

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Frank Czubayko

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Die physiologische Funktion von TRPC6 in Endothelzellen und
glatten Muskelzellen der Lunge**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Humanbiologie**

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Hermann Kalwa

aus Bielefeld

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 10.07. 2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Alexander Dietrich

Korreferent: Prof. Dr. Carsten Culmsee

Denn was man schwarz auf weiß besitzt, kann man getrost nach Hause tragen!

(Goethe, Faust I).

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Calciumionen als „second messenger“	1
1.2 Signaltransduktionskaskaden zur Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration und zur Ca ²⁺ -Homöostase	2
1.3 Der Phospholipidstoffwechsel.....	3
1.4 Die „Superfamilie“ der transient receptor potential TRP-Kanäle in Säugern.....	5
1.4.1 Die TRPC Familie.....	6
1.4.2 Der TRPC6-Kanal.....	8
1.5. Lokalisation und Funktion von glatten Muskelzellen und Endothelzellen in den Blutgefäßen der Lunge.....	10
1.6 Funktion glatter Muskelzellen der Lungenstrombahn bei der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV).....	12
1.6.1 Entdeckung und Formen der HPV	12
1.6.2 Hypothesen zur Entstehung der HPV in glatten Muskelzellen der Lungenstrombahn	13
1.6.3 Die Rolle exogener Mediatoren auf die HPV	14
1.6.4 Die Bedeutung von Calciumionen für die HPV in glatten Muskelzellen der Lungenstrombahn.....	15
1.7 Rolle der Endothelzellen beim Ischämie-Reperfusionsschaden der Lunge	16
1.8 Zielsetzung der vorliegenden Untersuchungen.....	18
2. Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1. Chemikalien	20
2.1.2. Enzyme, Kits und Marker	20
2.1.3. Reaktionsgefäße und Kunststoffmaterial	21
2.1.4. Geräte	21
2.1.5.Zelllinien und Nährmedien.....	22
2.1.6. Primer	23
2.1.7. Antikörper	24
2.1.8.Puffer	25
2.1.9. Plasmide	25
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	26
2.2.2. Herstellung von Proteinlysat	26
2.2.3.SDS-PAGE.....	27
2.2.4. Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen	27
2.2.5. Immunblot (Immunanfärbung des Western-Blot).....	28
2.2.6. Immunofluoreszenzfärbung	29
2.2.7. DAG-Kinase Aktivitäts Assay :	31
2.2.8. Kultivierung von Zellen	31
2.2.9. Isolierung glatter Muskelzellen aus der thorakalen Aorta der Maus	32
2.2.10. Isolierung der PASMC.....	32
2.2.11. Isolierung von murinen Lungendothelzellen (MLEC).....	33
2.2.12. Kryokonservierung kultivierter Zellen.....	33
2.2.13. Integration von cDNAs in primäre Zellen mittels Infektion durch rekombinante Adeno-Assoziierte- (AAV) und Lenti-Viren	34
2.2.14. Transiente Transfektion.....	34
2.3 Funktionelle Meßmethoden.....	35
2.3.1. Messung der normobaren Sauerstoffkonzentration des hypoxischen Perfusats	35

Inhaltsverzeichnis

2.3.2. Konfokale Mikroskopie.....	36
2.3.3. Transfektion und Detektion eines Diacylglycerin (DAG) Sensormoleküls.....	36
2.3.4. Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit Fura-2.....	37
2.3.5. Vorbereiten der Zellen zur Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit Fura-2.....	37
2.3.6. Beladung der transfizierten Zellen mit dem Calciumindikator Fura2-AM.....	38
2.3.7. Manganionen-„Quenching“	38
2.3.8. Impedanzmessung	39
2.4 Statistik.....	40
3. Ergebnisse	41
3.1. Isolation von glatten Muskelzellen und Endothelzellen aus der Lunge.....	41
3.2. Expression von TRPC-Kanälen in pulmonalen glatten Muskelzellen (PASMC) und Endothelzellen der Lunge (mLEC)	42
3.3 Etablierung eines fluorimetrischen Meßsystems mit hypoxischem Perfusat als Stimulus	43
3.4. Untersuchungen zum Hypoxie-induzierten Kationeneinstrom in PASMC aus TRPC6-defizienten und Wildtyp- Mäusen	44
3.4 Identifikation von Komponenten der Signaltransduktionskaskade von der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies bis zur Aktivierung von TRPC6-Kanälen	49
3.5. Untersuchungen zum Hypoxie-induzierten Kationeneinstrom in Endothelzellen aus TRPC6-defizienten und Wildtyp- Mäusen.....	53
3.6. Bedeutung des Ca^{2+} -Einstroms für den Verlust der pulmonalen Endothelzellbarriere..	57
3.7 Identifizierung von Komponenten der Signaltransduktion zur Aktivierung von TRPC6 in Endothelzellen.....	61
3.8 Untersuchungen zur Rolle von DAG-Kinasen bei der Hypoxie-induzierten Aktivierung von TRPC6.....	64
4. Diskussion	69
4.1 Zelluläre Isolationstechniken	69
4.2 Nachweis von TRPC6 in den Zielzellen	70
4.3 Etablierung des hypoxischen Meßsystems.....	71
4.4 Hypoxie-induzierter Ca^{2+} -Einstrom in präkapilläre pulmonale arterielle glatte Muskelzellen (PASMC)	72
4.5 Hypoxie-induzierter Ca^{2+} -Einstrom in Lungenedothelzellen (LEC)	75
4.6 Ionenkanäle in PASMC und LEC für den Hypoxie-induzierten Ca^{2+} -Einstrom	76
4.7 Auswirkungen des Hypoxie-induzierten Ca^{2+} -Einstroms auf die Morphologie der PASMC und LEC.....	77
4.8 Akkumulation von DAG und Modulation der DAG-Kinasen durch Hypoxie	79
4.9 Abschließende Betrachtung und Ausblick	82
5. Zusammenfassung.....	84
6. Literaturverzeichnis.....	86
7. Danksagung.....	92
8. Lebenslauf.....	94
9. Ehrenwörtliche Erklärung.....	95
10. Eigene Publikationen.....	96
11. Verzeichnis der akademischen Lehrer	101

1. Einleitung

1. Einleitung

In jedem vielzelligen Organismus müssen physiologische Prozesse durch extrazelluläre Botenstoffe wie Hormone, Wachstumsfaktoren oder Neurotransmitter koordiniert werden.

Dabei reagiert jede Zelle, eingebettet in komplexe Organe oder Systeme, auf umfangreiche Informationsmuster ihrer Umgebung in Abhängigkeit von ihrem Rezeptorexpressionsstatus. Verschiedenartige membranständige Rezeptoren und die nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden sorgen dafür, dass eine Zelle organ- oder systemspezifisch wächst, proliferiert, sich differenziert, migriert und schließlich stirbt. Nur so trägt sie zum Nutzen bei und fügt dem Gesamtorganismus keinen Schaden zu. Die Erforschung der Proteine und intrazellulären Botenstoffe (sog. „second messenger“), die an diesen Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind, ermöglicht es auch, viele pathologische Vorgänge im Körper besser zu verstehen.

1.1. Calciumionen als „second messenger“

Die Calciumkonzentration im Zytosol einer ruhenden Zelle beträgt normalerweise ungefähr $0,1 \mu\text{M}$. Um diese niedrige Konzentration aufrecht zu erhalten, pumpt die Zelle ständig unter Aufwand von Energie Calciumionen, die durch die Membranen diffundiert sind, in den Extrazellulärraum oder in die internen Calciumspeicher zurück (plasmamembranäre- Ca^{2+} -Pumpen [PMCA] und Ca^{2+} -Pumpen des sarkoplasmatischen/endoplasmatischen Retikulums [SERCA]). Diese aufwendige Strategie hat zwei Gründe. Zum einen muss die Zelle der Präzipitation von Calciumphosphaten vorbeugen, da eine hohe Konzentration an phosphorylierten Verbindungen in der Zelle den Energiestoffwechsel gewährleistet. Zum anderen gibt es vielfältige Signaltransduktionswege, die durch eine erhöhte zytoplasmatische Calciumkonzentration ausgelöst werden. Calciumionen sind wichtige „second messenger“, die über calciumsensitive Proteine wie Calmodulin (CaM), „Myosin-Light-Chain-Kinase“ (MLCK) und Troponin C (TnC) die Kontraktion in Muskelzellen steuern sowie über Calmodulinkinasen (CaMKs), Calcineurin und

1. Einleitung

Transkriptionsfaktoren unter anderem die Proliferation, Fertilisation und Lernvorgänge regulieren (siehe Abb. 1 und (Berridge, Lipp et al. 2000)) .

