzentration an OAG.

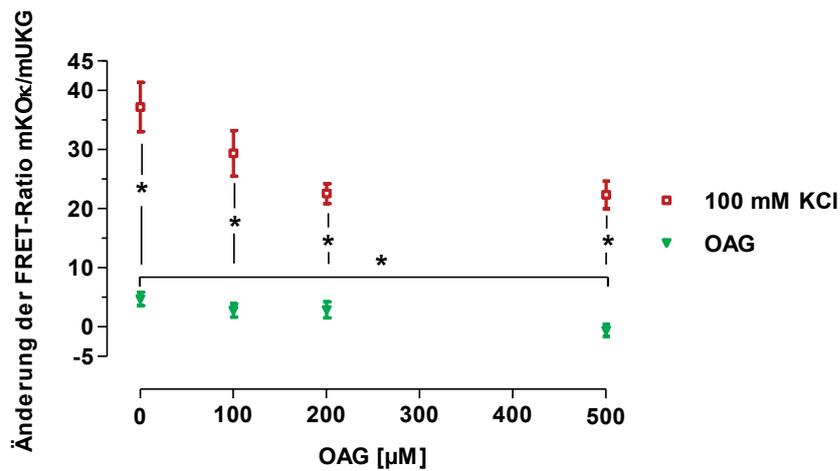


Abbildung 3-15 Änderung der FRET-Ratio von *Mermaid* in PASMCM mit Auswertung der Zellmembran nach Stimulierung mit OAG in verschiedenen Konzentrationen sowie nachfolgender Stimulierung mit 100 mM KCl. Die OAG-Konzentrationen betragen 100 µM (n = 6), 200 µM (n = 7), 500 µM (n = 11) neben der Kontrolllösung (n = 9). Dargestellt ist die Änderung der FRET-Ratio jeweils als Mittelwert ± SEM. Die PASMCM stammten aus jeweils mindestens 3 verschiedenen Mäusen. * bezeichnet signifikante Unterschiede (p < 0,05).

OAG	Änderung der FRET-Ratio von <i>Mermaid</i>			
	Gesamte Zelle		Zellmembran	
	OAG (in % ± SEM)	100 mM KCl (in % ± SEM)	OAG (in % ± SEM)	100 mM KCl (in % ± SEM)
Kontrolle	2,8 ± 0,6	26,6 ± 1,8	4,7 ± 1,1	37,2 ± 4,1
100 µM	1,2 ± 0,4	25,0 ± 2,2	2,7 ± 1,1	29,3 ± 3,8
200 µM	1,4 ± 0,8	17,1 ± 1,6	2,8 ± 1,3	22,5 ± 1,7
500 µM	-0,7 ± 0,7	18,9 ± 1,9	-0,6 ± 1,0	22,3 ± 2,3

Tabelle 3-2 Vergleichende Zusammenfassung der Änderungen der FRET-Ratio nach OAG- sowie KCl-Applikation für die beiden Auswertungen gesamte Zelle und Zellmembran. Darstellung als Mittelwerte ± SEM in %.

3.3.5 Versuche unter hypoxischen Bedingungen

Das Ziel der Expression des Ratio-basierten FRET-Sensors *Mermaid* in isolierten PASMC war die Etablierung eines Messsystems zur Darstellung der Membranspannungsänderung unter hypoxischen Bedingungen.

3.3.5.1 Auswertung der gesamten Zelle

Zur Exposition gegenüber hypoxischen Bedingungen wurden *Mermaid*-exprimierende PASMC in der geschlossenen Zellkammer eines Perfusionssystems initial mit normoxischer Hepes-Ringer-Lösung, dann mit normoxischer Hepes-Ringer-Lösung supplementiert mit 4 nM ET-1 perfundiert. Die Perfusion wurde ab der 6. Minute auf Stickstoff-begaste, hypoxische Hepes-Ringer-Lösung mit 4 nM ET-1 umgestellt. Als Kontrolllösung wurde ab der 6. Minute normoxische Hepes-Ringer-Lösung mit 4 nM ET-1 verwendet. Abbildung 3-16 zeigt die Mittelwerte der FRET-Ratio von *Mermaid* \pm SEM in %. Der jeweils erste Messwert einer PASMC wurde auf 100 % normalisiert. Die PASMC unter hypoxischen Bedingungen zeigten keine Änderung ihrer FRET-Ratio von *Mermaid* im Vergleich zu normoxischen Bedingungen. Sowohl unter hypoxischer wie auch normoxischer Perfusion steigt die FRET-Ratio von *Mermaid* in der Anfangszeit des Versuchs.

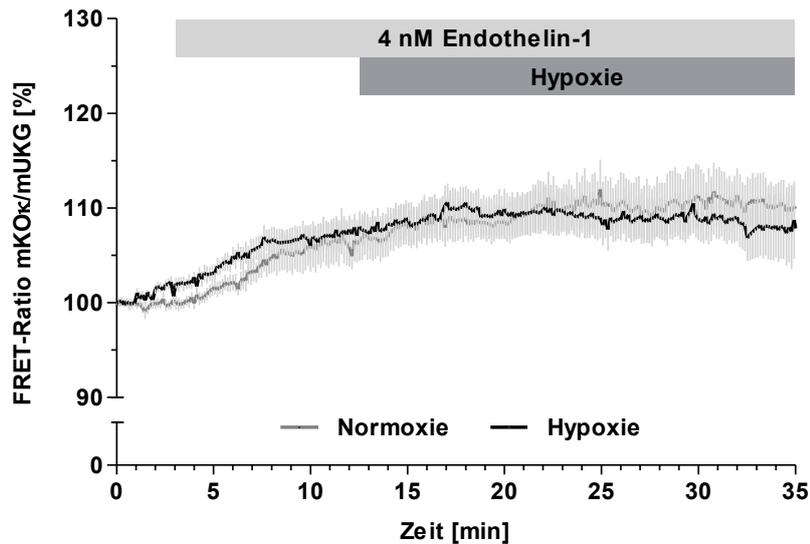


Abbildung 3-16 Messung der FRET-Ratio in *Mermaid*-exprimierenden PASMC mit Auswertung der gesamten Zelle bei Perfusion mit hypoxischer (n = 11) bzw. normoxischer (n = 6) Hepes-Ringer-Lösung. Initial erfolgte die Perfusion mit Hepes-Ringer-Lösung ohne Zusätze, nach 3 Minuten mit Hepes-Ringer-Lösung supplementiert mit 4 nM ET-1. Darstellung als Mittelwert \pm SEM. Die PASMC stammten aus jeweils mindestens 3 verschiedenen Mäusen.

Die statistische Analyse (Abbildung 3-17) erfolgte in Analogie zur Berechnung der Mangan-Quenching Rate zwischen der 16. und 17. Messminute ab der 16. Minute der Messung. Hierzu wurde ein Mittelwert aus jeweils 5 Messwerten der gemessenen PASMC bei hypoxischer sowie normoxischer Perfusion ab der 16. Minute der Messung gebildet und verglichen. Zu diesem Messzeitpunkt herrschte unter hypoxischer Perfusion ein pO_2 von $25,5 \text{ mmHg} \pm 2,7 \text{ mmHg}$. Die normoxische Perfusion ergab keine signifikante Änderung der FRET-Ratio von *Mermaid* ($108,7 \% \pm 2,1 \%$) im Vergleich zur hypoxischen Perfusion ($109,0 \% \pm 1,9 \%$).

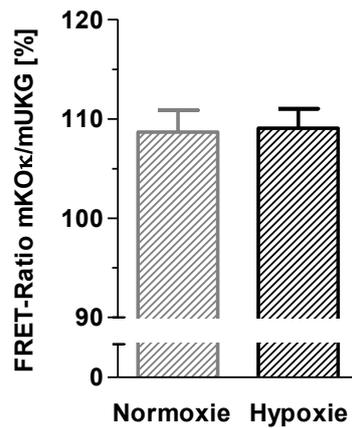


Abbildung 3-17 FRET-Ratio in *Mermaid*-exprimierenden PASCs bei hypoxischer (n = 11) und normoxischer (n = 6) Perfusion unter Auswertung der gesamten Zelle. Darstellung als Mittelwert \pm SEM. Die PASCs stammten aus jeweils mindestens 3 verschiedenen Mäusen.

3.3.5.2 Auswertung der Zellmembran

Abbildung 3-18 zeigt die FRET-Ratio von *Mermaid* unter Auswertung der Zellmembran von hypoxisch sowie normoxisch perfundierten PASCs. Wie sich bereits unter Auswertung der gesamten Zelle zeigte, ergibt sich auch unter Auswertung der Zellmembran kein Unterschied der FRET-Ratio von *Mermaid* zwischen normoxischer sowie hypoxischer Perfusion. Auch in dieser Auswertung steigt sowohl unter hypoxischer wie auch normoxischer Perfusion die FRET-Ratio von *Mermaid* in der Anfangszeit des Versuchs.

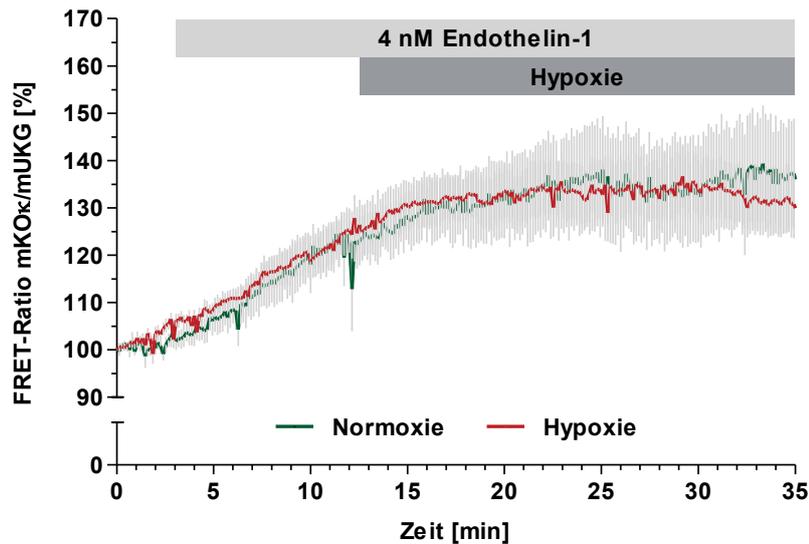


Abbildung 3-18 FRET-Ratio in *Mermaid*-exprimierenden PASMC unter Auswertung der Zellmembran bei Perfusion mit hypoxischer (n = 11) bzw. normoxischer (n = 6) Hepes-Ringer-Lösung. Initial erfolgte die Perfusion mit Hepes-Ringer-Lösung ohne Zusätze, nach 3 Minuten mit Hepes-Ringer-Lösung supplementiert mit 4 nM ET-1. Darstellung als Mittelwert \pm SEM. Die PASMC stammten aus jeweils mindestens 3 verschiedenen Mäusen.

Zur statistischen Analyse erfolgte die Berechnung der Mittelwerte in gleicher Weise wie unter 3.3.5.1 beschrieben. Abbildung 3-19 zeigt dies als Balkendiagramm. Die normoxische Perfusion ergab ab der 16. Minute einen Mittelwert der FRET-Ratio von *Mermaid* von $129,8 \% \pm 6,5 \%$ im Vergleich zu den hypoxisch perfundierten PASMC mit $131,2 \% \pm 5,0 \%$. Unter hypoxischer Perfusion herrschte zu diesem Messzeitpunkt ein pO_2 von $25,5 \text{ mmHg} \pm 2,7 \text{ mmHg}$.

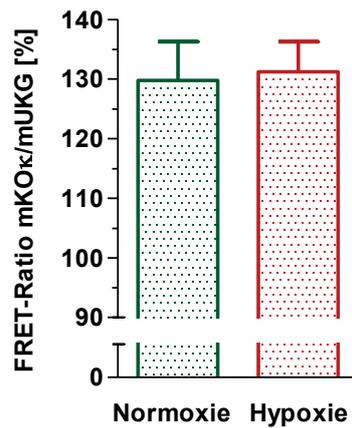


Abbildung 3-19 FRET-Ratio in *Mermaid*-exprimierenden PASC, 16. Minute bei hypoxischer (n = 11) und normoxischer (n = 6) Perfusion, Auswertung der Zellmembran. Darstellung als Mittelwert \pm SEM. Die PASC stammten aus jeweils mindestens 3 verschiedenen Mäusen.

