

**Etablierung von intrazellulären FRET-ATP-Sensoren zur Identifikation akuter
Hypoxie-induzierter ATP-Veränderungen in pulmonalvaskulären Zellen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Svenja Hirsch

aus Bad Homburg

Gießen, 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Medizinische Klinik II

Gutachterin: Prof. Dr. N. Sommer

Gutachter: Prof. Dr. M. Kracht

Tag der Disputation: 12.12.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Lunge und Gasaustausch	4
1.2	Hypoxie und hypoxische pulmonale Vasokonstriktion	5
1.2.1	Pulmonale Hypertonie	6
1.2.2	Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie	7
1.3	Mechanismus der HPV – Signaltransduktion und Effektormechanismus	8
1.4	O ₂ -Sensoren der HPV	9
1.4.1	Mitochondrien	10
1.4.1.1	Mitochondriale Atmungskette	10
1.4.1.2	Mitochondrien als O ₂ -Sensor	11
1.4.2	ROS	12
1.4.3	ATP	14
1.4.4	AMP-aktivierte Proteinkinasen und K _{ATP} -Kanäle	15
1.5	Methoden der ATP-Messung	19
1.5.1	Funktion und Aufbau des ATP-Sensors	19
1.5.2	Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)	21
1.5.2.1	Grundlagen	21
1.6	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Verwendete Geräte	24
2.2	Software	25
2.3	Verbrauchsmaterialien	26
2.4	Chemikalien und Medien	28
2.4.1	Medienzusammensetzung	31
2.5	Kits	32
2.6	Plasmide	32
2.7	Zellkultur	35
2.7.1	Kultivierung von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293T)	35
2.7.2	Isolation und Kultivierung von mPASCs	36
2.8	Molekularbiologie	38
2.8.1	Transfektion von HEK 293T Zellen	38

2.8.2	Produktion viraler Vektoren.....	38
2.8.3	Transduktion der primären PSMCs.....	40
2.8.4	Ribonucleinsäure (RNA)-Isolation	41
2.8.5	Quantitative Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) 43	
2.8.6	Plasmidamplifikation	45
2.9	FRET-Messung unter dem Fluoreszenzmikroskop.....	46
2.9.1	Messung des Energietransfers	46
2.9.2	Versuche der ATP-Sensoren mit Oligomycin A.....	49
2.9.3	Etablierung hypoxischer Messbedingungen unter dem Konfokalmikroskop.....	51
2.9.4	ATP-Messung unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen	53
2.10	Statistik.....	54
3	Ergebnisse	55
3.1	Expression <i>Cyto-/MitoATeam</i> in HEK 293T.....	55
3.2	Etablierung der ATP-Sensormessung mittels Oligomycin A.....	57
3.3	Etablierung hypoxischer Konditionen unter dem Konfokalmikroskop	59
3.4	ATP-Messung in HEK 293T Zellen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen.....	60
3.5	Transduktion von mPSMCs	65
3.6	ATP-Messung in mPSMCs unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen.....	66
4	Diskussion	67
4.1	Kritische Betrachtung der angewendeten Methoden.....	67
4.1.1	Verwendung von HEK 293T als Zelllinie.....	67
4.1.2	<i>Laser-Scanning-Konfokalmikroskopie</i>	67
4.1.3	Zellhomöostase.....	68
4.1.4	Die <i>Sensitized Emission</i> FRET-Messung.....	69
4.1.5	ATP-Messung mittels <i>Cyto-/MitoATeam</i>	70
4.1.6	Virenproduktion und Transduktion der mPSMCS mit <i>Cyto-/MitoATeam</i>	71
4.2	Ergebnisse	73

4.2.1	Etablierungsversuche der Sensoren mittels Oligomycin A.....	73
4.2.2	Etablierung hypoxischer Konditionen unter dem Konfokalmikroskop ..	74
4.2.3	ATP-Messungen unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen ..	74
4.3	Fazit und Ausblick	77
5	Zusammenfassung.....	78
6	Summary	79
7	Abkürzungsverzeichnis.....	80
8	Abbildungsverzeichnis	85
9	Tabellenverzeichnis	86
10	Literaturverzeichnis.....	87
11	Ehrenwörtliche Erklärung	94
12	Danksagung.....	95

1 Einleitung

1.1 Lunge und Gasaustausch

Die Lunge des Menschen befindet sich im Brustkorb und besteht aus zwei Lungenflügeln. Der Rechte ist in drei und der Linke in zwei Lungenlappen unterteilt. Von der Luftröhre ausgehend verzweigen sich die luftleitenden Wege in die beiden Hauptbronchien. An die Lappen- und Segmentbronchien schließen sich die Bronchiolen an. In den folgenden Bronchioli respiratorii beginnt bereits der Gasaustausch. Sie münden über Alveolargänge in die Alveolen (Lungenbläschen), welche einen Durchmesser von 75-300 μm haben und von einem dichten Kapillarnetz umgeben sind (Silbernagel et al. 2012). Die Bronchioli respiratorii bilden zusammen mit den Alveolargängen und den Alveolaren einen Azinus (Silbernagl et al. 2012). Als Atmungsorgan findet in der Lunge der Gasaustausch statt. Dieser umfasst die Aufnahme von Sauerstoff (O_2) aus der Atemluft und die Abgabe von im Stoffwechsel entstandenem Kohlenstoffdioxid (CO_2) an die Umwelt (Silbernagel et al. 2012). Grundlegend für die Funktion des Gasaustausches sind der Luftaustausch in der Lunge (Ventilation), die Diffusion der Gase über die Alveolarmembran und eine an die Ventilation angepasste Lungendurchblutung (Perfusion) (Huppelsberg et al. 2009). Die Alveolen sind der Hauptort des Gasaustausches, der mittels Diffusion stattfindet. Die Gesamtoberfläche, die für den Gasaustausch im Menschen zur Verfügung steht, beträgt ca. 120 m^2 (Huppelsberg et al. 2009). Hierbei überwinden Gasmoleküle die Alveolarmembran und binden an das Hämoglobin in den Erythrozyten (Huppelsberg et al. 2009). Das mit O_2 angereicherte Blut (oxygeniertes Blut) wird über den Körperkreislauf zu den verbrauchenden Zellen transportiert. Dort wird O_2 *per diffusionem* in die Körperzellen aufgenommen und von den Mitochondrien genutzt. In den Mitochondrien wird mithilfe der Atmungskette unter Verbrauch von O_2 der Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) produziert. Dabei entsteht das Stoffwechselprodukt CO_2 , welches hauptsächlich in Form von Bikarbonat (HCO_3^-) und zu einem geringen Anteil physikalisch gelöst, über den umgekehrten Weg wieder zurücktransportiert und über die Lunge abgeatmet wird (Silbernagel et al. 2012).

1.2 Hypoxie und hypoxische pulmonale Vasokonstriktion

Hypoxie beschreibt einen Mangelzustand von verfügbarem O_2 . Dies kann sich auf den gesamten Organismus oder auf Gewebe- und Zellebene beziehen (Welsh et al. 2013). Man unterscheidet grundsätzlich zwischen akuter Hypoxie (Sekunden bis Tage) und chronischer Hypoxie (Tage bis Wochen). Die Auswirkungen von sowohl akuter als auch chronischer Hypoxie können je nach Beobachtungsschwerpunkt und Zielobjekt (Zellebene oder gesamter Organismus) ganz unterschiedlich ausfallen (Welsh et al. 2013).

Die hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion (HPV), auch bekannt als Euler-Liljestrand-Mechanismus, ist ein physiologischer Mechanismus der Lungengefäße, welcher die alveoläre Perfusion an die regionale Ventilation anpasst, wenn infolge einer lokalen Minder-ventilation ein reduzierter Sauerstoffpartialdruck (pO_2) herrscht, siehe Abbildung (Abb.) 1. Ziel ist es, in weniger ventilierten Arealen der Lunge die Perfusion zu verringern und somit eine insgesamt bessere Oxygenierung des Blutes zu gewährleisten.

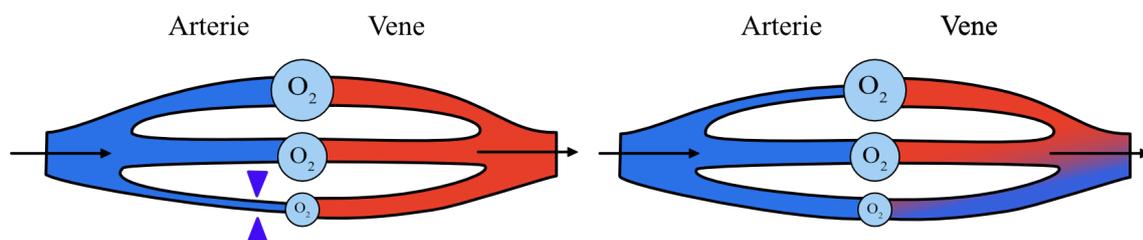


Abbildung 1: Schematische Darstellung der HPV

Die HPV dient der Umverteilung von Blut aus schlecht ventilierten in besser ventilierte Abschnitte der Lunge. Dadurch wird eine bessere Oxygenierung des Blutes erreicht (linkes Bild). Das rechte Bild demonstriert die verminderte Oxygenierung bei Ausfall der HPV. Schwarze Pfeile zeigen die Flussrichtung des Blutes, blaue Pfeile die Vasokonstriktion. Das sauerstoffarme Blut aus dem Körperkreislauf ist hier blau und sauerstoffreiches Blut rot dargestellt.

Modifiziert nach Sommer et al. (Sommer 2016).

Das Ausmaß der HPV hängt von Faktoren wie z.B. Spezies, Alter, Geschlecht oder pH-Wert ab (Weissmann et al. 2006). Ab einem pO_2 von 20-50 mmHg (2-6 % O_2 auf Meereshöhe) kommt es zur Aktivierung des Mechanismus (Sylvester 2001, Sommer et al. 2008). Es wurde gezeigt, dass vor allem die Kontraktion der prä-kapillären pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC), die am Eingang eines Azinus der Lunge lokalisiert sind, für die HPV wichtig sind (Staub 1985, Hillier et al. 1997). Den größten Effekt auf den arteriellen pO_2 (paO_2) zeigt der Mechanismus, wenn 30-70 % der Lunge

hypoxisch sind, da dann noch genug normoxische Lungenareale vorhanden sind, auf die der Blutfluss umgeleitet werden kann. Wächst der hypoxische Anteil der Lunge darüber hinaus, wird der Mechanismus ineffektiv und beeinflusst die Hämodynamik über einen erhöhten pulmonalvaskulären Widerstand (Theissen et al. 1996, Strielkov et al. 2017). Chronische Hypoxie führt in der Lunge zusätzlich zu einem Umbau der pulmonalen Gefäße, dem sogenannten vaskulären *Remodeling*. Dies resultiert in einer generalisierten Verengung des pulmonalen Gesamtgefäßdurchmessers (Sommer et al. 2008, Schumacker 2011). Die daraus resultierende Folge ist ein Anstieg des pulmonalen Gefäßwiderstandes und die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie (PH) (Sommer et al. 2016).

1.2.1 Pulmonale Hypertonie

Der Begriff PH umfasst chronisch progrediente Erkrankungen, die über eine Erhöhung des mittleren pulmonal-arteriellen Drucks (mPAP) und Gefäßwiderstandes (PVR) im Lungenkreislauf charakterisiert sind (Galie et al. 2015, Nazzareno Galie 2015, Wilcox et al. 2015). Bis zum Jahr 2018 wurde die PH, gemessen mittels Rechtsherzkatether in Ruhelage, durch einen mPAP ≥ 25 mmHg definiert und diagnostiziert (Nazzareno Galie 2015). Ein mPAP ≥ 30 mmHg unter körperlicher Belastung wurde als pathologisch angesehen (Petkov V. 2003, Rabinovitch 2012). Auf der 6. Weltkonferenz zur PH in Nizza 2018 wurde eine neue Definition zur hämodynamischen Charakterisierung der PH vorgeschlagen: Nach dieser wird die PH durch einen mPAP von > 20 mmHg definiert und die präkapilläre PH zusätzlich über einen PVR von > 3 Wood-Einheiten. Begründet wird dies damit, dass ein normaler mPAP im Bereich $14 \pm 3,3$ mmHg angesiedelt wird und ein mPAP > 20 mmHg somit bereits über der 95,7 - Perzentile liegt (Badesch et al. 2009, Kovacs et al. 2009).

Mit dem Voranschreiten der Erkrankung kommt es, ausgelöst durch den hohen mPAP und PVR, zu einer chronischen Rechtsherzbelastung. Zunächst wird die erhöhte Nachlast durch eine konzentrische Rechtsherzvergrößerung (Hypertrophie) kompensiert. Ist dieser Mechanismus erschöpft, folgt eine Ventrikeldilatation. Die erhöhte Wandspannung und Herzmasse beeinträchtigt schließlich die Perfusion der Herzmuskulatur, sodass diese Vorgänge letztendlich zum Rechtsherzversagen führen (Bogaard et al. 2009) – die häufigste Todesursache im Zusammenhang mit der PH. Die rechtsventrikuläre Funktion des Herzens ist ein prognostisch wichtiger Faktor für die PH (Vonk Noordegraaf et al. 2011).

Die Symptome der PH sind unspezifisch, die Patienten leiden häufig unter Leistungsmin-
derung, Synkopen (kurze Bewusstlosigkeit) und Müdigkeit (Rabinovitch 2012).

1.2.2 Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie

Die Ursachen der PH sind vielfältig. Auslöser können Lungenerkrankungen, Hypoxie, thromboembolische Ereignisse, Linksherzerkrankungen oder auch genetische Faktoren sein (Archer et al. 2010, Simonneau et al. 2019). 1998 wurde die PH zum ersten Mal klassifiziert. Es wurden fünf Kategorien etabliert, die sich an gemeinsamen pathologischen und hämodynamischen Merkmalen sowie der therapeutischen Handhabung orientierten und bis heute abgeändert in der aktuellen Nizza-Klassifikation von 2018 zu finden sind (Simonneau et al. 2013, Simonneau et al. 2019).

Tabelle 1: Klassifikation der PH, Nizza 2018

<p><u>1. Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH)</u></p> <ul style="list-style-type: none">1.1. Idiopathische PAH (IPAH)1.2. Hereditäre PAH<ul style="list-style-type: none">1.2.1. BMPR-21.2.2. ALK-1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK31.2.3. Unbekannte Ursachen1.3. PAH assoziiert mit Drogen und Toxinen1.4. PAH assoziiert mit<ul style="list-style-type: none">1.4.1. Bindegewebserkrankungen1.4.2. HIV- Infektionen1.4.3. Portaler Hypertension1.4.4. Angeborenen Herzfehlern1.4.5. Schistosomiasis1.5. PAH mit gutem Langzeit-Ansprechen auf Calcium-Kanal Blockern1.6. PAH mit offensichtlichen Merkmalen der venösen/kapillären Beteiligung (pulmonal venöse Verschlusskrankheit/pulmonale kapillare Hämangiomatose)1.7. Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen (PPHN) <p><u>2. Pulmonale Hypertonie (PH) bei Linksherzerkrankungen</u></p> <ul style="list-style-type: none">2.1. Systolische Dysfunktion2.2. Diastolische Dysfunktion2.3. Herzklappenerkrankungen2.4. Angeborene/erworbene kardiovaskuläre Erkrankungen, die zur postkapillären PH führen <p><u>3. PH bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxämie</u></p> <ul style="list-style-type: none">3.1. COPD3.2. Interstitielle Lungenkrankheit3.3. Andere Lungenerkrankungen mit gemischtem restriktiv-obstruktivem Muster3.4. Hypoxie ohne Lungenerkrankung3.5. Entwicklungsstörungen der Lunge

4. PH aufgrund pulmonal-arterieller Obstruktionen

- 4.1. Chronische thromboembolische PH (CTEPH)
- 4.2. Andere Obstruktion der Pulmonalarterien

5. PH unklarer und/oder multifaktorieller Genese

- 5.1. Hämatologische Erkrankungen: chronisch hämolytische Anämie, myeloproliferative Erkrankungen
- 5.2. Systemische und metabolische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Histiozytose, Glykogenspeicherkrankheit, Morbus Gaucher
- 5.3. Andere Erkrankungen: fibrosierende Mediastinitis, chronische Niereninsuffizienz mit Hämodialyse, segmentale PH
- 5.4. Komplexe angeborene Herzerkrankungen

Eine PH, die durch chronische Hypoxieexposition ausgelöst wird, gehört zu Gruppe 3 gem. Nizza-Klassifikation. Hierzu gehören auch PH-Formen, die mit Lungenerkrankungen assoziiert sind. Ursächlich können hier z.B. chronisch obstruktive Lungenerkrankungen wie *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD) oder interstitielle Lungenerkrankungen, wie z.B. die Lungenfibrose sein. Von der Hypoxie-induzierten PH sind beispielsweise Patienten betroffen, die in Höhenlagen wie dem Himalaya oder den Anden beheimatet sind und somit einem dauerhaft erniedrigten pO_2 exponiert sind. Die Therapie der PH Gruppe 3 liegt in der Behandlung der zugrundeliegenden Lungenerkrankung beziehungsweise (bzw.) einer Umsiedlung in niedrigere Höhenlagen (Simonneau et al. 2004).

Die Hypoxie-induzierte PH wird zum einen durch chronische Hypoxie-induzierte Gefäßumbauprozesse verursacht, zum anderen durch eine persistierende hypoxische pulmonale Vasokonstriktion. Die pathophysiologischen Mechanismen überschneiden sich teilweise mit anderen Formen der PH.

1.3 Mechanismus der HPV – Signaltransduktion und Effektormechanismus

Die grundlegenden Mechanismen der akuten und prolongierten HPV sind nicht vollständig erforscht. PASMCs wurden als Sensor- sowie Effektorzellen der akuten HPV identifiziert (Sylvester et al. 2012, Sommer et al. 2016). Unterstützt wird dies dadurch, dass isolierte prä-kapilläre pulmonale Gefäße ohne Endothelzellen sich unter akuter Hypoxie verengen (Marshall et al. 1983). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass isolierte PASMCs auf akute Hypoxie mit einem Anstieg des intrazellulären Kalziums (Ca^{2+}) reagieren (Murray et al. 1990). Die Kontraktion der PASMCs wird durch eine Erhöhung der intrazellulären

Ca²⁺-Konzentration durch extrazellulären Einstrom und Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern erreicht (Sommer et al. 2008). L-Typ-Ca²⁺-Kanäle, die zur Gruppe der spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen gehören (*voltage-dependend calcium channel*, VDCC) und nicht spezifische Kationen-Kanäle (*non specific cation channels*, NSCC) sorgen für den extrazellulären Einstrom von Ca²⁺. Diese wiederum werden aktiviert durch eine Membrandepolarisation, ausgelöst von unter Hypoxie vermindert leitfähigen Kalium-Kanälen (K⁺-Kanäle) (Evans 2006). Vor allem spannungsabhängigen K⁺-Kanälen (K_V2.1, K_V1.5, K_V9.3), aber auch ATP-abhängigen K⁺-Kanälen (K_{ATP}-Kanäle) wird eine Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus zugesprochen (Coppock et al. 2001, Sommer et al. 2008). Studien mit *knock-out* Mäusen, welche eine Defizienz für die K_V-Kanäle besaßen, haben jedoch nur eine unvollständige Inhibition der HPV zeigen können. Den NSCCs, die in Speicher-aktivierbare (*store-operated channel*, SOC) und Rezeptor-aktivierbare Kanäle (*receptor-operated channels*, ROC) gegliedert werden, wird ebenfalls eine Schlüsselrolle in der Regulation der HPV zugeschrieben. SOCs sind für den extrazellulären Ca²⁺-Einstrom nach Entleerung der intrazellulären Speicher verantwortlich, ein prominenter Vertreter ist der CRAC-Kanal (*Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel*). ROCs wie z.B. der TRPC6-Kanal (*transient receptor potential channel*) sind essentiell für die akute HPV (Weissmann et al. 2006). Für die prolongierte HPV, spielen möglicherweise auch andere endothelabhängige Mechanismen eine Rolle, die in dieser Arbeit allerdings nicht untersucht werden (Sommer et al. 2016). Neben dem eigentlichen Effektormechanismus ist die zentrale Frage nach den essenziellen Mediatoren der HPV weiterhin offen. Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), aber auch Veränderungen von ATP/ADP könnten als solche wirken (Sommer et al. 2016).

1.4 O₂-Sensoren der HPV

Um die Mechanismen der HPV zu verstehen, muss der primäre O₂-Sensor identifiziert werden. Dieser muss ein Protein oder eine Organelle sein, welche/r im Hypoxiebereich, der die HPV auslöst, sauerstoffsensitiv ist, sowie über Signalwege mit den Effektormechanismen der HPV in PSMCs (v.a. Ionenkanäle) kommunizieren kann (Sommer et al. 2008). Für die chronische Hypoxie ist HIF-1 α (*hypoxia inducible factor 1 alpha*) als zentraler O₂-Sensor bereits bekannt (Sylvester et al. 2012, Sommer et al. 2020). Der O₂-Sensor für die akute Hypoxie, welcher in der Lage ist eine schnelle Reaktion, wie z.B. die

akute Phase der HPV, auszulösen, ist bisher noch nicht vollständig identifiziert. Allerdings wurde kürzlich für die mitochondriale Untereinheit des Komplex IV der Atmungskette Cytochrom c Untereinheit 4 Isoform 2 (Cox4i2) eine Beteiligung als O₂-Sensor unter akuter Hypoxie beschrieben (Details siehe weiter unten) (Sommer et al. 2017).

1.4.1 Mitochondrien

Die Mitochondrien sind der Hauptkonsument von O₂ im Organismus und daher ein potentieller Ort für einen zellulären O₂-Sensor (Waypa et al. 2016). In ihnen werden, stark vereinfacht dargestellt, vor allem aus Kohlenhydraten und Lipiden unter O₂-Verbrauch CO₂ und H₂O hergestellt. Sie bestehen aus einer glatten äußeren Membran und einer inneren hoch-impermeablen Membran, die stark gefaltet ist, womit eine Oberflächenvergrößerung erreicht wird (Silbernagl et al. 2012). Dazwischen befindet sich der intermembranöse Spalt, auch Intermembranraum genannt. Die sich im Inneren der Organelle befindende mitochondriale Matrix enthält Enzyme, die für unterschiedliche Stoffwechselfvorgänge verantwortlich sind und dient als Pufferraum für Ca²⁺ (Nunnari et al. 2012). Eine der Hauptaufgaben der Mitochondrien ist die sauerstoffabhängige Umwandlung von Energie in ATP durch den Prozess der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) mittels der mitochondrialen Atmungskette. Veränderungen der mitochondrialen Atmungskette unter Hypoxie sind möglicherweise ein essenzieller Auslöser für die HPV (weitere Details unter 1.4.1.2).

1.4.1.1 Mitochondriale Atmungskette

Die Atmungskette besteht aus fünf Enzymkomplexen, die innerhalb der inneren impermeablen Mitochondrienmembran liegen. In die Zelle aufgenommene Energieträger werden durch den Zitratzyklus, die Pyruvatdehydrogenase (PDH) oder β -Oxidation unter Abspaltung von Wasserstoff (H⁺) zu CO₂ oxidiert. H⁺ wird zusammen mit freigesetzten Elektronen von Reduktionsäquivalenten Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) gebunden und so die Redoxenergie zwischengespeichert (Heinrich et al. 2006). Die Elektronen der Reduktionsäquivalente werden dann an verschiedenen Eintrittsstellen der Atmungskette abgegeben. Dort werden sie entlang eines elektrochemischen Gradienten zu Komplex IV (Cytochrom-Oxidase) transportiert, um auf O₂ übertragen zu werden. Dieser Vorgang entspricht formal der Knallgasreaktion $\text{H}_2 + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$, was eine stark exogene Reaktion ($\Delta G^\circ = -239 \text{ kJ/mol}$) ist (Horn 2009). Im Rahmen des o.g. Mechanismus läuft diese in der mitochondrialen Atmungskette

schrittweise ab. Dieser Prozess wird genutzt, um einen Protonengradient aufzubauen, der von der F_0/F_1 -ATP-Synthase genutzt wird, um aus ADP und einem organischen Phosphat ATP zu erzeugen (Horn 2009). Dieser Vorgang wird auch als OXPHOS bezeichnet.

1.4.1.2 Mitochondrien als O_2 -Sensor

Aufgrund des mitochondrialen O_2 -Verbrauchs zur Herstellung des zellulären Energieträgers ATP liegt es nahe, dass Mitochondrien als primäre O_2 -Sensoren dienen (Waypa et al. 2016). Die Inhibierung der mitochondrialen Atmungskette und somit ATP-Produktion durch reduzierte O_2 -Verfügbarkeit könnte hierbei als der gesuchte O_2 -Sensormechanismus dienen (Sommer et al. 2016). Experimente einiger Arbeitsgruppen zeigten allerdings, dass nur durch Inhibitoren der proximalen mitochondrialen Atmungskette (Komplex I, II und teilweise III) dosisabhängig die HPV verhindert werden konnte, während distale Inhibitoren (an Komplex IV) keinen Effekt zeigten (Waypa et al. 2001). Daraus schlussfolgerten Waypa et al. (2001), dass die Hypoxieantwort unabhängig von der vollständigen Funktion der Atmungskette und damit unabhängig von der ATP-Produktion ist. Widersprüchliche Arbeiten zeigten allerdings, dass die Hypoxieantwort auch durch distale Inhibitoren der Elektronentransportkette (*electron transport chain* - ETC) inhibiert wird (Sommer et al. 2008, Sommer et al. 2016). Gegen eine wesentliche Hypoxie-induzierte Inhibierung an Komplex IV der Atmungskette, sprach allerdings auch die Tatsache, dass Komplex IV in nicht-pulmonalvaskulären Zellen eine so hohe O_2 -Affinität hat, dass dieser in den relevanten O_2 -Konzentrationsbereichen, die zur HPV führen, nicht wesentlich inhibiert werden könnte (Sommer et al. 2016). In Experimenten in isolierten, ventilierten und perfundierten Lungen von Kaninchen konnte die HPV in einem Ventilations-Gasgemisch mit einem pO_2 von 40-75 mmHg (5-9 % O_2 auf Meereshöhe) ausgelöst werden (Weissmann et al. 1995). Bei PASMCs dagegen wurde die Hypoxie-induzierte Reaktion erst bei einem pO_2 von 20-25 mmHg (2-3 % O_2 auf Meereshöhe) in der Pufferlösung beobachtet (Murray et al. 1990), was allerdings immernoch deutlich über dem pO_2 bei halbmaximaler Respiration (p_{50}) der Atmungskette liegt (Sommer et al. 2010). In Experimenten mit isolierten, ventilierten und perfundierten Rattenlungen war bei einer Ventilation mit einem pO_2 von 0,76 mmHg (0,1 % O_2 auf Meereshöhe) die ATP-Konzentration signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit einem pO_2 von 152 mmHg (20 % O_2 auf Meereshöhe) beatmet wurde, reduziert (Fisher et al. 1981). Auch in isolierten Pulmonalarterien konnte kein Abfallen von ATP unter Hypoxie nachgewiesen

werden, was jedoch durch eine kompensatorische anaerobe glykolytische ATP-Produktion erklärt werden könnte (Leach et al. 2000, Leach et al. 2002). Aufgrund der allgemeinen Annahme, dass die OXPHOS in den Mitochondrien, während der HPV nicht relevant verringert wird, wurde der Fokus auf andere mögliche Sensormechanismen und Mediatoren gelegt. Insbesondere die Rolle von reaktiven Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species* - ROS), die unabhängig von einer Atmungsketteninhibierung an Komplex IV freigesetzt werden könnten, ist daher Bestandteil aktueller Forschung.