1.2 Signaltransduktionskaskaden zur Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration und zur Ca^{2+} -Homöostase

Phospholipasen C (PLC) stellen einen Konvergenzpunkt zwischen der durch G-Proteine und durch Tyrosinkinase vermittelten Signaltransduktion zur Freisetzung von Calciumionen aus den internen Speichern dar. Heptahelikale Rezeptoren, die die Plasmamembran mit sieben α -helikalen Domänen durchqueren, gehören mit mehr als tausend Mitgliedern zu einer der größten Genfamilien. Das breite Spektrum möglicher Liganden reicht von Aminosäuren, biogenen Aminen, Lipiden und Proteinhormonen bis hin zu den Glykoproteinhormonen und extrazellulären Calciumionen. Die meisten dieser Rezeptoren benötigen heterotrimere G-Proteine (siehe 1.3), die als molekulare Schalter die Signaltransduktion zwischen dem Rezeptor und den Effektoren wie Adenylylzyklasen und Phospholipasen C vermitteln (Gudermann, Schoneberg et al. 1997). Während Adenylylzyklase den „second messenger“ cAMP produzieren, der wiederum cAMP-abhängige Proteinkinase aktiviert, sorgen Phospholipasen C (PLC) für die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) (siehe 1.4). DAG kann Proteinkinase C aktivieren und sorgt über die Aktivierung von „Transient-receptor-potential“ TRP-Kanälen für einen Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum. IP_3 hingegen bindet an die IP_3 -Rezeptoren, die sich in der Membran der intrazellulären Calciumspeicher, z.B. des endoplasmatischen Retikulums, befinden. Durch eine Konformationsänderung öffnen sich IP_3 -Rezeptoren und entlassen Ca^{2+} ins Zytoplasma der Zelle. Parallel dazu existiert ein zweiter Signaltransduktionsweg über aktivierte Rezeptortyrosinkinase. Die Autophosphorylierung dieser Rezeptoren sorgt dafür, dass Phospholipase C- γ -Isoenzyme, die über SH2-Domänen an diese Rezeptoren binden können, phosphoryliert und aktiviert werden. Phospholipase C- γ kann dann wie die PLC β -Isoenzyme IP_3 generieren und bewirkt so eine Öffnung der IP_3 -Rezeptoren, um

1. Einleitung

Calciumionen aus den internen Speichern freizusetzen. Die Aktivierung von TRPC-Kanälen führt zu einem Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum (siehe Abb.1).

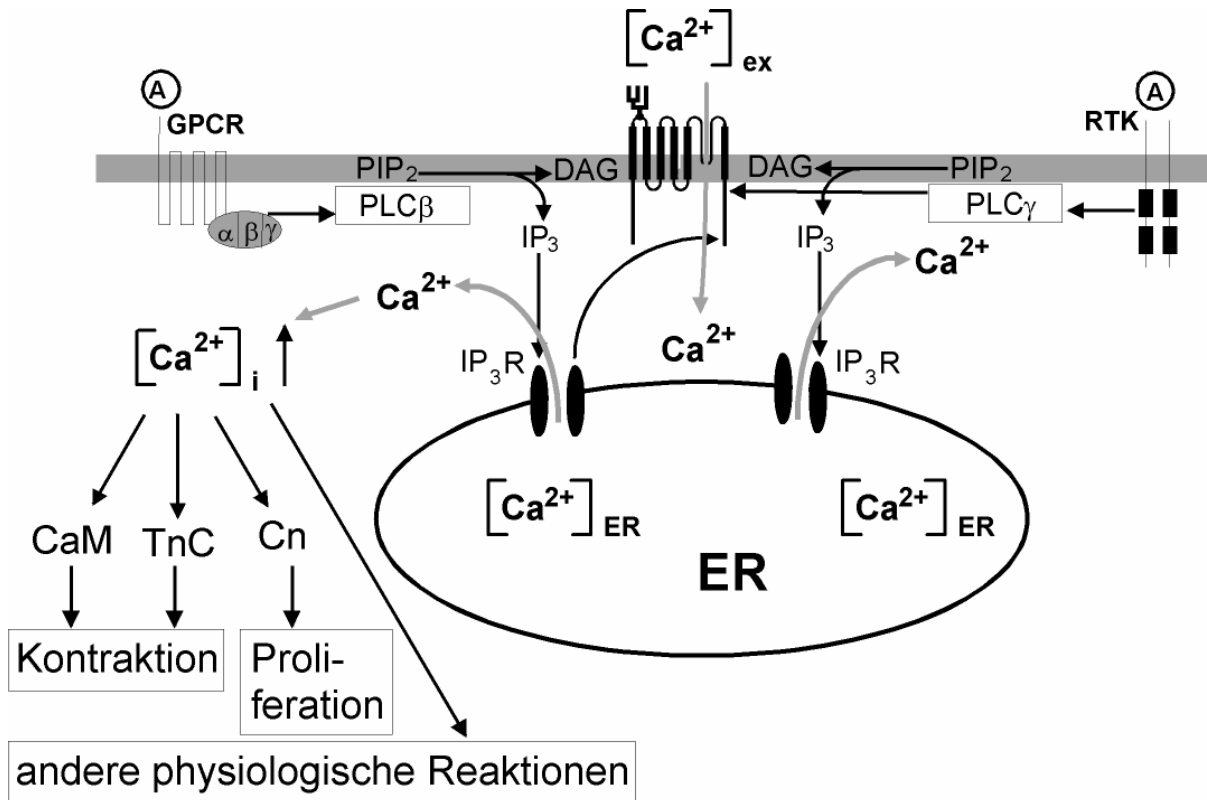


Abbildung 1: Darstellung der Signaltransduktionskaskaden zur Ca^{2+} -Freisetzung.

Siehe Text für eine detaillierte Darstellung. A, Agonist; GPCR, G-Protein-gekoppelter Rezeptor; $\alpha\beta\gamma$, G-Protein mit α -, β - und γ -Untereinheiten; PLC, Phospholipase C; PIP_2 , Phosphatidyl-inositolbisphosphat; IP_3 , Inositoltrisphosphat; IP_3R , Inositoltrisphosphatrezeptor; DAG, Diacylglycerin; RTK, Rezeptortyrosinkinase; Ca^{2+} , Calciumionen; $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$, intrazelluläre, zytoplasmatische Calciumkonzentration; $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$, extrazelluläre Calciumkonzentration; ER, endoplasmatisches Retikulum; CaM, Calmodulin; TnC, Troponin C; Cn, Calcineurin.

1.3 Der Phospholipidstoffwechsel

Wie oben bereits geschildert wird durch die Erhöhung der Aktivität der PLC-Isoenzyme ein membranständiges Phospholipid, das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) am dritten C-Atom des Glycerolgerüsts gespalten. Es entstehen der lösliche Botenstoff Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und ein in der Membran verbleibendes lipophiles Diacylglycerol (DAG). DAG kann nun an die cysteinreichen C1 Domänen von Isoformen der Proteinkinase C binden und zur Plasmamembran

1. Einleitung

lokalisieren. Dadurch wird auch die Kinasefunktion dieser Proteine aktiviert und zahlreiche Substrate und zelluläre Effektoren werden durch Phosphorylierung der Aminosäuren Serin und Threonin in ihrem Funktionszustand modifiziert. Neben der PKC gibt es eine Vielzahl von Proteinen, die über die für die DAG-Bindung notwendigen C1/C2 Domänen verfügen. Zur Entfernung des DAG aus dem Signalkreislauf existieren im Wesentlichen zwei Enzymsysteme: die DAG-Kinasen und die DAG-Lipasen. Die DAG-Kinase phosphoryliert DAG am dritten C-Atom und generiert damit Phosphatidsäure. Durch eine Phosphatidsäurephosphatase (PA Pase) ist diese Reaktion im Gleichgewicht. Die DAG-Lipase hydrolysiert weitere Fettsäureesterbindungen am Glycerolgerüst des DAG und produziert freie Fettsäuren und Monoacylglycerole (MAG). Das Phospholipid PIP_2 kann aber auch durch Phospholipase D (PLD) direkt in PA überführt werden. Aus PA kann dann Cytidinphosphat-DAG (CDP-DAG) entstehen, das über Phosphatidylinositol (PI) wieder in PIP_2 umgesetzt werden kann (siehe Abbildung 2).

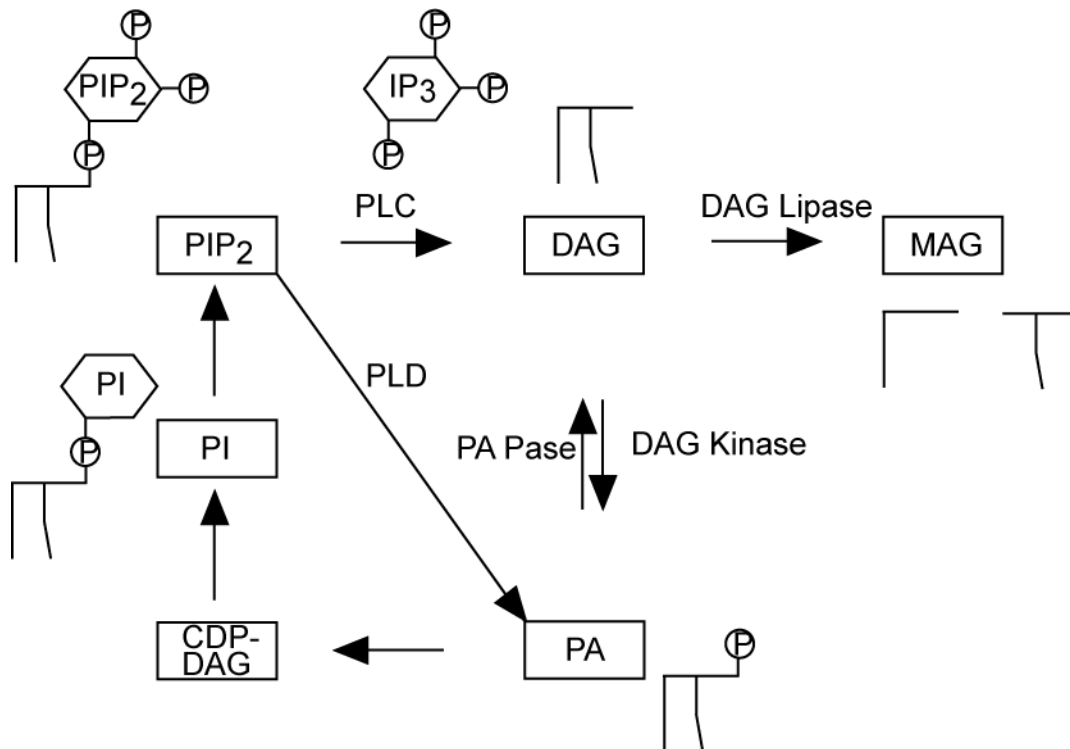


Abbildung 2: Der Phospholipidstoffwechselweg

Siehe Text für eine detaillierte Darstellung. PLC, Phospholipase C; PIP_2 , Phosphatidyl-inositolbisphosphat; IP_3 , Inositoltrisphosphat; DAG, Diacylglycerin; MAG, Monoacylglycerin, PA, Phosphatidsäure, CDP-DAG, Cytidinphosphat-DAG, PI, Phosphatidylinositol.