Den Vergleich der Mittelwerte \pm SEM der beiden Auswertungsvarianten erlaubt Tabelle 3-3. Auffällig sind die deutlich höheren Mittelwerte sowie SEM der FRET-Ratio von *Mermaid* unter Auswertung der Zellmembran im Vergleich zur Auswertung der gesamten Zellen, wie bereits bei der Auswertung der KCl- sowie OAG-Stimulierungen gesehen.

	FRET-Ratio von <i>Mermaid</i> zur 16. Minute	
	Gesamte Zelle (in % \pm SEM)	Zellmembran (in % \pm SEM)
Normoxie	108,7 \pm 2,1	129,8 \pm 6,5
Hypoxie	109,0 \pm 1,9	131,2 \pm 5,0

Tabelle 3-3 Gegenüberstellung der FRET-Ratio der beiden Auswertungen gesamte Zelle und Zellmembran in *Mermaid*-exprimierenden PASC unter hypoxischen sowie normoxischen Bedingungen ab der 16. Messminute. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM in %.

3.4 Messung des normobaren Sauerstoffpartialdrucks der hypoxischen Perfusionslösung

Bei den Versuchen unter hypoxischen Bedingungen wurden die PASMC mit hypoxischer bzw. in den Kontrollversuchen mit normoxischer Hepes-Ringer-Lösung perfundiert. Die PASMC befanden sich dafür in einer geschlossenen Zellkammer. Abbildung 3-20 zeigt die Messung des normobaren Sauerstoffpartialdrucks des hypoxischen Perfusates am Ende der geschlossenen Zellkammer bei einer Perfusionsgeschwindigkeit 0,5 ml / Minute. Der Graph zeigt den Abfall des Sauerstoffpartialdrucks als Mittelwert \pm SEM (n = 4 Messungen) nach einer vorausgehenden normoxischen Perfusion. Die Umstellung auf hypoxisches Perfusat wurde zum Zeitpunkt 0. Minute vorgenommen. Die Erfassung des Sauerstoffpartialdrucks erfolgte alle 30 Sekunden für einen Zeitraum von 35 Minuten. Nach 2,5 Minuten begann die Abnahme des Sauerstoffpartialdrucks, um zur 6,5. Minute einen pO_2 von $41,3 \text{ mmHg} \pm 5,0 \text{ mmHg}$ zu erreichen. Zur 10. Minute erreichte der Partialdruck $25,5 \text{ mmHg} \pm 2,7 \text{ mmHg}$ und nach 29 Minuten $12,3 \text{ mmHg} \pm 0,5 \text{ mmHg}$. Tabelle 3-4 zeigt eine Übersicht über die Messwerte zu Minute 0, 2,5, 6,5, 10 und 29. Zur Minute 2,5 beginnt der Abfall des Sauerstoffpartialdrucks in der Zellkammer. Zur 6,5. Minute unterschreitet der Sauerstoffpartialdruck 42 mmHg . In Experimenten der vorliegenden Arbeit mit Perfusion von hypoxischer Hepes-Ringer-Lösung wurde die Perfusion nach 6 Minuten auf Hypoxie umgestellt, sodass die 10. Minute der Messung des normobaren Sauerstoffpartialdrucks der 16. Messminute der FRET-Ratio Messungen sowie der Mangan-Quenching-Messungen entspricht. Der letzte Zeitpunkt der Versuche mit Perfusion entspricht der Minute 29 der Messung des Sauerstoffpartialdrucks. Die Messung erfolgte am Ausgang der geschlossenen Zellkammer, sodass die gemessenen Werte mindestens den Werten entsprechen, wie sie zu diesem Zeitpunkt in der Kammer vorherrschten.

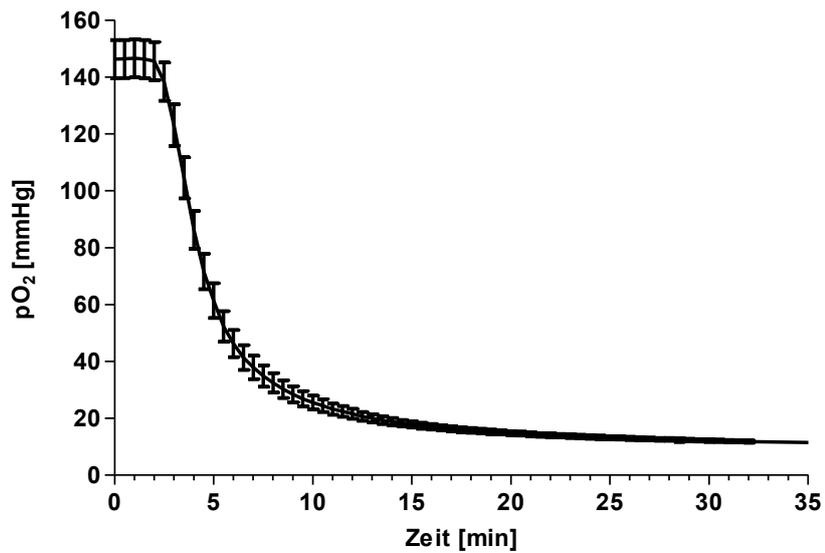


Abbildung 3-20 Messung des normobaren Sauerstoffpartialdrucks [mmHg] bei hypoxischer Perfusion. Die hypoxische Perfusion wurde zum Zeitpunkt 0. Minute einer vorausgehenden normoxischen Perfusion gestartet. Eingezeichnet ist der Mittelwert \pm SEM aus $n = 4$ Messungen.

Zeitpunkt [Minuten]	pO ₂ [mmHg]
0	146,2 \pm 7,7
2,5	138,3 \pm 7,7
6,5	41,3 \pm 5,0
10	25,5 \pm 2,7
29	12,3 \pm 0,5

Tabelle 3-4 Übersicht des Sauerstoffpartialdrucks des hypoxischen Perfusates in mmHg zum Zeitpunkt 0, 2,5, 6,5 10 und 29 Minuten.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den plasmamembranständigen FRET-Sensor *Mermaid* für die Messung der Hypoxie-induzierten Membranspannungsänderung in primär isolierten präkapillären PASMC der Maus zu charakterisieren. Es wurden präkapilläre PASMC untersucht, da diese die Sensor- und Effektorzellen der HPV sind [36, 75, 78]. Als etablierte Vergleichsmethode zur indirekten Messung von Hypoxie-induzierten Plasmamembranspannungsänderungen diente das Mangan-Quenching.

4.1 Charakterisierung der PASMC mittels Immunfluoreszenzfärbung

Zur Charakterisierung der in der vorliegenden Arbeit isolierten Zellen aus der Gefäßbahn der Lunge als glatte Muskelzellen wurden diese mit einem Antikörper gegen glattmuskuläres α -Aktin sowie einer zusätzlichen Kernfärbung mittels DAPI gefärbt. Es zeigte sich eine deutliche Färbung des Antikörpers gegen glattmuskuläres α -Aktin sowie auch eine Kernfärbung. Der Nachweis von glattmuskulärem α -Aktin in Kombination mit der Wachstumsgeschwindigkeit sowie der Morphologie der isolierten Zellen sprachen für das Vorliegen von PASMC.

In den vorliegenden Versuchen wurden ausschließlich PASMC der Passage 0 verwendet, da für primär isolierte vaskuläre glatte Muskelzellen ein Einfluss von Passagierung und Kultivierung auf die Expression der Proteine des kontraktilen Apparates sowie des Zytoskeletts, die zytoplasmatische Verteilung dieser Komponenten sowie der Zellmorphologie mit zunehmender Passage beschrieben ist. Dieser sogenannte *phenotype switch* vom „kontraktilen“ zum „synthetischen“ Phänotyp ist gekennzeichnet durch eine Abnahme der Proteinexpression kontraktiler Proteine, eine Zunahme der Expression zytoskelettaler Proteine sowie eine Reorganisation des Zytoskeletts und kontraktiler Proteine [76, 96]. Für kommerziell erhältliche, humane vaskuläre glatte Muskelzellen wurde dieser Übergang zwischen Passage 7 und 8 beschrieben [83], Worth et al. zeigten für vaskuläre SMC aus Kaninchen bereits Veränderungen der Proteinexpression und Verteilung ab Passage 2-3 [96].

4.2 Mangan-Quenching

In den vorliegenden Untersuchungen wurde der Ansatz des Mangan-Quenchings unter Hypoxie durchgeführt, um im Weiteren als Vergleichsmethode für die Messung einer

Membrandepolarisation bzw. einer Änderung der Plasmamembranspannung mithilfe des plasmamembranständigen FRET-Sensors *Mermaid* unter hypoxischen Bedingungen zu dienen. Das Mangan-Quenching wurde bereits von Weißmann et al. für PASMC unter hypoxischen Bedingungen etabliert [93]. Akute Hypoxie führt in PASMC zur Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mit einer vorausgehenden Membrandepolarisation. Eine essentielle Rolle des Kationenkanals TRPC6 für die akute Phase der Hypoxie wurde von Weißmann et al. gezeigt [93]. Diese erste akute Phase der Vasokonstriktion fehlte bei isolierten, ventilierten und perfundierten Lungen von TRPC6^{-/-}-Mäusen. Des Weiteren fehlte in PASMC von TRPC6^{-/-}-Mäusen im Gegensatz zu Wildtyp PASMC der Hypoxie-induzierte Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Zur weiteren Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktionskaskade, die zur Hypoxie-induzierten Aktivierung von TRPC6 führte, kann die Eigenschaft von TRPC6 als ein vorwiegend für monovalente Kationen permeabler Kanal mit geringerer Ca^{2+} -Permeabilität [22] zu Nutze gemacht werden. Unter Hypoxie kommt es zur Kanalaktivierung von TRPC6, die zu einem Einstrom von Kationen (vorwiegend Na^+) mit Depolarisation der Plasmamembran und der Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen führt. Zur Messung des Einstroms von Kationen und der damit verbundenen Membrandepolarisation wurden im Experiment extrazellulär Manganionen zugesetzt. Manganionen zeigen dabei im Vergleich zu Ca^{2+} eine höhere Affinität für Fura-2 AM. Diese Bindung von Manganionen führt zum Quenching der Fluoreszenzintensität von Fura-2 AM bei Anregung mit 360 nm. Wildtyp-PASMC zeigten infolge der Hypoxie-induzierten Aktivierung von TRPC6 ein Quenching der Fura-2 AM-Fluoreszenzintensität durch den Einstrom von extrazellulären Manganionen im Vergleich zu TRPC6-defizienten PASMC [93]. Die Technik des Mangan-Quenchings kann somit zur indirekten Messung einer Membrandepolarisation und damit auch zur Messung einer Hypoxie-induzierten Aktivierung des TRPC6-Ionenkanals – insbesondere im Hinblick auf die Entschlüsselung der TRPC6-Aktivierungskaskade – verwendet werden. Über die vorliegende Arbeit hinaus soll die Messung mit *Mermaid* auch der weiteren Aufschlüsselung des Signaltransduktionsweges zur Hypoxie-induzierten TRPC6-Aktivierung dienen. In der vorliegenden Arbeit wurden PASMC von C57BL/6J-Mäusen unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen verglichen. Dabei zeigte sich unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zum normoxischem Perfusat ein signifikant stärkeres Quenching der Fura-2 AM-Fluoreszenzintensität als Korrelat eines Hypoxie-induzierten Kationeneinstroms und folglich einer Membrandepolarisation bzw. Änderung der Plasmamembranspannung.