1.4.2 ROS

ROS werden als Nebenprodukte im O₂-Stoffwechsel in verschiedenen Kompartimenten der Zelle gebildet. Zu ihnen gehören freie Radikale, wie das Superoxid-Anion (O₂⁻) (Aggarwal et al. 2013). Mithilfe von Superoxiddismutasen, zum Beispiel der mitochondrialen Superoxiddismutase (mtSOD), können Superoxide zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂) umgewandelt werden. Wird das relativ stabile molekulare Oxidans H₂O₂ weiter reduziert, ist es möglich, dass sowohl H₂O als auch ein Hydroxyl-Radikal (OH•) entsteht (Turrens 2003). H₂O₂ kann durch Aquaporine aus der mitochondrialen Matrix ins Zytosol diffundieren, wohingegen die Superoxide durch Anionen-Kanäle aus dem Intermembranraum in die extramitochondriale Umgebung gelangen (Bienert et al. 2006, Weissmann et al. 2006, Waypa et al. 2016). ROS kann verschiedene intrazelluläre Signalwege, die in der akuten Hypoxie eine Rolle spielen, beeinflussen: So kann ROS mit K_v-Kanäle interagieren und sowohl durch die dabei ausgelöste Membrandepolarisierung als auch durch direkte und indirekte Interaktion mit Ca²⁺-Kanälen den intrazellulären Calciumanstieg und die zelluläre Kontraktion modulieren (Veit et al. 2015, Sommer et al. 2016). Unter physiologischen Bedingungen spielt ROS als *second messenger* eine wichtige Rolle in der Regulation vieler weiterer zellulärer Prozesse, wie der Proliferation, dem Altern der Zelle, der Regulation von Transkriptionsfaktoren und Entzündungen (Waypa et al. 2016).

Es gibt zwei unterschiedliche Konzepte bezüglich der Rolle von Mitochondrien und ROS in der HPV. Gemäss der einen Hypothese kommt es durch die verminderte O₂-Verfügbarkeit unter Hypoxie zu einem Abfall von zellulärem ROS. Dabei kommt es zu einem vermehrten Aufkommen von Reduktionsäquivalenten, die K_v-Kanäle hemmen, und darüber das plasmalemmale Membranpotential vermindern, was zu einem Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ über spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle führt (Waypa et al. 2005,

Sommer et al. 2016). Die Gegenhypothese geht von einem ROS-Anstieg aus, welcher eine intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum bewirken kann. Zudem führt auch hier über noch ungeklärte Mechanismen die Schließung von K_v -Kanälen zu einem Abfall des Membranpotentials und Anstieg des Ca^{2+} -Einstroms von extrazellulär, sowie die Aktivierung von TRPC6-Kanälen über Proteinkinasen und DAG zur HPV (Weissmann et al. 2006, Sommer et al. 2016). Limitationen der experimentellen Bedingungen und der Detektionsmechanismen von ROS führten zu den widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich erhöhter bzw. erniedrigter Freisetzung von ROS unter Hypoxie (Sommer et al. 2016). In neueren Untersuchungen konnte allerdings gezeigt werden, dass die mitochondriale ROS-Freisetzung essentiell für die akute HPV ist (Pak et al. 2018). Der Mechanismus einer erhöhten ROS-Freisetzung unter akuter Hypoxie ist noch nicht vollständig geklärt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine spezielle Isoform der Untereinheit 4 der Cytochrom C Oxidase (Cox) essenziell für die Hypoxie-induzierte ROS-Freisetzung und HPV ist. Diese Untersuchungen haben den Komplex IV als terminalen Elektronendonator an O_2 wieder in den Fokus der Diskussion um den primären O_2 -Sensormechanismus in PSMCs gerückt. Möglicherweise modifiziert Cox4i2 die Interaktion von O_2 mit Komplex IV in einer Weise, dass entweder die Sauerstoffaffinität erniedrigt oder die Hypoxie-induzierte Reduktion der Atmungskette erhöht wird. Dies hätte zur Folge, dass die Atmungskette der PSMCs bei höheren O_2 -Konzentrationen als in anderen Zelltypen inhibiert bzw. vermehrt reduziert wird (Sommer et al. 2017, Sommer et al. 2020). Allerdings spielt möglicherweise auch eine erniedrigte ATP-Konzentration durch die minimale Inhibierung der Atmungskette eine Rolle, die dann ATP-abhängige Signalwege aktivieren könnte, ohne eine komplette zelluläre ATP-Deprivation zu verursachen.

1.4.3 ATP

Der gesamte Energiestoffwechsel der Zelle ist abhängig vom Molekül ATP. Es ist ein universeller Energieträger, der etwa eine Milliarde mal in einer einzelnen Zelle vorhanden ist (Horn 2009). ATP besteht aus dem Zuckermolekül Ribose, das an einem Ende die Base Adenin und am anderen Ende drei Phosphate gebunden hat (siehe Abb. 2). Über eine N-glykosidische Verbindung ist die Base an das C¹-Atom der Ribose gebunden. Die Phosphate binden an die fünfte Hydroxylgruppe der Ribose über eine O-glykosidische Bindung. Die Phosphatmoleküle sind über energiereiche Phosphosäureanhydrid-Bindungen verknüpft. Werden diese Säureanhydrid-Bindungen mittels Hydrolyse (Spaltung einer biochemischen Verbindung durch Reaktion mit Wasser) von Enzymen gespalten, entsteht Adenosindiphosphat (ADP) oder Adenosinmonophosphat (AMP) (Horn 2009). Unter physiologischen Bedingungen werden dabei -50 kJ/mol freigesetzt (Horn 2009, Rassow et al. 2016). Diese Energie wird für zelluläre Transportprozesse, für die Biosynthese von Molekülen und für mechanische Arbeit, wie z.B. Muskelkontraktion, genutzt. Zudem ist ATP an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt: Veränderungen der zellulären Verhältnisse von AMP/ATP und ADP/ATP beeinflussen die Aktivität der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) (Evans 2006); die Adenylatzyklase katalysiert die Umwandlung von ATP zu zyklischem AMP (cAMP) (Rajendran et al. 2016) und cAMP wiederum übt als sekundärer Botenstoff Einfluss auf Proteinkinasen aus (Horn 2009). Extrazellulär dient ATP ebenfalls als Signalmolekül. Hierzu wurde gezeigt, dass ATP von unterschiedlichen Zelltypen freigesetzt werden kann und über autokrine und/oder parakrine Signalwege zum Beispiel das Gefäß- und Nervensystem beeinflusst (Lohman et al. 2012).

Im Stoffwechsel eines Organismus gibt es zahlreiche ATP verbrauchende Reaktionen, aber lediglich drei, in denen ATP generiert wird: Die Substratkettenphosphorylierung im Rahmen der Glykolyse und im Zitratzyklus, sowie die mitochondriale Atmungskette, auf die im Abschnitt 1.4.1.1 detailliert eingegangen wurde. Bei der Substratkettenphosphorylierung wird Energie, die bei Umwandlung von Substraten in einer Reaktionskette entsteht, durch Phosphorylierung in einer energiereichen Bindung konserviert und geht somit nicht als Wärme verloren (Horn 2009). Diese Bindung wird anschließend gespalten und das freiwerdende Phosphat auf ADP übertragen, so dass ATP generiert wird.

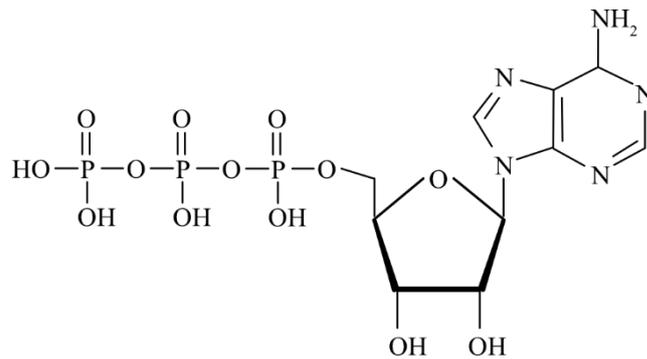


Abbildung 2: Molekulare Struktur von ATP

1.4.4 AMP-aktivierte Proteinkinasen und K_{ATP} -Kanäle

Obwohl vorhergehenden Untersuchungen darauf hinweisen, dass akute Hypoxie in PASCs zu keiner relevanten Erniedrigung der ATP-Spiegel und Einschränkung der zellulären Energieversorgung führt, könnten Veränderungen im AMP/ATP-Verhältnis, ausgelöst durch eine geringe Hemmung der Mitochondrien, als ein Signalmechanismus fungieren. Diese Hypothese stützt sich auf Respirationmessungen, bei denen eine geringe Hemmung der mitochondrialen Atmung unter Hypoxie in PASCs gemessen werden konnte (Sommer et al. 2016). Dieses könnte auch zu einer verminderten ATP-Produktion führen, die zwar in der gesamten Zelle durch eine erhöhte anaerobe Glykolyse kompensiert werden könnte, aber durch lokale Veränderungen des AMP/ATP-Verhältnisses zelluläre Signalprozesse initiieren könnte.

Dabei spielt insbesondere die AMPK eine wichtige Rolle (Evans 2006). Die AMPK ist als Sensor und Regulator zuständig für die Anpassung der mitochondrialen ATP-Produktion an den Energiehaushalt der Zelle (Evans et al. 2016). Ein Abfall der ATP-Produktion, oder eine Erhöhung des Bedarfs, führt zu einem Anstieg der AMP- und ADP-Spiegel im Verhältnis zu ATP. Es kommt zu einer verstärkten Aktivierung der AMPK, welche anschließend Zielproteine, wie z.B. die zyklische Adenosindiphosphoribose (cADPR) oder die Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) Carboxylase, phosphoryliert (Evans 2006, Hinchy et al. 2018). Versuche in isolierten PASCs mit dem AMP-Analogon 5-Aminoimidazole-4-carboxamid Ribonukleotid (AICAR) zeigten eine Aktivierung der AMPK, welche dann mittels cADPR eine Aktivierung des Ryanodin-Rezeptors (RyR) mit folgender Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und pulmonale Vasokonstriktion bewirkte (Evans 2006, Strielkov et al. 2017). Die Aktivierung von RyR mittels cADPR wurde auch in PASCs bei Exposition gegenüber Hypoxie (15-20 mmHg O_2)

beobachtet (Evans 2006). Aufgrund dessen schlugen Evans et al. vor, dass die AMPK eine Rolle als metabolischer Sensor und Effektor des Ca^{2+} -Signalweges unter Hypoxie in O_2 -sensiblen Zellen spielen könnte (Evans 2006). Für eine schematische Darstellung der AMPK-abhängigen Regulation der HPV siehe Abb. 3. Der AMPK Antagonist Compound C ist in der Lage die verlängerte Phase der HPV zu verhindern, dies könnte als ein weiterer Hinweis für die Rolle der AMPK als Sensor und Effektor des Ca^{2+} -Signalweges unter Hypoxie gesehen werden (Robertson et al. 2008). Andere Studien schlagen allerdings vor, dass auch mtROS für die Aktivierung der AMPK verantwortlich sein können (Hinchy et al. 2018). Hinchy et al. schlussfolgern, dass ROS die AMPK indirekt über Effekte auf das ATP/ADP-Verhältnis aktiviert.

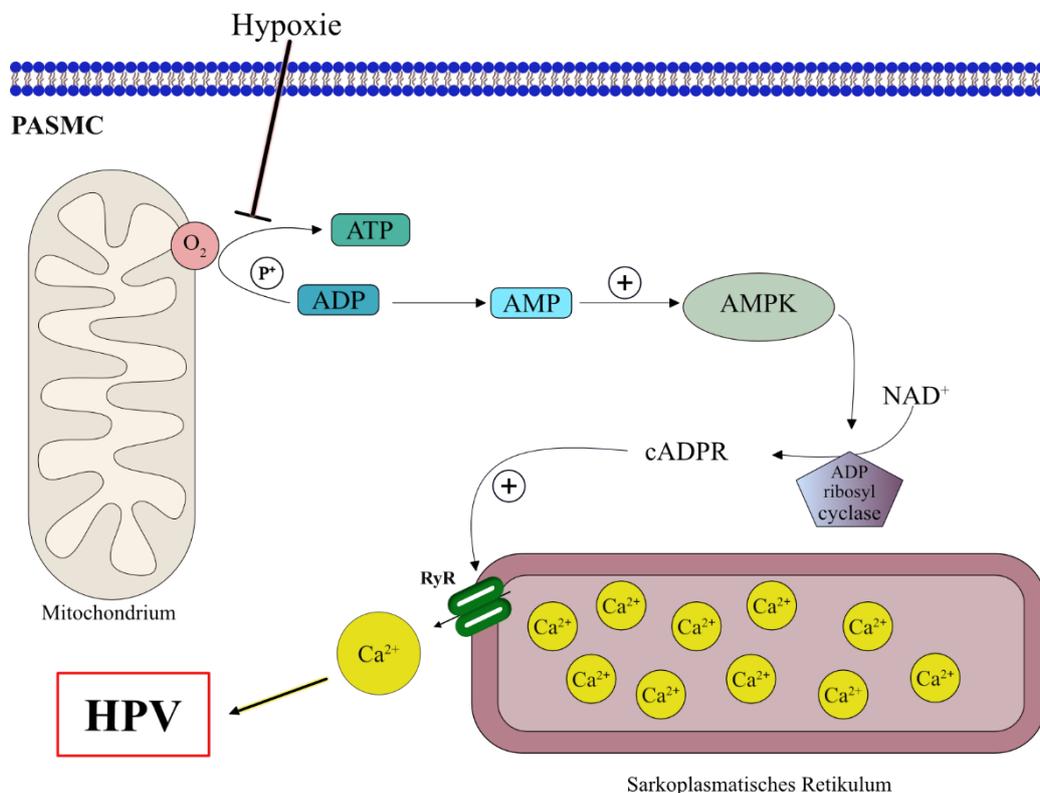


Abbildung 3: AMPK-abhängige Regulation der HPV

Schematische Darstellung der Hypothese zur Rolle der AMPK in der HPV. Hypoxie inhibiert die oxidative Phosphorylierung der Mitochondrien. Dies führt zu einer Erhöhung des AMP/ATP-Verhältnisses und somit zur Aktivierung der AMPK, nachfolgend zur cADPR-vermittelten Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum als Trigger für die HPV. ADP: Adenosindiphosphat, AMPK: AMP aktivierte Proteinkinase, AMP: Adenosinmonophosphat, ATP: Adenosindiphosphat

sintriphosphat, NAD^+ : Nicotinamidadenindinukleotid cADPR: zyklische Adenindiphosphoribose, Ca^{2+} : Calcium, HPV: Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion, O_2 : Sauerstoff, P^+ : Phosphat, PSMC: pulmonal-arterielle glatte Muskelzelle, RyR: Ryanodin-Rezeptor
Modifiziert nach Evans et al. (Evans 2006)

Auch ATP-abhängige K^+ -Kanäle (K_{ATP}) scheinen an der Regulation der HPV beteiligt zu sein. Erstmals identifiziert wurden sie in ventrikulären Herzmuskelzellen von Meerschweinchen und Kaninchen (Noma 1983). Unterschiedliche Typen des K_{ATP} -Kanals wurden in viszeralen und vaskulären glatten Muskelzellen entdeckt, in kultivierten humanen PSMCs z.B. der K_{ATP} -Kanal Kir6.1 (Cui et al. 2002, Teramoto 2006). K_{ATP} -Kanäle bestehen aus einem in der Plasmamembran sitzendem K^+ -Kanal (Kir6.x) und einer modulierenden Einheit, dem Sulfonylurea-Rezeptor (SUR) (Teramoto 2006). In glatten Muskelzellen führt die Öffnung der K_{ATP} -Kanäle durch Erniedrigung der ATP-Spiegel über einen Auswärtsstrom von K^+ zu einer Hyperpolarisation des zellulären Membranpotenzials. Dieses wiederum bewirkt die Schließung von Ca^{2+} -Kanälen, und führt so zu einer Verminderung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes und Relaxation (Turzo et al. 2018).

Unter Hypoxie werden der Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen kardioprotektive Eigenschaften zugesprochen: Bei ischämischen Ereignissen des Herzens führt die Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle zu einer Vasodilatation der Koronararterien und somit zu einer verbesserten Perfusion des Herzens (Yang et al. 2020). Auch in isolierten Kardiomyozyten kommt es bei Hypoxie zur Öffnung von K_{ATP} -Kanälen (Yang et al. 2020). Somit widerspricht die Funktionsweise der K_{ATP} -Kanäle eigentlich einer Beteiligung der K_{ATP} -Kanäle bei der HPV. Allerdings wurden K_{ATP} -Kanäle neben der Plasmamembran auch in der inneren mitochondrialen Membran (mito K_{ATP}) identifiziert (O'Rourke 2000). Eine Öffnung dieser Kanäle unter Hypoxie/Ischämie führt zu einem Transport von K^+ in die mitochondriale Matrix und Steigerung des oxidativen Metabolismus (Foster et al. 2016). Die Fettsäuresynthese und die Atmungskette werden aktiviert und somit auch die ATP-Produktion. Desweiteren führte eine Aktivierung von Mito K_{ATP} -Kanälen zur Kardioprotektion unter Ischämie durch eine milde Erhöhung der ROS-Produktion (O'Rourke 2000, Donato et al. 2021). Diese Mechanismen der ROS-Freisetzung könnten möglicherweise auch die HPV beeinflussen. So konnte in Studien von Paddenberg et al. (2009) gezeigt werden, dass in intra-azitären Arterien spezifische Inhibitoren von mito K_{ATP} die HPV komplett unterdrü-

cken konnten. Allerdings steht die Spezifität dieser Inhibitoren für $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ zur Diskussion (Li et al. 2010). Darüberhinaus könnten plasmalemnale K_{ATP} -Kanäle unter Hypoxie nicht nur über einen ATP-Abfall aktiviert, sondern im Gegensatz dazu auch über eine AMPK-abhängige Phosphorylierung inhibiert werden, so dass die HPV verstärkt werden würde (Evans et al. 2020).

1.5 Methoden der ATP-Messung

Bisherige Untersuchungen zur Rolle von ATP bei der HPV waren methodisch limitiert. Von den etablierten Methoden zur Messung von intrazellulärem ATP erlauben nur wenige eine lokalisierte und zeitlich hochauflösende Messung in lebenden Organismen. Das ATP-Verteilungsmuster zwischen den verschiedenen intrazellulären Kompartimenten in hoher zeitlicher Auflösung ist für wissenschaftliche Fragestellungen bzgl. der HPV von besonderem Interesse. Die am häufigsten verwendeten Messmethoden beruhen auf chemischer und physikalischer Basis, wie z.B. die Quantifizierungsmethode mittels Luciferase, einem Enzym aus dem Leuchtkäfer. Hierbei lässt Luciferol ATP und O₂ zu CO₂, AMP und Licht reagieren (Rajendran et al. 2016). Die Lichtabsorption kann nun z.B. in einem Zellysats oder in einem die Zellen umgebendem Medium gemessen werden und eine quantitative Aussage über die ATP-Menge getroffen werden. Weitere Methoden, welche vor allem für die extrazelluläre ATP-Detektion genutzt werden, umfassen Mikroelektrodensensoren und fluoreszierende ATP-Analoga (Conley et al. 2017).

Für die abbildenden (örtlich auflösenden) Messmethoden stehen die magnetische Resonanzspektroskopie oder die Kombination aus optischer Mikroskopie und molekularen Sonden zur Verfügung. Die molekularen Sonden gibt es in unterschiedlichen physikalischen Formen, von organischen Indikatoren bis hin zu Nanopartikeln (Rajendran et al. 2016). In dieser Arbeit wurden genetisch-kodierte ATP-Fluoreszenzsensoren verwendet. Für die Anwendung ist ein geeignetes Gentransfer- oder Expressionsverfahren notwendig. Hierzu zählen Transfektionsverfahren und die Virustransduktion.

1.5.1 Funktion und Aufbau des ATP-Sensors

Der für diese Arbeit genutzte ATP-Sensor besteht aus einer bakteriellen ϵ -Untereinheit der F₀/F₁-ATP-Synthase, die sich zwischen einem cyan- und einem gelbfluoreszierenden Protein befindet. Als cyan fluoreszierendes Donor-Protein wurde das *monomeric super-enhanced CFP* (mseCFP) und für das gelb fluoreszierende Akzeptor-Protein *monomeric Venus* (mVenus) ausgewählt. Die bakterielle Untereinheit ist mit 14 Kilodalton (kDa) das kleinste Protein, welches ATP binden kann. Sie besteht aus einem N-Terminus mit β -Fass Konfiguration und zwei C-terminalen Regionen mit einer α -Helix (siehe Abb. 6) (Imamura et al. 2009). In Abwesenheit von ATP sind die zwei α -Helices der ϵ -Untereinheit entspannt, bei Bindung von ATP kommt es zu einer Konformationsänderung in eine

gefaltete Form, sodass die α -Helices und die β -Fass Domäne dichter aneinandergelagert werden (Imamura et al. 2009). In dieser gefalteten Form, kommt es zu der sogenannten Resonanzenergieübertragung (Details siehe 1.5.2.).

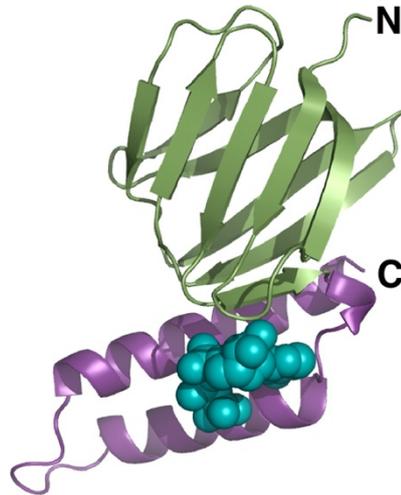


Abbildung 4: ATP-Sensor

Dreidimensionale Struktur der bakteriellen ϵ -Untereinheit mit gebundenem ATP. Der N-Terminus mit β -Fass Konfiguration ist grün und der C-Terminus mit den zwei α -Helices ist magenta gefärbt. Das ATP ist in der Farbe Cyan dargestellt.

Übernommen aus Imamura et al (Imamura 2009) mit freundlicher Genehmigung von Proceedings of the National Academy of Sciences. Imamura et al. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. Proceedings of the National Academy of Sciences Sep 2009, 106 (37) 15651-15656; DOI:10.1073/pnas.0904764106

Ohne eine zusätzliche Zielsequenz verteilt sich der Sensor im Zytoplasma und zu einem geringen Anteil im Nukleus der Zelle. Mit Zielsequenz kann der Sensor gezielt in verschiedene zelluläre Kompartimente eingeschleust werden, um räumlich differenziert ATP-Spiegel visualisieren zu können. Durch die Anheftung des mitochondrialen Zielsignals der Cox Untereinheit VIII an den N-Terminus erfolgte die Integration des Sensors in die mitochondriale Matrix (Imamura et al. 2009). Der im Zytoplasma lokalisierte Sensor ohne Zielsequenz wird nachfolgend als *CytoATeam*, der in der mitochondriale Matrix lokalisierte Sensor als *MitoATeam* bezeichnet.

1.5.2 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

Der Förster-Resonanzenergietransfer wurde benannt nach dem Physikochemiker Theodor Förster. Dieser beschrieb 1948 in seiner Veröffentlichung *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz* in „Annalen der Physik“ einen strahlungsfreien, d.h. nicht auf Photonen basierenden Energietransfer, zwischen zwei dicht beieinanderliegenden Fluorophoren (Förster 1948). Das führt dazu, dass bei Anregung mittels einer spezifischen Wellenlänge des einen Fluorophors (Donor) ein strahlungsfreier Energietransfer auf das zweite Fluorophore (Akzeptor) stattfindet (Ishikawa-Ankerhold et al. 2012). Der Energietransfer wird indirekt messbar durch eine Abnahme der Strahlungsintensität (oder auch Emissionsintensität in einem bestimmten Wellenlängenbereich) des Donors und durch eine verstärkte Strahlungsintensität des Akzeptors (Day et al. 2012).

1.5.2.1 Grundlagen

Damit FRET stattfinden kann müssen gewisse Voraussetzungen erfüllt sein. Das Emissionsspektrum des Donors muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Die beiden Fluoreszenzproteine müssen in einer Distanz von etwa 1 bis 10 nm voneinander entfernt liegen. Die elektronischen Schwingungsebenen von Donor und Akzeptor sollten möglichst parallel sein (Hussain 2009, Ishikawa-Ankerhold et al. 2012).

Die FRET-Effizienz ist das Verhältnis von transferierter Energie zur gesamten, vom Donor absorbierten Energie und steht in Abhängigkeit zur Distanz von Donor und Akzeptor sowie dem Förster-Radius R_0 (Pietraszewska-Bogiel et al. 2011). R_0 ist definiert als die Distanz, bei der die FRET-Effizienz 50 % beträgt. Bei einer Distanz der Fluorophore zwischen 3 - 8 nm ergibt sich der effektive Bereich der Energieübertragung. Die FRET-Effizienz liegt hier bei 5 – 95 % (Ishikawa-Ankerhold et al. 2012, Aoki et al. 2013).

Es gibt je nach experimenteller Fragestellung die Möglichkeit Donor- und Akzeptor-Fluorophor an ein Molekül (intramolekularer FRET) oder an unterschiedliche Moleküle (intermolekularer FRET) zu koppeln. Für die ATP-Sensoren wurde die intramolekulare FRET Variante genutzt. Es kommt bei dem darzustellenden Ereignis, z.B. bei der Bindung eines Liganden, zu einer Konformationsänderung des Moleküles. Dadurch verändert sich die räumliche Orientierung und Nähe der Fluorophore, sodass es zu einer Energieübertragung kommt (Ishikawa-Ankerhold et al. 2012). Abb. 7 zeigt eine schematische Darstellung der Funktion eines intramolekularen FRET-Sensors.