1. Einleitung

1.4 Die „Superfamilie“ der transient receptor potential TRP-Kanäle in Säugern

Die durch Homologie zu der „transient receptor potential“ oder trp Mutante der Fruchtfliege *Drosophila Melanogaster* entdeckten Ionenkanäle der Säugetiere werden wegen ihrer Vielzahl inzwischen als „Superfamilie“ bezeichnet (Montell and Rubin 1989; Wes, Chevesich et al. 1995). Sie lassen sich in sechs Großfamilien einteilen. So gibt es neben der TRPC Familie (C für „classical“ oder „canonical“) noch die TRPM (M für „Melastatin“), TRPV („Vanilloid“) TRPP („polycystic kidney disease“) TRPA („ankyrin rich“) und schließlich die TRPML (für Mucolipin) Familie.

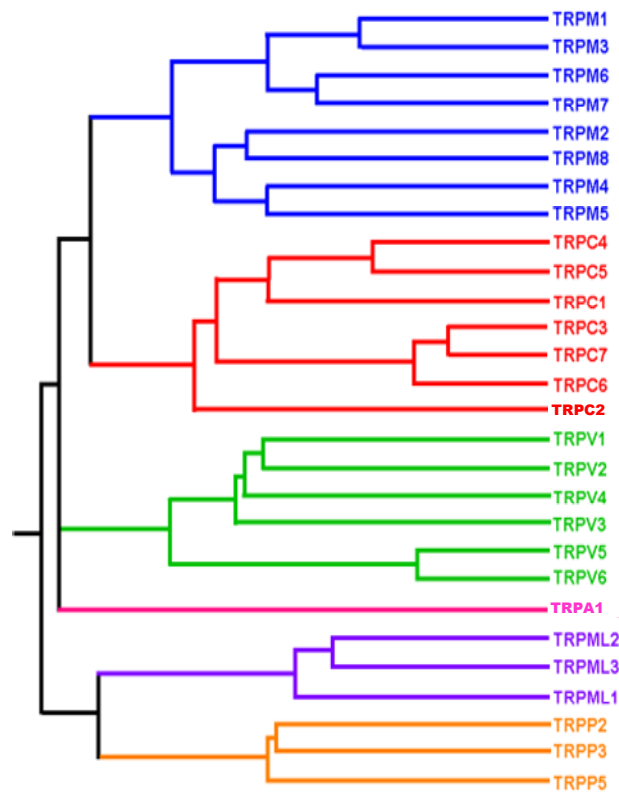


Abbildung 3: Phylogenetischer Stammbaum der TRP-Superfamilie in Säugern.

Dargestellt ist die evolutionäre Entfernung von benachbarten Proteinen. Die unterschiedlichen TRP-Familien sind farblich gekennzeichnet.

Die Mitglieder der einzelnen TRP Familien erfüllen soweit bekannt eine Vielzahl von Steuer und Detektionsfunktionen. Der bekannteste Vertreter der TRPV-Kanäle ist TRPV1, der auch als Vanilloid-Rezeptor 1 (VR1) bezeichnet wird. Er wird besonders stark in freien Nervenendigungen, die als Schmerzrezeptoren (Nozizeptoren) fungieren, exprimiert. Er kann direkt durch Capsaicin, die wirksame Substanz des Chillipeffers aktiviert werden. Auch wird seine Offenwahrscheinlichkeit durch

1. Einleitung

Temperaturänderungen im moderat warmen Bereich moduliert. So erklärt sich die Korrelation von einer scharfen Geschmacksempfindung mit einer heißen Temperaturwahrnehmung. Das funktionelle Gegenteil stellt TRPM8 dar. Dieser Kanal ist durch eine Verschiebung der Umgebungstemperatur in den kühlen Bereich oder durch Substanzen wie Menthol oder Eukalyptusöl aktivierbar. Dies entspricht den Empfindungen kalt und minzig (Clapham 2003). Die Kanäle wurden auch als Mechanosensoren (TRPV4), Resorptionsproteine für Magnesium- (TRPM6) oder Calciumionen (TRPV5) beschrieben. So wundert es nicht, daß Mutationen in Mitgliedern der TRP Familie gravierende Auswirkungen haben können. Hierbei reicht die Spanne von Speicherkrankheiten wie der Hypomagnesiämie (TRPM6) bis zu Nachtblindheit im Falle von TRPM1 (Chubanov, Schlingmann et al. 2007; Bellone, Brooks et al. 2008).

1.4.1 Die TRPC Familie

Der Buchstabe "C" im Namen dieser Familie steht für "classical" oder "canonical". Die TRPC-Kanäle zeigen die größte Ähnlichkeit zu den Drosophila TRP-Kanälen auf. Zu den TRPC-Kanälen gehören sieben Vertreter, TRPC1-TRPC7, die in drei Subfamilien eingeteilt werden. Sie weisen innerhalb der Subfamilien eine Aminosäureidentität von ca. 60-80% und zwischen den Subfamilien von 25 bis 40% auf. Obwohl sie als erste TRP-Kanäle in Säugetieren kloniert und charakterisiert wurden, ist ihre genaue physiologische Rolle immer noch nicht vollständig geklärt (Boulay, Brown et al. 1999). Alle TRPC-Kanäle sind unspezifische Ca^{2+} permeable Kationenkanäle, die durch den Einstrom von Kationen (vorwiegend Na^{+}) zu einer Depolarisierung der Zellmembran führen. Dadurch erfolgt zum Beispiel in glatten Muskelzellen die Aktivierung von spannungsabhängigen Calciumionenkanälen. Andererseits kann in Zellen ohne spannungsabhängige Calciumionenkanäle, z. B. Immunzellen, Endothelzellen oder Bindegewebszellen, durch TRPC-Kanäle auch ein direkter Calciumioneneinstrom erfolgen.

In nicht-neuronalen Säugerzellen war bereits seit langem nach Kanälen der Plasmamembran gesucht worden, die nach Entleerung der internen Speicher

1. Einleitung

Calcium aus dem Extrazellulärraum einströmen lassen. In T-Zellen war ein calciumselektiver Kanal durch Hoth und Penner charakterisiert worden, der sogenannte I_{CRAC} (= „calcium release activated Ca^{2+} “ Strom). In anderen Zelltypen wurde ein rezeptoroperierter (receptor operated calcium influx = ROC) und/oder ein speicheroperierter (store operated calcium influx = SOC) Calciumioneneinstrom gefunden. Der Calciumioneneinstrom des letzteren Kanaltyps wurde nach Applikation des Toxins Thapsigargin aktiviert. Thapsigargin hemmt die ATP-abhängigen Calciumpumpen an der Membran der intrazellulären Calciumspeicher und verhindert dadurch das Zurückpumpen durch die Membran diffundierender Calciumionen. Eine der wichtigsten Fragen war nun, ob TRP-Kanäle die molekularen Korrelate aller oder einzelner dieser beobachteten physiologischen Phänomene waren (Birnbaumer, Zhu et al. 1996). Schnell zeigte sich, dass heterolog exprimierte TRP-Kanäle zu wenig calciumselektiv für einen I_{CRAC} -Kanal der T-Zellen waren (Clapham 1996). Außerdem gab es immer wieder widersprüchliche Angaben, ob einzelne Kanäle speicheroperiert und/oder rezeptoroperiert waren, je nachdem, welches heterologe Expressionssystem oder welche Methode zur Analyse des Calciumeinstroms benutzt wurde (Clapham 2002). Als gesichert kann aber gelten, dass obwohl TRPC Kationenkanäle keine klassischen C1/C2 Domänen aufweisen, die Subfamilie TRPC 3/6/7 durch Diacylglycerin aktiviert wird (Hofmann, Obukhov et al. 1999). Es handelt sich also um rezeptoroperierte Kanäle (ROCs).

1. Einleitung

1.4.2 Der TRPC6-Kanal

TRPC6 wurde ursprünglich aus Mausgehirn-mRNA amplifiziert und ist zu 74 % identisch mit TRPC3. Der Kanal ist nach heterologer Expression Agonist-induziert, aber nicht nach Thapsigarginbehandlung speicher-operiert aktivierbar (Boulay, Zhu et al. 1997). Er wird vor allem im Gehirn und der Lunge (Boulay, Zhu et al. 1997) und in Geweben mit glatter Muskulatur exprimiert (Hofmann, Schaefer et al. 2000). Für den humanen TRPC6- und TRPC3-Kanal konnte eine Rezeptor-gesteuerte Aktivierung durch DAG unabhängig von PKC gezeigt werden (Hofmann, Obukhov et al. 1999). Eine physiologische Funktion für TRPC6-Kanäle wurde in den glatten Muskelzellen der Pfortader beschrieben. Dort konnten TRPC6-„Antisense“-Oligonukleotide den Ba^{2+} -Einstrom nach Aktivierung durch den α_1 -adrenozeptorspezifischen Agonisten Phenylephrin hemmen (Inoue, Okada et al. 2001). In kleinen Widerstandsgefäßen wie z.B. Gehirnarterien wird der sog. Bayliss-Effekt beschrieben. Hierbei führt der Anstieg des Blutdrucks zur Steigerung des myogenen Tonus und damit zur Kontraktion dieser Gefäße. Die Behandlung der Arterien mit „Antisense“-TRPC6-Oligonukleotiden führt zu einer drastischen Reduktion des myogenen Tonus im Vergleich zur Inkubation mit „Sense“-TRPC6-Oligonukleotiden. Gleichzeitig konnte eine druckinduzierte Depolarisation der Gehirnarterien durch „Antisense“-TRPC6-Oligonukleotide ebenfalls reduziert werden (Maruyama, Nakanishi et al. 2006). In der A7r5-Zelllinie aus der glatten Muskulatur der Aorta ließ sich elektrophysiologisch ein Strom beschreiben, der dem heterolog exprimierten TRPC6-Kanal sehr ähnlich ist, und eine Expression von TRPC6 und TRPC1 in diesen Zellen wurde ebenfalls nachgewiesen (Jung, Lenzian et al. 2005). Eine weitere Arbeit beschreibt, dass für die PDGF-induzierte Proliferation von pulmonalen glatten Muskelzellen eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors c-jun und TRPC6 verantwortlich gemacht werden kann (Yu, Liang et al. 2002). Im Gegensatz zu TRPC3 mit einer wesentlich höheren Basalaktivität ist TRPC6 zweifach glykosyliert (Dietrich, Mederos y Schnitzler et al. 2003). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die doppelte Glykosylierung ein wichtiger Grund für die verminderte Basalaktivität des TRPC6-Kanals im Vergleich zum TRPC3-Kanal ist (Dietrich, Mederos y Schnitzler et