4.3 FRET-Messungen mit *Mermaid*

Der grundlegende Mechanismus der HPV ist die Kontraktion der PASMC [78], welche mit einer vorangehenden Depolarisation der Plasmamembran einhergeht. Erste Hinweise auf eine direkte Hypoxie-induzierte Depolarisation der glatten Muskulatur von pulmonalarteriellen Gefäßsegmenten mit konsekutiver Verschiebung der intrazellulären Kalium- und Natriumkonzentration wurden bereits 1967 von Bergofsky und Holtzman gegeben [6]. Das Ruhemembranpotential der glatten Muskelzellen unterschiedlicher Spezies liegt zwischen $-40,7 \text{ mV} \pm 1,3 \text{ mV}$ und $-51 \text{ mV} \pm 1,4 \text{ mV}$ und wird durch eine Reduktion des $p\text{O}_2$ ($14 \text{ mmHg} \pm 2 - 50 \text{ mmHg}$) auf $-24 \text{ mV} \pm 2,4 \text{ mV}$ bis -38 mV depolarisiert. Die Messung der Membrandepolarisation bzw. Änderung der Plasmamembranspannung kann somit zur Aufschlüsselung des Hypoxie-induzierten intrazellulären Signalwegs der PASMC dienen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Verwendung des FRET-Sensors *Mermaid* für die Messung einer Hypoxie-induzierten Membranspannungsänderung in primär isolierten präkapillären PASMC der Maus charakterisiert werden, da diese Methode über die vorliegende Arbeit hinaus zur Entschlüsselung der zellulären Signaltransduktionskaskade genutzt werden soll.

4.3.1 Membranspannungsmessung mit dem FRET-Sensor *Mermaid*

Die Messung von Änderungen der Membranspannung in erregbaren Zellen mittels genetisch kodierter Membranspannungssensoren ist insbesondere in neurowissenschaftlichen Fragestellungen von Interesse [43]. Bei der Entwicklung neuer Sensoren für den neurowissenschaftlichen Bereich (u.a. zur selektiven Messung von Aktionspotentialen) sind eine schnelle Reaktionskinetik, eine Detektion der Spannung oberhalb der Depolarisationsschwelle sowie eine große Signalintensität von Interesse [77]. Andere Anwendungen sind beispielweise Untersuchung von Kardiomyozyten in Kardiotoxizitätsscans zur Bestimmung der Aktionspotentialdauer [82] oder zur in vivo Messung der Spannung am transgenen Zebrafisch-Herz [84]. Die Anwendung von genetisch-kodierten Membranspannungssensoren auf FRET-Basis wurde bereits in adulten Kardiomyozyten [10, 82], in primären, hippocampalen Neuronen [77] sowie in Zebrafisch-Embryonen [5, 84] oder in Mäusen [2, 10] gezeigt. Eine FRET-Messung der Plasmamembranspannung in vaskulären glatten Muskelzellen wurde von Ella et al. für die Messung mit einem spannungssensitiven, allerdings nicht genetisch-kodierten Farbstoff in glatten Muskelzellen der Ratte beschrieben [21].

4.3.2 Die Ratio-basierte FRET-Messung

In dieser Arbeit wurde für die FRET-Messung das *Ratio-Imaging* (Ratio-Bildung der Intensität von Akzeptor- und Donor-Emission nach Anregung des Donor-Fluorophors [62]) als intensitätsbasierte Methode verwendet. Neben dem Vorteil der Entfernung unbekannter Störvariablen in der Messung durch die Ratiobildung gibt es unterschiedliche Fehlerquellen zu beachten: ein sogenannter *Crosstalk* zwischen den Fluorophoren, unterschiedliche Helligkeiten der Fluorophore, ein nicht genau ausgerichteter Winkel oder eine zu große Distanz zwischen den Fluorophoren [65] sowie bei intermolekularen FRET-Paaren eine ungleiche Donor-Akzeptor-Stöchiometrie. Der *Crosstalk* zwischen den Fluorophoren beinhaltet zwei Phänomene, *Bleed-through* und *Cross-excitation*. *Bleed-through* beschreibt die Detektion der Fluoreszenzemission des Donors im Akzeptorkanal, *Cross-excitation* bezeichnet die Anregung des Akzeptors durch das Exzitationslicht bei der Anregung des Donors [20, 62, 65]. Diese Phänomene sind allen Donor-/Akzeptorpaaren inne [65] und führen zu einer Verstärkung des Rauschens. Die Helligkeit der Donor- und Akzeptor-Fluorophore wird im Wesentlichen bestimmt durch die Fluoreszenzquantenausbeute (QY, Verhältnis der emittierten durch die absorbierten Photonen) [40]. Im Falle von *Mermaid* besitzt mUKG eine QY von 0,72 und mKOk eine QY von 0,61 [85]. Im Vergleich zu anderen etablierten Fluorophoren wie beispielsweise EGFP (QY= 0,6), Cerulean (QY = 0,62) oder Venus (QY = 0,57) [40] liegt diese in einem vergleichbaren Bereich. Mutoh et al. bewertete diese Fluoreszenzquantenausbeute als relativ niedrig und damit als Limitation für die Nutzung von *Mermaid* [58]. Denn andere Fluorophore wie beispielsweise Micy erreichen eine Quantenausbeute von 0,9 [40]. Dabei ist eine hohe Akzeptorquantenausbeute, im Sinne einer stärkeren Emission, günstig für die Nutzung von Ratio-basierten Methoden, da dann eine geringere Exzitation notwendig ist und dadurch auch ein geringeres Photobleaching hervorgerufen wird. Der Energietransfer selbst wird dabei jedoch nicht beeinflusst [48].

4.3.3 Messeigenschaften von *Mermaid*

Tsutsui et al., die *Mermaid* entwickelt haben, testeten die Anwendung in unterschiedlichen Zellsystemen. So zeigte *Mermaid* in *Xenopus laevis* Oozyten eine 40 %-ige Änderung der FRET-Ratio bei einem 100 mV-Spannungsschritt, ausgelöst mittels *Patch-Clamping*. In Kardiomyozyten der Ratte mit synchronisierter, spontaner Aktivität betrug die Änderung der FRET-Ratio 23 % während eines Schlagzyklus, und bei Messung einzelner wie auch gruppierter Spikes in kultivierten kortikalen Neuronen

ergab sich eine Änderung der FRET-Ratio von 2-7 % [85]. In adulten Kardiomyozyten der Ratte wurde die Verwendbarkeit von *Mermaid* für den Einsatz in Kardiotoxizitätsuntersuchungen getestet. Bei Messung eines einzelnen Aktionspotentials zeigte *Mermaid* dabei eine 25 % größere FRET-Ratio im Vergleich zu dem herkömmlichen Farbstoff di-ANNEPS 8 [82]. In vivo zeigten Tsutsui et al. in einem transgenen Zebrafischmodell mit spezifischer myokardialer Expression von *Mermaid* eine Änderung der FRET-Ratio von 1,00 auf ca. 0,95 (jeweils *normalized value*) – entsprechend einer ca. 5 %-igen Änderung der FRET-Ratio – während eines Schlagzyklus [84]. In vivo erfolgte zudem durch Benedetti et al. die Untersuchung der neuronalen Aktivität in Neuronen, und zwar eines intakten spinalen Netzwerkes in Embryonen des Zebrafisch-Modells für Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) [5]. Mit *Mermaid* wurden die Frequenz, Dauer und basale FRET-Ratio in einer Wildtyp sowie einer genmutierten Motoneuron-Population untersucht, wobei sich – abhängig vom Vorliegen der ALS-spezifischen Mutation sowie vom Zelltyp – die FRET-Ratio während der spontanen Depolarisation von 1,0 auf 1,2 bzw. von 1,4 auf 2,0 änderte. In den hier aufgeführten Untersuchungen zeigte *Mermaid* somit eine deutliche, vom Untersuchungsobjekt abhängige Variabilität hinsichtlich der Auflösung der Membranspannungsänderungen.

Die maximale Spannungssensitivität von *Mermaid* liegt bei -35,8 mV [85]. Das erwartete Ruhemembranpotential der untersuchten präkapillären PASMIC liegt laut Literatur zwischen $-40,7 \text{ mV} \pm 1,3 \text{ mV}$ und $-51 \pm 1,4 \text{ mV}$ [35, 52, 61, 78, 100]. Bei einer Hypoxie-induzierten Depolarisation steigt das Membranpotential auf $-24,0 \text{ mV} \pm 2,4 \text{ mV}$ bis -38 mV [35, 52, 61, 100], sodass die maximale Spannungssensitivität von *Mermaid* in dem durch Hypoxie ausgelösten Messbereich liegt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur Charakterisierung von *Mermaid* wurden bei 33 °C durchgeführt, wie auch bei Tsutsui et al. für Neuro-2A Zellen beschrieben [85] sowie auch in Analogie zu den durchgeführten Versuchen mittels Mangan-Quenching.

Für *Mermaid* ist eine hohe Rate an Photobleaching beschrieben [58, 82], bei jedoch gleichzeitig stabiler Baseline-Ratio und ausreichendem Signal-Rausch-Verhältnis zur Detektion einzelner Aktionspotentiale [82]. Bei intensiver Exzitation mit einer Xenonlampe zeigte mUKG eine Photostabilität vergleichbar mit der von mMicy, jedoch deutlich geringer als der von Cerulean [85]. mKOk ist ähnlich stabil wie tagRFP, bleicht

jedoch schneller aus als mCherry [85]. Eine stabile FRET-Ratio konnte in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit KCl sowie mit OAG bestätigt werden.

4.3.4 *Mermaid* in PASMCM

Die *Mermaid*-kodierende DNA wurde mithilfe eines lentiviralen Gentransfersystems in die isolierten PASMCM der Maus eingebracht. Nach Infektion zeigten diese eine gute *Mermaid*-Expression. Die Funktionalität des Sensors in den PASMCM konnte durch die Änderung der Intensität der Fluoreszenzemission der beiden Fluorophore mUKG und mKOK nach Stimulierung mit unterschiedlichen Konzentrationen von KCl gezeigt werden. Der jeweilige Anstieg der Akzeptorfluoreszenz bei gleichzeitigem Abfall der Donorfluoreszenz zeigte eine stattfindende Energieübertragung vom Donor auf den Akzeptor nach Stimulierung mit KCl. Nach spezifischer Anregung des Donors bzw. Akzeptors mit der jeweils spezifischen Anregungswellenlänge zeigen *Mermaid*-exprimierende PASMCM die Fluoreszenzemission von Donor und Akzeptor jeweils im erwarteten Farbspektrum (mUKG: grün; mKOK: orange). In der Literatur ist jedoch auch die Tendenz zur intrazellulären Aggregatbildung beschrieben [58, 63]. Tian et al quantifizierten dies in Kardiomyozyten der Ratte: 17 % des *Mermaid*-Signals waren auf intrazelluläre, nicht mit der Plasmamembran in Verbindung stehende Strukturen zurückzuführen [82]. Ein optimales Antwortverhalten hängt allerdings hauptsächlich von der richtigen Lokalisation in der Plasmamembran ab, da – wie Perron et al. beschrieben – die intrazelluläre Expression prinzipiell zur Hintergrund-Fluoreszenz beiträgt und dadurch das Signal-Rausch-Verhältnis signifikant vermindern kann [63]. Aufgrund dieser Tatsache wurde in den vorliegenden Untersuchungen parallel zur Auswertung der gesamten Zellfläche zudem auch die Auswertung des Randes der Zellmembran vorgenommen.

4.3.5 Stimulierung mit KCl

Unter physiologischen Bedingungen ist Kalium (K^+) das vorrangige intrazelluläre Kation und spielt eine dominierende Rolle bei der Generierung des Ruhemembranpotentials in PASMCM [24], sodass eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration eine Depolarisation des Ruhemembranpotentials hervorruft [24]. In den vorliegenden Experimenten wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von KCl (25 mM, 50 mM sowie 100 mM) eine Depolarisation der *Mermaid*-exprimierenden PASMCM hervorgerufen. Bei dieser Stimulierung mit KCl in unterschiedlichen Konzentrationen

zeigt die FRET-Ratio dieser PASMC eine konzentrationsabhängige Änderung sowohl für die Auswertung der gesamten Zelle wie auch der Auswertung der Zellmembran. Die Stimulierung mit 25 mM KCl zeigte eine Erhöhung der FRET-Ratio, wobei dieser Unterschied statistisch nicht signifikant war. Die höheren Konzentrationen (50 und 100 mM) zeigten eine konzentrationsabhängige, jeweils signifikante Änderung der FRET-Ratio von *Mermaid* gegenüber der Kontrolle. Eine prinzipielle Funktionalität des Sensors *Mermaid* auf einen depolarisierenden Stimulus nach lentiviralem Gentransfer und Expression ist für PASMC der Maus somit gegeben.