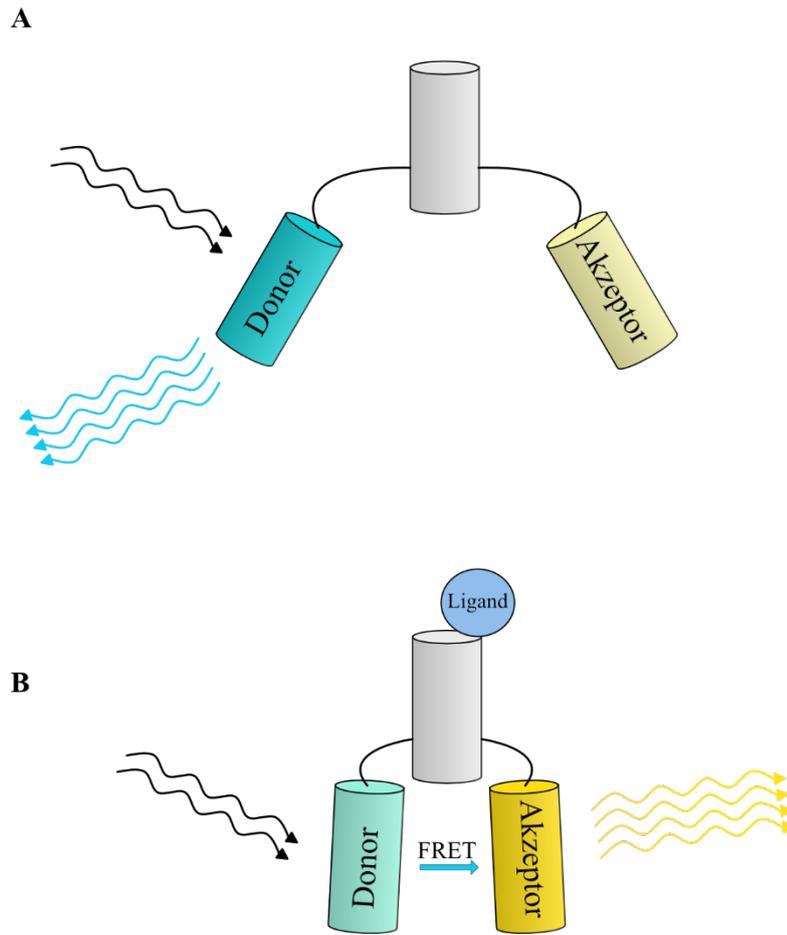


Abbildung 5: Schematische Darstellung des FRET-Vorganges

(A) Ohne Ligandenbindung (z.B. ATP) zeigt der Donor (cyan) bei Anregung (schwarze wellenförmige Pfeile) eine hohe Fluoreszenzintensität (blaue wellenförmige Pfeile). Es findet keine Energieübertragung (FRET) statt. (B) Nach Bindung eines Liganden findet eine Konformationsänderung statt, sodass sich die räumliche Distanz zwischen Donor und Akzeptor (gelb) reduziert. Dadurch ist bei Anregung des Donor eine Energieübertragung möglich und die Fluoreszenzintensität des Akzeptors wird erhöht (gelbe wellenförmige Pfeile). FRET: Förster-Resonanzenergietransfer. *Modifiziert nach Imamura et al. (Imamura 2009)*

1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Aktuell ist der genaue O₂-Sensor- und Signaltransduktionsprozess in PASMCs, der der HPV zugrundeliegt, unklar. Vorangehende Untersuchungen zeigten, dass ein akuter Abfall der O₂-Konzentration auf Werte, die eine zelluläre Hypoxieantwort auslösen können, zu einer leichten Inhibierung der Atmungskette und somit womöglich örtlich begrenztem Abfall der ATP-Konzentration führen könnten. Aufgrund von Limitationen bisheriger Messmethoden von intrazellulärem ATP ist aktuell allerdings die Rolle einer lokalisierten Einschränkung der ATP-Konzentration als Mediator für die HPV unklar.

Diese Arbeit hatte daher zum Ziel einen Sensor zu etablieren, der die intrazelluläre Messung von ATP-Konzentrationen mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung unter akuter Hypoxie erlaubt. Hierfür galt es zunächst einen genetisch-kodierten ATP-Sensor via Transfektion in eine Krebszelllinie (HEK 293T) einzubringen, welcher durch Verwendung von Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette in *in vitro* Experimenten überprüft werden sollte. Als Nächstes war es Ziel dieser Arbeit ein Protokoll zur Induktion von akuter Hypoxie unter dem konfokalen Mikroskop zu etablieren, um Echtzeitmessungen der ATP-Konzentration in akuter Hypoxie mit den erfolgreich transfizierten Zellen aus dem ersten Schritt durchführen zu können. Schließlich galt es den ATP-Sensor in primären Zellen zu etablieren. Hierfür wurden isolierte murine PASMCs (mPASMC) mittels lentiviraler Vektoren transduziert und Messungen in akuter Hypoxie unter dem konfokalen Mikroskop durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte für die Zellkultur und Mikrobiologie

<ul style="list-style-type: none">• Absaugsystem Vacusafe Comfort• Cellgard Class 2 - Biological Safety Cabinet, NuAire	IBS Integra Bioscience, Fernwald, Deutschland
<ul style="list-style-type: none">• Feinwaage	Mettler-Toledo, Columbus, USA
<ul style="list-style-type: none">• Inkubator HERAcell 150	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
<ul style="list-style-type: none">• Fluoreszenzmikroskop Olympus BX50 WI	Olympus, Hamburg, Deutschland
<ul style="list-style-type: none">• Fluoreszenzgerät, Kubier Codex• Fluoreszenzmodul, Kubier Codex• Inverses Labormikroskop mit LED-Beleuchtung Leica DM IL LED• Lichtmikroskop Leica DMLA• Mikroskop, DMIL (Zellkultur)	Leica, Wetzlar, Deutschland
<ul style="list-style-type: none">• Ultrazentrifuge Sorvell™ WX Ultra 80	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
<ul style="list-style-type: none">• Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc.™, New York, USA
<ul style="list-style-type: none">• Wasserbad WNE 14	Memmert, Schwabach, Deutschland

<ul style="list-style-type: none"> • Mx3000P QPCR System 230 Volt 	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
<ul style="list-style-type: none"> • Zentrifuge Rotina 460R • Tischzentrifuge Mikro 200R 	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer 	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
<ul style="list-style-type: none"> • PX1™ PCR Plate Sealer 	Bio-Rad, Hercules, USA

Tabelle 3: Verwendete Geräte für die Konfokalmikroskopie

<ul style="list-style-type: none"> • Konfokales Laser-Scanning Mikroskop TCS SP8 X 	Leica, Wetzlar, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • The Cube + The Box • Red Brick 	Life Imaging Services, Basel, Schweiz
<ul style="list-style-type: none"> • Licox Messgerät • Licox Sonde 	Integra LifeSciences, Tullamore, Ireland

2.2 Software

Tabelle 4: Verwendete Software

<ul style="list-style-type: none"> • Graph Pad Prism 8/9 	GraphPad Software, San Diego, USA
<ul style="list-style-type: none"> • Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) 	Leica, Wetzlar, Deutschland

<ul style="list-style-type: none"> • Microsoft Excel • Microsoft Word 	<p>Microsoft, Redmond, USA</p>
---	------------------------------------

2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Allgemeine Verbrauchsmaterialien

<ul style="list-style-type: none"> • Einmalspritzen 	<p>B.Braun, Melsungen, Deutschland</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Durapore® Medizinisches Klebeband 	<p>3M, St.Paul, MN, USA</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf Tubes (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml) 	<p>Sarstedt GmbH Nümbrecht, Deutschland</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Feather® Disposal Scalpel 	<p>PFMmedical AG, Köln, Deutschland</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Pur-Zellin® (Zellstofftupfer) 4 x 5 cm 	<p>Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Zellulose-Handtücher 	<p>Tork, Mannheim, Deutschland</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Handschuhe 	<p>Ansell, Richmond, Australien</p>

Tabelle 6: Verwendete Materialien Zellkultur und Mikrobiologie

<ul style="list-style-type: none"> • 0,45 µm Filter 	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
<ul style="list-style-type: none"> • 96-well PCR Platte, Multiplate PCR Plates, klar 	Bio-Rad, Hercules, USA
<ul style="list-style-type: none"> • Lenti-X Go Stix 	Clontech/ Takara Bio, Mountain View, USA
<ul style="list-style-type: none"> • Pipettenspitze 10 µl 	Glison, Middelton, USA
<ul style="list-style-type: none"> • Pipettenspitzen gestopft (10 µL, 100 µL, 1000 µL) 	Nerbe plus GmbH, Winsen, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 mL Gefäß, DNase/Rnase frei • 1,5 mL Gefäß, DNase/Rnase frei • Pipettenspitze 100 µl • Pipettenspitze 200 µl • Pipettenspitze 1000 µl • Zellkulturflasche T75 	Sarstedt GmbH, Nümbrecht, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • 12-well, Zellkulturplatte • 15 cm Zellkultur Wachstumsplatten • 100er Wachstumsplatte • Falconröhrchen 15 ml, 50 ml • Cyro Tubes • Serological Pipette 10 ml, 50 ml, steril 	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
<ul style="list-style-type: none"> • 15 µl -Slide 8-well • 35 mm Glasboden Zellkulturplatte 	Ibidi, Martinsried, Deutschland

Tabelle 7: Verwendete Materialien für die Isolation der PSMCs

<ul style="list-style-type: none"> Chirurgischer Faden, Polyester Garn 5/0 	FSSB, Jestetten, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> Kanüle Neobject®, 15 G x 11/2“, 1,8 x 40 mm 	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> Kanüle (18 G x 1,2“ x 40 mm) 	BD Microlane, Franklin Lakes, USA
<ul style="list-style-type: none"> Skalpell 	<i>Feather®</i> Safety Razor Co. Ltd, Osaka, Japan

2.4 Chemikalien und Medien

Tabelle 8: Chemikalien und Medien für Zellkultur und Mikrobiologie

<ul style="list-style-type: none"> Cyro serumfreies Medium (SFM) Einfriermedium 	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> 1M Galaktose Fetales Kälberserum (FCS) Kollagenlösung Typ I 0,01 % Oligomycin A L-Glutamine Methanol Agarose, low gelling temperature Eisen (II,III)-oxid, Pulver <5 µm 98 % Ampicillin 	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<ul style="list-style-type: none"> Heparin-Natrium-5000-rati- opharm® 	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

<ul style="list-style-type: none"> • Fetales Kälberserum (FCS), dialysiert • Penicillin / Streptomycin 	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
<ul style="list-style-type: none"> • Dulbeccos phosphatgepufferte Salz-lösung ohne Calcium und Magnesium • Trypsin/EDTA (1x) 	Pan-Biotech GmbH TM , Aidenbach, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • Hepes Ringer Lösung (0,2 M) 	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • Ketamin 10 % 	Belapharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • Lipofectamine® 2000 • S.O.C. Medium 	Invitrogen, Carlsbad, USA
<ul style="list-style-type: none"> • Medium 199 (M199) • Opti-MEM® Medium 	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
<ul style="list-style-type: none"> • Natriumchloridlösung 0,9 % Braun 	B. Braun, Melsungen, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • NormocinTM 	Invivogen, Toulouse, Frankreich
<ul style="list-style-type: none"> • Rompun® (Xylazin 2 %) 	Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • Normoxisches Gas (21 % O₂, 5 % CO₂, 74 % N₂) • Hypoxisches Gas (1,0 % O₂, 5 % CO₂, 94 % N₂) 	Linde, München, Deutschland

<ul style="list-style-type: none"> • Smooth Muscel Cell Basic Medium • Smooth Muscel Cell Basic Medium Supplement Mix 	<p>PromoCell, Heidelberg, Deutschland</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Viafect 	<p>Promega, Madison, USA</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Polybrene (Hexadimethrinbromid) 	<p>Millipore, Schwalbach, Deutschland</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Glycerol (Glycerin 85 %) 	<p>Merck, Darmstadt, Deutschland</p>

2.4.1 Medienzusammensetzung

Tabelle 9: Medien für Zellkultur

SMC Medium	Smooth Muscle Growth Me- dium 2	424 ml
	Smooth Muscle Growth Me- dium 2 Supplement Mix	1 Phirole/500 ml SMC- Medium
	Normocin	1 ml
	FCS	75 ml
<hr/>		
Galaktose-haltiges DMEM	DMEM ohne Glukose und Pyruvat	440 ml
	Galaktose	5 ml
	L-Glutamine	5 ml
	Dialysiertes FCS	50 ml
<hr/>		
Zellkulturmedium I	DMEM 4,5 g/l Glukose	445 ml
	FCS	50 ml
	P/S	5 ml

2.5 Kits

Tabelle 10: Verwendete Kits für die Mikrobiologie

<ul style="list-style-type: none"> • EndoFree® Plasmid Maxi Kit • QiAmp® Viral RNA Mini Kit 	Qiagen®, Hilden, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit • Lenti-X™ Go-Stix • Lenti-X p24 Rapid Titer Kit 	Clontech/ Takara Bio, Mountain View, USA

2.6 Plasmide

Für diese Doktorarbeit wurde ein ATP-Sensor verwendet, welcher von Imamura et al. (2009) entwickelt und in „*Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators*“ beschrieben wurde (Imamura et al. 2009). Die Plasmide, die den ATP-Sensor enthalten und die dazugehörigen Referenz-Fluoreszenzplasmide, wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat. Maren Mieth, Charité Berlin, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 11: ATP-Sensor Plasmide

Plasmid	Herkunft
<ul style="list-style-type: none"> • <i>CytoATeam</i> in pLenti-III-GFP-N • <i>MitoATeam</i> in pLenti-III-GFP-N 	Dr. rer. nat. Maren Mieth, Charité Berlin beschrieben in Imamura et al. (Imamura et al. 2009)

Tabelle 12: Hüllplasmid und Verpackungsplasmide

Plasmid	Herkunft
<ul style="list-style-type: none"> • pMD2.G • pMDLg/pRRE • pRSV-REV 	Addgene, Boston, MA, USA

Tabelle 13: Fluoreszenzplasmide

Plasmid	Herkunft
<ul style="list-style-type: none">• pEYFP-N1• pECFP-N1	Dr. rer. nat. Maren Mieth, Charité Berlin

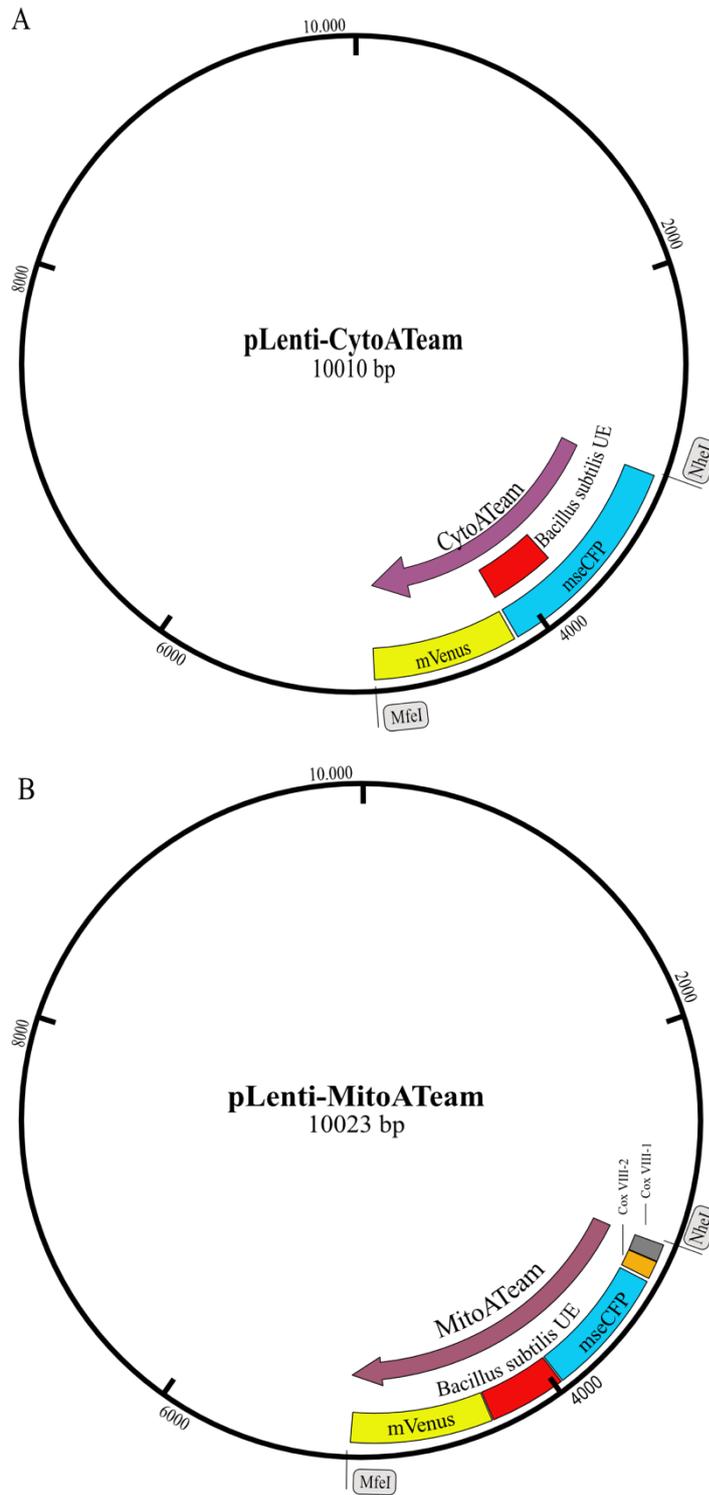


Abbildung 6: Darstellung der Sensoren enthaltenden Plasmide

(A): pLenti-CytoATeam, (B): pLenti-MitoATeam. NheI und MfeI: Schnittstellen für Restriktionsendonuklease. mVenus: Variante des Yellow-Fluoreszenzprotein (A260K). mscCFP: Variante des Cyan-Fluoreszenzprotein. Cox VIII: Cytochrome C Oxidase VIII. Rot: Bacillus subtilis Untereinheit Epsilon

2.7 Zellkultur

2.7.1 Kultivierung von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293T)

Die Kultivierung von humanen embryonalen Nierenzellen (*human embryonic kidney cells* - HEK 293T) erfolgte auf Zellkulturplatten im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂, 21 % O₂, 74 % Stickstoff (N₂) und 90-95 % Luftfeuchtigkeit. Ein Wechsel des Zellkulturmediums (Zellkulturmedium I) fand alle zwei bis drei Tage statt. Kontrolliert wurde das Zellwachstum täglich unter dem Mikroskop.

Zellpassagierung

Sobald eine Konfluenz von 70-80 % erreicht wurde, erfolgte die Passagierung der Zellen mit einer auf 37 °C erwärmten Trypsin-/EDTA-Lösung. Dafür wurde zunächst das vorherige Zellkulturmedium mittels Pasteur-Pipette entfernt und die Zellen dreimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) ohne Magnesium und Calcium gewaschen. Danach wurden circa 5 ml Trypsin-/EDTA-Lösung auf die Kulturplatte gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1-2 Minuten bei 37 °C wurden die abgelösten Zellen mit einer Pipette in 1 ml FCS, welches die enzymatische Wirkung des Trypsins abstoppte, überführt. Die Zellsuspension wurde anschließend für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und neues Zellkulturmedium I zu den Zellen hinzugefügt. Die Zellsuspension mit dem frischen Zellkulturmedium konnte dann auf neue Zellkulturplatten aufgeteilt und ausgesät werden. Für die Fortführung der Kultivierung wurden ein Drittel der Zellen auf neue T75-Flaschen oder 10 cm Wachstumsplatten ausgesät, je nach Zellzahl. Für eine Versuchsreihe wurden circa 35.000 Zellen auf 35 mm Glasboden Kulturschalen (Normoxie/Hypoxie Versuche) und 10.000 Zellen/*well* (8-*well slides*, Oligomycin A Versuche) ausgesät.

Einfrieren und Auftauen

Für die permanente Lagerung wurden die HEK 293T Zellen in flüssiges N₂ überführt. Dazu wurden die Zellen gemeinsam mit dem Zellkulturmedium von der Zellkulturplatte durch Trypsinierung abgelöst und für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 1200 *revolutions per minute* (rpm) zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in insgesamt 500 µl Zellkulturmedium Cyro-SFM Einfriermedium resuspendiert und in Kryogefäße pipettiert. Es erfolgte eine Lagerung der Zellen über 24 Stunden bei -80 °C, um sie anschließend zur permanenten Lagerung in flüssiges N₂ zu überführen. Um die Zellen aufzutauen wurden diese nach der Entnahme aus dem Stickstofftank unmittelbar in ein 37 °C warmes

Wasserbad gestellt. Sobald die Zellsuspension aufgetaut war, wurde diese auf eine Zellkulturplatte mit auf 37 °C vorgewärmten Zellkulturmedium I pipettiert. Zur Entfernung des noch vorhandenem Einfriermediums wurde am darauffolgenden Tag ein Wechsel des Zellkulturmediums durchgeführt.

2.7.2 Isolation und Kultivierung von mPASCs

Vorbereitung

Eine Agarose-Lösung (30 mg Agarose) und eine Agarose-Eisen-Mischung (15 mg Agarose, 15 mg Eisenoxid-Pulver) wurden angesetzt. Die abgewogenen Mengen in jeweils 3 ml Zellkulturmedium 199 plus [1 % Penicillin/Streptomycin (P/S)] gelöst und im Wasserbad bei 70 °C für 10 Minuten erhitzt. Danach wurden die Lösungen bei 40 °C auf einer Heizplatte warmgehalten. Weiterhin wurden 10 ml Kollagenase (80 U/ml) angesetzt und bei 36,5 °C im Wasserbad für den späteren Gebrauch bereitgestellt.

Präparation

Die Versuchsmaus wurde mittels Injektion eines Gemisches in die Bauchhöhle, bestehend aus 100 mg/kg*Körpergewicht (KG) Ketamin (10 %, 100 mg/ml), 20 mg/kg*KG Xylazin (2 %, 20 mg/ml) narkotisiert. Zusätzlich wurde eine Antikoagulation mit 50000 I.E Heparin/kgKG (Heparin Natrium 250000 I.E./10 ml) durchgeführt. Es wurde eine 1ml-Mischspritze für die Injektionslösung genutzt (0,1 ml Ketamin, 0,1 ml Xylazin, 0,2 ml Heparin und 0,6 ml isotonische Kochsalzlösung [NaCl (0,9 %)]). Somit waren 0,1 ml der Injektionslösung für 10 g Maus kalkuliert. Zehn Minuten nach Injektion wurden der Zwischenzehen- und Schwanzreflex bei der Maus getestet. Erst nach Sicherstellung der erloschenen Reflexantworten wurde mit der Präparation begonnen. Bauch- und Brusthöhle wurde von kaudal beginnend bis zum Hals eröffnet und die Luftröhre umgebenden Muskeln, der Thymus und die Speicheldrüsen entfernt. Die Luftröhre wurde mit einer Ligatur umfahren, über eine Schnittinzision ein endotrachealer Tubus eingeführt und dieser durch Festbinden der Schlaufe fixiert. Im nächsten Schritt wurde eine lockere Schlaufe um die A. pulmonalis gebunden und eine Inzision in die linke Herzkammer gemacht. Dies führte zu einem Ausbluten und dem Tod der Versuchsmaus. Durch eine weitere Inzision in die rechte Herzkammer wurde ein mit Spülflüssigkeit gefüllter und vorab entlüfteter Katheter in die A. pulmonalis vorgeschoben und durch Festziehen der Schlaufe sicher fixiert. Die Lunge wurde zunächst mit *Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution*

(DPBS) blutfrei gespült, und im Anschluss die vorbereitete Agarose-Eisen-Mischung über den Katheter appliziert. Diese lagerte sich durch die Partikelgröße im präkapillaren Bereich ab und ermöglichte so eine Isolation dort ansässiger Zellen. Es wurde auf eine gleichmäßige Verteilung der Anreicherung in der Lunge mit Eisen geachtet. Im Anschluss wurde die Agarose-Lösung über den Endotrachealtubus appliziert bis sich alle Lungenlappen entfaltet hatten. Beim Entfernen des Endotrachealtubus wurde die Luft-röhre ligiert um ein Rückfluss der applizierten Mischung zu unterbinden. Im Anschluss wurde das Lungen-Herz-Paket entnommen und in ca. 4 °C kaltes, steriles DPBS gelegt, um die Agarose aushärten zu lassen.

Isolation der glatten Gefäßmuskelzellen

Das Lungengewebe wurde zunächst von Herz und restlichem Gewebe unter der sterilen Werkbank gesäubert. Mithilfe der Drei-Scheren-Technik wurden die fünf Lungenlappen mechanisch in sterilem DPBS zerkleinert. Das eisenbehaftete Lungengewebe wurde dreimal mittels Nutzung eines Magnetkonzentrierers in DPBS aufgereinigt. Nach dem letzten Waschschritt wurden die angewärmten 10 ml Kollagenase (80 U/ml) hinzugefügt und die Zell-Kollagenase-Mischung für etwa 60 Minuten inkubiert (37 °C, 5 % CO₂, 21 % O₂, 74 % N₂, 90-95 % Luftfeuchtigkeit). Anschließend wurde durch Applikation von M 199 (10 % FCS, 1 % P/S) die Kollagenase-Aktivität gestoppt. Die angedauten Gewebereste wurden mittels mechanischer Scherkräfte durch 15G- und 18G-Kanülen weiter zerkleinert. Es folgte erneutes dreimaliges Waschen des Eisenpartikel-enthaltenden Lungengewebes mit M199 (10 % FCS, 1 % P/S) unter Zuhilfenahme des Magnetkonzentrierers. Danach wurden das Eisenpartikel-enthaltende Lungengewebe in 4 ml SMC-Medium (Supplement-Mix, Normocin®, 15 % FCS) resuspendiert und auf Kulturschalen ausgesät (Aus-saat 1, Passage 0). Inkubiert wurden die Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂, 21 % O₂, 74 % N₂ und 90-95 % Luftfeuchtigkeit.

Kultivierung

Um ein angemessenes Wachstum der mPASCs aus den Eisenpartikel-enthaltende Lun-gengewebestücken zu gewährleisten, wurden die Suspension fünf bis zehn Tage unter normoxischen Verhältnissen im Inkubator belassen. Für weitere Aussaaten wurde das Ei-senpartikel-enthaltende Lungengewebe vorsichtig von der Kulturschale genommen, mit DPBS gewaschen und anschließend auf eine neue Kulturschale mit frischem Zellkultur-medium gelegt. Die ausgesprossenen mPASCs verblieben dabei auf der Kulturschale und

wurden unter den vorherigen Bedingungen weiter im Inkubator kultiviert. Nach entsprechender Zeit und Wachstum konnten die Zellen (Aussaat 1/2/3 Passage 0) zur Virustransduktion weiterverwendet werden.

2.8 Molekularbiologie

In dieser Arbeit wurden die HEK 293T Zellen mit Plasmiden transfiziert und die mPASCs hingegen wurden mit lentiviralen Vektoren transduziert.

2.8.1 Transfektion von HEK 293T Zellen

Die Transfektion wurde mit Viafect mittels optimiertem Herstellerprotokoll durchgeführt. Ein Transfektionsmedium aus Opti-MEM (10 % vom Gesamtvolumen), Plasmid (0,6 µg/cm²) und Viafect in einem Verhältnis 3:1 zum Plasmid wurde hergestellt. Um eine optimale Komplexbildung der Komponenten zu erreichen, wurde das Transfektionsmedium bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert und in der Zwischenzeit das alte Zellkulturmedium gegen Neues ausgetauscht. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Transfektionsmedium auf die Zellen pipettiert. Der Erfolg der Transfektion wurde am nächsten Tag mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft. War die Transfektion erfolgreich fluoreszierten die Zellen in der Farbe grün. Die transfizierten Zellen wurden entweder im Zellkulturmedium I belassen oder am Versuchsvortag in DMEM Galaktose überführt.

2.8.2 Produktion viraler Vektoren

Die Produktion von lentiviralen Vektoren in HEK 293T Zellen umfasste insgesamt fünf Tage. Mithilfe der lentiviralen Vektorpartikel wurde das Zielgen, welches in dieser Arbeit für den ATP-Sensor kodierte, in die Zielzelle (mPASCs) übertragen. Es kam ein aus vier Plasmiden bestehendes Vektorsystem zu Einsatz. Die Arbeiten erfolgen nach Anzeige und Genehmigung unter dem Aktenzeichen IV44-53r30.03 UGI125.13.03 nach Gentechnik-Sicherheitsverordnung. Die Produktionszellen (HEK 293T) wurden zunächst mit den Verpackungsplasmiden (pMDLg/pRRE, pRSV-REV), dem Hüllplasmid (pMD2.G) und dem Transferplasmid mit der kodierenden Sequenz für den FRET ATP-Sensor transfiziert. Daraufhin produzierten diese lentivirale Vektorpartikel, welche im

Zellkulturmedium freigesetzt wurden (Labbe et al. 2021). Für eine schematische Darstellung siehe Abb. 5. Anschließend konnten die Zielzellen (mPASCs) mit den Vektorpartikeln transduziert werden.