1. Einleitung

al. 2003; Dietrich, Mederos et al. 2005). Durch die Phosphorylierung von TRPC6 durch die Calmodulin abhängige Kinase II (CaMK II) und die Fyn-Kinase (zur Src-Kinase-Familie gehörend) kann die Kanalaktivität erhöht werden; während durch Proteinkinase C der Kanal inaktiviert wird. Studien konnten nun zeigen, dass es in Patienten mit Ideopatischer, pulmonaler Hypertonie zu einem erhöhten Expressionsniveau von TRPC6 kommt (Kunichika, Landsberg et al. 2004; Yu, Fantozzi et al. 2004).

Aus den genannten Daten ergibt sich die Möglichkeit, dass TRPC6 eine wichtige Funktion in der Lungenstrombahn ausübt. Mögliche Funktionen gäbe es sowohl in den glatten Muskelzellen bei der Vasokonstriktion als auch in den Endothelzellen bei der Regulation von deren Barrierefunktion (Cioffi, Lowe et al. 2008).

1. Einleitung

1.5. Lokalisation und Funktion von glatten Muskelzellen und Endothelzellen in den Blutgefäßen der Lunge.

Die Säugerylunge besteht aus zwei Lungenflügeln, die in Lungenlappen unterteilt sind. Beim Menschen weist der rechte Flügel drei und der linke zwei Lungenlappen auf. Die luftleitenden Strukturen werden von den Bronchien gebildet, die sich entlang des sogenannten Bronchialbaumes mehr und mehr verästeln und schließlich in den Alveolen, dem Ort des Gasaustausches, münden. Die letzten Verzweigungen des Bronchialbaumes, die sogenannten *bronchioli terminales* bilden ein Netzwerk, in dem die Alveolen in einer weinrebenartigen Struktur dicht gepackt liegen. Dieses Endstück der luftleitenden Strukturen wird als *acinus* bezeichnet. Auf der Blutgefäßseite ist der *acinus* von einem Kapillarnetz umgeben, das aus den Pulmonalarterien des Lungenkreislaufes gebildet wird.

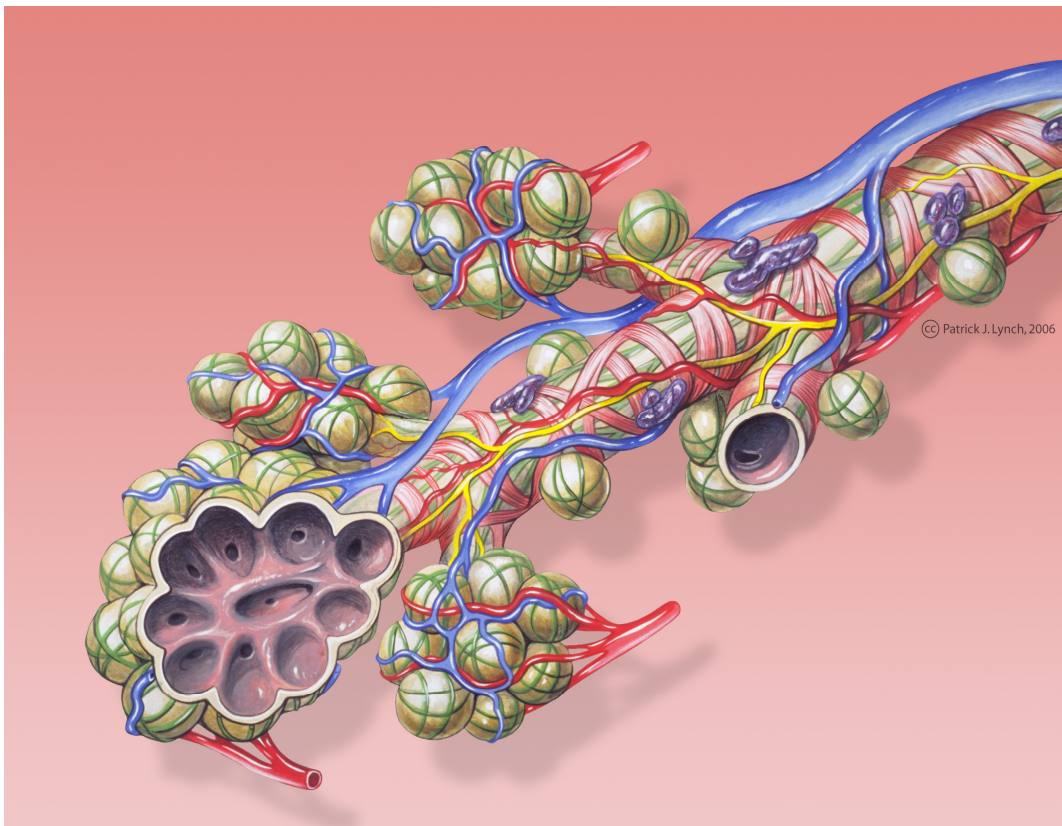


Abbildung 4: Makroskopischer Aufbau der Lungenbläschen. Deutlich lässt sich die räumliche Nähe der luftleitenden zu den blutleitenden Gefäßen erkennen. Durch die räumliche Nähe ist eine funktionelle Verschaltung zwischen Oxygenierungsgrad der Alveole und Kontraktionsstatus der Kapillare möglich.

1. Einleitung

Generell bestehen Blutgefäße aus drei Schichten, wobei die Ausprägung der einzelnen Schichten zwischen Arterien und Venen funktionsbedingt variieren. Diese Schichten sind die *tunica intima*, eine einlagige Endothelzellschicht, die *tunica media*, eine Ummantelung mit glatten Muskelzellen und die *tunica adventitia* bestehend aus Fibroblasten. Bei den Arterien ist die Muskelschicht stark ausgeprägt, da so durch Vasodilatation und Vasokonstriktion der Blutfluß reguliert und gelenkt werden kann. Venen besitzen im Gegensatz dazu keine so ausgeprägte Schichtung, jedoch sind sie meistens großlumiger und mit Klappen versehen. Der Schichtaufbau der Arterien wird bei den kleineren Lungenkapillaren vollständig aufgehoben. Hier findet sich nur die *tunica intima*, um eine bestmögliche Diffusion zu erreichen.

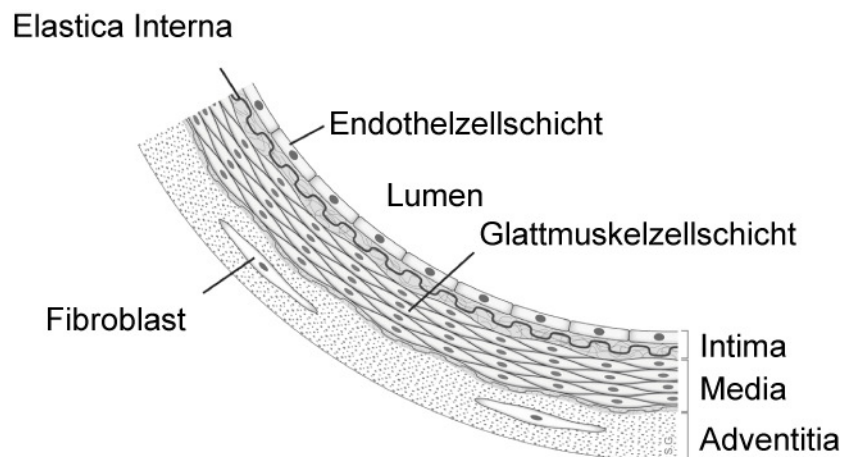


Abbildung 5: Aufbau eines arteriellen Blutgefäßes. Hervorgehoben sind Zelltypen, die insbesondere auch für die folgende Arbeit von Bedeutung sind. Die Ausprägung der einzelnen Schichten variiert in Abhängigkeit ihrer Position im Organsystem.

Entgegen der sonstigen Definition wird im Lungenkreislauf das venöse Blut vom Herzen rechtsseitig in die Pulmonalarterie gepumpt und in den alveolären Kapillaren mit Sauerstoff angereichert. Dann strömt es über die Lungenvenen zurück zum Herzen und wird linksseitig in den Körperkreislauf eingespeist. Der Gasaustausch von Kohlendioxid und Sauerstoff in den Alveolen funktioniert hierbei rein passiv, durch Ausnutzung der Partialdruckunterschiede. Dadurch stellt sich schließlich im arteriellen Blut ein Partialdruck von 100 mmHg für Sauerstoff und 40 mmHg für Kohlendioxid ein.