Ella et al. beschrieben eine Ratio-basierte FRET-Messung von Plasmamembranspannungsänderungen in Kombination mit Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ in isolierten glatten Muskelzellen (zerebrale glatte Muskelzellen sowie glatte Muskelzellen des M. cremaster). Als Reaktion auf einen KCl-Stimulus in unterschiedlichen Konzentrationen (Stimulierung mit 10 mM, 30 mM, 45 mM sowie 60 mM KCl) zeigte sich eine konzentrationsabhängige Depolarisation, ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ sowie eine Verringerung der Zellfläche [21]. Turner et al. depolarisierten PASMC der Ratte durch eine Erhöhung der extrazellulären KCl-Konzentration auf 20 mM, sodass eine Plasmamembranspannungsänderung als Reaktion auf Hypoxie gemessen wurde [86]. Mithilfe von *Patch-Clamp*-Messungen von PASMC der Ratte zeigten sie auch, dass die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration von 5 auf 20 mmol das Ruhemembranpotential von $47,2 \text{ mmHg} \pm 1,4 \text{ mV}$ auf $36,8 \text{ mV} \pm 1,5 \text{ mV}$ änderte [86], was einer Änderung der Membranspannung um $0,693 \text{ mV} / \text{mM KCl}$ entspricht. Eine Erhöhung der extrazellulären KCl-Konzentration um 25 mM, wie in der vorliegenden Arbeit als niedrigster Stimulus verwendet, würde in diesen Zellen somit zu einer Depolarisation von $17,325 \text{ mV}$ führen. Dieser Wert ist allerdings aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen und Spezies nicht direkt auf die eigenen Versuche übertragbar. In glatten Muskelzellen aus humanen plazentaren Gefäßen beschrieben Ibrahim et al. einen Anstieg von $0,4120 \pm 0,093 \text{ mV}$ pro mM extrazellulärem K^+ -Anstieg [38], umgerechnet dementsprechend eine Depolarisation von $10,3 \pm 2,325 \text{ mV}$ bei einer Erhöhung der extrazellulären KCl-Konzentration um 25 mM. Die Kultivierung von PASMC der Ratte in Zellkulturmedium mit 40 mM K^+ führte zu einer Depolarisation des Ruhemembranpotentials um fast 20 mV [98]. Der Vergleich beider Versuchsansätze unterstreicht die Variabilität der Ergebnisse unterschiedlicher Spezies und experimenteller Bedingungen, sodass die Ergebnisse nicht auf das

vorliegende Untersuchungssystem direkt übertragen werden können. Turner et al. führten ihre *Patch-Clamp*-Untersuchungen zudem in Abwesenheit extrazellulären Calciums durch [86]. Für die exakte Bestimmung der KCl-induzierten Depolarisation, insbesondere bei niedrigen Konzentrationen sind *Patch-Clamp*-Messungen hilfreich, um die Auflösungsgenauigkeit einer Membranspannungsänderung von *Mermaid* zu bestimmen. Dies ist aber nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

4.3.6 Quantifizierung von intensitätsbasierten FRET-Messungen

Betrachtet man den statistisch differenzierbaren Anstieg der FRET-Ratio auf stark depolarisierende Reize durch KCl, stellt sich die Frage nach einer relativen oder absoluten Quantifizierbarkeit der Membranspannungsänderung anhand der vorliegenden Änderungen der FRET-Ratio. Prinzipiell ist eine Quantifizierung Ratio-basierter FRET-Messungen möglich, benötigt jedoch dezidierte und aufwendige Kontrollmessungen aufgrund des *Crosstalks* [40, 65]. *Crosstalk* ist bei den intensitätsbasierten Messmethoden als maßgeblicher Störfaktor generell sowie bei einer Quantifizierung im Speziellen zu berücksichtigen [20, 62, 102]. Grundvoraussetzung für alle quantitativen Ansätze sind außerdem eine strenge Gleichhaltung der experimentellen Bedingungen wie Belichtungsintensität und Equipment-Setup [62, 102]. Durch Korrektur anhand von Donor-*only*, Akzeptor-*only* und gemeinsamen Messungen können *Crosstalk*-Korrekturen durchgeführt werden, wobei jedoch aus der aufwendigen Bildverarbeitung eine Verstärkung des Rauschens resultiert [32, 40, 65]. Dies kann im ungünstigen Fall das eigentliche FRET-Signal übertreffen [40] und somit valide Aussagen zunehmend erschweren. Eine Vergrößerung des Signals durch eine längere Exzitation reduziert jedoch aufgrund des mit jeder Exzitation einhergehenden Photobleachings die Lebensdauer der Fluorophore. Aber insbesondere repetitive Messungen mit vielfacher Exzitation des FRET-Sensors reduzieren die Lebensdauer der Fluorophore, da die Exzitation photodestruktiv wirkt [95]. Zudem ist dann zwar eine relative Aussage in Bezug auf das Grundsignal, in der vorliegenden Arbeit dementsprechend das Ruhemembranpotential, möglich, eine absolute Quantifizierung der tatsächlichen Membranspannungsänderung in mV benötigt jedoch eine Korrelation mit einer direkten, absoluten Messung der Membranspannung mit beispielweise *Patch-Clamp*-Messungen wie von Ella et al. mit dem intermolekularen FRET-Paar CC2-DMPE und DisBAC4 in vaskulären glatten Muskelzellen beschrieben [21]. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Sensor *Mermaid* ist ein genetisch-kodierter intramolekularer FRET-

Sensor, sodass Messungen mit alleinigen Donor-*only* und Akzeptor-*only*-Proben nicht durchführbar sind. Eine relative oder absolute Quantifizierung der FRET-Ratio der in dieser Arbeit vorliegenden experimentellen Ansätze war somit nicht möglich.

4.3.7 Stimulierung mit OAG

Mithilfe des FRET-Sensors *Mermaid* sollte die durch OAG induzierte Membranspannungsänderung in isolierten, präkapillären PASMC der Maus gemessen werden. TRPC6 wird durch den *second messenger* Diacylglycerol bzw. in vitro durch sein membranpermeables Analogon OAG aktiviert [16, 27, 37], was zu einem Kationeneinstrom mit nachfolgender Depolarisation und der Aktivierung von spannungssensitiven Calciumkanälen sowie resultierendem Calciumeinstrom führt [22, 26, 72]. Über die vorliegende Arbeit hinaus soll die Messung mit *Mermaid* der weiteren Aufschlüsselung des Signaltransduktionsweges zur Hypoxie-induzierten TRPC6-Aktivierung dienen. In den vorliegenden Versuchen erfolgte die Applikation von OAG in Konzentrationen von 100 μM , 200 μM sowie 500 μM . Evidenz für die essentielle Rolle sowohl von TRPC6 wie auch DAG für die akute Phase der HPV auf zellulärer Ebene wurde von Weißmann et al. gezeigt: In Wildtyp-PASMC sind unter hypoxischen Bedingungen nach Blockade von spannungsabhängigen Calciumkanälen durch Nifedipin Kationenströme messbar, welche in TRPC6^{-/-}-PASMC fehlen [93]. Auch die direkte TRPC6-Aktivierung mit OAG unter normoxischen Bedingungen ruft einen Kationeneinstrom in Wildtyp PASMC hervor, welcher folglich mit einer Änderung der Membranspannung einhergeht und in TRPC6^{-/-}-PASMC fehlt [93]. Dies unterstreicht die Rolle von OAG für die TRPC6-Aktivierung in PASMC unter hypoxischen Bedingungen. Auch die Inhibition der DAG-Kinase, die zu einer Akkumulation von DAG führt, sowie akute Hypoxie führen zu einem intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg in Wildtyp-PASMC, welcher in TRPC6^{-/-}-PASMC fehlt [93]. Des Weiteren akkumuliert DAG, welches unter normoxischen Bedingungen im Zytosol lokalisiert ist, bei akuter Hypoxie an der Plasmamembran [93]. Auch auf Ebene des intakten Organs konnte von Fuchs et al. in der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge gezeigt werden, dass die alleinige Zugabe von OAG zum normoxischen Perfusat einen dosisabhängigen Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks (PAP) als Ausdruck einer Vasokonstriktion in Wildtyp-Mäusen hervorruft, welcher in Lungen von TRPC6-defizienten Mäusen ausbleibt [27]. Durch die OAG-induzierte Öffnung kommt es zum Ioneneinstrom über die Membran mit Membrandepolarisation, Tonuserhöhung der glatten Muskulatur und konsekutivem

Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes. Insgesamt gibt es somit deutliche Hinweise, dass OAG eine Schlüsselrolle bei der TRPC6-Aktivierung der akuten HPV spielt. Die Stimulierung der *Mermaid*-exprimierenden PASMC mit OAG erbrachte in den vorliegenden Versuchen für alle verwendeten Konzentrationen untereinander (100 μM , 200 μM sowie 500 μM) keine Änderung der Fluoreszenzintensität als Korrelat einer Membranspannungsänderung. Der sowohl in der Auswertung der gesamten Zelle wie auch der Zellmembran gesehene leichte Abfall mit Signifikanz bei 500 μM im Vergleich mit der Kontrolllösung scheint ohne Bedeutung zu sein, da zum einen keine Graduierung in der Reaktion auf eine typische Stimulusstärke mit 100 μM sowie 200 μM zu sehen ist. Typische Konzentrationen für die TRPC6-Stimulierung im Zellkulturexperiment sind 50-100 μM [37, 39, 54, 80] bzw. 30-120 μM in der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge [27]. In TRPC6-exprimierenden CHO (*Chinese Hamster Ovary*)-Zellen ist der OAG-induzierte Effekt von TRPC6 konzentrationsabhängig und zeigte eine halbmaximale Antwort bei 117 μM [37]. Des Weiteren bewirkt die Stimulierung mit OAG in PASMC der Maus in *Patch Clamp*-Messungen TRPC6-vermittelte Kationeneinströme [54, 93], wohingegen der mit 500 μM OAG messbare Abfall der FRET-Ratio von *Mermaid* eine Hyperpolarisation andeutet, sodass diesem kontroversen Ergebnis, insbesondere unter fehlender Reaktion mit 100 μM und 200 μM , keine Relevanz für die vorliegende Fragestellung beigemessen wird. Zum Nachweis der Funktionsfähigkeit des FRET-Sensors erfolgte zusätzlich die Stimulierung mit 100 mM KCl, welche jeweils einen signifikanten Anstieg der FRET-Ratio zeigte, sodass von einer prinzipiellen Funktionalität des Sensors ausgegangen werden kann. Allerdings zeigt, wie bereits in Kapitel 4.3.5 beschrieben, die niedrigste verwendete Stimulierung mit 25 mM KCl zwar eine Tendenz für die Erhöhung der Fluoreszenzintensität jedoch ohne statistisch differenzierbaren Unterschied, sodass die geringe, OAG-induzierte Änderung der Membranspannung mit dem FRET-Sensor *Mermaid* nicht auflösbar scheint. Zusammenfassend eignet sich der FRET-Sensor *Mermaid* nicht zur Untersuchung einer OAG-induzierten Änderung der Plasmamembranspannung in PASMC der Maus.