Am ersten Tag wurden HEK 293T Zellen auf die Zellkulturplatten (10 cm Durchmesser) ausgesät und mit 5 ml frischem DMEM 4,5 g/l Glukose-haltigem Medium bedeckt. Am zweiten Tag wurde ein Gemisch bestehend aus dem Hüllplasmid (pMD2.G), den Verpackungsplasmiden (pMDLg/pRRE, pRSV-REV), dem ATP-Sensor Plasmid (*CytoATeam* oder *MitoATeam*), Opti-MEM und Viafect hergestellt. Die benötigte Menge der einzelnen Komponenten ist in Tabelle 14 zusammengefasst. Die Mischung wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die HEK 293T Zellen gegeben. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C, 5 % CO₂, 21 % O₂, 74 % N₂ und 90-95 % Luftfeuchtigkeit. Am dritten Tag wurde das Zellkulturmedium vom Vortag entfernt und durch 8 ml frisches Opti-MEM ersetzt, sodass Überreste einzelner Plasmide oder Viafect entfernt wurden. Am vierten Tag wurde das Zellkulturmedium, welches nun die lentiviralen Vektoren enthielt, filtriert (Filterporengröße: 0,45 µm), um Detritus zu eliminieren. Die Kontrolle der erfolgreichen Produktion lentiviraler Vektoren erfolgte mit dem Lenti-X™ Go-Stix (Clontech). Dazu wurden 20 µl des Vektor-enthaltende Zellkulturmedium und 80 µl Pufferlösung auf die Testkassette aufgetragen. Nach 10 Minuten konnte das Ergebniss abgelesen werden. Bei einem positivem Ergebniss konnten, eine T-Linie im Testbereich und eine C-Linie im Kontrollbereich abgelesen werden. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C über Nacht im Kühlschrank. Am fünften Tag wurde das Vektor-enthaltende Zellkulturmedium mittels Ultrazentrifuge bei 25000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das verbliebende Pellet wurde dann in PBS in einem Verhältnis 1:100 gelöst. Schließlich wurden die viralen Vektoren aliquotiert und entweder frisch verwendet oder bei -80 °C gelagert.

Tabelle 14: Komponenten Virusproduktion

Opti-MEM	1,50 ml
pMD2G	2,70 µg
pMDLg/pRRE	4,50 µg
pRSV-Rev	1,80 µg

pLenti-MitoA <i>Team</i>	9,00 µg
pLenti-CytoA <i>Team</i>	9,00 µg
Viafect direkt in Lösung	45 µl

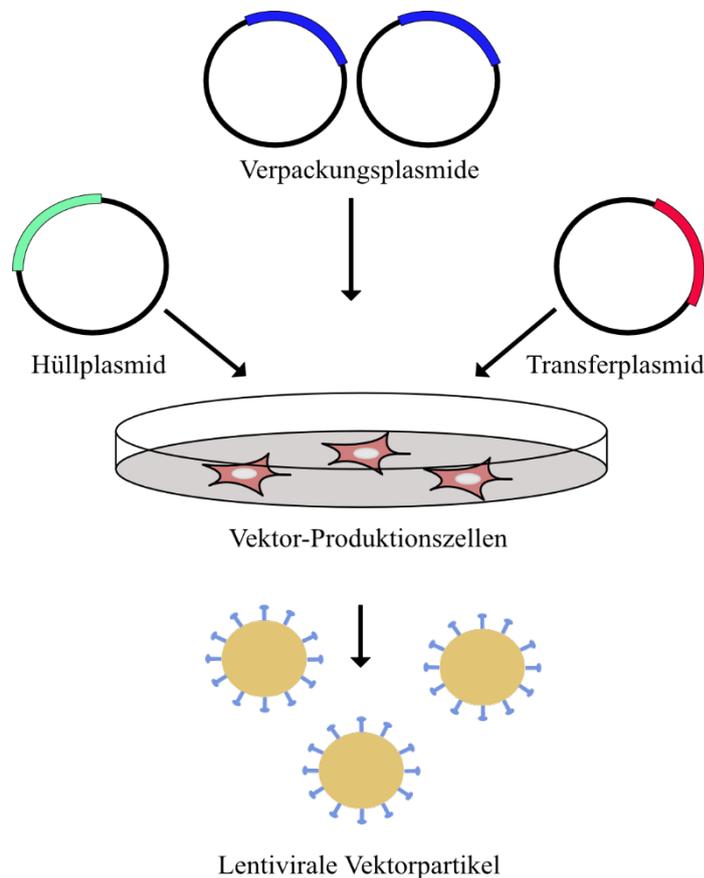


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Produktion von viralen Vektoren

2.8.3 Transduktion der primären PSMCs

Die Transduktion der primären mPSMCs mit den Zielgenen mittels lentiviraler Vektorpartikel erfolgte, je nach Wachstum der Zellen, 5-6 Tage nach der Isolierung. Vor der Transduktion wurden die lentiviralen Vektorpartikel, falls nicht frisch verwendet, über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank oder am Tag der Transduktion auf Eis aufgetaut. Zu Beginn wurde das alte Zellkulturmedium entfernt und die lentiviralen Vektorpartikel mit einem Titer von mindestens 1×10^7 auf die mPSMCs gegeben. Der Titer wurde nach Pro-

tokollangaben des Herstellers mit dem Lenti-X p24 *Rapid Titer Kit* kontrolliert. Zusätzlich wurde Polybrene (Endkonzentration 8 µg/ml) auf die Zellen gegeben und die Kulturplatten kreuzförmig geschwenkt. Polybrene (Hexadimethrinbromid) ist ein kationisches Polymer mit einem Molekulargewicht von 3,6 kDa. Es wird genutzt, um die Transduktionseffizienz zu steigern, indem es durch die Maskierung negativer Ladungen der Zelloberfläche der PSMCs die Abstoßung der lentiviralen Vektorpartikel von dieser reduziert (Davis et al. 2004). Danach wurde mit SMC-Medium das Zellkulturmedium auf ein Endvolumen von 500 µl aufgefüllt und die Zellkulturplatten anschließend 6 Stunden bei 37 °C, 21 % O₂, 5 % CO₂, 74 % N₂ und 90-95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Abschließend erfolgte ein erneuter Wechsel des Zellkulturmediums. Eine längere Kontaktzeit der Viren mit den Zellen hätte zwar eine bessere Sensorexpression, aber auch einen höheren toxischen Effekt bedeutet. Zur Kontrolle der erfolgreichen Transduktion wurde 24 Stunden später die Fluoreszenz per Mikroskop überprüft.

2.8.4 Ribonucleinsäure (RNA)-Isolation

Für die Isolation wurde das RNA-Lyse *QiAmp® Viral RNA Mini Kit* verwendet und nach Protokoll der Firma Qiagen vorgegangen.

Im ersten Schritt erfolgte die Lyse der Probe, um RNasen zu inaktivieren und die Isolierung intakter viraler RNA sicherzustellen. Das Hinzufügen der *Carrier*-RNA verbesserte die Bindung an die *QiAmp membrane*. Anschließend wurde das Gemisch auf eine *QiAmp Mini spin column* pipettiert und mit zwei verschiedenen Pufferlösungen unter Zentrifugation gewaschen. Damit wurde erreicht, dass die RNA an die *QiAmp membrane* bindet und Verunreinigungen weggewaschen wurden. Nach jedem Waschgang wurde das Eluat verworfen. Im letzten Schritt wurde die *QiAmp membrane* mit 60 µl RNAase-freiem Wasser für eine Minute inkubiert und ein weiteres Mal zentrifugiert. Das Eluat enthielt die isolierte RNA. Alle Schritte wurden mit sterilen Pipettenspitzen durchgeführt. Die lysierte RNA wurde frisch verwendet oder bei -80 °C eingefroren, wenn die Proben am nächsten Tag verwendet werden sollten.

Tabelle 15: Protokoll PCR

Substanzen	Vortex/ Zentrifuge
1. 560 µl AVL Puffer + 5,6 µl <i>Carrier</i> + 140 µl Probe	15 Sekunden Pulsvortex
2. 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur	Kurzes Zentrifugieren der Lösung
3. + 560 µl Ethanol	15 Sekunden Pulsvortex
4. 630 µl der Lösung aus 1.+ 2. auf <i>QiAmp Mini spin column</i>	8000 rpm für eine Minute
5. Wiederholung des vierten Arbeitsschrittes	
6. Waschgang <i>QiAmp Mini spin column</i> mit 500 µl AW1 Puffer	8000 rpm für eine Minute
7. Waschgang <i>QiAmp Mini spin column</i> mit 500 µl AW2 Puffer	14000 rpm für drei Minuten
8. <i>QiAmp Mini spin column</i>	Trocknung bei 14000 rpm für eine Minute
9. 60 µl AVE in <i>QiAmp Mini spin column</i> einwirken lassen	8000 rpm für eine Minute

2.8.5 Quantitative Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

In dieser Arbeit wurde die Methode eingesetzt um den viralen RNA-Gehalt einer Probe zu bestimmen. Die qRT-PCR ist eine Kombination aus zwei Methoden, einmal die Reverse Transkription, um RNA in doppelsträngige komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umzuschreiben und die PCR, um cDNA mittels thermostabiler DNA-Polymerasen zu amplifizieren. Die Quantifizierung der neu synthetisierten DNA-Menge wird durch den Einbau von Fluoreszenzsonden, wie z.B. *SYBR Green*, gemessen. Die neu gebildete Produktmenge ist proportional zur Intensität des Fluoreszenzsignals.

Die PCR wurde nach dem Protokoll des *Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit* vorbereitet und durchgeführt. Um eventuell zurück gebliebene Plasmid DNA zu entfernen wurde die virale RNA Probe mit folgenden Reagenzien aus dem Kit behandelt.

Table 16: Protokoll PCR Reagenzien 1

DNase I Buffer (10x)	2,5 µl
DNase I (5 units/µl)	4,0 µl
RNase-free Water	6,0 µl

Dieser Mix wurde erst bei 37 °C 30 Minuten lang inkubiert und danach nochmal 5 Minuten bei 70 °C. Während der Inkubationszeit wurde der Mastermix hergestellt.

Table 17: Material PCR Mastermix

RNase-free Water	8,5 µl/well
Quant-X Buffer (2X)	12,5 µl/well
Lenti-X Forward Primer (10 µM)	0,5 µl/well
Lenti-X Reverse Primer (10 µM)	0,5 µl/well
ROX Reference Dye LSR or LMP (50X)	0,5 µl/well
Quant-X Enzyme	0,5 µl/well

RT Enzyme Mix	0,5 µl/well
---------------	-------------

Durchführung

Eine Verdünnungsreihe 1:10 der viralen RNA-Probe wurde mit dem *Easy Dilution Buffer* über 3 Verdünnungsstufen angelegt. Des Weiteren wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe über 5 Verdünnungsstufen für die kalibrierte Lenti-X-RNA-Kontrolle angelegt, um C_T -Werte (*Cycle Threshold*) für eine Standardkurve zu bestimmen. Auf der 96-well PCR-Platte wurden in die benötigte Anzahl *wells* jeweils 23 µl des Mastermix pipettiert. Von den Kontrollverdünnungen und den Proben wurden 2 µl entnommen und zu dem Mastermix hinzugefügt. RNase-free Water und der *Easy Dilution Buffer* dienten als zusätzliche Negativkontrollen. Vor dem Start des PCR-Programmes wurden die Platte bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen. Anschließend wurde die 96-well-Platte mit einer Folie versiegelt und die qRT-PCR gestartet. Die reverse Transkriptionsreaktion wurde in 5 Minuten bei 42 °C durchgeführt, gefolgt von 10 Sekunden bei 95 °C zur Denaturierung. Die Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte in 40 Zyklen, jeweils bestehend aus Denaturierung (5 Sekunden, 95 °C), Hybridisierung und Elongation (30 Sekunden, 60 °C). Zum Abschluss wurde eine Schmelzkurvenanalyse (Denaturierung für 15 Sekunden bei 95 °C und Hybridisierung für 30 Sekunden bei 60 °C) gemacht. Diese dient der Auskunft über die Spezifität der amplifizierten Fragmente. Bei der Schmelzkurvenanalyse wird DNA wieder aufgeschmolzen und die vorab eingebaute Fluoreszenzsonde *SYBR Green* wieder freigesetzt. Dadurch kommt es bei einer für das Amplifikat charakteristischen Schmelztemperatur zu einem Abfall des Fluoreszenzsignals. Somit war eine Unterscheidung zwischen spezifischen doppelsträngigen Amplifikaten und unspezifischen Amplifikaten mit anderer Schmelztemperatur möglich (Arya et al. 2005).

Auswertung

Ausgewertet wurde der C_T -Wert (*Cycle Threshold*). Dieser beschreibt die Zykluszahl bei der sich das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant vom Hintergrundwert abhebt. Um die Kopienzahl für das RNA-Genom in der unverdünnten oder verdünnten Probe zu bestimmen, wurde der C_T -Wert mit dem korrespondierenden C_T -Wert auf einer Standardkurve abgeglichen.

2.8.6 Plasmidamplifikation

Zur Amplifikation der Plasmide wurden *JM109 E.Coli competent cells* verwendet. Die Arbeitsschritte erfolgten mit gestopften Pipettenspitzen, um eine Kontamination der Plasmide durch Fremd-DNA zu vermeiden. Im ersten Schritt wurden die Plasmide mittels Hitzeschocktransformation in die Bakterien eingebracht. Dies erfolgte durch das gemeinsame Erhitzen von 400 ng des gewünschten Plasmids und 50 µl *E.Coli* für 50 Sekunden bei 42 °C in einem Falconröhrchen. Zur Steigerung der Transformationseffizienz wurden 950 µl S.O.C Nährlösung hinzugefügt und die Mischung 90 Minuten bei 37 °C, 21 % O₂, 5 % CO₂, 74 % N₂ mit 225 rpm auf einer Platte im Inkubator gerüttelt. Anschließend wurde die Mischung mit einer Tischzentrifuge herunterzentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden unter Verwendung der Sicherheitswerkbank die nun Plasmid-enthaltenden Bakterien auf eine Agarplatte ausgesät und mittels Streichbügel verteilt. Die Agarplatte enthielt ein Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) gegen die das gewünschte Plasmid eine Resistenz besaß. Somit wurde gewährleistet, dass nur Bakterienkolonien, welche das gewünschte Plasmid enthielten, kultiviert wurden. Zur Kultivierung wurden die Agarplatten über Nacht in einem Wärmeschrank bei 37 °C, 21 % O₂, 5 % CO₂, 74 % N₂ und 90-95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde eine Kolonie mit Hilfe einer Pipettenspitze aufgenommen und in einen Glaskolben mit 100 ml S.O.C Nährlösung pipettiert. Es folgte eine erneute Inkubation (37 °C, 21 % O₂, 5 % CO₂, 74 % N₂ und 90-95 % Luftfeuchtigkeit) über Nacht auf einem Rüttler mit 250 rpm. Anschließend wurden die Plasmide mit dem *EndoFree Plasmid Maxi Kit* gemäß Herstellerprotokoll aufgereinigt. Nach Isolation wurden die Plasmide auf Eis gelagert und eine Konzentrationsbestimmung mithilfe eines Spektrophotometers durchgeführt. Die Plasmide wurden dann bei -20 °C gelagert. Für die dauerhafte Lagerung der Bakterienkultur bei -20 °C wurde eine Glycerol-Stocklösung angesetzt. Dazu wurden 500 µl der angesetzten Bakterienkultur unter sterilen Bedingungen mit 500 µl Glycerol (Glycerin 85 %) in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gemischt.

2.9 FRET-Messung unter dem Fluoreszenzmikroskopie

2.9.1 Messung des Energietransfers

Zur Messung des Energietransfers zwischen den Fluorophoren stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde die Methode der *Sensitized Emission* genutzt, welche zu den Bekanntesten gehört (Ishikawa-Ankerhold et al. 2012). Bei dieser Methode wird nur der Donor angeregt, der dann seine Energie auf den Akzeptor überträgt. Findet ein Energietransfer statt, kommt es zu einer Zunahme der Intensität der Fluoreszenzemission des Akzeptors, während die Intensität der Fluoreszenzemission des Donors abnimmt. Mit den gemessenen Werten kann entweder ein FRET-Index oder die Energietransfer-Effizienz (FRET-Effizienz) berechnet werden (Berney et al. 2003). In dieser Arbeit wurden die FRET-Messungen mit dem FRET *Sensitized Emission Wizard* aus der *Application Suite Advanced Fluorescence Software* von Leica durchgeführt und als FRET-Effizienz berechnet. Diese ist definiert als der vom Donor absorbierte Anteil der Photonenenergie, welcher auf den Akzeptor transferiert wird. Die optimale FRET-Effizienz ist abhängig von der Distanz zwischen Donor und Akzeptor (Berney et al. 2003, Pietraszewska-Bogiel et al. 2011). Die Bindung von ATP führt zu einer Konformationsänderung und Annäherung der Fluorophore, was FRET optimiert. Der konsekutive Anstieg oder Abfall der FRET-Effizienz wurde in dieser Arbeit als Indikator (ATP-Sensor) für lokale ATP-Veränderungen verwendet.

Die Messung unter dem Mikroskop erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C und konstanter Gaszufuhr (21 % O₂, 5 % CO₂, 74 % N₂) über ein Gasmischgerät. Zu Beginn wurden die Einstellungen für Donor-, FRET- und Akzeptor-Signal am Konfokalmikroskop festgelegt: Der Donor – *Cyan*-Fluoreszenzprotein (CFP) – wurde mit einer Wellenlänge von 458 nm angeregt und für die Emission ein Spektrum vom 465-490 nm eingestellt. Für das FRET-Signal wurde ein Emissionsspektrum von 525-535 nm festgelegt. Der Akzeptor – *Yellow*-Fluoreszenzprotein (YFP) – wurde mit einer Wellenlänge von 514 nm angeregt. Das Emissionsspektrum wurde im selben Bereich wie das FRET-Signal eingestellt. Je Anregung wurden drei Bildkanäle erzeugt, deren Informationen von der Software gleichzeitig gesammelt wurden. Mittels des Softwareprogrammes wurde der Donor in Cyan, das FRET-Signal in Gelb und der Akzeptor in Rot dargestellt.

Bevor die eigentlichen Messung erfolgen konnten, mussten Korrekturfaktoren (β und γ) erhoben werden, um Störquellen wie *Crosstalk* zu reduzieren. Für die Errechnung der

Korrekturfaktoren mussten separate Proben von Donor und Akzeptor unter dem Konfokalmikroskop angeregt werden. Die Donorprobe wurde mit den oben beschriebenen Einstellungen für den Donor angeregt und die Fluoreszenzintensitäten in den drei Bildkanälen gemessen. Daraus ließ sich der Korrekturfaktor β berechnen, dieser korrigiert für Donor *Bleed-through*. Der Korrekturfaktor γ , welcher für die Akzeptor *Cross-excitation* korrigiert, wurde durch die Anregung des Akzeptors mit den Einstellungen für die Anregung des Donors und Messung der Fluoreszenzintensitäten in alle der Bildkanälen berechnet. Diese wurden dann von der Software bei Berechnung der Messwerte berücksichtigt. Für eine genauere Beschreibung der Korrekturfaktoren siehe Diskussion.

$$\beta = \frac{B}{A} \quad \gamma = \frac{B}{C}$$

Formel 1: Korrekturfaktoren

A: Donor-Signal, B: FRET-Signal, C: Akzeptor-Signal

Die Berechnung der korrigierten FRET-Effizienz erfolgte mit der Methode 1 aus dem *Confocal Application Letter* (2009) von Leica.

$$E_A = \frac{B - A \times \beta - C \times \gamma}{C}$$

Formel 2: Berechnung der FRET-Effizienz (Wouters et al. 2001)

E_A : FRET-Effizienz, A: Donor-Signal, B: FRET-Signal, C: Akzeptor-Signal, β : Korrekturfaktor *Bleed-through*, γ : Korrekturfaktor *Cross-excitation*

Zur Messung der FRET-Effizienz wurde in der Sensor-enthaltenden Probe eine passende Zelle ausgewählt und eine *region of interest* (ROI) eingezeichnet. Die ROI markierte den Bereich der Messung. Für die Hintergrundkorrektur wurde auch jeweils ein ROI in einem Bereich ohne FRET-Signal eingezeichnet.

Die FRET-Effizienz wurde von der Software berechnet und ließ somit Rückschlüsse auf Veränderungen der ATP-Spiegel innerhalb der gemessenen Areale zu (Imamura et al. 2009).

2.9.2 Versuche der ATP-Sensoren mit Oligomycin A

Zur Validierung der ATP-Sensoren wurde die mitochondriale ATP-Produktion mittels Oligomycin A gehemmt und die Signale der ATP-Sensoren in HEK 293T Zellen untersucht. Die mit dem ATP-Sensor transfizierten HEK 293T Zellen wurden am Versuchsvortag in 500 μl Zellkulturmedium DMEM-Galaktose überführt. Glukose-freies, Galaktose-haltiges Zellkulturmedium wurde gewählt, da dieses in der anaeroben Glykolyse zu einer verminderten glykolytischen ATP-Produktion im Vergleich zur Glukoseverstoffwechslung beiträgt, und die Zelle somit verstärkt auf die mitochondriale ATP-Produktion angewiesen ist (Rossignol et al. 2004). Somit kann durch die Hinzugabe von Oligomycin A die mitochondriale ATP-Produktion mit einem geringeren kompensatorischen Anstieg der glykolytischen ATP-Produktion inhibiert werden. Am Versuchstag wurden eine Oligomycin A-Lösung (0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in DMEM-Galaktose) und eine Kontrolllösung (Methanol 0,025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in DMEM-Galaktose, welches als Lösungsmittel für Oligomycin A diente) hergestellt und auf 37 °C angewärmt. Die HEK 293T Zellen wurden in 8-well Platten unter das Konfokalmikroskop gestellt. Messwerte wurden unter unstimulierten Bedingungen und nach Ersetzen von 100 μl Zellkulturmedium DMEM-Galaktose mit Oligomycin A (Endkonzentration 0,002 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 0,005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Methanol als Lösungsmittel) bzw. Kontrolllösung (äquimolares Lösungsmittel) aufgenommen. Nach einer Äquibilibierungszeit von 5 Minuten erfolgte eine erste Bildaufnahme (Zeitpunkt 0), drauffolgend wurde sofort Oligomycin A oder die Kontrolllösung hinzugefügt. Weitere Bildaufnahmen erfolgten alle 5 Minuten. Eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs ist in Abb. 8 dargestellt.

Oligomycin A/Kontrolllösung

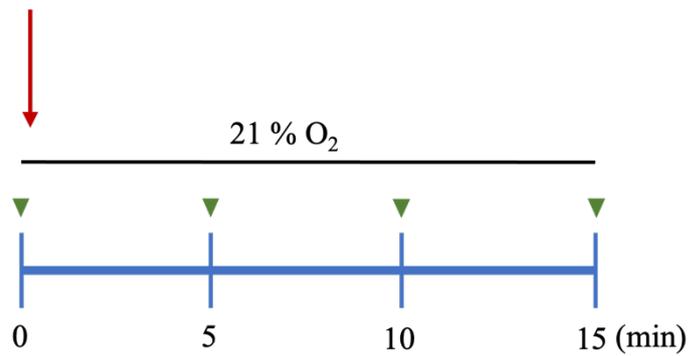


Abbildung 8: Versuchsablauf der Oligomycin A-Versuche

Nach einer Äquiblierungszeit von 5 Minuten (nicht dargestellt) wurde nach der ersten Bildaufnahme zum Zeitpunkt 0 sofort 100 μl des Galaktose-haltigen Zellkulturmedium durch entweder 100 μl Oligomycin A (Endkonzentration 0,002 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) oder 100 μl Kontrolllösung (äquimolares Lösungsmittel) ersetzt. Bilder wurden alle 5 Minuten über den Zeitraum von 15 Minuten von den vorab ausgewählten Zellen aufgenommen (grüne Dreiecke).

2.9.3 Etablierung hypoxischer Messbedingungen unter dem Konfokalmikroskop

Die Zellkulturschale wurde, nur mit 500 µl Zellkulturmedium gefüllt, unter das Mikroskop gestellt. Das Mikroskop war in eine Box (*the box*) aus Plexiglas (siehe Bild A in Abb. 9) eingebettet. *The box* war an eine Heizeinheit (blauer Kasten, *the cube*) angeschlossen, die für eine konstante Umgebungstemperatur von 37 °C sorgte. Die aufgewärmte Luft wurde über Heizschläuche in *the box* eingeleitet. Über die Zellkulturschale auf dem Mikroskopiertisch wurde ein Vorrichtung gestetzt, welche als Halterung für zwei an der Seite angebrachte Gasschläuche (siehe Bild B in Abb. 9) diente. Über diese beiden Schläuche erfolgte die Gaszufuhr ausgehend von einer roten Steuereinheit (*the brick*) (siehe Bild A in Abb. 9), welche die umgebende Gasphase des Zellkulturmediums steuerte. Die pO₂-Sonde (Licox) wurde in das Zellkulturmedium gelegt (nicht dargestellt). Ein am Mikroskop befestigter Plexiglasdeckel (siehe Bild B in Abb. 9) dichtete die Zellkulturschale nach oben hin ab. Nach 8 Minuten Äquilibration unter normoxischen Bedingungen (21 % O₂, 5 % CO₂, 74 % N₂) erfolgte die Umschaltung der Gaszufuhr auf hypoxische Bedingungen (1 % O₂, 5 % CO₂, 94 % N₂). Der pO₂-Wert im Zellkulturmedium wurde jede Minute dokumentiert. Nach 30 Minuten wurde zurück auf normoxische Bedingungen geschaltet und die Messwerte weitere 10 Minuten dokumentiert. Diese Messreihe wurde jeweils mit einem Gasfluss von 20 l/h, 30 l/h und 40 l/h durchgeführt.