1. Einleitung

1.6 Funktion glatter Muskelzellen der Lungenstrombahn bei der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV)

1.6.1 Entdeckung und Formen der HPV

Von allen physiologischen Steuerungsprozessen ist die Aufrechterhaltung einer konstanten Versorgung mit Sauerstoff einer der Wichtigsten. Sauerstoff kommt eine zentrale Bedeutung bei der Energiegewinnung durch Oxidation und als Substrat vieler enzymatischer Prozesse zu. Bereits minimale Änderungen des Sauerstoffpartialdruckes im zirkulierenden Blut führen zu Bewusstseinsstrübung, Ohnmacht und schlimmstenfalls Tod. Da der Sauerstoffversorgung so eine gravierende Bedeutung zukommt, ist ihre Feinsteuerung in der Lunge besonders wichtig. Einer der zentralen Mechanismen dieser Feinsteuerung ist die Hypoxievermittelte pulmonale Vasokonstriktion (HPV) oder auch von-Euler-Liljestrand-Mechanismus (Theissen and Meissner 1996). Mechanistisch ist dies die Anpassung des präkapillären Gefäßtonus an die sich ständig ändernden Ventilationsbedingungen der nachgeschalteten Kapillaren. Durch die Kontraktion von Gefäßen, die schlecht ventilerten Alveolen vorgeschaltet sind, wird der Blutfluß in Lungenbezirke mit verbesserter Oxygenierung umgeleitet. So ist immer ein optimiertes Verhältnis von Perfusion und Sauerstoffangebot gegeben und es wird eine arterielle Hypoxämie vermieden (Fishman 1976; Sanchez de Leon, Orchard et al. 1983; Voelkel 1986). Die HPV wurde erstmalig 1946 als Anstieg des pulmonalen Drucks bei Applikation von Hypoxie durch Ulf von Euler und Carl Liljestrand beschrieben. Seit dieser Zeit bestehen kontinuierliche Bemühungen die diesem Effekt zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu entschlüsseln.

Der HPV kommt nun aber nicht nur eine wichtige physiologische sondern auch eine pathophysiologische Bedeutung zu. Eine über längere Zeit persistente Hypoxie, wie sie zum Beispiel bei chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen oder Aufenthalt in großen Höhen auftritt, kann durch die generalisierte und anhaltende Erhöhung des Gefäßwiderstandes zur pulmonalarteriellen Hypertonie mit anschließenden vaskulären Gefäßumbauprozessen führen (Jeffery and Wanstall 2001; Shimoda, Sham et al. 2002; Ghofrani, Reichenberger et al. 2004; Schermuly, Dony et al. 2005).

1. Einleitung

Für die Auslösung eines HPV Reflexes reicht bereits eine leichte Absenkung des alveolaren Sauerstoffpartialdruckes auf 80 mmHg, wobei die Intensität der Kontraktion in einer klaren Dosis-Wirkungs-Beziehung steht (Hambraeus-Jonzon, Bindslev et al. 1997; Weissmann, Tadic et al. 2000).

Es können drei Phasen der HPV unterschieden werden:

1. die akute alveoläre Phase (im Sekunden- bis Minuten Bereich)
2. die protrahierte alveoläre Hypoxie (Stunden): Der Übergang von akuten zu chronischen Prozessen.
3. die chronische Hypoxie. Sie ist durch Umbauprozesse im Lungengewebe und eine pulmonale Hypertonie gekennzeichnet.

Auch wenn die Ausprägung der HPV von vielen genetischen und umweltbedingten Faktoren abhängig zu sein scheint, lässt sich doch ein gemeinsamer und stark konservierter Mechanismus erkennen (Fishman 1976; Peake, Harabin et al. 1981; Voelkel 1986; Dumas, Bardou et al. 1999).

1.6.2 Hypothesen zur Entstehung der HPV in glatten Muskelzellen der Lungenstrombahn

Obwohl die HPV schon lange bekannt ist (Theissen and Meissner 1996), sind viele Details der Signaltransduktionskaskade, die zur Kontraktion der Pulmonalarterien führen nach wie vor unverstanden (Kato and Staub 1966; Dawson, Grimm et al. 1978; Hillier, Graham et al. 1997; Weissmann, Zeller et al. 2006). Es zeigte sich jedoch relativ früh, daß der Hypoxiesensor und die Effektormoleküle in einer Zelle zu finden sind. So reagieren glatte Muskelzellen der Lungenstrombahn auf einen hypoxischen Stimulus mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Die Stärke dieser Sensitivität gegenüber hypoxischen Ereignissen ist direkt an die Position der glatten Muskelzelle im Gefäß gekoppelt. Befindet sich die Zelle im distalen Bereich zur Endstrecke des Acinus (200 bis 700 μ m Lumen) reagiert sie stärker als eine proximal gelegene glatte Muskelzelle (800 μ m bis 5 mm Lumen) (Madden, Vadula et al. 1992; Sham, Crenshaw et al. 2000).

1. Einleitung

Als funktionaler Sauerstoffsensoren werden verschiedene Effektormoleküle diskutiert. Primär sind hierbei die Enzyme der mitochondrialen Atmungskette zu nennen, zum Beispiel NAD(P)H Oxidasen, die Cyclasen der ADP-Ribose und die korrespondierenden Ribosehydrolasen. Auch Enzyme des Cytochrom P450 Systems könnten eine wichtige Rolle spielen. Als ein alternativer Weg zur Sauerstoffdetektion kommen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), das zelluläre Redoxpotential, und cGMP in Frage. Im Rahmen dieser Arbeit wird vor allem das Modell der ROS Produktion favorisiert. Die alternativen Wege bleiben jedoch Gestand der Diskussion.

1.6.3 Die Rolle exogener Mediatoren auf die HPV

Neben der direkten Wirkung der Hypoxie auf die glatten Muskelzellen wird auch ein indirekter, mediierender Effekt des Endothels, also der *tunica intima* diskutiert. Jedoch sind die Befunde hierzu kontrovers (Holden and McCall 1984; Rodman, Yamaguchi et al. 1989; Kovitz, Aleskowitch et al. 1993; Robertson, Aaronson et al. 1995). Eine direkte Beteiligung des Endothels an der 1. Phase der HPV erscheint jedoch anhand der Datenlage als sehr unwahrscheinlich (Burke-Wolin and Wolin 1989; Yuan, Goldman et al. 1993). Für eine modulierende Funktion was die Stärke und das Einsetzen der HPV angeht scheint jedoch Endothelin 1 (ET-1) wichtig zu sein. Endothelin 1 ist ein aus 21 Aminosäuren bestehendes, vasokonstriktiv wirkendes Peptid, das von Endothelzellen sezerniert und auf den Zielzellen durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren gebunden wird. Im Falle der glatten Gefäßmuskulatur der Pulmonalarterien sind dies die ET_a- und ET_b- Rezeptoren (Sato, Oka et al. 1995; McCulloch, Docherty et al. 1998; Park, Ko et al. 2005). Beides sind klassische G_q gekoppelte Rezeptoren; also Aktivatoren eines Phospholipase- vermittelten Signalweges. In vielen klassischen Experimentalmodellen der HPV ist eine suboptimale Konzentration eines Agonisten Voraussetzung für das Einsetzen des Reflexes nach Hypoxieeinwirkung (Liu, Sham et al. 2001). Dieser vielfach stillschweigend hingenommene, sogenannte „priming-Effekt“ scheint auf die Notwendigkeit eines gewissen Grundtonus oder Grundumsatzes an „second messenger“ hinzudeuten. Auch läßt sich das Einsetzen der HPV im isolierten Lungenmodell mit intaktem Endothel durch Gabe des ET-1 Antagonisten BQ123

1. Einleitung

abschwächen (Oparil, Chen et al. 1995; Sham, Crenshaw et al. 2000). In der Literatur wird die Notwendigkeit des „primings“ mit einer Herabsetzung des Membranpotentials entweder durch Inhibition ATP-sensitiver Kaliumkanäle oder durch PKC-vermittelte Inhibition spannungsabhängiger Kaliumkanäle begründet. Alternativ wäre auch eine bereits erhöhte intrazelluläre Calciumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) durch Freisetzung von Ca^{2+} aus internen Speichern des endoplasmatischen Retikulums denkbar (Shimoda, Sham et al. 2002).

1.6.4 Die Bedeutung von Calciumionen für die HPV in glatten Muskelzellen der Lungenstrombahn

Obwohl der Mechanismus der HPV in der Literatur kontrovers diskutiert wird, herrscht doch ein allgemeiner Konsens über die essentielle Bedeutung einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in den präkapillären glatten Muskelzellen der Lungenstrombahn (*precapillary pulmonary arterial smooth muscle cells* = PASMOC). Ob diese Ca^{2+} -Ionen nun aber aus dem Extrazellulärraum oder den internen Speichern kommen, ist wiederum Gegenstand einer intensiven Diskussion. In primär isolierten PASMOC existieren viele Befunde, die auf die Bedeutung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (*voltage gated calcium channels* = VGCC) hindeuten, die durch eine Membrandepolarisation mittels Inhibition spannungsabhängiger Kalium-Kanäle aktiviert werden (Post, Gelband et al. 1995; Osipenko, Evans et al. 1997; Turner and Kozlowski 1997; Archer, Souil et al. 1998). Obwohl von einer Beteiligung der VGCC an der HPV ausgegangen werden, bleibt ihre genaue Position in der Signaltransduktionskaskade unklar (Archer and Michelakis 2002; Olschewski, Hong et al. 2002; Shimoda, Sham et al. 2002; Weir, Lopez-Barneo et al. 2005).