4.3.8 Versuche unter hypoxischen Bedingungen

Die Messung der Plasmamembranspannung dient als Meßgröße für Untersuchungen der Signaltransduktionskaskade in den Effektorzellen der HPV. Werden PASMC beispielweise durch Hypoxie depolarisiert, resultieren aus dieser Depolarisation ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und die Kontraktion der PASMC. Das Ziel der vorliegenden Arbeit

war die Charakterisierung des FRET-Sensors *Mermaid* zur Messung einer Hypoxiebedingten Änderung der Plasmamembranspannung. Denn über diese Arbeit hinaus sollte mithilfe dieser Methode die zelluläre Signaltransduktionskaskade, die zur Hypoxie-induzierten Aktivierung von TRPC6 führt, weiter aufgeschlüsselt werden. Dazu wurden isolierte, *Mermaid*-exprimierende PASMC mit hypoxischer Hepes-Ringer-Lösung perfundiert und mit normoxisch perfundierten PASMC verglichen. Es wurde keine signifikante Änderung der FRET-Ratio der hypoxisch perfundierten PASMC im Vergleich zu den normoxisch perfundierten PASMC gemessen. In beiden Ansätzen enthielt die Hepes-Ringer-Lösung 4 nM ET-1 als *Priming*. Wie bereits in Kapitel 4.3 beschrieben führt eine Reduktion des pO_2 als Stimulus der HPV zu einer Depolarisation des Membranpotentials in PASMC und pulmonalarteriellen Gefäßen. In kleinen pulmonalarteriellen Gefäßen von Mischlingskatzen (Durchmesser $< 300 \mu\text{M}$) zeigten *Patch Clamp*-Untersuchungen von Harder et al. bei einem pO_2 von 50 Torr, entsprechend 50 mmHg, eine Depolarisation von $-51,0 \text{ mV}$ auf $-38,0 \text{ mV}$ [35] sowie bei Untersuchungen von Madden et al. eine Depolarisation von $-51,0 \text{ mV} \pm 1,4 \text{ mV}$ auf $-37,0 \text{ mV} \pm 2,0 \text{ mV}$ [52]. In PASMC der Ratte, ausgehend von einem Ruhemembranpotential von $-40,7 \text{ mV} \pm 1,3 \text{ mV}$, depolarisierte Hypoxie (pO_2 von $17 \pm 3 \text{ mmHg}$) die Membran reversibel auf $-24 \text{ mV} \pm 2,4 \text{ mV}$ [100] sowie von -43 mV auf -19 mV beim *Priming* mit ET-1 [86]. In PASMC aus Kaninchen führte die Reduktion des pO_2 auf $14 \text{ mmHg} \pm 2 \text{ mmHg}$ ebenfalls zu einer Membrandepolarisation von $-45 \text{ mV} \pm 1 \text{ mV}$ auf $-35 \text{ mV} \pm 3 \text{ mV}$ [61]. Ein Vergleich dieser Werte zeigt, dass eine Variabilität sowohl bezüglich des Ruhemembranpotentials wie auch des Grades der Depolarisation vorliegt, die sowohl durch unterschiedliche Grade an Hypoxie, durch unterschiedliche Spezies, durch unterschiedliches Untersuchungsmaterial (Zellen oder Gefäße) wie auch weitere Faktoren des experimentellen Aufbaus verursacht werden. Die Depolarisation wies zudem unterschiedliche Kinetiken auf. *Patch-Clamp*-Messungen zeigten beispielweise in PASMC der Ratte eine initiale schnelle Depolarisation der Membranspannung von 10 mV für maximal 2 Minuten mit einer nachfolgenden langsamen Depolarisation der Membranspannung über einen Zeitraum von 10 Minuten [100]. Des Weiteren zeigte sich in PASMC des Hundes eine langsame kontinuierliche Depolarisation über 4 Minuten [66] und in PASMC von Kaninchen ebenfalls eine langsame Depolarisation über 15 Minuten [61]. Passend hierzu zeigte auch die $[Ca^{2+}]_i$ als Ergebnis einer Hypoxie-induzierten Zellaktivierung einen Anstieg über mehrere Minuten, beispielweise waren es bei PASMC

der Maus 25 Minuten bei hypoxischer Perfusion mit einem pO_2 von 18 mmHg [93]. In humanen PASMC zeigte sich ein deutlich schnellerer Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ bei Perfusion mit hypoxischem Medium (pO_2 von 20 mmHg), jedoch war die Perfusionsgeschwindigkeit mit 5 ml / Minute zehnfach höher [80] im Vergleich zu den eigenen vorliegenden Experimenten. Allerdings sollte die Perfusionsrate nicht zu hoch gewählt werden, da PASMC im Körper keinem Scherstress ausgesetzt sind. Ansonsten könnten dadurch Effekte verursacht werden, die die PASMC aktivieren. In PASMC der Ratte findet sich bei einer langsamen Perfusionsrate (0,5 ml / Minute) ein Hypoxie-induzierter Calciumanstieg ebenfalls innerhalb weniger Minuten [89].

Bestandteil des Messprotokolls der vorliegenden Arbeit war ein *Priming* mit ET-1. Das Peptidhormon ET-1 ist ein potenter Vasokonstriktor und ein Mitogen für vaskuläre glatte Muskelzellen [44]. *Priming* durch vasoaktive Substanzen wie ET-1 oder Prostaglandin $F2\alpha$ zeigte sich als eine Voraussetzung für die Entstehung bzw. die volle Entwicklung der HPV [45, 49, 70, 86]. In Untersuchungen isolierter PASMC der Ratte war das *Priming* Voraussetzung für eine hypoxische Depolarisation [86]. Ebenso wurde in PASMC des Schweines [70] sowie in pulmonalen Arterien des Schweines [49] und der Ratte [45] die Hypoxie-induzierte Kontraktion durch *Priming* mit ET-1 bzw. Prostaglandin $F2\alpha$ deutlich verstärkt. In den vorliegenden eigenen Untersuchungen zeigte sich für die PASMC der Maus ein kontinuierlicher Anstieg der FRET-Ratio von *Mermaid* bei hypoxischer wie auch normoxischer Perfusion, welcher jedoch bereits vor Umstellung auf hypoxisches Medium begann. Turner et al. zeigten mithilfe von *Patch-Clamp*-Messungen in PASMC der Ratte, dass die Applikation von 0,1 nM ET-1 eine langsam ansteigende und prolongierte Depolarisation von -43 mV auf -26 mV hervorrief [86]. Eine zusätzliche Depolarisation durch Hypoxie zeigte dann eine nochmalige weitere Depolarisation auf -19 mV [86]. Der in den durchgeführten Experimenten gemessene Anstieg der FRET-Ratio von *Mermaid* sowohl bei normoxisch wie auch hypoxisch perfundierten PASMC könnte somit unter anderem durch das notwendige ET-1-*Priming* induziert sein. Nichtsdestotrotz konnten Turner et al. einen Hypoxie-induzierten weiteren Anstieg der Membrandepolarisation aufzeigen, welcher in den eigenen FRET-Messungen nicht gemessen wurde.

Zusammenfassend stellt sich somit die Frage, ob der FRET Sensor *Mermaid* die erwartete Hypoxie-induzierte Plasmamembranspannungsänderung messen kann. Eine angenommene Erhöhung des Membranpotentials zwischen 10,3 und 17,3 mV durch eine

Erhöhung der extrazellulären Kaliumionenkonzentration um 25 mM entspricht in etwa einer minimalen Hypoxie-induzierten Depolarisation von mindestens 10 mV. In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich zwar eine Erhöhung der FRET-Ratio auf der niedrigsten Stufe der Stimulierung mit 25 mM KCl, wobei sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zeigte. In diesem Bereich einer Membranpotentialänderung kann somit nicht von einer eindeutigen Messbarkeit mittels *Mermaid* ausgegangen werden.

Mermaid fand, wie bereits beschrieben, bereits in unterschiedlichsten Fragestellungen, vor allem jedoch für die Messung von Membranspannungsänderungen in neuronalen und kardialen Zellen sowie Zellverbänden Anwendung, wobei jedoch eine große Variabilität der erreichten Signalgrößen unter unterschiedlichen Untersuchungsbedingungen und Untersuchungsobjekten (Zelllinien, frisch isolierte Zellen sowie in vivo) auffällt. So zeigten Kardiomyozyten der Ratte eine Veränderung der FRET-Ratio um 23 % während eines Schlagzyklus [85]. Die in vivo-Untersuchung des Zebrafischmodells mit spezifischer myokardialer Expression von *Mermaid* zeigte jedoch nur eine 5 %-ige Änderung der FRET-Ratio während eines Schlagzyklus [84] und bei Tian et al. in Kardiomyozyten eine Änderung der FRET-Ratio von 7 % während eines Schlagzyklus [82]. Insgesamt scheint die Nutzung von *Mermaid* somit stark von Untersuchungsbedingungen und untersuchtem Objekt abhängig zu sein.

4.3.9 Vergleich der Auswertungen – gesamte Zelle versus Zellmembran

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswertung der gesamten Zelle mit der Auswertung der Zellmembran verglichen. Für die Depolarisation mit KCl zeigte die Auswertung der Zellmembran verglichen mit der Auswertung der gesamten Zelle insbesondere für die stärkere Stimulierung mit 50 mM sowie 100 mM KCl eine etwas größere mittlere Änderung der FRET-Ratio von *Mermaid* sowie auch einen größeren Standardfehler. Auch für die direkte TRPC6-Aktivierung mit OAG bestätigt sich die Tendenz einer größeren FRET-Ratio von *Mermaid* mit einem größeren Standardfehler sowohl für die Stimulierung mit OAG wie auch die nachfolgende Depolarisation mit KCl. Am deutlichsten zeigte sich diese Differenz jedoch bei den Messungen unter hypoxischen Bedingungen. Die Auswertung der Zellmembran konnte wie bei der Auswertung der gesamten Zelle keinen Unterschied der Plasmamembranspannung zwischen hypoxischen und normoxischen PASMCS zeigen. Größere Standardfehler bei der Auswertung der Zellmembran sind Ausdruck einer größeren Streubreite der Messwerte.

Der zum Teil stärkere Anstieg der FRET-Ratio von *Mermaid* nach der jeweiligen Stimulierung bei Auswertung der Zellmembran im Vergleich zur gesamten Zelle könnte darauf zurückzuführen sein, dass in die Auswertung der gesamten Zelle ein insgesamt stärkeres Hintergrundrauschen in das Gesamtsignal durch Auswertung der gesamten Zellfläche eingeht, und das Signal somit im Vergleich zur Auswertung der Zellmembran kleiner ausfällt. *Mermaid* zeigt eine nicht unbeträchtliche Lokalisation in intrazellulären Strukturen. Wie bereits beschrieben zeigten Tian et al in Kardiomyozyten, dass 17 % des Fluoreszenzsignals von Strukturen herrührt, welche nicht mit dem Extrazellulärraum verbunden sind und nicht zu spannungsabhängigen Veränderungen des FRET-Signals beitragen [82]. Perron et al. sahen ebenfalls eine starke intrazelluläre Aggregatbildung [63] und wie Perron et al. beschrieben, verschlechterte eine hohe intrazelluläre Fluoreszenz durch Erhöhung der Hintergrundfluoreszenz das Signal-Rausch-Verhältnis. Auch Sung et al. fanden bei einer gegenüberstellenden Auswertung der gesamten Zelle gegenüber eines Plasmamembranrandes bei Nabi2.242-exprimierenden HEK293 Zellen zwar ein um 10 % größeres Signal der reinen Zellmembranrand-Auswertung, wobei sich hier jedoch keine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses zeigte [77]. Insgesamt erbrachte die Auswertung der Zellmembran keine Verbesserung für die Stimulierung mit OAG oder die direkte Applikation von Hypoxie im Sinne einer signifikant messbaren Änderung der FRET-Ratio von *Mermaid*.

5 Zusammenfassung

Die Hypoxische Pulmonale Vasokonstriktion ist ein spezieller Mechanismus des pulmonalen Gefäßbettes zur Optimierung der Oxygenierung des Blutes bei lokaler oder generalisierter alveolärer Hypoxie durch Umverteilung des Blutes von schlecht belüfteten Lungenabschnitte in gut ventilierte Bereiche. Die Sensor- sowie Effektorzellen dieses Mechanismus sind präkapilläre pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (PASMC). In der Vermittlung der ersten akuten Phase der HPV spielt der Ionenkanal TRPC6 eine essentielle Rolle, wobei die Signaltransduktionskaskade der Aktivierung noch nicht im Detail entschlüsselt ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von *Mermaid* zur Messung von Membranspannungsänderungen in PASMC der Maus, die aus einer Hypoxie-induzierten TRPC6-Aktivierung resultieren, um über diese Arbeit hinaus zur weiteren Entschlüsselung der TRPC6-aktivierenden Signaltransduktionskaskade zu dienen. Es wurden präkapilläre PASMC der Maus isoliert und mit *Mermaid*-Sequenz-enthaltenden Lentiviren infiziert. Nach Expression des FRET-Sensors in der Plasmamembran der PASMC wurde die Sensorreaktion bei Membranspannungsänderungen mithilfe unterschiedlicher Stimuli charakterisiert. Die Verifizierung der Sensorfunktionalität mit KCl in unterschiedlichen Konzentrationen zeigte nur für die höheren Konzentrationen eine gute Unterscheidbarkeit der unterschiedlichen Stimulierungsstärken, wobei die schwächste Konzentrationsstufe keinen signifikanten Unterschied zeigte. Die direkte Aktivierung von TRPC6 mit seinem membranpermeablen Aktivator OAG zeigte für alle verwendeten Konzentrationen keine mithilfe von *Mermaid* gemessene Membranspannungsänderung. Auch die Applikation von Hypoxie unter gleichzeitigem *Priming* durch den Vasokonstriktor ET-1 zeigte bei den vorliegenden Versuchsbedingungen keine mit *Mermaid* messbare Membranspannungsänderung im Vergleich zu normoxischen Kontrollen. Dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten PASMC der Maus eine Hypoxie-induzierte Membranspannungsänderung indirekt zeigen können, wurde mithilfe der auf Fura-2 AM basierten Mangan-Quenching Methode verifiziert. Zusammengefasst zeigte sich der FRET-Sensor *Mermaid* im vorliegenden Versuchsaufbau nicht geeignet zur Messung einer Hypoxie-induzierten Änderung der Plasmamembranspannung in präkapillären PASMC der Maus.