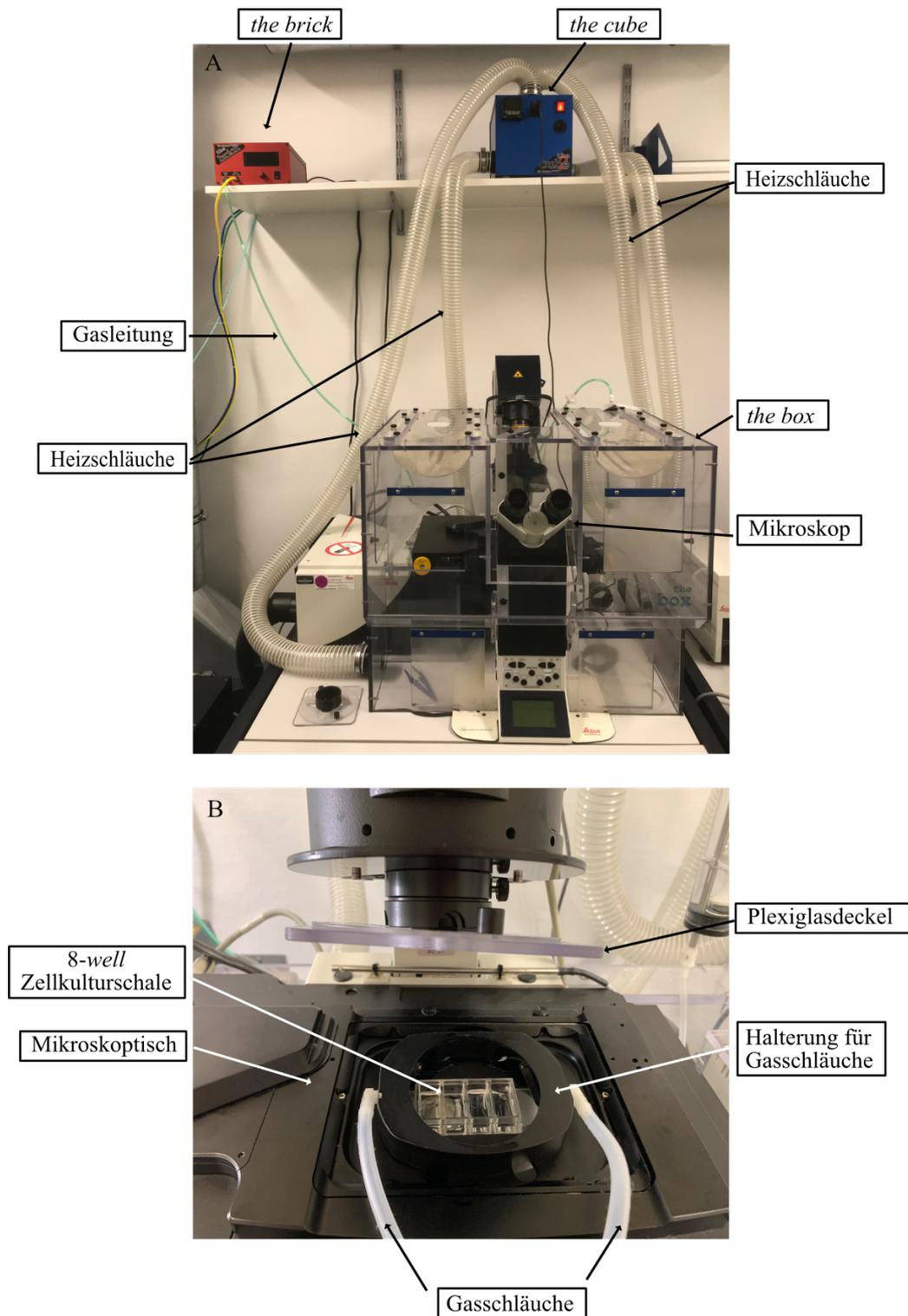


Abbildung 9: Ansicht auf Zellkammer und Aussenbox Konfokalmikroskop

(A): Konfokalmikroskop von einer Plexiglasbox (*the box*) umgeben. Auf dem oberen Regal sind die Steuereinheit für die Gaszufuhr (*the brick*) und das Heizelement (*the cube*) zu sehen. (B): Aufsicht auf den Mikroskoptisch mit 8-well Zellkulturschale, Halterung mit den zuführenden Gasschläuchen und einem Plexiglasdeckel, der nach unten geklappt wurde, um die Zellkulturschale abzudichten.

2.9.4 ATP-Messung unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

Die mit dem ATP-Sensor transfizierten Zellen wurden unter dem Mikroskop plaziert. Folgend wurden Zellen zur Messung ausgewählt, die gut im Fokus lagen und ein nicht-übersättigtes Fluoreszenzsignal zeigten. Nach einer ersten Kontrollaufnahme zu Versuchsbeginn wurde anschließend alle 5 Minuten eine weitere Bildaufnahme durchgeführt. Zur Quantifizierung des Effektes der Hypoxie wurden in den entsprechenden Experimenten nach 5 Minuten initialer Normoxie (21 % O₂, 5 % CO₂, 74 % N₂, 30 l/h Gasfluss) die Gaszufuhr auf hypoxische Bedingungen (1 % O₂, 5 % CO₂, 94 % N₂) eingestellt und nach 20 Minuten zurück auf normoxische Bedingungen (21 % O₂, 5 % CO₂, 74 % N₂) gesetzt. Bei den Kontrollversuchen wurden die Zellen über die gesamte Versuchsdauer von 30 Minuten unter normoxischen Bedingungen (21 % O₂, 5 % CO₂, 74 % N₂) belassen. Die Gaszufuhr erfolgte stets mit einem Fluss von 30 l/h. Die Versuche wurden mit Glukosehaltigem und Galaktosehaltigem Zellkulturmedium durchführt. Eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs ist in Abb. 10 zusehen.

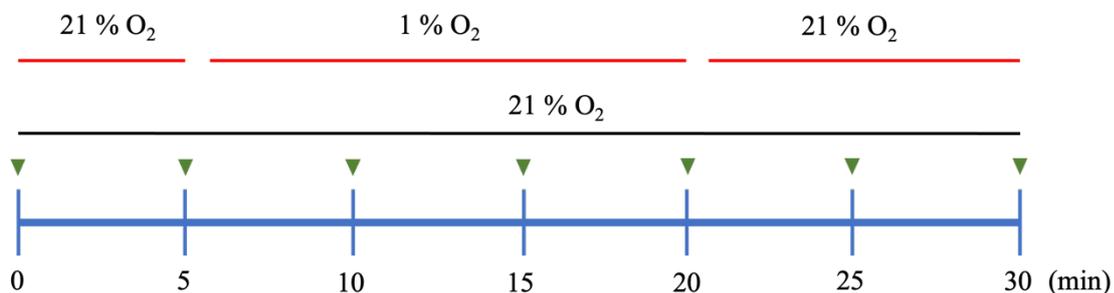


Abbildung 10: Versuchsablauf Normoxie/Hypoxie Versuche

Nach einer Äquiblierung von 5 Minuten unter normoxischen Bedingungen (21 % O₂, 5 % CO₂, 74 % N₂) wurde in den Hypoxie-Experimenten (rote Linien) die Gaszufuhr auf hypoxische Bedingungen (1 % O₂, 5 % CO₂, 94 % N₂) umgestellt und ab 20 Minuten wieder zurück auf Normoxie gestellt. Während der Normoxie-Experimente (schwarze Linie) befanden sich die Gaszufuhr konstant auf 21 % O₂, 5 % CO₂, 74 % N₂. Die Gaszufuhr erfolgte mit einem Fluss von 30 l/h. Bildaufnahme alle 5 Minuten (grüne Dreiecke).

2.10 Statistik

Die statistische Auswertung und Graphen dieser Arbeit wurden mit der Software *Graph-Pad Prism 8/9* erstellt. Die Daten wurden auf den ersten Messwert normalisiert und als Mittelwerte mit Standardabweichung (*standard deviation* - SD) dargestellt. Als n-Zahl für die statistische Auswertung wurde die Anzahl der einzelnen unabhängigen Versuche verwendet. Für einen Versuch wurde der Mittelwert aus den gemessenen Zellen ausgewertet. Die Anzahl der gemessenen Zellen variierte in den einzelnen Versuchen mit Oligomycin A/Kontrolllösung zwischen 6 und 32 Zellen. Für die Normoxie/Hypoxie Versuche variierte die Zellzahl in den einzelnen Versuchen zwischen 3 und 18 Zellen. Die Schwankung in der Anzahl der Zellen ist auf unterschiedliches Wachstum in den Zellkulturschalen und der Variation in der Transduktionseffizienz zurückzuführen. Beim Vorhandensein von einer abhängigen Variablen (z.B. FRET-Effizienz) und zwei unabhängigen Variablen (z.B. O₂-Konzentration und Zeit) wurde die *two-way* ANOVA verwendet. Hierbei wurde das *post-hoc* Testverfahren nach Bonferroni genutzt. Die Ergebnisse des *post-hoc* Testverfahren wurden im Diagramm dargestellt. Die Haupteffekte der *two-way* ANOVA wurden in der Abbildungsbeschreibung beschrieben.

3 Ergebnisse

3.1 Expression *Cyto-/MitoATeam* in HEK 293T

In Abb. 11 werden exemplarisch *CytoATeam/MitoATeam* exprimierende HEK 293T Zellen gezeigt. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder zeigten eine erfolgreiche Expression der ATP-Sensoren *CytoATeam* und *MitoATeam* in HEK 293T Zellen mittels des gewählten Transfektionsprotokolls. Abb. 12 zeigt die Expression von *MitoATeam* und exemplarisch die unterschiedlichen Bildkanäle unter dem Konfokalmikroskop.

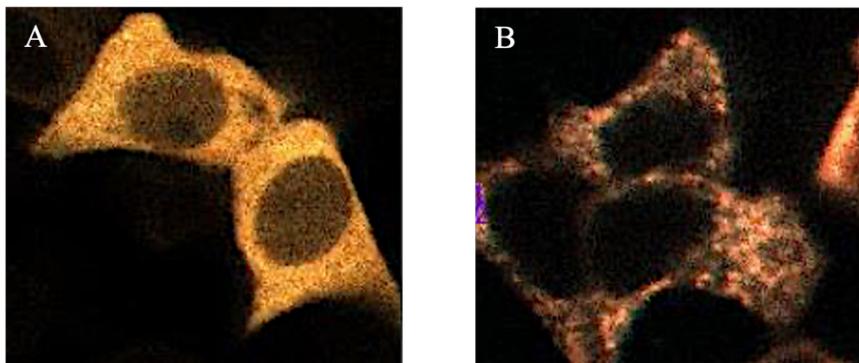


Abbildung 11: ATP-Sensor unter dem Konfokalmikroskop

Exemplarische Darstellung des integrierten ATP-Sensors unter dem Konfokalmikroskop mit zytoplasmatischem oder mitochondrialem Verteilungsmuster in HEK 293T Zellen. Für diese Untersuchung erfolgte eine einfache Anregung des Donors. Die Anregungswellenlänge betrug 458 nm und das Emissionsspektrum 465-490 nm. (A): *CytoATeam*: zytoplasmatische Verteilung des Sensors (B): *MitoATeam*: mitochondriale Verteilung des Sensors

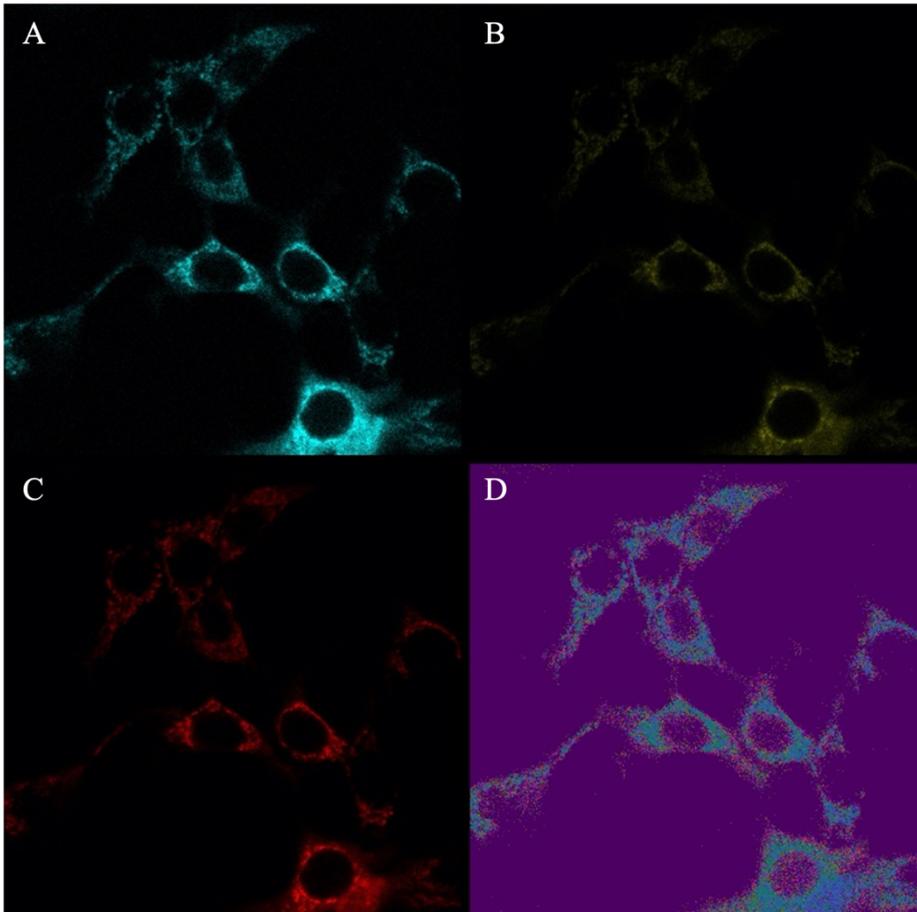


Abbildung 12: *MitoATeam* unter dem Konfokalmikroskop

HEK 293T Zellen mit integriertem *MitoATeam* unter dem Konfokalmikroskop. Darstellung der unterschiedlichen Kanäle. (A): Donor, (B): FRET, (C): Akzeptor, (D): Von der Software erzeugtes Bild durch Fusion aller Bildkanäle. Anregungswellenlänge des Donors: 458 nm, Emissionsspektrum des Donors: 465-490 nm. Anregungswellenlänge des Akzeptors: 514 nm, Emissionsspektrum des Akzeptors: 525-535 nm.

3.2 Etablierung der ATP-Sensormessung mittels Oligomycin A

Um die Funktion der ATP-Sensoren zu überprüfen, wurde in HEK 293T Zellen die Veränderung der FRET-Effizienz nach Inhibierung der mitochondrialen ATPase mittels Oligomycin A getestet. Die Zellen wurden 12 h vor Versuchsbeginn in Galaktose-haltigem Zellkulturmedium kultiviert, um den Einfluss der Glykolyse auf die zellulären ATP-Spiegel gering zu halten. Die Experimente mit *CytoATeam* zeigten 5 Minuten nach Hinzugabe von Oligomycin A eine signifikante Reduktion der FRET-Effizienz im Zytoplasma und im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abb. 13).

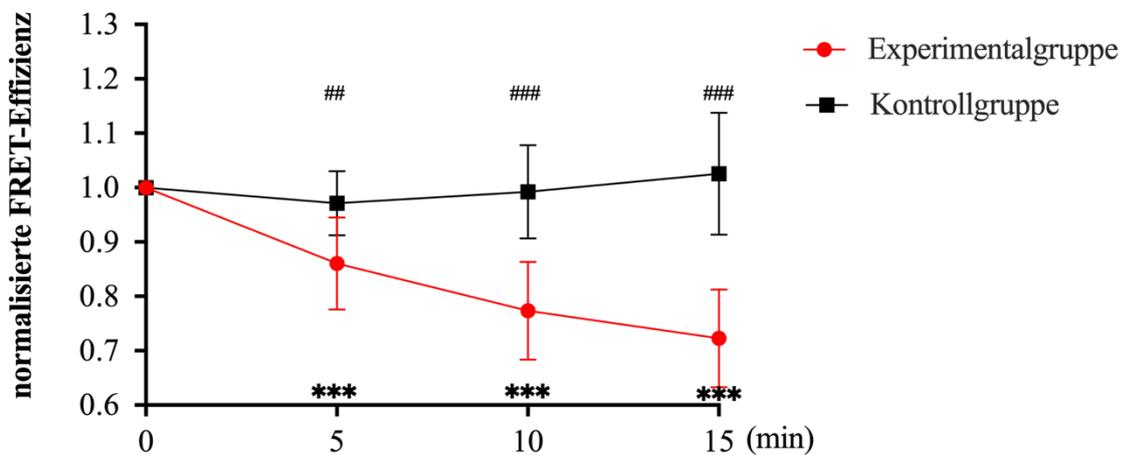


Abbildung 13: Effekt von Oligomycin A auf die FRET-Effizienz von *CytoATeam*

Zum Zeitpunkt 0 wurden 100 μ l Zellkulturmedium entweder durch 100 μ l Oligomycin A (Endkonzentration: 0,002 μ g/ μ l ; Experimentalgruppe) oder 100 μ l Kontrolllösung (äquimolares Lösungsmittel ; Kontrollgruppe) ersetzt. Die FRET-Effizienz wurde auf den Zeitpunkt vor Oligomycin A Gabe normalisiert. n=11 unabhängige Versuche in der Kontrollgruppe und n=12 unabhängige Versuche in der Experimentalgruppe. *** (p = 0,0004), Vergleich der entsprechenden Zeitpunkte mit dem Zeitpunkt 0 in der Experimentalgruppe. ## (p = 0,0065), ### (p < 0,0001), Vergleich der einzelnen Zeitpunkte zwischen der Experimentalgruppe und der Kontrollgruppe. Haupteffekt: Behandlung p < 0,0001, Haupteffekt: Zeit p < 0,0001, Haupteffekt: Interaktion p < 0,0001 ; Statistischer Test: *two-way* ANOVA mit Bonferroni *post-hoc* Test.

Dagegen zeigte sich in der Messung mit *MitoATeam* kein statistisch signifikanter Unterschied in der FRET-Effizienz, weder über die Zeit noch im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abb. 14).

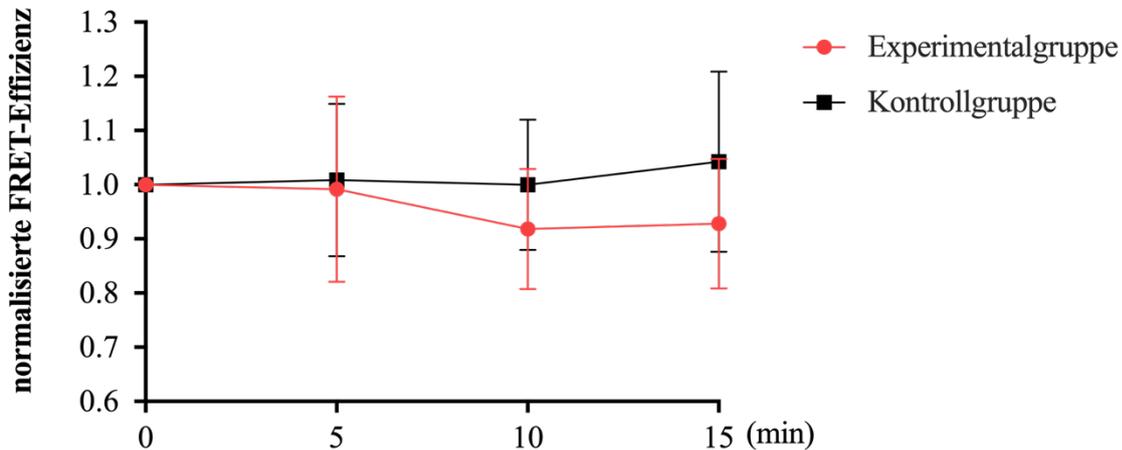


Abbildung 14: Effekt von Oligomycin A auf die FRET-Effizienz von *MitoATeam*

Zum Zeitpunkt 0 wurden 100 μl Zellkulturmedium entweder durch 100 μl Oligomycin A (Endkonzentration: 0,002 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Experimentalgruppe) oder 100 μl Kontrolllösung (äquimolares Lösungsmittel ; Kontrollgruppe) ersetzt. Die FRET-Effizienz wurde auf den Zeitpunkt vor Oligomycin A Gabe normalisiert. $n=5$ unabhängige Versuche in der Kontrollgruppe und $n=6$ unabhängige Versuche in der Experimentalgruppe. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte mit dem Zeitpunkt 0 und im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte zwischen der Experimentalgruppe und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Statistischer Test: *two-way* ANOVA mit Bonferroni *post-hoc* Test.

3.3 Etablierung hypoxischer Konditionen unter dem Konfokalmikroskop

Um hypoxische Bedingungen im Zellkulturmedium zu induzieren, wurden drei unterschiedliche Einstellung des Gasflusses pro Stunde in einer geschlossenen Kammer, die zur Messung im Konfokalmikroskop verwendet wird, getestet. Bei einem Gasfluss von 20 l/h wurden pO_2 -Werte bis zu einem Minimum von 25 mmHg im Zellkulturmedium gemessen. Für die Flüsse 30 l/h und 40 l/h wurde innerhalb von 3,5 Minuten ein Abfall der pO_2 -Werte auf unter 20 mmHg im Zellkulturmedium gemessen (siehe Abb. 15). Bei einem Umgebungsluftdruck von ca. 760 mmHg entsprechen die pO_2 -Werte von 20 mmHg einem prozentualen O_2 -Wert von ca. 2 % O_2 in der Raumluft. Um die Schubspannung auf die Zellen möglichst gering zu halten, wurde für die folgenden normoxischen und hypoxischen Versuche ein Fluss von 30 l/h gewählt.

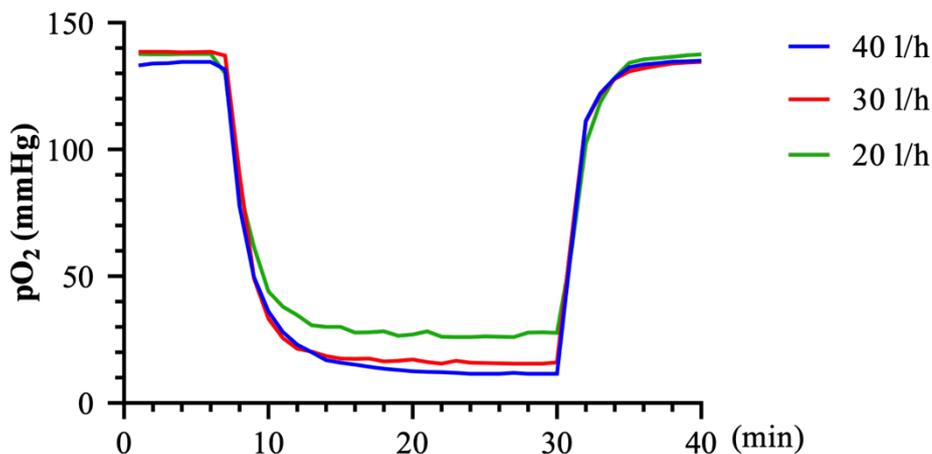


Abbildung 15: Effekt von hypoxischem Gasfluss auf den pO_2 in Zellkulturmedium unter dem Konfokalmikroskop

Nach 8 Minuten Äquibillierung in Normoxie (21 % O_2 , 5 % CO_2 , 74 % N_2) wurde die Gaszufuhr auf Hypoxie (1 % , 5 % CO_2 , 94 % N_2) verändert. Ab der 30. Minute wurde die Gaszufuhr wieder auf Normoxie gesetzt. Der pO_2 in mmHg wurde jede Minute dokumentiert.

3.4 ATP-Messung in HEK 293T Zellen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

Ziel dieses Experimentes war es die Veränderungen von ATP im Zytoplasma und der mitochondrialen Matrix unter hypoxischen Bedingungen (1-6 % O₂, 5 % CO₂, 94 % N₂) zu messen. Zum Vergleich wurde die FRET-Effizienz in einem Kontrollsample unter normoxischen Bedingungen (21 % O₂, 5 % CO₂, 74 % N₂) im Zeitverlauf gemessen.

Die Experimente für *CytoATeam* in Glukose-haltigem Zellkulturmedium zeigten in der Kontrollgruppe nach 15 Minuten Normoxie eine abfallende Tendenz der FRET-Effizienz, welche danach aber stabil blieb. In der Experimentalgruppe zeigten sich über den gesamten Zeitraum eine stabile FRET-Effizienz. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen oder innerhalb einer Gruppe über den Messzeitraum festgestellt werden (siehe Abb. 16).

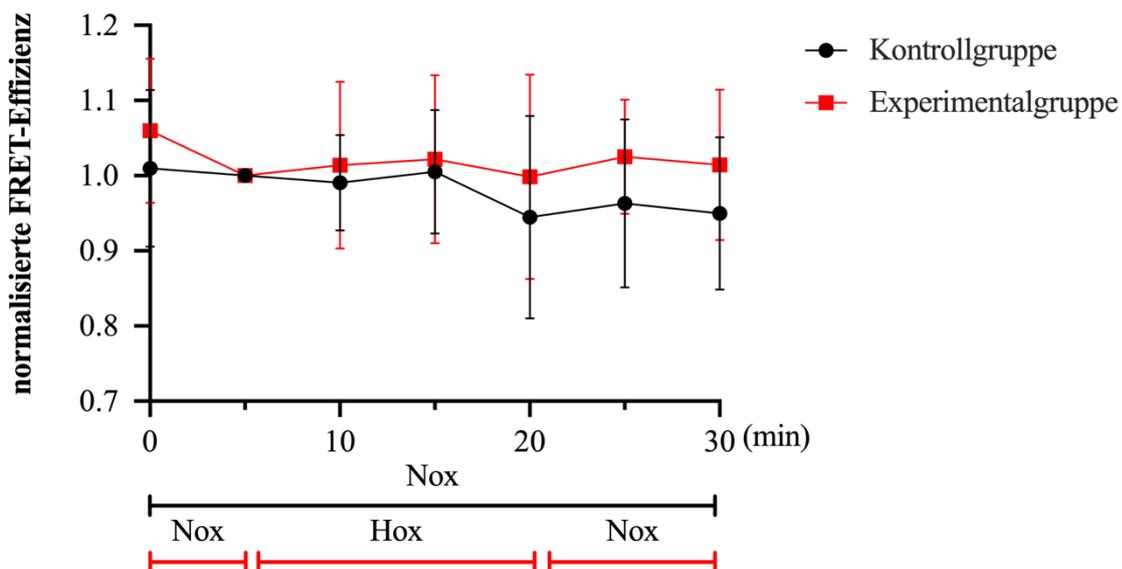


Abbildung 16: Effekte von Normoxie/Hypoxie auf die FRET-Effizienz von *CytoATeam* in HEK 293T in Glukose-haltigem Zellkulturmedium

Nach 5 Minuten Äquilibration in Normoxie (21% O₂, 5 % CO₂, 74 % N₂) wurde in der Experimentalgruppe die Gaszufuhr auf Hypoxie (1 % O₂, 5 % CO₂, 94 % N₂) herabgesetzt. Ab der 21. Minute wurde die Gaszufuhr wieder auf Normoxie gesetzt. Die Kontrollgruppe blieb die gesamten 30 Minuten unter stabilen normoxischen Verhältnissen. Die FRET-Effizienz wurde auf den

Zeitpunkt 5 Minuten normalisiert. n= 4 unabhängige Versuche in der Kontrollgruppe und n= 6 unabhängige Versuche in der Experimentalgruppe. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte mit dem Zeitpunkt 0 und im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte zwischen der Experimentalgruppe und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Statistischer Test: *two-way* ANOVA mit Bonferroni *post-hoc* Test. Nox: Normoxie, Hox: Hypoxie.

Unter Inhibition der Glykolyse, durch den Ersatz von Glukose-haltigem mit Galaktose-haltigem Zellkulturmedium, zeigte sich in den Experimenten mit *CytoATeam* zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der FRET-Effizienz im Vergleich zwischen der Kontrollgruppe unter Normoxie und der Experimentalgruppe unter Hypoxie. Auch im zeitlichen Verlauf zeigte sich kein signifikanter Unterschied für eine der Gruppen (siehe Abb. 17).