Weitere Studien legen nahe, dass auch den extrazellulären Ca^{2+} -Ionen ein hohes Maß an Bedeutung bei der HPV zukommt. Mehrere Arbeitsgruppen konnten unabhängig voneinander zeigen, dass nicht-selektiven Kationenkanälen eine wichtige Funktion bei der Entstehung der HPV zukommt (Robertson, Hague et al. 2000; Robertson, Aaronson et al. 2003). In diesem Kontext erscheinen die Mitglieder der TRPC-Familie als ideale Kandidaten. Besonders Mitglieder der TRPC3/6/7 Subfamilie, deren Funktion bei der Steuerung der glatten Muskelkontraktion auch

1. Einleitung

durch Untersuchungen an gendefizienten Mäusen bestätigt wurde (Dietrich, Mederos y Schnitzler et al. 2003; Yu, Fantozzi et al. 2004; Dietrich, Mederos et al. 2005), könnten hier wichtige Aufgaben in der Signaltransduktionskaskade übernehmen. Eine weitere Ebene an Komplexität entsteht durch Befunde, daß Pharmaka, die eine inhibierende Wirkung auf die Calciumspeicher des endoplasmatischen Retikulums haben, das Einsetzen der HPV beeinflussen (Jabr, Toland et al. 1997; Dipp, Nye et al. 2001; Morio and McMurtry 2002).

1.7 Rolle der Endothelzellen beim Ischämie-Reperfusionsschaden der Lunge

Die die Blutgefäße auskleidende Endothelzellschicht stellt das physikalische Korrelat einer dynamischen, semipermeablen Grenzschrift dar. Diese Grenzschrift trennt die Organe funktionell von der Blutstrombahn und erlaubt eine Regulation von Übertrittstellen. Dadurch kann die Integrität der Gefäße ermöglicht werden, wodurch die Aufnahme und Abgabe von Flüssigkeit, Ionen und Plasmaproteinen zeitlich und räumlich koordiniert wird. Die Permeabilitätseigenschaften dieser Zellschicht werden durch ein Fließgleichgewicht zwischen der Kontraktionskraft der Endothelzelle und der aus ihrer Verankerung resultierenden Adhäsionskraft gebildet. Überwiegt also die Kontraktion über die Adhäsion, runden die Endothelzellen sich ab, der intrazelluläre Spalt vergrößert sich und es kommt letztlich zum Zusammenbruch der Barrierefunktion. Diese Kontraktion wird im Regelfall durch Cytokine, Wachstumsfaktoren oder Zellen des Immunsystems ausgelöst. Also durch Zustände in denen eine verminderte Barrierefunktion für die schnelle Invasion von Immunzellen zur Abwehr von Pathogenen für den Gesamtorganismus wichtig ist.

Bei diesen Vorgängen aktivieren Mediatoren über ihre Rezeptoren eine Phospholipase C-Isoform, deren Aktivierung letztlich zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führt. Dadurch kann die Aktinfilamentstabilisierung und eine Aktinpolymerisierung gefördert werden sowie über die Myosinleichtketten Kinase eine Aktin-Myosin-abhängige Kontraktion ausgelöst werden, die zur Veränderung der Zellform und einer verminderten Barrierefunktion führt. Bestimmte Immunzellen, wie zum Beispiel neutrophile Granulozyten können durch eine Erhöhung der reaktiven

1. Einleitung

Sauerstoffradikale (ROS) mit Hilfe des sogenannten „oxidative burst“ eine Kontraktion des Endothels auslösen. Neben dieser konstanten Exposition der Endothelzellen mit ROS sind sie auch intrinsisch in der Lage durch NADPH oder Xanthin-Oxidase-Systeme, ROS zu produzieren. Die gleichen Mechanismen spielen auch bei der Metastasierung von Tumoren oder der Ödembildung unter hypoxischen Zuständen eine Rolle. Eine immer wieder auftretende Komplikation nach einer Organtransplantation oder bei der Behandlung von Verschlusskrankheiten ist die Bildung von gewebsschädigenden Ödemen nach der erfolgreichen Reetablierung der Perfusion der Lunge. Der biophysikalische Grund für diesen sogenannten Ischämie-Reperfusionsschaden ist, obwohl er Gegenstand vieler Untersuchungen war und ist, nach wie vor nur wenig verstanden. Obwohl es klar ist, dass ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in den Endothelzellen notwendig für die Gewebeschädigung und die Ödembildung ist, ist der genaue Ursprung dieser erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ ist nach wie vor umstritten. Es gibt wie bei den glatten Muskelzellen Hinweise, dass nichtselektive Kationenkanäle der TRPC-Familie bei diesen Vorgängen eine große Rolle spielen (Cioffi, Lowe et al. 2008). Aus diesem Grund lag es nun nahe sich auch mit der Rolle von TRPC Kanalproteinen beim Ischämie-Reperfusionsschaden zu beschäftigen. Hierzu ist die Faktenlage in der Literatur sehr kontrovers. Es werden eine Funktion von TRPC1, TRPC4, TRPC6 und TRPM2 in Endothelzellen diskutiert (Nilius, Droogmans et al. 2003; Freichel, Philipp et al. 2004; Yu, Fantozzi et al. 2004; Fleming, Rueben et al. 2007; Folgering, Sharif-Naeini et al. 2008). Alle bisherigen Untersuchungen deuten darauf hin, dass es auch hier intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden von der Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen bis zur Aktivierung von TRP-Kanälen geben muss, da bisher keine direkte Aktivierbarkeit von TRP-Kanälen durch Sauerstoffradikale nachgewiesen werden konnte. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass heteromere TRPC1/4 Kanalkomplexe einen Ca^{2+} Anstieg in Endothelzellen auslösen (Freichel, Philipp et al. 2004; Dietrich, Kalwa et al. 2007). In TRPC4-defizienten Mausearten fehlte eine durch Acetylcholin induzierte Vasorelaxation und ein Calciumeinstrom in deren Endothelzellen, der sich in Wildtypmäusen durch elektrophysiologische Methoden und mit Hilfe des „Calciumimaging“ an Fura-2 beladenen Zellen nachweisen ließ (Freichel, Suh et al. 2001). Auch konnten in Mesenterialarterien des Froschs VEGF medierte Ströme durch Modulatoren von

1. Einleitung

TRPC3/6/7 Kanälen potenziert oder unterdrückt werden (Singh, Knezevic et al. 2007). Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass TRPC-Kanäle auch in Endothelzellen eine wichtige Funktion bei der Steuerung der Permeabilität zu haben scheinen. Die Identität der Kanäle und ihre Aktivierung sind aber noch völlig unklar.

1.8 Zielsetzung der vorliegenden Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit sollten Untersuchungen zur Hypoxie-induzierten Aktivierung von TRPC6 Kanälen in präkapillären glatten Muskelzellen und Endothelzellen der pulmonalen Strombahn durchgeführt werden. Ausgangspunkt waren vergleichende Untersuchungen an der isolierten Lunge von TRPC6-defizienten und Wildtyp-Mäusen, die Hinweise für eine wichtige Funktion von TRPC6 für die akute hypoxische Vasokonstriktion und den Ischämie-Reperfusionsschaden erbracht hatten. Diese Befunde sollten nun auf zellulärer Ebene an präkapillären pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen (*precapillary arterial smooth muscle cells* = PASM) und an pulmonalen Endothelzellen (*lung endothelial cells* = LEC), die aus TRPC6-defizienten und Wildtyp-Mäusen isoliert wurden, bestätigt werden. Als primärer Messparameter diene die Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) nach einem hypoxischen Stimulus. Dabei sollte mittels klassischer und moderner pharmakologischer Methoden im Ausschlußverfahren auch die Signaltransduktionskaskade von der Hypoxie-induzierten Bildung von Sauerstoffradikalen bis zur TRPC6-Aktivierung aufgeklärt werden. So musste im Verlauf der Arbeit eine Methodik zur Gewinnung der zu untersuchenden Zelltypen etabliert und validiert werden. Simultan musste ein klassisches, Fura-2 basiertes Ca^{2+} -Fluometriesystem so umgerüstet werden, dass es möglich wurde, Hypoxie im Sinne eines pharmakologischen Stimulus auf die Zellen auszuüben. Mittels dieser Messtechnik und unter Verwendung eines TRPC6-defizienten Mausmodells sollten dann die Rolle der Hypoxie-induzierten TRPC6-Aktivierung und mögliche Signaltransduktionswege in PASM und LEC aufgeklärt werden.

2. Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1. Chemikalien

Ampicillin-Na-Salz	Applichem, Darmstadt
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BSA (Kälber Serum Albumin)	Carl Roth, Karlsruhe
DEPC (Diethylpyrocarbonate)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
LB-Medium: Bacto™ Agar, Bacto™ Tryptone, Bacto™ yeast Extract	Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix (Frankreich)
Lösungsmittel: Ethanol Methanol	Riedel-de Haen, Seelze
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Salze	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SDS (sodium dodecyl sulfat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Zellkultur: Medien, PBS, FCS, HS, PAA Trypsin	Laboratories, Pasching (Österreich)

2.1.2. Enzyme, Kits und Marker

Western-Pico/Femto Detection reagents	Pierce Paris Frankreich
Enzyme: Restriktionsenzyme; Taq- DNA- Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Marker: 100 bp und 1 kbp	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNA- Probenpuffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Metafectene™	Biontex Laboratories GmbH,

2. Material und Methoden

	München
Fura 2-AM	Calbiochem®/Merck Bioscience GmbH, Schwalbach
Plasmid DNA Purification kit	Nucleobond, Düren
Proteinmarker: prestained protein ladder (10-170 kDa)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Tri Fast™ peq GOLD	Peq Lab Biotechnologie GmbH, Erlangen
TOPO TA Cloning	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.3. Reaktionsgefäße und Kunststoffmaterial

Reaktionsgefäße 1,5 ml / 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturmaterialien: Auslaufpipetten, 6-Loch-Platten, 75cm ² Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
X-OMAT UV-Film	Kodak, Stuttgart

2.1.4. Geräte

Fluoreszenzmikroskop IX70	Olympus, Hamburg
<i>Ca²⁺ - Imaging System</i>	TILL – Photonics GmbH Gräfelfing
Mikropipetten	Gilson, Middleton, WI (USA)
T3-Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen®
Electric Cell-Substrate Impedance Sensing	IBID GmbH, München
Konfokales Lasermikroskop LSM 510 Meta	Zeiss, Oberkochen
Nucleofector	Amaya, Köln