6 Summary

Hypoxic pulmonary vasoconstriction is an intrinsic mechanism of the pulmonary vascular bed to optimise blood oxygenation in terms of localised alveolar hypoxia and diverts bloodflow from bad to well ventilated areas of the lung. The sensor and effector cells of this mechanism are precapillary pulmonary arterial smooth muscle cells. The ion channel TRPC 6 plays an essential role for the first acute phase of HPV, but the signaling cascade of its activation isn't still resolved in detail. The present study aimed for characterising the FRET-sensor *Mermaid* for measuring changes of the plasma membrane potential in mouse precapillary pulmonary arterial smooth muscle cells resulting from hypoxia-induced activation of TRPC6. Exceeding the present work the FRET-based plasma membrane potential measurement should help deciphering this TRPC6-activating signal transduction pathway. Mouse precapillary pulmonary arterial smooth muscle cells were isolated and infected by lentiviruses coding for the *Mermaid*-sequence. After expression of the sensor in the plasma membrane the sensor response to changes in membranvoltage was chararecterised with different stimuli. Evidence for the function of the sensor using potassiumchloride in different concentrations was given only for higher concentrations of potassiumchloride. The lowest stimulus did not show a significant change. Direct activation of TRPC6 by its membranepерmeable activator OAG showed no changes of the plasma membrane potential measured by *Mermaid* for all tested OAG concentrations. Also the application of hypoxia with simultaneous *priming* with the vasoconstrictor Endothelin-1 showed no change of the plasma membrane potential measured by *Mermaid* in comparison to normoxic conditions with Endothelin-1 priming. Indirect evidence for the hypoxia-induced change of plasma membrane potential of mouse PASMC was measured by the Fura-2 AM based manganese quenching method.

In summary, hypoxia-induced changes of plasma membrane potential in mouse precapillary pulmonray arterial smooth muscle cells are not detectable by the FRET sensor *Mermaid* with the used experimental setup.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumkonzentration
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
ALI	<i>acute lung injury</i>
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
ATP	Adenosintriphosphat
α-sma	<i>alpha-smooth muscle actin</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD4	<i>cluster of differentiation 4</i>
Ci-VSP	<i>Ciona-intestinalis voltage sensing phosphatase</i>
CO ₂	Kohlendioxid
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
d. h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
ET-1	Endothelin-1
FCS	fötale Kälberserum
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer

Fura-2 AM	Fura-2-Acetoxymethylester
g	Gramm
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEK293 T	<i>human embryonic kidney cells</i> , humane embryonale Nierenzellen mit SV40-T-Antigen
HIV	humane Immundefizienzviren
HPV	Hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion
Hz	Hertz
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Mol
m ²	Quadratmeter
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MnCl ₂	Manganchlorid
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanonmol
OAG	1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol

PAP	pulmonalarterieller Druck
PASMC	pulmonalarterielle glatte Muskelzelle
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
QY	Quantenausbeute
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	<i>receptor operated channel</i> (= Rezeptor-gesteuerter Kanal)
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RRE	<i>Rev responsive element</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SMC-Medium	<i>Smooth Muscle Cell Growth Medium 2</i>
SOC	<i>store operated channel</i>
S.O.C.	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SV40	Simian-Virus 40
tat	<i>transactivator of transcription</i>
TRPC	<i>transient receptor potential channel</i>
VDCC	<i>voltage dependent channel</i>
VSD	<i>voltage sensing domain</i>
VSFP	<i>voltage sensing fluorescent protein</i>
VSV-G	Glykoprotein des Vesicular-Stomatitis-Virus

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Schematische Funktionsweise eines intramolekularen FRET-Sensors.	S. 11
Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der Struktur des FRET-basierten Membranspannungssensors <i>Mermaid</i> in einer Zellmembran.	S. 13
Abbildung 1-3 Emissionsspektren (durchgehende Linien) sowie Absorptionsspektren (gepunktete Linien) des Donors (mUKG; grün) sowie Akzeptors (mKOK; orange) des FRET-Sensors <i>Mermaid</i> [aus [85]].	S. 13
Abbildung 2-1 HEK 293T-Zellen mit Calciumphosphatpräzipitaten.	S. 36
Abbildung 2-2 Fluoreszenzexcitationsspektrum des Ca ²⁺ -Indikators Fura-2 [aus [81]].	S. 39
Abbildung 2-3 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Perfusionsversuche.	S. 40
Abbildung 2-4 Auswertung der Versuche mit <i>Mermaid</i> -exprimierenden PASMC mittels ImageJ.	S. 48
Abbildung 2-5 Schematische Darstellung der Auswertung der <i>Mermaid</i> -Versuche.	S. 50
Abbildung 3-1 PASMC, die aus isolierten Eisenpartikel-enthaltenden Gefäßstücken der pulmonalarteriellen Gefäßstrombahn der Maus wuchsen.	S. 52
Abbildung 3-2 Direkte Immunfluoreszenzfärbung der PASMC aus der Maus.	S. 53
Abbildung 3-3 Mangan-Quenching in PASMC unter hypoxischen sowie normoxischen Bedingungen.	S. 54
Abbildung 3-4 Mangan-Quenching-Rate in PASMC unter hypoxischen sowie normoxischen Bedingungen.	S. 55
Abbildung 3-5 <i>Mermaid</i> -exprimierende PASMC, aufgenommen mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops.	S. 56

Abbildung 3-6 Exemplarische Darstellung von Donor- (mUKG) sowie Akzeptorfluoreszenz (mKOk) nach Aufteilung des emittierten Fluoreszenzlichtes in Donor- sowie Akzeptorkanal mithilfe eines Strahlteilers.	S. 57
Abbildung 3-7 Exemplarische Darstellung der Donor- und Akzeptoremission sowie der FRET-Ratio einer PASMCM ohne Stimulierung mit KCl (Kontrolle) sowie nach Stimulierung mit unterschiedlichen Konzentrationen an KCl (25 mM, 50 mM, 100 mM KCl).	S. 58
Abbildung 3-8 Messung der FRET-Ratio in <i>Mermaid</i> -exprimierenden PASMCM mit Auswertung der gesamten Zelle nach Applikation verschiedener Konzentrationen von KCl.	S. 59
Abbildung 3-9 Änderung der FRET-Ratio von <i>Mermaid</i> in PASMCM nach Stimulierung mit KCl in verschiedenen Konzentrationen	S. 60
Abbildung 3-10 FRET-Ratio in <i>Mermaid</i> -exprimierenden PASMCM mit Auswertung der Zellmembran nach Applikation verschiedener Konzentrationen von KCl (25 mM (n = 7), 50 mM (n = 9), 100 mM (n = 8) neben der Kontrolle (n = 7)).	S. 61
Abbildung 3-11 Änderung der FRET-Ratio von <i>Mermaid</i> in PASMCM nach Stimulierung mit KCl in verschiedenen Konzentrationen	S. 62
Abbildung 3-12 FRET-Ratio in <i>Mermaid</i> -exprimierenden PASMCM mit Auswertung der gesamten Zelle nach Stimulierung mit OAG in verschiedenen Konzentrationen sowie nachfolgender Stimulierung mit 100 mM KCl.	S. 64
Abbildung 3-13 Änderung der FRET-Ratio von <i>Mermaid</i> in PASMCM mit Auswertung der gesamten Zelle nach Stimulierung mit OAG in verschiedenen Konzentrationen sowie nachfolgender Stimulierung mit 100 mM KCl.	S. 65
Abbildung 3-14 FRET-Ratio in <i>Mermaid</i> -exprimierenden PASMCM mit Auswertung der Zellmembran nach Stimulierung mit OAG in verschiedenen Konzentrationen sowie nachfolgender Stimulierung mit 100 mM KCl.	S. 66

Abbildung 3-15 Änderung der FRET-Ratio von <i>Mermaid</i> in PASMC mit Auswertung der Zellmembran nach Stimulierung mit OAG in verschiedenen Konzentrationen sowie nachfolgender Stimulierung mit 100 mM KCl.	S. 67
Abbildung 3-16 Messung der FRET-Ratio in <i>Mermaid</i> -exprimierenden PASMC mit Auswertung der gesamten Zelle bei Perfusion mit hypoxischer (n = 11) bzw. normoxischer (n = 6) Hepes-Ringer-Lösung.	S. 69
Abbildung 3-17 FRET-Ratio in <i>Mermaid</i> -exprimierenden PASMC bei hypoxischer (n = 11) und normoxischer (n = 6) Perfusion unter Auswertung der gesamten Zelle.	S. 70
Abbildung 3-18 FRET-Ratio in <i>Mermaid</i> -exprimierenden PASMC unter Auswertung der Zellmembran bei Perfusion mit hypoxischer (n = 11) bzw. normoxischer (n = 6) Hepes-Ringer-Lösung.	S. 71
Abbildung 3-19 FRET-Ratio in <i>Mermaid</i> -exprimierenden PASMC, 16. Minute bei hypoxischer (n = 11) und normoxischer (n = 6) Perfusion, Auswertung der Zellmembran.	S. 72
Abbildung 3-20 Messung des normobaren Sauerstoffpartialdrucks [mmHg] bei hypoxischer Perfusion.	S. 74

9 Formel- und Tabellenverzeichnis

Formel 1-1 Berechnung der FRET-Ratio von Donor- und Akzeptoremission.	S. 12
Formel 2-1 Formel zur Steigungsberechnung bei den Mangan-Quenching-Versuchen.	S. 43
Formel 2-2 Formel zur Berechnung der Mangan-Quenching-Rate.	S. 43
Tabelle 2-1 Zusammensetzung der HBS-Lösung (2-fach).	S. 24
Tabelle 2-2 Zusammensetzung des TE-Puffers (0,1-fach).	S. 24
Tabelle 2-3 Zusammensetzung der Hepes-Ringer-Lösung/-Stocklösung.	S. 25
Tabelle 2-4 Protokoll zur Transfektion von HEK 293T-Zellen mittels Calciumphosphatpräzipitation.	S. 35
Tabelle 2-5 Versuchsablauf der Mangan-Quenching-Versuche.	S. 42
Tabelle 2-6 Messzeitpunkte zur Berechnung der Mangan-Quenching-Rate.	S. 43
Tabelle 3-1 Gegenüberstellung der KCl-induzierten Änderung der FRET-Ratio von <i>Mermaid</i> für die verschiedenen Konzentrationen bei Auswertung der gesamten Zelle bzw. der Zellmembran.	S. 63
Tabelle 3-2 Vergleichende Zusammenfassung der Änderungen der FRET-Ratio nach OAG- sowie KCl-Applikation für die beiden Auswertungen gesamte Zelle und Zellmembran.	S. 67
Tabelle 3-3 Gegenüberstellung der FRET-Ratio der beiden Auswertungen gesamte Zelle und Zellmembran in <i>Mermaid</i> -exprimierenden PASCs unter hypoxischen sowie normoxischen Bedingungen ab der 16. Messminute.	S. 72
Tabelle 3-4 Übersicht des Sauerstoffpartialdrucks des hypoxischen Perfusates in mmHg zum Zeitpunkt 0, 2,5, 6,5 10 und 29 Minuten.	S. 74