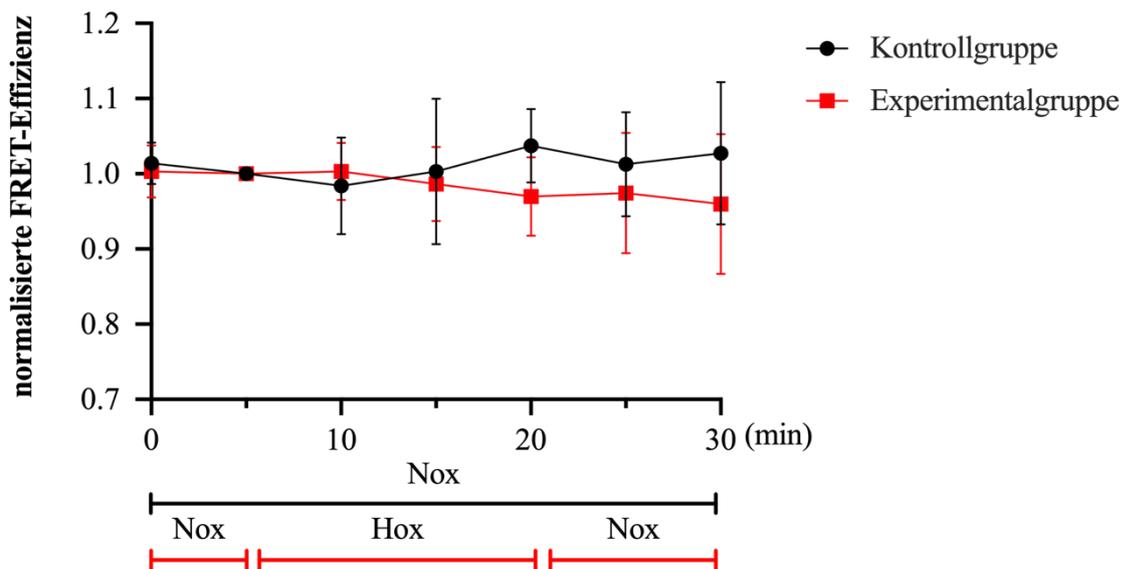


Abbildung 17: Effekte von Normoxie/Hypoxie auf auf die FRET-Effizienz von *CytoATeam* in HEK 293T in Galaktose-haltigem Zellkulturmedium

Nach 5 Minuten Äquilibration in Normoxie (21% O₂, 5 % CO₂, 74 % N₂) wurde in der Experimentalgruppe die Gaszufuhr auf Hypoxie (1 % O₂, 5 % CO₂, 94 % N₂) herabgesetzt. Ab der 21. Minute wurde die Gaszufuhr wieder auf Normoxie gesetzt. Die Kontrollgruppe blieb die gesamten 30 Minuten unter stabilen normoxischen Verhältnissen. Die FRET-Effizienz wurde auf den Zeitpunkt 5 Minuten normalisiert. n= 5 unabhängige Versuche in der Kontrollgruppe und n= 7 unabhängige Versuche in der Experimentalgruppe. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte mit dem Zeitpunkt 0 und im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte zwischen der Experimentalgruppe und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Statistischer Test: *two-way* ANOVA mit Bonferroni *post-hoc* Test. Nox: Normoxie, Hox: Hypoxie

In den *MitoATeam* Experimenten mit Glukose-haltigem Zellkulturmedium war kein signifikanter Unterschied in der FRET-Effizienz von der Kontrollgruppe unter Normoxie zu der Experimentalgruppe unter Hypoxie detektierbar. Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied im zeitlichen Verlauf, sowohl in der Experimentalgruppe als auch der Kontrollgruppe (siehe Abb. 18).

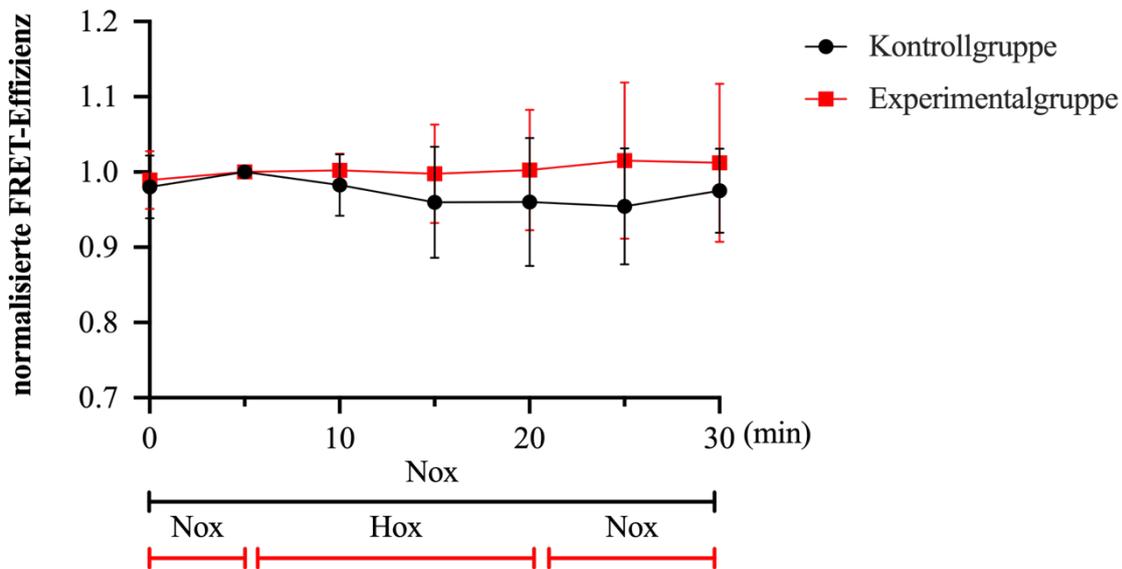


Abbildung 18: Effekte von Normoxie/Hypoxie auf auf die FRET-Effizienz von *MitoATeam* in HEK 293T in Glukose-haltigem Zellkulturmedium

Nach 5 Minuten Äquilibration in Normoxie (21% O₂, 5 % CO₂, 74 % N₂) wurde in der Experimentalgruppe die Gaszufuhr auf Hypoxie (1 % O₂, 5 % CO₂, 94 % N₂) herabgesetzt. Ab der 21. Minute wurde die Gaszufuhr wieder auf Normoxie gesetzt. Die Kontrollgruppe blieb die gesamten 30 Minuten unter stabilen normoxischen Verhältnissen. Die FRET-Effizienz wurde auf den Zeitpunkt 5 Minuten normalisiert. n= 8 unabhängige Versuche in der Kontrollgruppe und n= 7 unabhängige Versuche in der Experimentalgruppe. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte mit dem Zeitpunkt 0 und im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte zwischen der Experimentalgruppe und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Statistischer Test: *two-way* ANOVA mit Bonferroni *post-hoc* Test. Nox: Normoxie, Hox: Hypoxie

Unter Inhibition der Glykolyse, durch den Ersatz von Glukose- mit Galaktose-haltigem Zellkulturmedium, zeigte sich in den Experimenten mit *MitoATeam* kein signifikanter Unterschied in der FRET-Effizienz zwischen der Kontroll- und der Experimentalgruppe. Über den zeitlichen Verlauf des Experimentes ließ sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede innerhalb einer Gruppe feststellen (siehe Abb. 19).

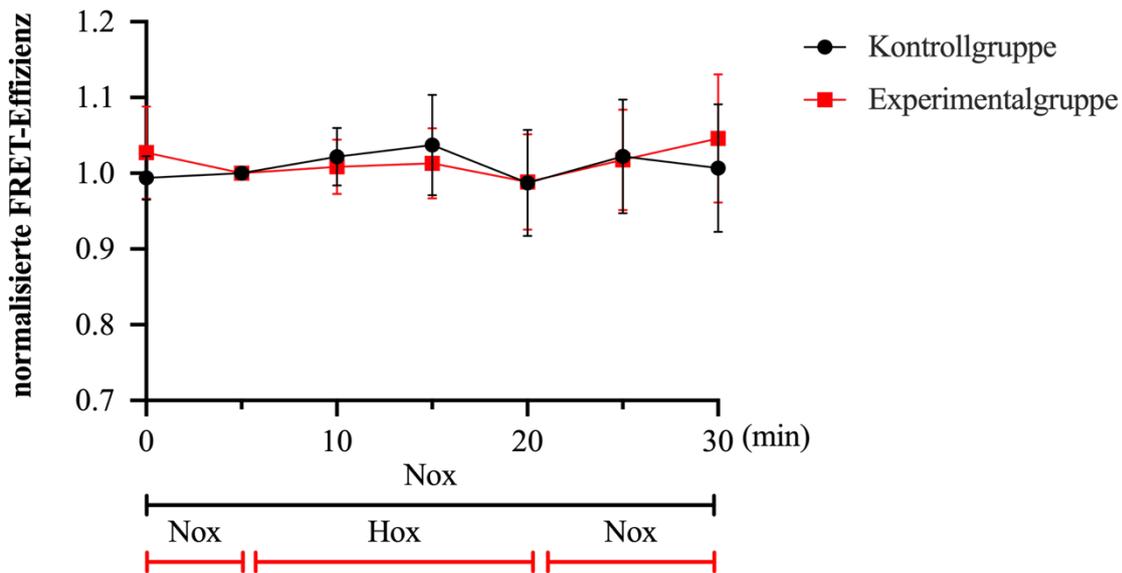


Abbildung 19: Effekte von Normoxie/Hypoxie auf die FRET-Effizienz von *MitoATeam* in HEK 293T in Galaktose-haltigem Zellkulturmedium

Nach 5 Minuten Äquilibration in Normoxie (21% O₂, 5 % CO₂, 74 % N₂) wurde in der Experimentalgruppe die Gaszufuhr auf Hypoxie (1 % O₂, 5 % CO₂, 94 % N₂) herabgesetzt. Ab der 21. Minute wurde die Gaszufuhr wieder auf Normoxie gesetzt. Die Kontrollgruppe blieb die gesamten 30 Minuten unter stabilen normoxischen Verhältnissen. Die FRET-Effizienz wurde auf den Zeitpunkt 5 Minuten normalisiert. n= 8 unabhängige Versuche in der Kontrollgruppe und n= 7 unabhängige Versuche in der Experimentalgruppe. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte mit dem Zeitpunkt 0 und im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte zwischen der Experimentalgruppe und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Statistischer Test: *two-way* ANOVA mit Bonferroni *post-hoc* Test. Nox: Normoxie, Hox: Hypoxie

3.5 Transduktion von mPASCs

Die Kontrolle der Transduktion erfolgte nach Tagen und wurde mittels Konfokalmikroskopie durchgeführt. Abb. 20 zeigt exemplarische die Darstellung von *CytoATeam* in mPASCs unter dem Konfokalmikroskop.

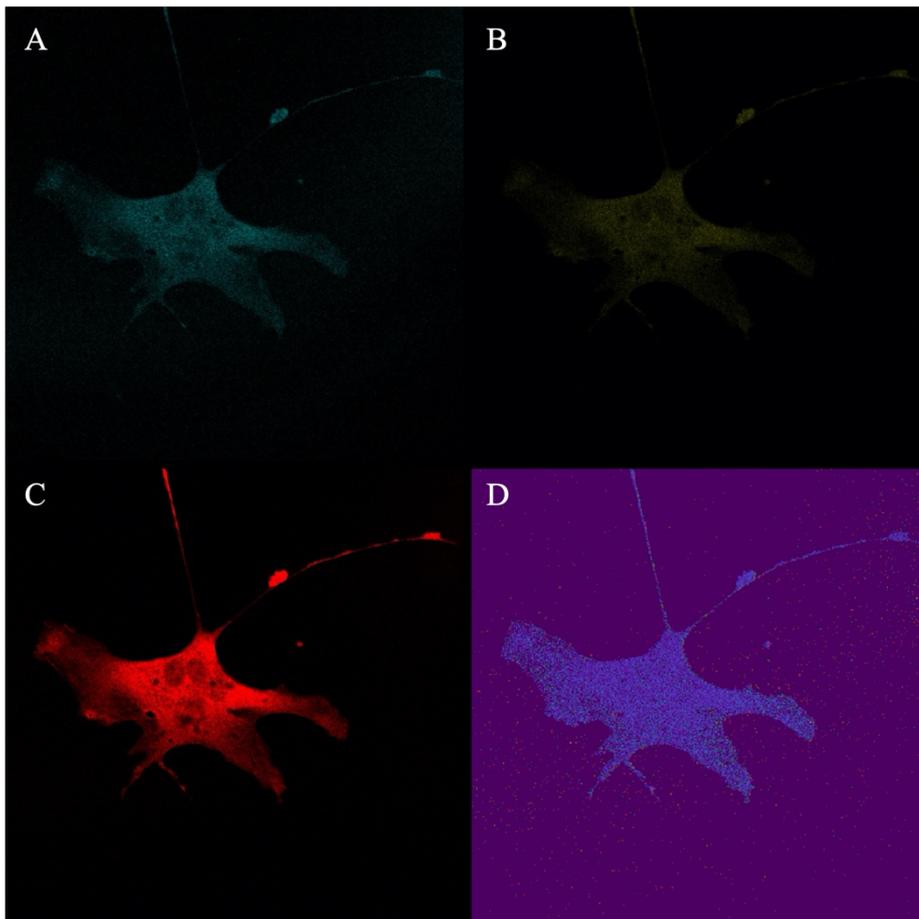


Abbildung 20: mPASCs mit integriertem *CytoATeam* unter dem Konfokalmikroskop

Darstellung von mPASCs mit integriertem *CytoATeam* unter dem Konfokalmikroskop mit Aufteilung in die unterschiedlichen Kanäle. (A): Donor, (B): FRET, (C): Akzeptor, (D): Von der Software erzeugtes Bild durch Fusion aller Bildkanäle. Anregungswellenlänge des Donors: 458 nm, Emissionsspektrum des Donors: 465-490 nm. Anregungswellenlänge des Akzeptors: 514 nm, Emissionsspektrum des Akzeptors: 525-535 nm.

3.6 ATP-Messung in mPASCs unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

Aufgrund der Vorergebnisse in den HEK 293T Zellen wurde in mPASCs auf den *CytoATeam* Sensor fokussiert. Zur höheren zeitlichen Auflösung erfolgte eine Messaufnahme alle 2,5 Minuten. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der FRET-Effizienz im Zeitverlauf oder zwischen der Kontroll- und Experimentalgruppe detektiert werden (siehe Abb. 21).

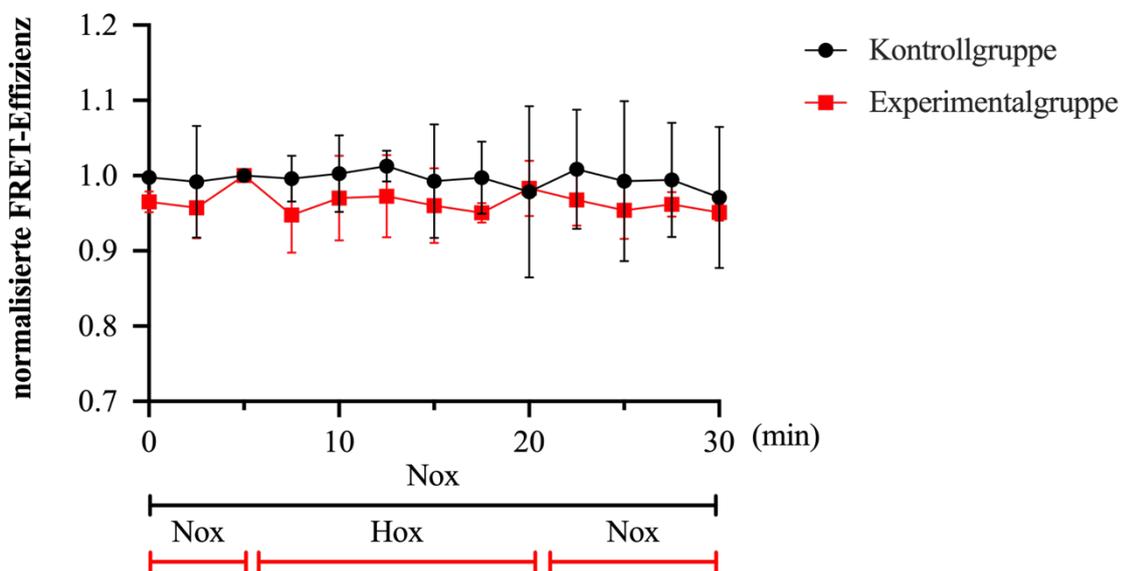


Abbildung 21: Effekt von Normoxie/Hypoxie auf die FRET-Effizienz von *CytoATeam* in PASCs

Nach 5 Minuten Äquilibration in Normoxie (21% O₂, 5 % CO₂, 74 % N₂) wurde in der Experimentalgruppe die Gaszufuhr auf Hypoxie (1 % O₂, 5 % CO₂, 94 % N₂) herabgesetzt. Ab der 21. Minute wurde die Gaszufuhr wieder auf Normoxie gesetzt. Die Kontrollgruppe blieb die gesamten 30 Minuten unter stabilen normoxischen Verhältnissen. Die FRET-Effizienz wurde auf den Zeitpunkt 5 Minuten normalisiert. n= 3 unabhängige Versuche in der Kontrollgruppe und n= 3 unabhängige Versuche in der Experimentalgruppe. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte mit dem Zeitpunkt 0 und im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte zwischen der Experimentalgruppe und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Statistischer Test: *two-way* ANOVA mit Bonferroni *post-hoc* Test. Nox: Normoxie, Hox: Hypoxie

4 Diskussion

4.1 Kritische Betrachtung der angewendeten Methoden

4.1.1 Verwendung von HEK 293T als Zelllinie

Die HEK 293T Zellen wurden künstlich mit dem Simian-Virus 40 T-Antigen (SV40) transformiert. Das T-Antigen bringt ruhende Zellen zur Zellteilung. Die Zellen werden dadurch immortalisiert und können sich unbegrenzt teilen. Die Vorteile darin liegen in der einfachen Kultivierbarkeit, Eignung für Transfektion und die Produktion viraler Vektoren (Graham et al. 1977, Merten et al. 2016). Aufgrund der künstlichen Transformation ist die Zellphysiologie und -zyklus von HEK 293T Zellen nur eingeschränkt mit derer von Primärzellen vergleichbar. Der Aspekt war jedoch im Rahmen dieser Arbeit, in welcher die Zellen neben der Transfektion auch für die Produktion der viralen Vektoren für *Cyto-/MitoATeam* genutzt wurden, zu vernachlässigen.

4.1.2 Laser-Scanning-Konfokalmikroskopie

Das in dieser Arbeit genutzte *Laser-Scanning-Konfokalmikroskop* ist ein spezielles Lichtmikroskop, welches im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie nicht das gesamte Präparat beleuchtet. Die Beleuchtung geht von einer punktförmigen Lichtquelle aus, die Stück für Stück über das Präparat scannt (Sanderson et al. 2014). Es entsteht somit kein vollständiges Bild, sondern wird erst im Anschluss zu einem Ganzen konstruiert, nachdem die Lichtintensitäten nacheinander in allen abzubildenden Bereichen gemessen wurden. Optische Schnittbilder werden so mit einer hohen örtlichen Auflösung erzeugt. Ein entscheidender Vorteil der Konfokalmikroskopie gegenüber anderen Methoden, wie z.B. der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie, ist der Einsatz einer Lochblende. Diese schirmt Streulicht, welches nicht von dem gewählten Fokus zurückkommt, ab. Somit wird die Bildqualität erhöht (Sanderson et al. 2014). Allerdings sind *Laser-Scanning* Mikroskope im Vergleich zu herkömmlichen Mikroskopen sehr langsam in der Bildaufnahme. Die Geschwindigkeit der Bildaufnahme wird durch den Galvanometerscanner limitiert. Dieser besteht aus zwei Spiegeln, die für die Positionierung des Lasers zuständig sind (Sanderson et al. 2014). Möchte man die Zeit der Bildaufnahme beschleunigen, geht dies nur auf Kosten der Bildqualität (Hochreiter et al. 2015). Bei der Bildaufnahme lebender Zellen ist es wichtig zu beachten, dass unter physiologischen Bedingungen die Zellen keiner Lichtquelle ausgesetzt sind. Für Ultraviolettlicht ist bekannt, dass es DNA

schädigt. Infrarotlicht verursacht lokalisierte Hitze. Die Erregung einer Zelle mit Fluoreszenzlicht erzeugt Phototoxizität in den Zellen und im Gewebe (Pattison et al. 2006). Einer der Hauptgründe für die Phototoxizität ist die O_2 -abhängige Reaktion von freien Radikalen. Diese freien Radikale werden durch die Anregung von Fluoreszenzproteinen im Zusammenspiel mit zellulären Komponenten gebildet (Frigault et al. 2009). Daher ist es wichtig, die Menge des anregenden Lichtes so gering wie möglich zu halten, aber auch die Konzentration der fluoreszierenden Probe. Freie Radikale sind in der Signalkaskade der HPV ein wichtiger Bestandteil. Sie werden neben ihrer Rolle als Regulator vieler zellulärer Vorgänge auch als Auslöser der HPV diskutiert (Sommer et al. 2016, Waypa et al. 2016). Des Weiteren wird für ROS auch ein Einfluss auf die ATP-abhängigen Mechanismen in HEK 293T Zellen beschrieben, beispielsweise die indirekte Aktivierung der AMPK über das ATP/ADP-Verhältnis (Hinchy et al. 2018). Daher könnten Ergebnisse aus der Fluoreszenzmikroskopie durch Phototoxizität entstandene ROS beeinflusst werden.

4.1.3 Zellhomöostase

Eine wichtige Voraussetzung für die Zellhomöostase sind die Umgebungskonditionen. Wenn Zellen irreguläre Ausbuchtungen der Plasmamembran formen, sich mehrere große Vakuolen bilden oder die Zellen sich von der Zellkulturplatte abheben, sind dies Zeichen dafür, dass die Zellen unter Stress sind (Frigault et al. 2009). Durch eine eventuell eingeleitete Apoptose kommt es zur Freisetzung von intrazellulären Bestandteilen, einschließlich des O_2 -Sensors. Eine spezifische Detektion von ATP-Spiegeln kann dann nicht mehr gewährleistet werden.

Die Temperatur, das Zellkulturmedium und die Luftzusammensetzung sollten daher physiologische Bedingungen bieten. Die ideale Umgebungstemperatur der meisten Zelltypen liegt bei 37 °C. Daher galt es diese während der Versuche stabil zu halten. Um dies zu erreichen, wurde eine Plexiglasbox von *Living Cells Imaging* genutzt, die das gesamte Mikroskop umfasste. Um die gewünschte Temperatur in der Plexiglasbox zu erreichen, musste genügend Vorlaufzeit gegeben werden. Im Rahmen der Arbeiten unter dem Mikroskop führte beispielsweise das Einsetzen einer neuen Kulturschale dazu, dass es zum Austausch mit der deutlich kühleren Umgebungsluft kam. Die dadurch nicht auszuschließenden Temperaturschwankungen könnten zum Verlust des Fokus auf die Zellen, der sich in

den Untersuchungen als häufiges Problem erwies, beigetragen haben (Frigault et al. 2009). Das Zellkulturmedium benötigt CO₂, um einen physiologischen pH-Wert aufrecht zu erhalten. Das CO₂ enthaltende Gasgemisch, das über die Schläuche seitlich der Zellkulturschalen-Abdeckung über das Zellkulturmedium geleitet wurde, passierte vorab ein Wasserreservoir, um einer Veränderung der Luftfeuchtigkeit und damit Evaporation vorzubeugen. Ein mögliche Austrocknung würde den Stress auf die Zellen erhöhen und somit zu einer eventuellen Apoptose beitragen.

Somit wurden durch den Versuchsaufbau optimale Bedingungen geschaffen, um Messungen unter physiologischen Bedingungen durchführen zu können.

4.1.4 Die *Sensitized Emission* FRET-Messung

Für die FRET-Messung wurde die Methode *Sensitized Emission* genutzt (siehe Kapitel 2.9). Diese Methode wird aufgrund der nicht destruktiven Eigenschaften der Messung häufig genutzt (Elder et al. 2008). Hierbei gibt es verschiedene Fehlerquellen zu beachten, wozu der *Crosstalk* zwischen den Fluorophoren zählt. Der *Crosstalk* lässt sich unterteilen in *Cross-excitation* und *Bleed-through*.

Die *Cross-excitation* beschreibt die fälschliche Anregung des Akzeptors durch die spezifische Anregungswellenlänge des Donors. Die *Cross-excitation* ist besonders groß, wenn die Fluorophore nicht im Verhältnis 1:1 vorliegen (Padilla-Parra et al. 2012). Die in dieser Arbeit verwendeten *ATeam* Sensoren lagen als intramolekulares FRET-Paar vor, sodass ein Verhältnis von 1:1 gegeben war. Weiterhin wurde die Anregungswellenlänge des Donors so gewählt, dass deren Kreuzung mit dem Akzeptor-Absorptionsspektrum nur zu einer vernachlässigbaren Anregung des Akzeptors führte. Dies reduzierte die *Cross-excitation* als potentielle Fehlerquelle.

Vom *Bleed-through* spricht man, wenn die Fluoreszenz-Emissionen des Donors mit dem emittierten Wellenlängenbereich des Akzeptors überlappen und im Akzeptorkanal gemessen werden können. Die Verwendung von CFP und YFP als Fluorophorenpaar, wie in den *ATeam* Sensoren, birgt dieses Problem, da die Emissionsspektren einen großen Überlappungsbereich aufweisen und somit der Effekt des *Bleed-through* besonders stark sein kann (Elder et al. 2008). Aufgrund dessen wurden mittels Filter spezifische Wellenlängenbereiche innerhalb der Emissionsspektren von Donor und Akzeptor gewählt, um die Überlappung und somit den *Bleed-through* zu reduzieren.

Neben der Reduzierung des Crosstalks durch die Einstellung am Konfokalmikroskop, besteht die Notwendigkeit für eine mathematische Korrektur des *Crosstalk*. Dies wurde durch die Erhebung von Korrekturfaktoren mit Proben, die nur das Donor-Fluorophor oder das Akzeptor-Fluorophor enthielten, durchgeführt. Diese Korrekturfaktoren wurden von der Software automatisch in die Berechnung der FRET-Effizienz mit einbezogen (für Details siehe Kapitel 2.9).

Zusammenfassend erhöhten diese Maßnahmen die Sensitivität des in dieser Arbeit verwendeten FRET-Sensors.