2. Material und Methoden

2.1.5.Zelllinien und Nährmedien

Name	Herkunft	Nährmedium
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen	Earle`s MEM, 10%FCS,100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
mLEC	Murine primäre, pulmonale Endothelzellen	Komplettes Endothelzellmedium, Promocell, Heidelberg
mPASMC	Murine präkapilläre pulmonale arterielle glatte Muskelzellen	Medium 99, Invitrogen, Karlsbad

2. Material und Methoden

2.1.6. Primer

Name	Oligonukleotidsequenz: sense / antisense	Produkt- länge
TRPC1	GATGTGTCTTTGCCCAAGC CTGGACTGGCCAGACATCTAT	127 bp
TRPC3	TGGATTGCACCTTGTAGCAG CAAGCAGACCCAGAAAGATGA	100 bp
TRPC4	TGACGGAGGAGAATGTTAAGG CGCGTTGGCTGACTGTATT	110 bp
TRPC5	GGCGATGCATTACTCTACGC ATCATCAGCGTGGGAACC	107 bp
TRPC6	ACTGGTGTGCTCCTTGCAG TCAGCTGCATTCATGACGA	118 bp
TRPC7	AATGGCGATGTGAACTTGC CAGTTAGGGTGAGCAACGAAC	110 bp
DAG-Kinase alpha	AGAGAGATGGATCAGGACGG CCGAGACTTGGCATAGGTG	116 bp
DAG-Kinase beta	TGCACCACTATTGGGTCGA GCTTTATTTGGCTGCTGGG	112 bp
DAG-Kinase delta	AGAGCATTTTGAGCCTACCC CCATCCTCGTCCTCAATGA	118 bp
DAG-Kinase etha	GTGACGAGTCCTTGGGTGA GTGGTTTTGGCTGATAGCG	98 bp
DAG-Kinase gamma	CCACCAACGCTGTGTATCC ACTGCCATCGGACTTCCCT	109 bp
β-Aktin	CCAACCGTGAAAAGATGACC GTGGTACGACCAGAGGCATAC	106 bp

2. Material und Methoden

2.1.7. Antikörper

gerichtet gegen	aus Spezies	einzusetzende Konzentration	Firma
TRPC 6	Kaninchen	1:5000	Alomone, Jerusalem, Israel
CD 144	Ratte	0,5µg/ ml	Pharmingen, Heidelberg
Fc Teil des Kaninchen IgG	Ziege	1:10000	Sigma (München)
Glatte Muskelzellen α -Aktin	Maus	1:200	Sigma (München) #A2547, 81K4869
von-Willebrand-Faktor	Kaninchen	1:300	Boehringer (Ingelheim) 84757420-10
Maus-IgG, FITC-konjugiert	Ziege	1:750	Sigma (München) #F0257, 102K9150
Kaninchen IgG, FITC- konjugiert	Ziege	1:750	Sigma (München) #F0382, 063K4816

2. Material und Methoden

2.1.8. Puffer :

Puffer und Lösungen wurden gemäß den Vorgaben klassischer molekularbiologischer Protokolle angefertigt (siehe Sambrock et al Molecular Cloning und Current Protocols in Molecular Biology CSH Press)

2.1.9. Plasmide :

pSUPER Oligoengine, Seattle

pcDNA3.1 Invitrogen, Karlsruhe

pMD2G Addgene, Boston 1225

psPAX2 Addgene, Boston 12260

pWpl G5A Addgene, Boston 12257

pmax eGFP Amara Köln

2. Material und Methoden

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Design der siRNA Sequenzen

Die siRNA-Sequenzen wurden gemäß der von Elbashir (Elbashir, Harborth et al. 2002) vorgeschlagenen und durch die von Reynolds (Khvorova, Reynolds et al. 2003) erweiterten Regel ermittelt.

Als Hilfe diente das von Maurice Ho generierte Excel Makro: <http://boz094.ust.hk/RNAi/siRNA>, sowie eine Strukturanalyse potentiell maskierter Abschnitte mittels SFold: <http://sfold.wadsworth.org/>

2.2.2. Herstellung von Proteinlysat

Für rekombinante Proteine wurden in einer 6-Lochplatte $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Loch in 2 ml Earls MEM mit 5% FCS ausgesät und über Nacht inkubiert. Die Transfektion erfolgte mit den angegebenen Plasmiden unter Verwendung von Trans-It (Mirrus Bio San Jose Californien) gemäß der Anleitung des Herstellers im Verhältnis 1:3 für 48-72h. Die Proben wurden zweimal mit PBS gewaschen, bevor sie in 500 µl PBS 0,1 % Triton mit Protease-Inhibitoren (Complete mini tabs Roche, Mannheim) lysiert wurden. Nach Abtrennung der Kerne wurde der Proteingehalt mittels Bradford kolorimetrisch bestimmt und normiert. Die Lysate wurden anschließend in SDS Laemmli-puffer aufgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

3x SDS Probenpuffer	18,75 ml Tris HCL
	3g SDS
	7,5 ml β-Mercaptoethanol
	50 mg Bromphenolblau
	15 ml Glycerin
	ad 50ml in H ₂ O

2. Material und Methoden

2.2.3. SDS-PAGE

Mit einer SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate poly-acrylamid gel-electrophoresis*) können Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgrund ihres Molekulargewichts während ihrer Wanderung durch eine Gelmatrix aufgetrennt werden. Die Proteine werden bei der Probenvorbereitung in SDS-Probenpuffer bei 60-100°C denaturiert. Dabei erhalten alle Proteine durch den Zusatz des stark anionischen Detergenz SDS und die Anlagerung der Sulfatgruppen eine einheitliche negative Ladung. SDS eliminiert außerdem alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen im nativen Protein. Niedermolekulare Thiole wie β -Mercaptoethanol im Probenpuffer bewirken eine Reduzierung von Disulfidbrücken in den Polypeptidketten. Aus den genannten Gründen verlieren die Charakteristika Ladung und Tertiärstruktur bei der gelelektrophoretischen Auftrennung ihren Einfluss, so dass die Proteine ausschließlich aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Die unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit der SDS-Protein-Komplexe ist dabei ungefähr zu dem Logarithmus ihrer Molekularmasse proportional. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 7%igen kontinuierlichen Polyacrylamid-Gel nach Laemmli (Laemmli, Molbert et al. 1970). Die aufzutrennenden Proteingemische wurden 3:1 mit 3x SDS-Probenpuffer versetzt und 15 min bei 65°C im Heizblock denaturiert. Dabei wurden pro Spur etwa 20 μ g Protein im Volumen von 20 μ l aufgetragen. Neben den Proben wurde ein Größenmarker aufgetrennt, der aus Proteinen definierter Molekulargewichte bestand. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 20 mA (ca. 125 V) in einem vertikalen Gel-Elektrophorese-System in SDS-Laufpuffer bis die Bromphenolblau-Bande den unteren Gelrand erreicht hatte (ca. 90 min).

2.2.4. Elektrotransfer von Proteinen auf Membranen

Der hier durchgeführte Western-Blot erfolgte als Nassblotverfahren (Mini-Blot Kammer, Biorad, München) auf Nitrocellulosemembranen. Ca. 6X9 cm große Blotting-Papiere wurden kurz in SDS-Blotpuffer getaucht, auf das Gel transferiert und in eine geeignete Nassblot Kammer eingespannt. Um einen exakten Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran zu erzielen, mussten Luftblasen entfernt werden. Die Übertragung erfolgt bei 80 mA im SDS-Blotpuffer über Nacht.

2. Material und Methoden

Laufpuffer:

Tris Base [250 mM]

Glycin [1,920 M]

SDS (Natriumlaurylsulfat) [35 mM, 1 %]

Transferpuffer:

Tris Base [250 mM]

Glycin [1,920 M]

(Natriumlaurylsulfat) [7 mM, 0,2 %]

2.2.5. Immunblot (Immunanfärbung des Western-Blot)

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in Blockpuffer (PBS/5% Milchpulver) für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde 2 h bei Raumtemperatur mit einem Protein-spezifischen Erstantikörper (1:1000 in PBS + 0,5% Tween 20 = PBST) inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Membran (je 15 min) in PBST entfernt. Anschließend wurde die Membran 2 h mit einem Peroxidase- (POD-) gekoppelten Zweitantikörper (1:1000 in PBST), der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörper gerichtet ist, bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran erneut zweimal je 15 min in PBST und einmal 15min mit PBS gewaschen. Die Detektion des POD-gekoppelten Antikörpers erfolgte mittels Chemolumineszenz. Je 2 ml ECL-Reagenz A und B wurden gemischt und die Membran damit benetzt. Nach 30 sec Inkubation wurde die Membran luftblasenfrei in Folie eingebettet und auf einem Röntgenfilm (Biomax, Kodak Rochester, New York USA) exponiert. Je nach Stärke des Signals variierten die Expositionszeiten. Zum Schluss wurde der Film in einem Entwickler-, Fixierer- und Wasserbad manuell entwickelt.