10 Literaturverzeichnis

- [1] Agustí, A. G., Barberá, J. A., Roca, J., Wagner, P. D., Guitart, R., and Rodríguez-Roisín, R. 1990. Hypoxic pulmonary vasoconstriction and gas exchange during exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *Chest* 97, 2, 268–275.
- [2] Akemann, W., Mutoh, H., Perron, A., Park, Y. K., Iwamoto, Y., and Knopfel, T. 2012. Imaging neural circuit dynamics with a voltage-sensitive fluorescent protein. *J. Neurophysiol.* 108, 8, 2323–2337.
- [3] Ballester, E., Roca, J., Ramis, L., Wagner, P. D., and Rodríguez-Roisin, R. 1990. Pulmonary gas exchange in severe chronic asthma. Response to 100% oxygen and salbutamol. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141, 3, 558–562.
- [4] Barberà, J. A., Roger, N., Roca, J., Rovira, I., Higenbottam, T. W., and Rodríguez-Roisin, R. 1996. Worsening of pulmonary gas exchange with nitric oxide inhalation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 347, 8999, 436–440.
- [5] Benedetti, L., Ghilardi, A., Rottoli, E., Maglie, M. de, Prospero, L., Perego, C., Baruscotti, M., Bucchi, A., Del Giacco, L., and Francolini, M. 2016. INaP selective inhibition reverts precocious inter- and motoneurons hyperexcitability in the Sod1-G93R zebrafish ALS model. *Sci. Rep.* 6, 24515.
- [6] Bergofsky, E. H. and Holtzman, S. 1967. A study of the mechanisms involved in the pulmonary arterial pressor response to hypoxia. *Circ. Res.* 20, 5, 506–519.
- [7] Bhagi, S., Srivastava, S., and Singh, S. B. 2014. High-altitude pulmonary edema: review. *J. Occup. Health.* 56, 4, 235–243.
- [8] Brimiouille, S., Julien, V., Gust, R., Kozłowski, J. K., Naeije, R., and Schuster, D. P. 2002. Importance of hypoxic vasoconstriction in maintaining oxygenation during acute lung injury. *Crit. Care Med.* 30, 4, 874–880.
- [9] Brimiouille, S., LeJeune, P., and Naeije, R. 1996. Effects of hypoxic pulmonary vasoconstriction on pulmonary gas exchange. *J. Appl. Physiol.* 81, 4, 1535–1543.
- [10] Chang Liao, M.-L., Boer, T. P. de, Mutoh, H., Raad, N., Richter, C., Wagner, E., Downie, B. R., Unsold, B., Arooj, I., Streckfuss-Bomeke, K., Doker, S., Luther, S., Guan, K., Wagner, S., Lehnart, S. E., Maier, L. S., Stuhmer, W., Wettwer, E., van Veen, T., Morlock, M. M., Knopfel, T., and Zimmermann, W.-H. 2015. Sensing Cardiac Electrical Activity With a Cardiac Myocyte--Targeted Optogenetic Voltage Indicator. *Circ. Res.* 117, 5, 401–412.

- [11] Christ, B. 2008. *Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem*. Anatomie 1. Elsevier, Urban & Fischer, München.
- [12] Cockrell, A. S. and Kafri, T. 2007. Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol. Biotechnol.* 36, 3, 184–204.
- [13] Corte, P. and Young, I. H. 1985. Ventilation-perfusion relationships in symptomatic asthma. Response to oxygen and clemastine. *Chest* 88, 2, 167–175.
- [14] Davis, H. E., Rosinski, M., Morgan, J. R., and Yarmush, M. L. 2004. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys. J.* 86, 2, 1234–1242.
- [15] Dietrich, A., Kalwa, H., Fuchs, B., Grimminger, F., Weissmann, N., and Gudermann, T. 2007. In vivo TRPC functions in the cardiopulmonary vasculature. *Cell Calcium* 42, 2, 233–244.
- [16] Dietrich, A., Kalwa, H., Rost, B. R., and Gudermann, T. 2005. The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance. *Pflugers Arch.* 451, 1, 72–80.
- [17] Dimitrov, D., He, Y., Mutoh, H., Baker, B. J., Cohen, L., Akemann, W., and Knöpfel, T. 2007. Engineering and characterization of an enhanced fluorescent protein voltage sensor. *PLoS One* 2, 5, e440.
- [18] DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., and Calos, M. P. 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1, 379–387.
- [19] Durand, S. and Cimorelli, A. 2011. The inside out of lentiviral vectors. *Viruses* 3, 2, 132–159.
- [20] Elder, A., Domin, A., Kaminski Schierle, G., Lindon, C., Pines, J., Esposito, A., and Kaminski, C. 2009. A quantitative protocol for dynamic measurements of protein interactions by Forster resonance energy transfer-sensitized fluorescence emission. *J. R. Soc. Interface* 6, Suppl_1, S59-S81.
- [21] Ella, S. R., Yang, Y., Clifford, P. S., Gulia, J., Dora, K. A., Meininger, G. A., Davis, M. J., and Hill, M. A. 2010. Development of an image-based system for measurement of membrane potential, intracellular Ca(2+) and contraction in arteriolar smooth muscle cells. *Microcirculation* 17, 8, 629–640.

- [22] Estacion, M., Sinkins, W. G., Jones, S. W., Applegate, M. A. B., and Schilling, W. P. 2006. Human TRPC6 expressed in HEK 293 cells forms non-selective cation channels with limited Ca²⁺ permeability. *J. Physiol. (Lond.)* 572, Pt 2, 359–377.
- [23] EULER, U. S. v. and LILJESTRAND, G. 1946. Observations on the Pulmonary Arterial Blood Pressure in the Cat. *Acta Physiol. Scand.* 12, 4, 301–320.
- [24] Firth, A. L., Remillard, C. V., Platoshyn, O., Fantozzi, I., Ko, E. A., and Yuan, J. X.-J. 2011. Functional ion channels in human pulmonary artery smooth muscle cells: Voltage-dependent cation channels. *Pulm. Circ.* 1, 1, 48–71.
- [25] Förster, T. 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* 437, 1-2, 55–75.
- [26] Fuchs, B., Dietrich, A., Gudermann, T., Kalwa, H., Grimminger, F., and Weissmann, N. 2010. The role of classical transient receptor potential channels in the regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Adv. Exp. Med. Biol.* 661, 187–200.
- [27] Fuchs, B., Rupp, M., Ghofrani, H. A., Schermuly, R. T., Seeger, W., Grimminger, F., Gudermann, T., Dietrich, A., and Weissmann, N. 2011. Diacylglycerol regulates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction via TRPC6. *Respir. Res.* 12, 20.
- [28] Gao, Y. and Raj, J. U. 2010. Regulation of the pulmonary circulation in the fetus and newborn. *Physiol. Rev.* 90, 4, 1291–1335.
- [29] Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 1, 59–74.
- [30] Graham, F. L. and van der Eb, A. J. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 2, 456–467.
- [31] Grant, J. L., Naylor, R. W., and Crandell, W. B. 1980. Bronchial adenoma resection with relief of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Chest* 77, 3, 446–449.
- [32] Grecco, H. E. and Verveer, P. J. 2011. FRET in cell biology: still shining in the age of super-resolution? *Chemphyschem* 12, 3, 484–490.
- [33] Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 6, 3440–3450.
- [34] Gudermann, T., Mederos y Schnitzler, Michael, and Dietrich, A. 2004. Receptor-operated cation entry--more than esoteric terminology? *Sci. STKE* 2004, 243, pe35.

- [35] Harder, D. R., Madden, J. A., and Dawson, C. 1985. Hypoxic induction of Ca²⁺-dependent action potentials in small pulmonary arteries of the cat. *J. Appl. Physiol.* 59, 5, 1389–1393.
- [36] Hillier, S. C., Graham, J. A., Hanger, C. C., Godbey, P. S., Glenny, R. W., and Wagner, W. W., JR. 1997. Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules. *J. Appl. Physiol.* 82, 4, 1084–1090.
- [37] Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., and Schultz, G. 1999. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397, 6716, 259–263.
- [38] Ibrahim, B., Guet-Bara, A., Levetau, J., and Bara, M. 1998. Involvement of external potassium in membrane potential of smooth muscle cells of human allantochoial placental vessels. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 45, 1, 131–134.
- [39] Imai, Y., Itsuki, K., Okamura, Y., Inoue, R., and Mori, M. X. 2012. A self-limiting regulation of vasoconstrictor-activated TRPC3/C6/C7 channels coupled to PI(4,5)P₂-diacylglycerol signalling. *J. Physiol. (Lond.)* 590, Pt 5, 1101–1119.
- [40] Ishikawa-Ankerhold, H. C., Ankerhold, R., and Drummen, Gregor P C. 2012. Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* 17, 4, 4047–4132.
- [41] Jernigan, N. L. and Resta, T. C. 2014. Calcium homeostasis and sensitization in pulmonary arterial smooth muscle. *Microcirculation* 21, 3, 259–271.
- [42] Jordan, M. and Wurm, F. 2004. Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods* 33, 2, 136–143.
- [43] Kaestner, L., Tian, Q., Kaiser, E., Xian, W., Muller, A., Oberhofer, M., Ruppenthal, S., Sinnecker, D., Tsutsui, H., Miyawaki, A., Moretti, A., and Lipp, P. 2015. Genetically Encoded Voltage Indicators in Circulation Research. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 9, 21626–21642.
- [44] Kylhammar, D. and Radegran, G. 2016. The principal pathways involved in the in vivo modulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction, pulmonary arterial remodelling and pulmonary hypertension. *Acta Physiol. (Oxf).*
- [45] Leach, R. M., Robertson, T. P., Twort, C. H., and Ward, J. P. 1994. Hypoxic vasoconstriction in rat pulmonary and mesenteric arteries. *Am. J. Physiol.* 266, 3 Pt 1, L223-31.
- [46] Lever, Andrew M L, Strappe, P. M., and Zhao, J. 2004. Lentiviral vectors. *J. Biomed. Sci.* 11, 4, 439–449.

- [47] Lichtman, J. W. and Conchello, J.-A. 2005. Fluorescence microscopy. *Nat. Methods* 2, 12, 910–919.
- [48] Lindenburg, L. and Merckx, M. 2014. Engineering genetically encoded FRET sensors. *Sensors (Basel)* 14, 7, 11691–11713.
- [49] Liu, Q., Sham, J. S., Shimoda, L. A., and Sylvester, J. T. 2001. Hypoxic constriction of porcine distal pulmonary arteries: endothelium and endothelin dependence. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280, 5, L856-65.
- [50] Lüllmann-Rauch, R. 2012. *Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen*. Thieme, Stuttgart, New York, NY.
- [51] Lumb, A. B. and Slinger, P. 2015. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: physiology and anesthetic implications. *Anesthesiology* 122, 4, 932–946.
- [52] Madden, J. A., Dawson, C. A., and Harder, D. R. 1985. Hypoxia-induced activation in small isolated pulmonary arteries from the cat. *J. Appl. Physiol.* 59, 1, 113–118.
- [53] Mahon, M. J. 2011. Vectors bicistronically linking a gene of interest to the SV40 large T antigen in combination with the SV40 origin of replication enhance transient protein expression and luciferase reporter activity. *BioTechniques* 51, 2, 119–128.
- [54] Maier, T., Follmann, M., Hessler, G., Kleemann, H.-W., Hachtel, S., Fuchs, B., Weissmann, N., Linz, W., Schmidt, T., Lohn, M., Schroeter, K., Wang, L., Rutten, H., and Strubing, C. 2015. Discovery and pharmacological characterization of a novel potent inhibitor of diacylglycerol-sensitive TRPC cation channels. *Br. J. Pharmacol.* 172, 14, 3650–3660.
- [55] Modrow, S., Falke, D., Schätzl, H., and Truyen, U. 2008. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Neckar.
- [56] MOTLEY, H. L. and Cournand, A. 1947. The influence of short periods of induced acute anoxia upon pulmonary artery pressures in man. *Am. J. Physiol.* 150, 2, 315–320.
- [57] Murata, Y., Iwasaki, H., Sasaki, M., Inaba, K., and Okamura, Y. 2005. Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature* 435, 7046, 1239–1243.
- [58] Mutoh, H., Perron, A., Dimitrov, D., Iwamoto, Y., Akemann, W., Chudakov, D. M., and Knöpfel, T. 2009. Spectrally-resolved response properties of the three most advanced FRET based fluorescent protein voltage probes. *PLoS One* 4, 2, e4555.