4.1.5 ATP-Messung mittels *Cyto-/MitoATeam*

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, gibt es unterschiedliche Methoden, um ATP zu messen. Die in dieser Arbeit verwendeten ATP-Sensoren (*ATeam*) wurden von Imamura et al. entwickelt und erstmals beschrieben (Imamura et al. 2009). Den großen Vorteil, den diese Sensoren im Zusammenhang mit FRET-Messung bieten, ist die Nutzung in unterschiedlichen Zellkompartimenten (z.B. Zytoplasma oder mitochondriale Matrix) und die Möglichkeit der Echtzeitbeobachtung von dynamischen Veränderungen der ATP-Spiegel. Die in den Sensoren genutzte ϵ -Untereinheit aus der thermophilen *Bacillus subtilis* Spezies hat den besonderen Vorteil, dass sie ATP mit hoher Affinität bindet, aber nicht hydrolysiert. Außerdem besitzt sie eine sehr hohe Spezifität für ATP gegenüber anderen Nukleotiden wie z.B. ADP oder Guanosintriphosphat (GTP) (Imamura et al. 2009). Limitationen können durch Veränderungen im pH-Wert entstehen, da dieser Einfluss auf die Protonierung der Fluorophore haben kann, was wiederum die Absorptionscharakteristika und die Überlebenszeit des Fluorophors verändern kann (Kneen et al. 1998). In einer Studie von Imamura et al. (2009) wurde dieser Zusammenhang untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Fluoreszenzemissionen bei pH-Werten zwischen 7,1 und 8,5 fast nicht variierten (Imamura et al. 2009). In Bezug auf die Fluoreszenzemission unter physiologischen Bedingungen schien der pH-Wert somit kein Störfaktor zu sein. In einer Studie von Borst et al. (2010) wurde ein Einfluss von ATP auf CFP beschrieben, wenn dieses Fluorophor in Kombination mit YFP angewendet wird. Mittels *in vitro* Versuchen zeigten sie, dass ATP mit dem Histidin an Position 148 des CFP eine elektrostatische Interaktion eingeht und dadurch Abweichungen im YFP/CFP-Emissionsverhältnis hervorruft (Borst et al. 2010). Mit höheren ATP-Konzentrationen,

bis 20 Millimolar (mM), wurde das YFP/CFP- Emissionsverhältnis in den Versuchen von Borst et al. (2010) geringer. Angesichts dieser Ergebnisse würde man auch bei den Versuchen mit der Negativkontrolle von Imamura et al. (2009), welche eine veränderte, nicht-ATP-bindende ϵ -Untereinheit im *ATeam*-Sensor enthält, eine direkte Interaktion von ATP mit CFP und daraus resultierende Veränderungen im YFP/CFP-Emissionsverhältnis ohne Induktion von FRET erwarten. Hier zeigten sich jedoch keine Abweichungen im YFP/CFP-Emissionsverhältnis bei ATP-Konzentrationen bis 10 mM. Borst et al. (2010) nahmen an, dass die Sensitivität der bakteriellen ϵ -Untereinheit der F_0/F_1 -ATP-Synthase höher ist, als die elektrostatische Interaktion von ATP und Histidin an Position 148. Jedoch sollte besonders bei großen Mengen von ATP oder schnellen Veränderungen von lokalen oder globalen Konzentrationen die Interaktion als Einflussfaktor auf die Messung berücksichtigt werden (Borst et al. 2010). Diese Bedingungen sind in den aktuellen Untersuchungen nicht zu erwarten. Weitere mögliche Limitationen des Sensors bestehen in seiner Temperaturempfindlichkeit. Morciano et al. beschreiben eine temperaturempfindliche Affinität der *ATeam*-Sensoren, welche unabhängig von der ATP-Konzentration zu einer Veränderung von FRET führen können (Morciano et al. 2020). Steigende Temperaturen führen zu einer Reduktion der Affinität von *ATeam* (Imamura et al. 2009). Diese umfasst eine etwa fünf-fache Abnahme der Affinität bei Temperaturerhöhungen um 10 °C (Imamura et al. 2009). In den hier vorliegenden Untersuchungen wurde die Umgebungstemperatur unter der Messung daher genau kontrolliert und stabil gehalten. Ein möglicher lokaler thermischer Einfluss durch den hier verwendeten Argon-Laser schien nach Literaturrecherchen ebenfalls unwahrscheinlich. Morimoto et al. (1994) untersuchten den thermischen Effekt von Argon-Lasern in Zellkulturmedien. Sie konnten zeigen, dass die Temperatur im Zellkulturmedium während der Bestrahlung (50-60 s) mit einem Argon-Laser sich nur um ca. 0,1 °C erhöhte (Morimoto et al. 1994). Die Exposition der in dieser Arbeit verwendeten Proben gegenüber dem Laser war während der Bildaufnahmen nicht länger als 60 s, sodass eine Temperaturerhöhung von 0,1 °C durch den Laser als Störfaktor für die Affinität der Sensoren vernachlässigt werden kann.

4.1.6 Virenproduktion und Transduktion der mPASMCS mit *Cyto-/MitoATeam*

In dieser Arbeit wurden Lentiviren als Vektoren für die Transduktion ausgewählt. Diese bilden eine Gattung innerhalb der Retroviren und basieren auf dem humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) (Kafri 2004). Die Vorteile der Verwendung von Lentiviren umfassen die stabile Integration in das Genom der zu transduzierenden Zelle. Lentiviren

sind in der Lage sowohl proliferierende Zellen als auch ruhende Zellen (G0-Phase des Zellzyklus) zu infizieren (Dull et al. 1998). Wie auch in dieser Arbeit werden zur Virusproduktion häufig HEK 293T Zellen genutzt. Limitationen der Methode liegen in den erforderlichen labortechnischen Sicherheitsmaßnahmen, da die Produktion nur in gentechnischen Anlagen der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt werden darf. Bei der Produktion können Lentiviren entstehen, welche replikationskompetente aber mutierte genetische Informationen enthalten. Dies birgt ein proonkogenetisches Potenzial. Umgekehrt kann das Transgen jedoch auch potentiell zelltoxisch sein (Dull et al. 1998). Verschiedenen Vortestungen mit mPASCs zeigten ein heterogenes Bild in der Transduktionseffizienz und toxischen Effekte. Die Transduktion in dieser Arbeit wurde entsprechend dieser Vortestungen mit einem Titer von 1×10^7 Partikel durchgeführt, wobei die Transduktionseffizienz eingeschränkt war. Die Gründe, die zu einer unzureichenden Transduktion führen können, sind vielfältig und umfassen zu niedrige virale Titer, unzureichende Inkubationszeiten, ein zu großes Volumen an Zellkulturmedium oder die Inkompatibilitäten zwischen Zielzelle und Transduktionsmedium (Zhang et al. 2004). Die Transduktion primärer Zellen wird allgemein als schwieriger (im Vergleich mit Tumorzellreihen) angesehen. Infolge dessen werden umfangreiche Versuchsreihen bezüglich der richtigen Multiplizität der Infektion (*multiplicity of infection*, MOI) benötigt, um eine erfolgreiche, stabile und nicht toxische Infektion der Zellen zu erreichen. Die MOI beschreibt das Verhältnis der Anzahl von infektiösen Viruspartikeln zu der Anzahl der Zielzellen. Eine weitere Optimierung der Transduktionseffizienz kann z.B. durch die Verwendung von Antibiotika-Resistenzen gelingen. Dies gewährleistet eine Selektion erfolgreich transduzierter Zellen. In dieser Arbeit wurden keine Antibiotika-Resistenzen mit dem transduzierten Vektor in die Zelle übertragen. Die Komponenten für die Herstellung lentiviraler Vektoren wurden uns freundlicherweise bereits als fertige Plasmide zur Verfügung gestellt, sodass eine Möglichkeit des nachträglichen Hinzufügens einer Antibiotika-Resistenz nicht bestand. Allerdings hätte dies die Transduktionseffizienz erhöhen können. Die in dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen waren durch die geringe Transduktionseffizienz limitiert, sodass eine Optimierung des Transduktionsprotokoll im Fokus zukünftiger Untersuchungen sein wird.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Etablierungsversuche der Sensoren mittels Oligomycin A

Der zelluläre Energiehaushalt ist vor allem von der OXPHOS, als Hauptsynthesemechanismus für ATP, abhängig. Die Glykolyse spielt jedoch auch, insbesondere in der kurzfristigen ATP-Bereitstellung, eine wichtige Rolle. Das Ziel der ersten Versuche mit Oligomycin A war es, zu überprüfen, ob diese eine intrazelluläre oder mitochondriale ATP-Veränderung unter inhibierter mitochondrialer ATP-Synthese detektieren. Diesbezüglich hatten Imamura et. al. in Versuchen mit HeLA-Zellen (Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) in Galaktose-haltigem Zellkulturmedium gezeigt, dass beim Hinzufügen von Oligomycin A, ein deutlicher Abfall der ATP-Spiegel über die FRET-Effizienz im Zytoplasma gemessen werden kann. Auch die Versuche mit *CytoATeam* in HEK 293T Zellen in dieser Arbeit haben nach der Zugabe von Oligomycin A einen signifikanten Abfall der ATP-Spiegel gezeigt. Durch die allgemein bekannte und in wissenschaftlichen Studien etablierte Wirkung von Oligomycin A als Inhibitor der ATP-Synthase konnte gezeigt werden, dass der Sensor tatsächlich ATP-Veränderungen messen kann. Dagegen zeigten die Messungen mit *MitoATeam* keine signifikanten Veränderungen der FRET-Effizienz nach Zugabe von Oligomycin A. Imamura et al. zeigten, dass die ATP-Spiegel innerhalb der Mitochondrien geringer sind als im Cytoplasma oder im Nukleus (Imamura et al. 2009) und möglicherweise geringeren Schwankungen unterliegen, da ATP aus den Mitochondrien freigesetzt wird, um die zelluläre ADP/ATP-Ratio aufrechtzuerhalten (Imamura et al. 2009). Daher könnten geringere absolute Schwankungen der ATP-Spiegel auftreten, die von *MitoATeam* nicht detektiert werden können. Die Gruppe um Kioka et al. führte ebenfalls Inhibitionsversuche mit Oligomycin A zur Messung mit *CytoATeam* und *MitoATeam* durch. Diese kamen allerdings zu dem Ergebnis, dass *MitoATeam* deutlich sensitiver als *CytoATeam* in der Detektion von ATP sei. Sie beschrieben, dass im Gegensatz zum *CytoATeam* beim *MitoATeam* eine geringere Dosierung Oligomycin A das YFP/CFP-Emissionsverhältnis in HeLA-Zellen innerhalb von 10 Minuten signifikant reduzierte (Kioka et al. 2014). Möglicherweise spielt der verwendete Zelltyp eine Rolle für die unterschiedlichen Ergebnisse. Insgesamt zeigten die Messungen dieser Studie, dass *CytoATeam* geeignet ist um zytosolische ATP-Veränderungen zu messen. Für *MitoATeam* konnten keine Veränderungen im FRET-Signal bei inhibierter ATP-Produktion festgestellt werden. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen von Imamura et al. und Kioka et al. bzgl. des *MitoATeam*-Sensors muss weiter untersucht werden.

4.2.2 Etablierung hypoxischer Konditionen unter dem Konfokalmikroskop

Dreieinhalb Minuten nach Beginn des hypoxischen Gasflusses konnte im Rahmen des Versuchsaufbaus ein stabiles hypoxisches Niveau mit pO_2 -Drücken unter 20 mmHg (2 % O_2 auf Meereshöhe) erreicht werden. Limitationen der pO_2 -Sonde bestehen in der verzögerten Detektion (im Durchschnitt 78 ± 21 s) von Veränderungen der Partialdrücke (Purins et al. 2010). Diese Messverzögerungen waren jedoch in diesem Versuchsaufbau nicht relevant, da die Erzeugung von stabilen hypoxischen Konditionen über einen 25-minütigen Zeitraum gewünscht war. Die Ergebnisse zeigten, dass die Etablierung hypoxischer Konditionen unter dem Konfokalmikroskop mittels des o.g. Versuchsaufbaus möglich war. Im Kontext der zellulären Signalwege, die der akuten HPV zugrundeliegen und innerhalb von Sekunden auftreten können, könnte der Zeitraum von dreieinhalb Minuten bis stabile hypoxische Bedingungen erreicht sind zu lang sein, sodass der Versuchsaufbau für Aussagen zur akuten HPV nur bedingt nutzbar wäre. Für Messungen und Aussagen bezüglich prolongierter HPV wäre der Zeitraum von dreieinhalb Minuten bis zum Erreichen hypoxischer Bedingungen keine Einschränkung.

4.2.3 ATP-Messungen unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen

Die Versuche mit HEK 293T Zellen in Glukose-haltigem Zellkulturmedium zeigten weder bei der Messung mit *CytoATeam* noch *MitoATeam* eine signifikante Veränderungen der FRET-Effizienz unter 25-minütiger Hypoxie. Dieser Zeitraum wurde gewählt, da zelluläre hypoxische Reaktionen, insbesondere eine Reduktion des Energiestoffwechsels unter Hypoxie innerhalb von 5 Minuten und über einen Zeitraum von 20 Minuten anhaltend, in Pulmonalarterien von Rindern beschrieben wurden (Gupte et al. 2010). Es konnte ein signifikanter Abfall vom ATP/ADP-Verhältnis nach einer 5-minütigen Exposition von Pulmonalarterien gegenüber Hypoxie von Gupte et al. detektiert werden (Gupte et al. 2010). Eine Erklärung für den fehlenden Abfall des ATP-Signals in den Experimenten dieser Arbeit wäre, dass über den Zeitraum der Messung eine verstärkte Glykolyse die verminderte ATP-Produktion, die durch die Hypoxie-bedingte Inhibition von OXPHOS verursacht wurde, ausglich. Um diese Annahme genauer zu untersuchen, wurden die Versuche in Galaktose-haltigem Zellkulturmedium durchgeführt. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der FRET-Effizienz unter Hypoxie. Hierbei ist zu be-

achten, dass epitheliale Nierenzellen in der Lage sind Glukoneogenese (zelleigene Produktion von Glukose) zu betreiben und es somit möglich wäre ein Substratdefizit der Glykolyse, zumindest für einen gewissen Zeitraum, zu überbrücken (Legouis et al. 2020). HEK 293T Zellen besitzen als mesenchymale Zellen genetische Marker epithelialer Zellen (Stepanenko et al. 2015). Es bleibt aber unklar, ob diese ebenfalls die Fähigkeiten der Glukoneogenese als potentielle Vorläuferzellen für epitheliale Nierenzellen besitzen. In der Literatur ließen sich hierzu keine Hinweise finden. Weiterhin könnten adaptive Mechanismen der Zellen über eine Reduktion von ATP-verbrauchenden Stoffwechselwegen (z.B. Proteinbiosynthese) dazubeitragen, dass es zu keinen relativen Veränderungen der intrazellulären ATP-Spiegel kommt und die FRET-Effizienz erhalten bleibt.

Sommer et al. (2017) konnten für Cox4i2 eine wichtige Beteiligung als O₂-Sensor in PSMCs unter akuter Hypoxie nachweisen (Sommer et al. 2017). Cox4i2 reguliert die Hypoxie-induzierte Freisetzung von ROS als Trigger für die HPV (Sommer et al. 2017). Als Hypoxie-Sensormechanismus werden zum einen eine verminderte Bildung von Disulfid-Brücken an Cysteinresten von Cox4i2 als auch Veränderungen im ATP/ADP-Verhältnis unter Hypoxie diskutiert (Sommer et al. 2017). Die Etablierung eines lokalisierten ATP-Sensors mittels FRET in PSMCs könnte die jeweiligen Thesen unterstützen oder abschwächen. Ein fehlende Veränderung von ATP in PSMCs würde beispielsweise die Hypothese der verminderten Bildung von Disulfid-Brücken als führenden *Sensing*-Mechanismus unterstützen, da es zu keiner Veränderung des ATP/ADP-Verhältnisses kommt. Außerdem könnte ein verändertes ATP/ADP-Signal ein Cox4i2-abhängiger Signalmechanismus sein, der neben ROS die Signalwege zur Auslösung der HPV aktiviert.

Genauere Kenntnisse der auslösenden Mechanismen der HPV könnten zur Entwicklung von Therapiemöglichkeiten auf Ebene des O₂-Sensor der HPV beitragen. Fehlende Veränderungen von ATP würden den Fokus für therapeutische Ziele auf andere Aspekte des Energiemetabolismus, z.B. die ROS-Produktion, lenken. In dieser Arbeit gelang die Etablierung der Messung des zytosolischen ATP/ADP-Gehaltes unter akuter Hypoxie mittels des *CytoATeam*-Sensors. Weitere Untersuchungen mit *CytoATeam* sowie *MitoATeam* sollten durchgeführt werden, um die Fragestellung lokalisierter ATP/ADP-Veränderungen unter akuter Hypoxie in PSMCs beantworten zu können.

Während der prolongierten Hypoxie führt die AMPK-Aktivierung in PSMCs über eine Freisetzung von sarkoplasmatischem Ca²⁺ zu einer Vasokonstriktion und Auslösung der

HPV. Die AMPK-Aktivierung wird durch Veränderungen des AMP/ATP-Verhältnisses beeinflusst (Strielkov et al. 2017). Kioka et al. (2014) konnten in Studien mit *CytoATeam* und *MitoATeam* in HeLa-Zellen über 2,5 Stunden Hypoxie einen Abfall des YFP/CFP-Emissionsverhältnisses und damit der ATP-Menge zeigen (Kioka et al. 2014). Daher wären auch Untersuchungen mittels FRET unter längeren Hypoxie-Zeiten in PSMCs für das Verständnis der prolongierten und chronischen Hypoxie von Bedeutung und eine interessante Ergänzung zu den bestehenden Daten.

4.3 Fazit und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von intrazellulären FRET-ATP-Sensoren zur Identifikation akuter Hypoxie-induzierter ATP-Veränderungen in PASMCs, da diesen eine Sensor- aber auch Effektor-Funktion in der HPV zugesprochen wird (Sommer et al. 2016).

In dieser Arbeit gelang die erfolgreiche Etablierung von *CytoATeam* zur cytosolischen Detektion von ATP-Veränderungen, wie von Imamura et al. (2009) und Kioka et al. (2014) beschrieben. Ebenfalls wurde erfolgreich ein System zur Induktion von akuter/prolongierter Hypoxie im konfokalen Mikroskop etabliert. In den daraufhin durchgeführten Messungen mit *CytoATeam* in HEK 293T Zellen oder mPASMCs konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen der Experimentalgruppe in Hypoxie und der Kontrollgruppe in Normoxie festgestellt werden. Einschränkungen in der Ergebnisbewertung der mPASMCs-Versuche bestanden hinsichtlich der geringen Anzahl an Messungen, welche durch eine niedrige Transduktionseffizienz bedingt waren. Eine weitere Limitation bestand hinsichtlich der zeitlichen Messpunkte, da sehr kurzfristige ATP-Veränderungen (innerhalb von Sekunden) aufgrund des Versuchsaufbaus nicht hätten erfasst werden können.

Zukünftige Untersuchungen sollte die Etablierung von *MitoATeam* fortführen. Weiterhin gilt es die Ursache für das unveränderte Signal von *MitoATeam* unter Oligomycin A Gabe zu identifizieren. Die Experimente in mPASMCs sollten mit höherer n-Zahl wiederholt werden, um valide Ergebnisse zu erhalten. Zusätzlich könnten Untersuchungen mit längeren Hypoxiephasen helfen, den Effekt chronischer Hypoxie auf ATP-Veränderungen besser zu verstehen.

5 Zusammenfassung

Akute alveoläre Hypoxie führt in der Lunge innerhalb von Sekunden zu einer Vasokonstriktion der präkapillären Gefäße (Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion, HPV), welche eine optimale arterielle Oxygenierung des Bluts durch Umverteilung der pulmonalen Durchblutung von schlecht in gut belüftete Alveolen sicherstellt. Eine verminderte HPV kann zu einer Hypoxämie, eine verstärkte HPV zu der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie (PH) beitragen. Die zellulären Signalwege und Mechanismen der HPV sind bisher nicht vollständig geklärt. Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle bei der zellulären Hypoxiedetektion und Signalvermittlung, allerdings ist unklar, ob eine Hypoxie-induzierte Verminderung der mitochondrialen ATP-Produktion und daraus folgenden Veränderung der zytosolischen ATP-Konzentration bzw. des AMP/ATP Verhältnisses als Mediator beteiligt ist. Limitation in der Detektion von zeitlich und örtlich hoch aufgelösten ATP-Veränderungen schränkten bisher die Untersuchungen ein. Ziel dieser Arbeit war es daher mit Hilfe von genetisch-codierten Fluoreszenzmarkern (*CytoATeam* und *MitoATeam*) eine Möglichkeit zu etablieren, um zeitliche und lokalisierte Veränderungen von ATP-Spiegel in glatten Gefäßmuskelzellen der Maus (mPASMCs) während akuter Hypoxie mit dem konfokalen Mikroskop zu detektieren. Diese Arbeit konnte zeigen, dass *CytoATeam* die erwartete Abnahme der FRET-Effizienz im Cytosol nach Inhibierung der mitochondriale ATP-Produktion zeigte, und somit zur Detektion von cytosolischen ATP-Veränderungen geeignet ist. Dagegen konnte mit *MitoATeam* keine Signaländerung unter inhibierter mitochondrialer ATP-Produktion detektiert werden. Unter akuter Hypoxie, die erfolgreich für Messungen unter dem konfokalen Mikroskop etabliert wurde, zeigte sich in HEK 293T Zellen ebenfalls keine signifikante Änderung der FRET-Effizienz zwischen den Zeitpunkten oder experimentellen Gruppen, weder mit den unterschiedlichen Sensoren, noch mit Glukose-freiem oder -haltigem Zellkulturmedium. Außerdem wurde die Messung mit *CytoATeam* unter akuter Hypoxie erfolgreich in mPASMCs etabliert.

Zusammenfassend demonstriert diese Arbeit, dass mit *CytoATeam* Veränderungen der ATP-Spiegel im Konfokalmikroskop gemessen werden können. Unter akuter Hypoxie konnten keine signifikanten Änderungen der Signale in HEK 293T Zellen detektiert werden. Weitere Untersuchungen, insbesondere nach optimierter Expression der Sensoren in primären mPASMCs, sind notwendig, um zu überprüfen, ob Änderungen des ATP/ADP-Verhältnisses unter akuter Hypoxie auftreten können.

6 Summary

Acute alveolar hypoxia results in constriction of pre-capillary pulmonary vessels (hypoxic pulmonary vasoconstriction, HPV) in between seconds of onset of hypoxia, to optimize arterial oxygenation by redistributing the pulmonary perfusion from poorly ventilated to well-ventilated alveoli. A reduced HPV results in hypoxemia, an increased HPV can contribute to the development of pulmonary hypertension (PH). The cellular signaling pathways and mechanisms of HPV have not yet been fully elucidated. Mitochondria play a central role in detection of cellular hypoxia and downstream signaling, but it is unclear whether an acute hypoxia-induced reduction in mitochondrial ATP production and the resulting change in cytosolic ATP concentration or the AMP/ATP ratio is involved as a mediator. Limitations in temporally and spatially highly resolved detection of ATP changes have so far restricted the investigations. Therefore the aim of this work was to use genetically encoded fluorescence markers (*CytoATeam* and *MitoATeam*) to establish a method to detect temporal and local changes in ATP levels in mPASCs with the confocal microscope during acute hypoxia. This work showed that the *CytoATeam* sensor was able to detect the expected cytosolic decrease in FRET-efficiency after inhibition of mitochondrial ATP production and is therefore suitable for detection of cytosolic ATP changes. In contrast no signal change could be detected with the *MitoATeam* sensor under inhibited mitochondrial ATP production. In acute hypoxia, which was successfully implemented for measurements under the confocal microscope, HEK 293T showed no significant change in FRET-efficiency in comparison of single time points or between the experimental groups, neither with the different sensors nor with glucose-free or glucose-containing cell culture medium. The *CytoATeam* sensor was successfully transduced into mPASCs for measurement of ATP/ADP in acute hypoxia.

In summary this work demonstrates that the *CytoATeam* can be used to measure changes in ATP levels under the confocal microscope. Under acute hypoxia no significant signal changes could be detected. Further investigations, especially after optimized expression of the sensors in primary mPASCs are necessary to determine whether very small changes can occur.

7 Abkürzungsverzeichnis

ε	epsilon
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ALK-1	<i>activin-like reseptor-1</i>
AMP	Adenosinmonophospat
AMPK	AMP aktivierte Kinase
ANT	Adeninukleotidtranslokator
ATP	Adenosintriphosphat
BMPR2	<i>bone morphogenic protein reseptor type 2</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
Ca ²⁺	Kalzium
cADPR	Zyklische Adenosindiphosphatribose
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CAV1	<i>caveolin-1</i>
cDNA	komplementäre DNA
CFP	Cyan Fluoreszenzprotein
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CHPH	chronisch-hypoxisch induzierte pulmonale Hypertonie
cm	Zentimeter
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
Cox	Cytochrom C Oxidase
Cox4i2	Cytochrom C Oxidase Untereinheit 4 Isoform 2
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CTEPH	Chronische thrombo-embolische pulmonale Hypertonie

DAG	Diacylglycerol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's - Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution</i>
e ⁻	Elektron
E _m	Zellmembranpotenzial
ENG	<i>endogelin</i>
ETC	<i>electron transport chain</i>
FACS	Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie
FAD	<i>flavine adenine dinucleotide</i>
FADH ₂	<i>reduced form of flavine adenine dinucleotide</i>
FCS	Fetales Kälberserum
Fe ²⁺	zweiwertiges Eisen
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
G0s2	<i>Hypoxia-inducible protein G0/G1 switch gene 2</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoff Proton
H ₂	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEK 293T	<i>Human Embryonic Kidney Cells</i>
HeLA	Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
Hif-1α	<i>hypoxia inducible factor 1 alpha</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPAH	Hereditäre pulmonal-arterielle Hypertonie
hPASC	Humane PASC
HPV	Hypoxische Vasokonstriktion
Hz	Hertz
IgG	Immunglobulin G

IL	Interleukin
IPAH	Idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie
K ⁺	Kalium
K _{ATP}	ATP abhängige Kalium Kanäle
KCNK3	<i>potassium channel super family K member-3</i>
KG	Körpergewicht
kJ	Kilojoule
K _v -Kanäle	Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle
L	Liter
m	Meter
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
mitoK _{ATP}	Mitochondriale K _{ATP}
MitoSOX	Fluoreszierender Farbstoff
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mol	SI-Einheit Stoffmenge
mPAP	<i>mean pulmonary artery pressure</i>
mPASMCM	murine PASMCM
mseCFP	<i>monomeric super-enhanced CFP</i>
mtROS	mitochondriale ROS
mtSOD	Mitochondriale Superoxiddismutase
mVenus	<i>monomeric Venus</i>
N	Signifikanzen
N ₂	Stickstoff
NAD ⁺	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat)
nm	Nanometer

NO	Stickstoffmonoxid
NOX	NADPH-Oxidase
ns	Nanosekunde
NSCC	<i>Non specific cation channels</i>
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
OH•	Hydroxyl-Radikal
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
P/S	Penicillin/Streptomycin Lösung
PAH	Pulmonal-arterielle Hypertonie
PASMC	<i>pulmonary arterial smooth muscle cell</i> (pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen)
pCO ₂	Partialdruck von Kohlenstoffdioxid
PDE	Phosphodiesterase
PDH	Pyruvat Dehydrogenase
PDK	Pyruvat Dehydrogenase Kinase
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PH	Pulmonale Hypertonie
PHD	<i>prolyl-4-hydroxylase domain protein</i>
pO ₂	Partialdruck von Sauerstoff
PPHN	Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen
PVR	Pulmonaler Gefäßwiderstand
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time PCR</i> (Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion)
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Rezeptor regulierte Kanäle (<i>receptor operated channels</i>)
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (Sauerstoffradikale)
rpm	<i>revolutions per minute</i>
s	Sekunden
SEM	<i>standard error of the mean</i>

SFM	Serumfreies Medium
SMAD 9	<i>Smad family member 9</i>
SMC-Medium	<i>smooth muscle cell</i> Nährmedium
SOC	Speichervermittelt regulierte Kanäle (<i>store-operated channels</i>)
SV40	Simian-Virus 40
TRPC	<i>transient receptor potential cation channel</i>
VDCC	Spannungsabhängige Kalziumkanäle (<i>voltage dependent calcium channels</i>)
YFP	Yellow (Gelb) Fluoreszenzprotein
z.B.	zum Beispiel
α	alpha
β	beta
γ	gamma
δ	delta
ΔG^0	Freie Standardreaktionsenthalpie
Δp	Partialdruckdifferenz
μl	Mikroliter
μm	Mirkometer
Ψ_m	mitochondriales Membranpotenzial

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der HPV	5
Abbildung 2: Molekulare Struktur von ATP.....	15
Abbildung 3: AMPK-abhängige Regulation der HPV	16
Abbildung 4: ATP-Sensor	20
Abbildung 5: Schematische Darstellung des FRET-Vorganges	22
Abbildung 6: Darstellung der Sensoren enthaltenden Plasmide	34
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Produktion von viralen Vektoren	40
Abbildung 8: Versuchsablauf der Oligomycin A-Versuche	50
Abbildung 9: Ansicht auf Zellkammer und Aussenbox Konfokalmikroskop.....	52
Abbildung 10: Versuchsablauf Normoxie/Hypoxie Versuche.....	53
Abbildung 11: ATP-Sensor unter dem Konfokalmikroskop.....	55
Abbildung 12: <i>MitoATeam</i> unter dem Konfokalmikroskop.....	56
Abbildung 13: Effekt von Oligomycin A auf die FRET-Effizienz von <i>CytoATeam</i>	57
Abbildung 14: Effekt von Oligomycin A auf die FRET-Effizienz von <i>MitoATeam</i>	58
Abbildung 15: Effekt von hypoxischem Gasfluss auf den pO ₂ in Zellkulturmedium unter dem Konfokalmikroskop.....	59
Abbildung 16: Effekte von Normoxie/Hypoxie auf die FRET-Effizienz von <i>CytoATeam</i> in HEK 293T in Glukose-haltigem Zellkulturmedium	60
Abbildung 17: Effekte von Normoxie/Hypoxie auf auf die FRET-Effizienz von <i>CytoATeam</i> in HEK 293T in Galaktose-haltigem Zellkulturmedium.....	62
Abbildung 18: Effekte von Normoxie/Hypoxie auf auf die FRET-Effizienz von <i>MitoATeam</i> in HEK 293T in Glukose-haltigem Zellkulturmedium	63
Abbildung 19: Effekte von Normoxie/Hypoxie auf die FRET-Effizienz von <i>MitoATeam</i> in HEK 293T in Galaktose-haltigem Zellkulturmedium.....	64
Abbildung 20: mPASCs mit integriertem <i>CytoATeam</i> unter dem Konfokalmikroskop	65

Abbildung 21: Effekt von Normoxie/Hypoxie auf die FRET-Effizienz von <i>CytoATeam</i> in PSMCs.....	66
---	----

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der PH, Nizza 2018.....	7
Tabelle 2: Verwendete Geräte für die Zellkultur und Mikrobiologie	24
Tabelle 3: Verwendete Geräte für die Konfokalmikroskopie	25
Tabelle 4: Verwendete Software	25
Tabelle 5: Allgemeine Verbrauchsmaterialien.....	26
Tabelle 6: Verwendete Materialien Zellkultur und Mikrobiologie	27
Tabelle 7: Verwendete Materialien für die Isolation der PSMCs	27
Tabelle 8: Chemikalien und Medien für Zellkultur und Mikrobiologie	28
Tabelle 9: Medien für Zellkultur	31
Tabelle 10: Verwendete Kits für die Mikrobiologie	32
Tabelle 11: ATP-Sensor Plasmide	32
Tabelle 12: Hüllplasmid und Verpackungsplasmide.....	32
Tabelle 13: Fluoreszenzplasmide	33
Tabelle 14: Komponenten Virusproduktion.....	39
Tabelle 15: Protokoll PCR	42
Tabelle 16: Protokoll PCR Reagenzien 1	43
Tabelle 17: Material PCR Mastermix	43

10 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, S.; Gross, C. M.; Sharma, S.; Fineman, J. R.; Black, S. M. (2013). "Reactive oxygen species in pulmonary vascular remodeling." Compr Physiol 3(3): 1011-1034.
- Aoki, K.; Kamioka, Y.; Matsuda, M. (2013). "Fluorescence resonance energy transfer imaging of cell signaling from in vitro to in vivo: basis of biosensor construction, live imaging, and image processing." Dev Growth Differ 55(4): 515-522.
- Archer, S. L.; Weir, E. K.; Wilkins, M. R. (2010). "Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: new concepts and experimental therapies." Circulation 121(18): 2045-2066.
- Arya, M.; Shergill, I. S.; Williamson, M.; Gommersall, L.; Arya, N.; Patel, H. R. (2005). "Basic principles of real-time quantitative PCR." Expert Rev Mol Diagn 5(2): 209-219.
- Badesch, D. B.; Champion, H. C.; Sanchez, M. A.; Hoeper, M. M.; Loyd, J. E.; Manes, A.; McGoon, M.; Naeije, R.; Olschewski, H.; Oudiz, R. J.; Torbicki, A. (2009). "Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension." Journal of the American College of Cardiology 54(1 Suppl): S55-66.
- Berney, C.; Danuser, G. (2003). "FRET or no FRET: a quantitative comparison." Biophys J 84(6): 3992-4010.
- Bienert, G. P.; Schjoerring, J. K.; Jahn, T. P. (2006). "Membrane transport of hydrogen peroxide." Biochim Biophys Acta 1758(8): 994-1003.
- Bogaard, H. J.; Abe, K.; Vonk Noordegraaf, A.; Voelkel, N. F. (2009). "The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension." Chest 135(3): 794-804.
- Borst, J. W.; Willemse, M.; Slijkhuis, R.; van der Krogt, G.; Laptенок, S. P.; Jalink, K.; Wieringa, B.; Fransen, J. A. (2010). "ATP changes the fluorescence lifetime of cyan fluorescent protein via an interaction with His148." PLoS One 5(11): e13862.
- Conley, J. M.; Radhakrishnan, S.; Valentino, S. A.; Tantama, M. (2017). "Imaging extracellular ATP with a genetically-encoded, ratiometric fluorescent sensor." PLoS One 12(11): e0187481.
- Coppock, E. A.; Martens, J. R.; Tamkun, M. M. (2001). "Molecular basis of hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction: role of voltage-gated K⁺ channels." American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 281(1): L1-12.
- Cui, Y.; Tran, S.; Tinker, A.; Clapp, L. H. (2002). "The molecular composition of K(ATP) channels in human pulmonary artery smooth muscle cells and their modulation by growth." Am J Respir Cell Mol Biol 26(1): 135-143.
- Davis, H. E.; Rosinski, M.; Morgan, J. R.; Yarmush, M. L. (2004). "Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation." Biophys J 86(2): 1234-1242.
- Day, R. N.; Davidson, M. W. (2012). "Fluorescent proteins for FRET microscopy: monitoring protein interactions in living cells." Bioessays 34(5): 341-350.
- Donato, M.; Bin, E. P.; V, D. A.; Gelpi, R. J. (2021). "Myocardial remote ischemic preconditioning: from cell biology to clinical application." Mol Cell Biochem 476(10): 3857-3867.

- Dull, T.; Zufferey, R.; Kelly, M.; Mandel, R. J.; Nguyen, M.; Trono, D.; Naldini, L. (1998). "*A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system.*" Journal of Virology 72(11): 8463-8471.
- Elder, A. D.; Domin, A.; Kaminski Schierle, G. S.; Lindon, C.; Pines, J.; Esposito, A.; Kaminski, C. F. (2008). "*A quantitative protocol for dynamic measurements of protein interactions by Förster resonance energy transfer-sensitized fluorescence emission.*" Journal of The Royal Society Interface 6(suppl_1): 59 - 81.
- Evans, A. M. (2006). "*AMP-activated protein kinase and the regulation of Ca²⁺ signalling in O₂-sensing cells.*" J Physiol 574(Pt 1): 113-123.
- Evans, A. M.; Hardie, D. G. (2020). "*AMPK and the Need to Breathe and Feed: What's the Matter with Oxygen?*" Int J Mol Sci 21(10).
- Evans, A. M.; Mahmoud, A. D.; Moral-Sanz, J.; Hartmann, S. (2016). "*The emerging role of AMPK in the regulation of breathing and oxygen supply.*" Biochemical Journal 473(17): 2561-2572.
- Fisher, A. B.; Dodia, C. (1981). "*Lung as a model for evaluation of critical intracellular PO₂ and PCO.*" American Journal of Physiology 241(1): E47-50.
- Förster, T. (1948). "*Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz.*" Annalen der Physik 437(1-2): 55-75.
- Foster, M. N.; Coetzee, W. A. (2016). "*KATP Channels in the Cardiovascular System.*" Physiol Rev 96(1): 177-252.
- Frigault, M. M.; Lacoste, J.; Swift, J. L.; Brown, C. M. (2009). "*Live-cell microscopy - tips and tools.*" J Cell Sci 122(Pt 6): 753-767.
- Galie, N.; Humbert, M.; Vachiery, J.; Gibbs, S. L., I.; Torbicki, A.; Simonneau, G.; Peacock, A.; Vonk Noordegraaf, A.; Beghetti, M.; Ghofrani, A.; Sanchez, M.; Hansmann, G.; Klepetko, W.; Lancellotti, P.; Matucci, M.; McDonagh, T.; Pierard, L.; Trindade, P. T.; Zompatori, M.; Hoeper, M. (2015). "*The 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: a practical chronicle of progress.*" Eur Respir J 46(4): 879-882.
- Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R. (1977). "*Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.*" J Gen Virol 36(1): 59-74.
- Gupte, R. S.; Rawat, D. K.; Chettimada, S.; Cioffi, D. L.; Wolin, M. S.; Gerthoffer, W. T.; McMurtry, I. F.; Gupte, S. A. (2010). "*Activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase promotes acute hypoxic pulmonary artery contraction.*" J Biol Chem 285(25): 19561-19571.
- Heinrich, P. C.; Müller, M.; Graeve, L. (2006). Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg, Springer Verlag.
- Hillier, S. C.; Graham, J. A.; Hanger, C. C.; Godbey, P. S.; Glenny, R. W.; Wagner, W. W., Jr. (1997). "*Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules.*" J Appl Physiol (1985) 82(4): 1084-1090.
- Hinchy, E. C.; Gruszczczyk, A. V.; Willows, R.; Navaratnam, N.; Hall, A. R.; Bates, G.; Bright, T. P.; Krieg, T.; Carling, D.; Murphy, M. P. (2018). "*Mitochondria-derived ROS activate AMP-activated protein kinase (AMPK) indirectly.*" J Biol Chem 293(44): 17208-17217.

- Hochreiter, B.; Garcia, A. P.; Schmid, J. A. (2015). "*Fluorescent proteins as genetically encoded FRET biosensors in life sciences.*" Sensors (Basel) 15(10): 26281-26314.
- Horn, F. (2009). Biochemie des Menschen. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Huppelsberg, J.; Walter, K.; Huckstorf, C.; Gusta, M.; Gusta, P. (2009). Kurzlehrbuch Physiologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Hussain, S. A. (2009). "*An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET).*"
- Imamura, H.; Nhat, K. P.; Togawa, H.; Saito, K.; Iino, R.; Kato-Yamada, Y.; Nagai, T.; Noji, H. (2009). "*Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators.*" Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(37): 15651-15656.
- Ishikawa-Ankerhold, H. C.; Ankerhold, R.; Drummen, G. P. (2012). "*Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM.*" Molecules 17(4): 4047-4132.
- Kafri, T. (2004). "*Gene delivery by lentivirus vectors an overview.*" Methods Mol Biol 246: 367-390.
- Kioka, H.; Kato, H.; Fujikawa, M.; Tsukamoto, O.; Suzuki, T.; Imamura, H.; Nakano, A.; Higo, S.; Yamazaki, S.; Matsuzaki, T.; Takafuji, K.; Asanuma, H.; Asakura, M.; Minamino, T.; Shintani, Y.; Yoshida, M.; Noji, H.; Kitakaze, M.; Komuro, I.; Asano, Y.; Takashima, S. (2014). "*Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation.*" Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 111(1): 273-278.
- Kneen, M.; Farinas, J.; Li, Y.; Verkman, A. S. (1998). "*Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator.*" Biophys J 74(3): 1591-1599.
- Kovacs, G.; Berghold, A.; Scheidl, S.; Olschewski, H. (2009). "*Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review.*" European Respiratory Journal 34(4): 888-894.
- Labbe, R. P.; Vessillier, S.; Rafiq, Q. A. (2021). "*Lentiviral Vectors for T Cell Engineering: Clinical Applications, Bioprocessing and Future Perspectives.*" Viruses 13(8).
- Leach, R. M.; Hill, H. S.; Snetkov, V. A.; Ward, J. P. (2002). "*Hypoxia, energy state and pulmonary vasomotor tone.*" Respir Physiol Neurobiol 132(1): 55-67.
- Leach, R. M.; Sheehan, D. W.; Chacko, V. P.; Sylvester, J. T. (2000). "*Energy state, pH, and vasomotor tone during hypoxia in precontracted pulmonary and femoral arteries.*" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 278(2): L294-304.
- Legouis, D.; Faivre, A.; Cippa, P. E.; de Seigneux, S. (2020). "*Renal gluconeogenesis: an underestimated role of the kidney in systemic glucose metabolism.*" Nephrol Dial Transplant.
- Li, X.; Rapedius, M.; Baukowitz, T.; Liu, G. X.; Srivastava, D. K.; Daut, J.; Hanley, P. J. (2010). "*5-Hydroxydecanoate and coenzyme A are inhibitors of native sarcolemmal KATP channels in inside-out patches.*" Biochim Biophys Acta 1800(3): 385-391.
- Lohman, A. W.; Billaud, M.; Isakson, B. E. (2012). "*Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall.*" Cardiovascular Research 95(3): 269-280.

- Marshall, C.; Marshall, B. E. (1983). "Influence of perfusate PO₂ on hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats." Circ Res 52(6): 691-696.
- Merten, O. W.; Hebben, M.; Bovolenta, C. (2016). "Production of lentiviral vectors." Mol Ther Methods Clin Dev 3: 16017.
- Morciano, G.; Imamura, H.; Patergnani, S.; Pedriali, G.; Giorgi, C.; Pinton, P. (2020). "Measurement of ATP concentrations in mitochondria of living cells using luminescence and fluorescence approaches." Methods Cell Biol 155: 199-219.
- Morimoto, Y.; Arai, T.; Kikuchi, M.; Nakajima, S.; Nakamura, H. (1994). "Effect of low-intensity argon laser irradiation on mitochondrial respiration." Lasers Surg Med 15(2): 191-199.
- Murray, T. R.; Chen, L.; Marshall, B. E.; Macarak, E. J. (1990). "Hypoxic contraction of cultured pulmonary vascular smooth muscle cells." Am J Respir Cell Mol Biol 3(5): 457-465.
- Nazzareno Galie, M. H., Jean-Luc Vachiery, Simon Gibbs, Irene Lang, Adam Torbicki, Gerald Simonneau, Andrew Peacock, Anton Vonk Noordegraaf, Maurice Beghetti, Ardeschir Ghofrani, Miguel Angel Gomez Sanchez, Georg Hansmann, Walter Klepetko, Patrizio Lancellotti, Marco Matucci, Theresa McDonagh, Luc A. Pierard, Pedro T. Trindade, Maurizio Zompatori and Marius Hoeper (2015). "2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS)." Nazzareno Galie, Marc Humbert, Jean-Luc Vachiery, Simon Gibbs, Irene Lang, Adam Torbicki, Gerald Simonneau, Andrew Peacock, Anton Vonk Noordegraaf, Maurice Beghetti, Ardeschir Ghofrani, Miguel Angel Gomez Sanchez, Georg Hansmann, Walter Klepetko, Patrizio Lancellotti, Marco Matucci, Theresa McDonagh, Luc A. Pierard, Pedro T. Trindade, Maurizio Zompatori and Marius Hoeper. Eur Respir J 2015; 46: 903-975." European Respiratory Journal 46(6): 1855-1856.
- Noma, A. (1983). "ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle." Nature 305(5930): 147-148.
- Nunnari, J.; Suomalainen, A. (2012). "Mitochondria: in sickness and in health." Cell 148(6): 1145-1159.
- O'Rourke, B. (2000). "Myocardial K(ATP) channels in preconditioning." Circ Res 87(10): 845-855.
- Padilla-Parra, S.; Tramier, M. (2012). "FRET microscopy in the living cell: different approaches, strengths and weaknesses." Bioessays 34(5): 369-376.
- Pak, O.; Scheibe, S.; Esfandiary, A.; Gierhardt, M.; Sydykov, A.; Logan, A.; Fysikopoulos, A.; Veit, F.; Hecker, M.; Kroschel, F.; Quanz, K.; Erb, A.; Schafer, K.; Fassbinder, M.; Alebrahimdehkordi, N.; Ghofrani, H. A.; Schermuly, R. T.; Brandes, R. P.; Seeger, W.; Murphy, M. P.; Weissmann, N.; Sommer, N. (2018). "Impact of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ on hypoxia-induced pulmonary hypertension." Eur Respir J.
- Pattison, D. I.; Davies, M. J. (2006). "Actions of ultraviolet light on cellular structures." EXS(96): 131-157.
- Petkov V., D. D. (2003). "Pulmonale Hypertonie." Journal of Hypertonie.

- Pietraszewska-Bogiel, A.; Gadella, T. W. (2011). "FRET microscopy: from principle to routine technology in cell biology." J Microsc 241(2): 111-118.
- Purins, K.; Enblad, P.; Sandhagen, B.; Lewen, A. (2010). "Brain tissue oxygen monitoring: a study of in vitro accuracy and stability of Neurovent-PTO and Licox sensors." Acta Neurochir (Wien) 152(4): 681-688.
- Rabinovitch, M. (2012). "Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension." Journal of Clinical Investigation 122(12): 4306-4313.
- Rajendran, M.; Dane, E.; Conley, J.; Tantama, M. (2016). "Imaging Adenosine Triphosphate (ATP)." Biological Bulletin 231(1): 73-84.
- Rassow, J.; Hauser, K.; Netzker, R.; Deutzmann, R. (2016). Biochemie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Robertson, T. P.; Mustard, K. J.; Lewis, T. H.; Clark, J. H.; Wyatt, C. N.; Blanco, E. A.; Peers, C.; Hardie, D. G.; Evans, A. M. (2008). "AMP-activated protein kinase and hypoxic pulmonary vasoconstriction." European Journal of Pharmacology 595(1-3): 39-43.
- Rosignol, R.; Gilkerson, R.; Aggeler, R.; Yamagata, K.; Remington, S. J.; Capaldi, R. A. (2004). "Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells." Cancer Res 64(3): 985-993.
- Sanderson, M. J.; Smith, I.; Parker, I.; Bootman, M. D. (2014). "Fluorescence microscopy." Cold Spring Harb Protoc 2014(10): pdb top071795.
- Schumacker, P. T. (2011). "Lung cell hypoxia: role of mitochondrial reactive oxygen species signaling in triggering responses." Proceedings of the American Thoracic Society 8(6): 477-484.
- Silbernagel, S.; Despopoulos, A. (2012). Taschenatlas Physiologie. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.
- Silbernagl, S.; Despopoulos, A. (2012). Taschenatlas Physiologie. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.
- Simonneau, G.; Galie, N.; Rubin, L. J.; Langleben, D.; Seeger, W.; Domenighetti, G.; Gibbs, S.; Lebrec, D.; Speich, R.; Beghetti, M.; Rich, S.; Fishman, A. (2004). "Clinical classification of pulmonary hypertension." Journal of the American College of Cardiology 43(12 Suppl S): 5S-12S.
- Simonneau, G.; Gatzoulis, M. A.; Adatia, I.; Celermajer, D.; Denton, C.; Ghofrani, A.; Gomez Sanchez, M. A.; Krishna Kumar, R.; Landzberg, M.; Machado, R. F.; Olschewski, H.; Robbins, I. M.; Souza, R. (2013). "Updated clinical classification of pulmonary hypertension." Journal of the American College of Cardiology 62(25 Suppl): D34-41.
- Simonneau, G.; Montani, D.; Celermajer, D. S.; Denton, C. P.; Gatzoulis, M. A.; Krowka, M.; Williams, P. G.; Souza, R. (2019). "Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension." Eur Respir J 53(1).
- Sommer, N.; Alebrahimdehkordi, N.; Pak, O.; Knoepp, F.; Strielkov, I.; Scheibe, S.; Dufour, E.; Andjelkovic, A.; Sydykov, A.; Saraji, A.; Petrovic, A.; Quanz, K.; Hecker, M.; Kumar, M.; Wahl, J.; Kraut, S.; Seeger, W.; Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A.; Ramser, K.; Braun, T.; Jacobs, H. T.; Weissmann, N.; Szibor, M. (2020). "Bypassing mitochondrial complex III using alternative oxidase inhibits acute pulmonary oxygen sensing." Sci Adv 6(16): eaba0694.

- Sommer, N.; Dietrich, A.; Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A.; Gudermann, T.; Schulz, R.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Weissmann, N. (2008). "*Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms.*" European Respiratory Journal 32(6): 1639-1651.
- Sommer, N.; Huttemann, M.; Pak, O.; Scheibe, S.; Knoepp, F.; Sinkler, C.; Malczyk, M.; Gierhardt, M.; Esfandiary, A.; Kraut, S.; Jonas, F.; Veith, C.; Aras, S.; Sydykov, A.; Alebrahimdehkordi, N.; Giehl, K.; Hecker, M.; Brandes, R. P.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Ghofrani, H. A.; Schermuly, R. T.; Grossman, L. I.; Weissmann, N. (2017). "*Mitochondrial Complex IV Subunit 4 Isoform 2 Is Essential for Acute Pulmonary Oxygen Sensing.*" Circulation Research 121(4): 424-438.
- Sommer, N.; Pak, O.; Schorner, S.; Derfuss, T.; Krug, A.; Gnaiger, E.; Ghofrani, H. A.; Schermuly, R. T.; Huckstorf, C.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Weissmann, N. (2010). "*Mitochondrial cytochrome redox states and respiration in acute pulmonary oxygen sensing.*" Eur Respir J 36(5): 1056-1066.
- Sommer, N.; Strielkov, I.; Pak, O.; Weissmann, N. (2016). "*Oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction.*" European Respiratory Journal 47(1): 288-303.
- Staub, N. C. (1985). "*Site of hypoxic pulmonary vasoconstriction.*" Chest 88(4): 240 - 245.
- Stepanenko, A. A.; Dmitrenko, V. V. (2015). "*HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution.*" Gene 569(2): 182-190.
- Strielkov, I.; Pak, O.; Sommer, N.; Weissmann, N. (2017). "*Recent advances in oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction.*" Journal of Applied Physiology (1985) 123(6): 1647-1656.
- Sylvester, J. T. (2001). "*Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a radical view.*" Circulation Research 88(12): 1228-1230.
- Sylvester, J. T.; Shimoda, L. A.; Aaronson, P. I.; Ward, J. P. (2012). "*Hypoxic pulmonary vasoconstriction.*" Physiological Reviews 92(1): 367-520.
- Teramoto, N. (2006). "*Physiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels in smooth muscle.*" J Physiol 572(Pt 3): 617-624.
- Theissen, I.; Meissner, A. (1996). "*Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion.*" Der Anaesthesist 45: 643 – 652
- Turrens, J. F. (2003). "*Mitochondrial formation of reactive oxygen species.*" J Physiol 552(Pt 2): 335-344.
- Turzo, M.; Vaith, J.; Lasitschka, F.; Weigand, M. A.; Busch, C. J. (2018). "*Role of ATP-sensitive potassium channels on hypoxic pulmonary vasoconstriction in endotoxemia.*" Respir Res 19(1): 29.
- Veit, F.; Pak, O.; Brandes, R. P.; Weissmann, N. (2015). "*Hypoxia-dependent reactive oxygen species signaling in the pulmonary circulation: focus on ion channels.*" Antioxid Redox Signal 22(6): 537-552.
- Vonk Noordegraaf, A.; Galie, N. (2011). "*The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension.*" European Respiratory Review 20(122): 243-253.

- Waypa, G. B.; Chandel, N. S.; Schumacker, P. T. (2001). "Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing." Circulation Research 88(12): 1259-1266.
- Waypa, G. B.; Schumacker, P. T. (2005). "Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing." J Appl Physiol (1985) 98(1): 404-414.
- Waypa, G. B.; Smith, K. A.; Schumacker, P. T. (2016). "O₂ sensing, mitochondria and ROS signaling: The fog is lifting." Molecular Aspects of Medicine 47-48: 76-89.
- Weissmann, N.; Dietrich, A.; Fuchs, B.; Kalwa, H.; Ay, M.; Dumitrascu, R.; Olschewski, A.; Storch, U.; Mederos y Schnitzler, M.; Ghofrani, H. A.; Schermuly, R. T.; Pinkenburg, O.; Seeger, W.; Grimminger, F.; 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.
- Weissmann, N.; Grimminger, F.; Walmrath, D.; Seeger, W. (1995). "Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs." Respir Physiol 100(2): 159-169.
- Weissmann, N.; Sommer, N.; Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A.; Seeger, W.; Grimminger, F. (2006). "Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction." Cardiovascular Research 71(4): 620-629.
- Welsh, D. J.; Peacock, A. J. (2013). "Cellular responses to hypoxia in the pulmonary circulation." High Alt Med Biol 14(2): 111-116.
- Wilcox, S. R.; Karbrhel, C.; Channick, R. N. (2015). "Pulmonary Hypertension and Right Ventricular Failure in Emergency Medicine." Annals of emergency medicine 66(6): 619 - 628.
- Yang, M.; Dart, C.; Kamishima, T.; Quayle, J. M. (2020). "Hypoxia and metabolic inhibitors alter the intracellular ATP:ADP ratio and membrane potential in human coronary artery smooth muscle cells." PeerJ 8: e10344.
- Zhang, B.; Metharom, P.; Jullie, H.; Ellem, K. A.; Cleghorn, G.; West, M. J.; 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.

11 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. 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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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 an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Svenja Hirsch

12 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bedanken bei:

- PD Dr. Natascha Sommer für die Themenvergabe, die gesamte Betreuung während der Laborzeit und darüber hinaus, der Hilfestellung bei Verfassung der Dissertation und der umfangreichen Korrekturarbeit.
- Prof. Dr. Norbert Weissmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie die apparative und finanzielle Unterstützung für die Durchführung dieser Arbeit.
- Dr. Oleg Pak für die Unterstützung bei jeglichen Laborarbeiten, sei es bei primären Zellen, S2-Arbeiten oder dem konfokalen Mikroskop. Und auch für die Bereitschaft meine Fragen zu beantworten.
- Dr. Beate Fuchs für die Einarbeitung in die Thematik und die Unterstützung beim Erlernen der Labortechniken besonders im Bezug auf die Arbeit mit viralen Vektoren und dem konfokalen Mikroskop.
- Unser Kooperationspartnerin Dr. rer. nat. Maren Mieth aus der Charité Berlin für die Bereitstellung der ATP-Sensor Plasmide und der dazugehörigen Referenz-Fluoreszenzplasmide.
- Carmen Homberger, Elisabeth Kappes, Ingrid Breitenborn-Müller, Karin Quanz für eure vielen Erklärungen und technischen Hilfestellungen in der Molekularbiologie, Zellkultur sowie organisatorischen Fragen rund um das Labor.
- Gesamten ECCPS-Team für die nette und hilfsbereite Atmosphäre im Labor, so ließ sich manch ein Rückschlag doch besser überwinden.

Auch möchte ich meiner Familie und meine Freunden danken, die an mich glauben haben, wenn ich es nicht mehr tat und mich immer wieder motiviert haben weiter zu machen. Felix, dir möchte ich ganz besonders Danken. Diese Arbeit hat uns beide einiges an Nerven gekostet. Du warst mir eine riesige Hilfe beim Schreibprozess, jede thematische Diskussion mit dir hat mich vorwärts gebracht. Danke, dass du ein offenes Ohr für meine Fragen und Zeit für das Korrekturlesen der Arbeit hattest. Danke, dass du mich immer wieder ermutigt hast.