- [59] Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., and Trono, D. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 5259, 263–267.
- [60] Orchard, C. H., Sanchez de Leon, R., and Sykes, M. K. 1983. The relationship between hypoxic pulmonary vasoconstriction and arterial oxygen tension in the intact dog. *J. Physiol. (Lond.)* 338, 61–74.
- [61] Osipenko, O. N., Evans, A. M., and Gurney, A. M. 1997. Regulation of the resting potential of rabbit pulmonary artery myocytes by a low threshold, O₂-sensing potassium current. *Br. J. Pharmacol.* 120, 8, 1461–1470.
- [62] Padilla-Parra, S. and Tramier, M. 2012. FRET microscopy in the living cell: different approaches, strengths and weaknesses. *Bioessays* 34, 5, 369–376.
- [63] Perron, A., Mutoh, H., Akemann, W., Gautam, S. G., Dimitrov, D., Iwamoto, Y., and Knöpfel, T. 2009. Second and third generation voltage-sensitive fluorescent proteins for monitoring membrane potential. *Front. Mol. Neurosci.* 2, 5.
- [64] Pietraszewska-Bogiel, A. and Gadella, T W J. 2011. FRET microscopy: from principle to routine technology in cell biology. *J. Microsc.* 241, 2, 111–118.
- [65] Piston, D. W. and Kremers, G.-J. 2007. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem. Sci.* 32, 9, 407–414.
- [66] Post, J. M., Hume, J. R., Archer, S. L., and Weir, E. K. 1992. Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am. J. Physiol.* 262, 4 Pt 1, C882-90.
- [67] Sakuma, T., Barry, M. A., and Ikeda, Y. 2012. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem. J.* 443, 3, 603–618.
- [68] Salvaterra, C. G. and Goldman, W. F. 1993. Acute hypoxia increases cytosolic calcium in cultured pulmonary arterial myocytes. *Am. J. Physiol.* 264, 3 Pt 1, L323-8.
- [69] Schmidt, R. F., Lang, F., and Heckmann, M. 2010. Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie ; mit 85 Tabellen ; mit herausnehmbarem Repetitorium. *Physiologie des Menschen.*
- [70] Sham, J. S., Crenshaw, B. R., JR, Deng, L. H., Shimoda, L. A., and Sylvester, J. T. 2000. Effects of hypoxia in porcine pulmonary arterial myocytes: roles of K(V) channel and endothelin-1. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279, 2, L262-72.
- [71] Silverthorn, D. U. 2009. *Physiologie*. Pearson Studium, München, Boston [u.a.].

- [72] Soboloff, J., Spassova, M., Xu, W., He, L.-P., Cuesta, N., and Gill, D. L. 2005. Role of endogenous TRPC6 channels in Ca²⁺ signal generation in A7r5 smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 280, 48, 39786–39794.
- [73] Sommer, N., Dietrich, A., Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Gudermann, T., Schulz, R., Seeger, W., Grimminger, F., and Weissmann, N. 2008. Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *Eur. Respir. J.* 32, 6, 1639–1651.
- [74] Sommer, N., Strielkov, I., Pak, O., and Weissmann, N. 2016. Oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Eur. Respir. J.* 47, 1, 288–303.
- [75] Staub, N. C. 1985. Site of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Chest* 88, 4 Suppl, 240S–245S.
- [76] Stegemann, J. P. and Nerem, R. M. 2003. Altered response of vascular smooth muscle cells to exogenous biochemical stimulation in two- and three-dimensional culture. *Exp. Cell Res.* 283, 2, 146–155.
- [77] Sung, U., Sepehri-Rad, M., Piao, H. H., Jin, L., Hughes, T., Cohen, L. B., and Baker, B. J. 2015. Developing Fast Fluorescent Protein Voltage Sensors by Optimizing FRET Interactions. *PLoS One* 10, 11, e0141585.
- [78] Sylvester, J. T., Shimoda, L. A., Aaronson, P. I., and Ward, Jeremy P T. 2012. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol. Rev.* 92, 1, 367–520.
- [79] Talbot, N. P., Balanos, G. M., Dorrington, K. L., and Robbins, P. A. 2005. Two temporal components within the human pulmonary vascular response to approximately 2 h of isocapnic hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 98, 3, 1125–1139.
- [80] Tang, C., To, W. K., Meng, F., Wang, Y., and Gu, Y. 2010. A role for receptor-operated Ca²⁺ entry in human pulmonary artery smooth muscle cells in response to hypoxia. *Physiol. Res.* 59, 6, 909–918.
- [81] Thermo Fisher Scientific. *The Molecular Probes Handbook*. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/indicators-for-ca2-mg2-zn2-and-other-metal-ions/fluorescent-ca2-indicators-excited-with-uv-light.html>.
- [82] Tian, Q., Oberhofer, M., Ruppenthal, S., Scholz, A., Buschmann, V., Tsutsui, H., Miyawaki, A., Zeug, A., Lipp, P., and Kaestner, L. 2011. Optical action potential screening on adult ventricular myocytes as an alternative QT-screen. *Cell. Physiol. Biochem.* 27, 3-4, 281–290.

- [83] Timraz, S. B. H., Farhat, I. A. H., Alhussein, G., Christoforou, N., and Teo, J. C. M. 2016. In-depth evaluation of commercially available human vascular smooth muscle cells phenotype: Implications for vascular tissue engineering. *Exp. Cell Res.* 343, 2, 168–176.
- [84] Tsutsui, H., Higashijima, S.-i., Miyawaki, A., and Okamura, Y. 2010. Visualizing voltage dynamics in zebrafish heart. *J. Physiol. (Lond.)* 588, Pt 12, 2017–2021.
- [85] Tsutsui, H., Karasawa, S., Okamura, Y., and Miyawaki, A. 2008. Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins. *Nat. Methods* 5, 8, 683–685.
- [86] Turner, J. L. and Kozlowski, R. Z. 1997. Relationship between membrane potential, delayed rectifier K⁺ currents and hypoxia in rat pulmonary arterial myocytes. *Exp. Physiol.* 82, 4, 629–645.
- [87] Veit, F., Pak, O., Brandes, R. P., and Weissmann, N. 2015. Hypoxia-dependent reactive oxygen species signaling in the pulmonary circulation: focus on ion channels. *Antioxid. Redox Signal.* 22, 6, 537–552.
- [88] Wang, J., Shimoda, L. A., and Sylvester, J. T. 2012. Ca²⁺ responses of pulmonary arterial myocytes to acute hypoxia require release from ryanodine and inositol trisphosphate receptors in sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 303, 2, L161-8.
- [89] Wang, J., Shimoda, L. A., Weigand, L., Wang, W., Sun, D., and Sylvester, J. T. 2005. Acute hypoxia increases intracellular [Ca²⁺] in pulmonary arterial smooth muscle by enhancing capacitative Ca²⁺ entry. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 288, 6, L1059-69.
- [90] Wang, Q., Wang, D., Yan, G., Sun, L., and Tang, C. 2016. TRPC6 is required for hypoxia-induced basal intracellular calcium concentration elevation, and for the proliferation and migration of rat distal pulmonary venous smooth muscle cells. *Mol. Med. Rep.* 13, 2, 1577–1585.
- [91] Weigand, L., Foxson, J., Wang, J., Shimoda, L. A., and Sylvester, J. T. 2005. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by antagonists of store-operated Ca²⁺ and nonselective cation channels. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 289, 1, L5-L13.
- [92] Weissmann, N., Akkayagil, E., Quanz, K., Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Fink, L., Hanze, J., Rose, F., Seeger, W., and Grimminger, F. 2004. Basic features of

- hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 139, 2, 191–202.
- [93] Weissmann, N., Dietrich, A., Fuchs, B., Kalwa, H., Ay, M., Dumitrascu, R., Olschewski, A., Storch, U., Mederos y Schnitzler, Michael, Ghofrani, H. A., Schermuly, R. T., Pinkenburg, O., Seeger, W., Grimminger, F., and Gudermann, T. 2006. Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 50, 19093–19098.
- [94] Weissmann, N., Grimminger, F., Walmrath, D., and Seeger, W. 1995. Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Respir. Physiol.* 100, 2, 159–169.
- [95] Woehler, A., Wlodarczyk, J., and Neher, E. 2010. Signal/noise analysis of FRET-based sensors. *Biophys. J.* 99, 7, 2344–2354.
- [96] Worth, N. F., Rolfe, B. E., Song, J., and Campbell, G. R. 2001. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton* 49, 3, 130–145.
- [97] Wrobel, J. P., Thompson, B. R., and Williams, T. J. 2012. Mechanisms of pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease: a pathophysiologic review. *J. Heart Lung Transplant.* 31, 6, 557–564.
- [98] Xu, M., Platoshyn, O., Makino, A., Dillmann, W. H., Akassoglou, K., Remillard, C. V., and Yuan, J. X.-J. 2008. Characterization of agonist-induced vasoconstriction in mouse pulmonary artery. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, 1, H220-8.
- [99] Young, I. H. and Bye, P. T. P. 2011. Gas exchange in disease: asthma, chronic obstructive pulmonary disease, cystic fibrosis, and interstitial lung disease. *Compr. Physiol.* 1, 2, 663–697.
- [100] Yuan, X. J., Goldman, W. F., Tod, M. L., Rubin, L. J., and Blaustein, M. P. 1993. Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *Am. J. Physiol.* 264, 2 Pt 1, L116-23.
- [101] Zhang, B., Metharom, P., Jullie, H., Ellem, K. A. O., Cleghorn, G., West, M. J., and Wei, M. Q. 2004. The significance of controlled conditions in lentiviral vector titration and in the use of multiplicity of infection (MOI) for predicting gene transfer events. *Genet. Vaccines Ther.* 2, 1, 6.

- [102] Zhang, J., Li, H., Chai, L., Zhang, L., Qu, J., and Chen, T. 2015. Quantitative FRET measurement using emission-spectral unmixing with independent excitation crosstalk correction. *J. Microsc.* 257, 2, 104–116.

11 Publikationsverzeichnis

Poster

Charakterisierung des genetisch kodierten Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)-Sensors Mermaid für die Messung einer Membrandepolarisation in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen unter hypoxischen Bedingungen

Ruth Dartsch, Beate Fuchs, Tim Mayer, Ralph T. Schermuly, Hossein A. Ghofrani, Werner Seeger, Friedrich Grimminger, Thomas Gudermann, Alexander Dietrich, Norbert Weißmann

(PH-DACH Herbstsymposium, Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V., Thoraxklinik am Universitätsklinikum Heidelberg, 2012)

12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, 31.12.2018 

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Mein abschließender Dank gilt...

....ganz besonders Herrn Prof. Dr. Norbert Weißmann für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.

....Frau Dr. Beate Fuchs für ihre hervorragende und engagierte Betreuung, ihre stete Hilfsbereitschaft und ihr immer offenes Ohr!

....unseren Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. Alexander Dietrich sowie Herrn Dr. Tim Mayer aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Bereitstellung des viralen Vektorsystems, des Transfer-Plasmids mit *Mermaid* sowie die Möglichkeit, die Calciumphosphatpräzipitation in Marburg zu erlernen.

....Carmen Homberger, Miriam Wessendorf, Ingrid Breitenborn-Müller und Karin Quanz für die tolle Arbeitsatmosphäre, ihre stetige Geduld, Hilfsbereitschaft und Unterstützung sowie Dr. Jochen Wilhelm für seine Ratschläge.

....meinen Doktorandenkollegen, allen voran Simone Kraut für die vielen netten Stunden im Labor!

....meiner Familie und Freunden, insbesondere jedoch meinen Eltern Hannelore Kraft-Vetter und Hans Vetter, meiner Großmutter sowie meinem Bruder für die stetige Motivation und moralische Unterstützung bis zum Fertigstellen dieser Dissertationsschrift.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6751-9



9 783835 1967519