2. Material und Methoden

PBS-Puffer pH 7,4	NaCl [130 mM] KCl [3mM] Na ₂ HPO ₄ [6,4mM] KH ₂ PO ₄ [1,5mM] pH 7,4 mit HCl einstellen
PBS-T	1X PBS Tween20 0,5% (v/v)

2.2.6. Immunofluoreszenzfärbung

Als Immunofluoreszenzfärbung wurde eine indirekte Fluoreszenzfärbung unter Verwendung eines primären Antikörpers gegen das nachzuweisende Protein und eines sekundären Antikörpers, der gegen den primären Antikörper gerichtet war und einen Fluoreszenzfarbstoff trug, durchgeführt. Bei Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes mit einer entsprechenden Wellenlänge emittierte dieser Licht einer für den jeweiligen Farbstoff spezifischen Wellenlänge, das mittels einer Kamera detektiert und über eine entsprechende Software als digitales Bild dargestellt wurde. Um bei der Signalgabe einen Eigeneffekt des sekundären Antikörpers ausschließen zu können, wurde auch als sogenannte negative Kontrolle die Fluoreszenzfärbung ohne den primären Antikörper durchgeführt. Die primär isolierten präkapillären pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) wurden durch die Immunofluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen das α -Aktin des glatten Muskels, im Folgenden als SM- α -Aktin abgekürzt (anti- α -smooth muscle actin, Clone 1A4, monoklonal, Maus anti-Human, Sigma-Aldrich, Steinheim), die schweren Ketten des Myosins des glatten Muskels, im Folgenden als SM-MI IC abgekürzt (anti-myosin heavy chain, Clone SMMS-1, monoklonal, Maus anti-Human, Dako Deutschland, Hamburg), und den von Willebrand Faktor, im Folgenden als vWF abgekürzt (anti-von Willebrand factor, Kaninchen anti-Human, Dako Diagnostika, Hamburg) charakterisiert. Zur Identifikation von murinen Lungenendothelzellen (MLEC) wurden Antikörper gegen Pecam 1 und vWF verwendet.

Die Zellen wurden nach der Isolation direkt auf Glasobjektträgern ausgesät, nach 3 Tagen wurde das Zellkulturmedium entfernt und zweimal vorsichtig mit warmem

2. Material und Methoden

Medium 1991 gewaschen. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mittels eines eiskalten Gemisches aus Aceton (Sigma-Aldrich, Steinheim) und Methanol (Sigma-Aldrich, Steinheim) im Verhältnis 1:1 für 5 Minuten wurde vier Mal mit Waschpuffer, d.h. 0,1% BSA in PBS, das aus 0,8% NaCl (Roth, Karlsruhe), 0,02% KCl (Merck, Darmstadt), 0,115% Na₂HPO₄ x 2H₂O (Merck, Darmstadt), 0,02% KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt) bei einem pH-Wert von 7,4 besteht, gewaschen. Darauf folgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 1% Ziegen Serum (PAA Cölbe) in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der primäre Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur appliziert. Die Antikörper wurden dabei in Waschpuffer wie folgt verdünnt: SM- α -Aktin 1:450, SM-MHC 1:20, Pecam 1 1:500 und vWF 1:500. Bei der negativen Kontrolle wurde nur Waschpuffer verwendet. Danach wurde vier Mal mit Waschpuffer gewaschen und der FITC (fluorescein isothiocyanate)-konjugierte sekundäre Antikörper (1:100 in Waschpuffer verdünnt) für 1 Stunde bei Raumtemperatur und im Dunkeln appliziert. Dabei wurde bei der Färbung gegen Pecam1, SM- α -Aktin, und SM-MHC ein Antikörper Ziege gegen Maus (Goat F(ab')₂, polyklonal, Dako Cytomation, Hamburg) und beim vWF ein Antikörper Ziege gegen Kaninchen (polyklonal, Dako Cytomation, Hamburg) verwendet. Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer folgte die Färbung der Zellkerne für 5 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, Sigma-Aldrich, Steinheim), das 1:100 in Waschpuffer verdünnt wurde. DAPI besitzt die Eigenschaft, spezifisch an doppelsträngige DNA zu binden und einen fluoreszierenden Komplex zu bilden. Nach der DAPI-Färbung wurde noch dreimal mit Waschpuffer gewaschen, die Kammern vom Objektträger entfernt, der Objektträger mit Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako cytomation, Hamburg) eingedeckt und durch ein Deckglas (24x50 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig) abgedeckt.

Die Immunofluoreszenzfärbung der PSMC wurde unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss Axiovert AX 100) und eines Computers mit der Software Image J ausgewertet. Die Anregung des FITC-konjugierten sekundären Antikörpers erfolgte unter Zuhilfenahme eines Filters der Bandbreite 450-490 nm, und die Detektion des emittierten Fluoreszenzlichtes (Maximum des Emissionsspektrums bei 530 nm) mit anschließender Digitalisierung geschah mittels einer Kamera (Zeiss) und eines Personalcomputers. Die maximale

2. Material und Methoden

Anregungswellenlänge für DAPI lag bei 359 nm (Filter AL, 340-380 nm) und das Maximum des Emissionsspektrums bei 461 nm.

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

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

2.2.7. DAG-Kinase Aktivitäts Assay nach (Klauck, Xu et al. 1996) :

COS Zellen wurden 24h nach Transfektion mit den rekombinanten Plasmiden, die cDNAs für die einzelnen DAG-Kinasen enthielten, lysiert und geerntet. Die Lysate wurden in einen Sucrose-ATP-Puffer aufgenommen und gemäß ihres Proteingehaltes auf 50 mg Aliquots normiert. Die Markierungsreaktion- erfolgte in einem Volumen von insgesamt 50 µl in Anwesenheit von 100 mM Tris-Cl, pH 7.4, 1 mM Natrium Deoxycholat, 0,5 mM Dithiothreitol, 1 mM Diolein, 1,6 mM [γ - 32 P]ATP (5000 cpm/nmol) und 5 mM Magnesium Chlorid. Nach 10 Minuten bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von Salzsäure gestoppt. Im Anschluß wurden die Lipide durch einen Butanol Trennungsgang abgetrennt und mit einem Szintillationszähler vermessen.

2.2.8. Kultivierung von Zellen

Die aufgelisteten Zelllinien wurden in 75 cm² Plastik-Zellkulturflaschen mit 15 ml Medium ausgesät und bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Um die adhärennten Zellen vom Zellkulturflaschenboden abzulösen und gleichzeitig zu separieren, wurde das Medium zuerst abgesaugt, und anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS ohne Zusatz von Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen. Zum Lösen von Zell-Zell-Interaktionen wurden die Zellen für 0,5 bis 4 min mit 2 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C

2. Material und Methoden

inkubiert. Die Proteasereaktion wurde durch Zugabe von 10 ml des jeweiligen Kulturmediums gestoppt, die Zellen mittels mehrmaligen Auf- und Abpipettierens vereinzelt, und ein Teil der separierten Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit Medium überführt.

2.2.9. Isolierung und Kultivierung glatter Muskelzellen aus der thorakalen Aorta der Maus

Nach Tötung der Maus mittels zervikaler Dislokation wurde der Brustkorb eröffnet und die Aorta mit ihren Abgängen freipräpariert. Nach dem Transfer der Aorta in Isolierlösung (127 mM NaCl, 5,9 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂ x 6 H₂O, 11,8 mM Glucose, 10 mM HEPES, 2,4 mM CaCl₂) wurde das umgebende Bindegewebe entfernt, die Adventitia abpräpariert, das Gefäß longitudinal aufgeschnitten und in Ca²⁺ freier Isolierlösung gewaschen. Darauf folgte eine Ca²⁺ freie Inkubation mit der E1 Enzymlösung (0,1 % Albumin, 0,07 % Papain, 0,5 % Dithiothreitol) für 30 Minuten. In einem weiteren Schritt wurden die Gewebestücke in die Enzymlösung E2 (0,1 % Albumin, 0,1 % Kollagenase, und 0,1 % Hyaluronidase) überführt. Eine 10 min Inkubation erfolgte diesmal in Anwesenheit von 50 µM Calcium. Die Aorten wurden mit einer hitzepolierten Pasteurpipette vereinzelt. Die so gewonnenen Einzelzellen wurden direkt auf Glasobjektträger ausgesät und in Analogie zu den PASMC kultiviert.

2.2.10. Isolierung der PASMC

Als Basismethodik zur Isolation der murinen PASMC dient eine Adaption der von der Gruppe um Paul Schoemacker etablierten Isolierungstechnik in Ratten. Hierbei werden die narkotisierten und heparinisierten Tiere fixiert und ihr Brustraum eröffnet. Die *arteria pulmonalis* wird freipräpariert, kanüliert und mittels einer Ligatur fixiert. Der Zufluß vom Herzen wird nun durch eine Inzision in den linken Ventrikel eröffnet und der komplette Lungenkreislauf gespült. Anschließend wird eine luftblasenfreie Mischung aus niedrigschmelzender (LMP) Agarose und Eisenpartikeln eingewaschen, die sich aufgrund ihrer Größe präferentiell im präkapillären Gefäßanteil absetzen. Das Organ wird nun, zur besseren Handhabbarkeit, von der Trachealseite aus mit eisenfreier niedrigschmelzender (LMP) Agarose befüllt und aus

2. Material und Methoden

dem *Situs* entnommen. Nach einer mechanischen Zerkleinerung und anschließendem enzymatischem Verdau konnten die präkapillären Lungenareale mit Hilfe eines Magneten (DynaL Biotech, Karlsbad) isoliert und in Kulturmedium ausgesät werden. Die PSMC wuchsen als Zellrasen aus diesen Gewebestückchen heraus.

2.2.11. Isolierung von murinen Lungendothelzellen (MLEC)

Die Mäuselungen wurden freipräpariert, mechanisch zerkleinert durch Wasch- und Sieb-Schritte von Blutbestandteilen befreit und mittels einer HBS Dispase (5 U/ml) Enzymlyösung mazeriert. Die erhaltenen Organfragmente wurden durch einen weiteren Siebschritt bei 70 µm homogenisiert und in Kulturmedium aufgenommen. Es folgte eine Inkubation mit Antikörpern deren Epitop gegen das Endothelzell-spezifische Protein CD 144 gerichtet ist. Nach erfolgter Adsorption der Antikörper an ihre Zielstrukturen wurde das Gewebehomogenisat mit sekundären Antikörpern inkubiert, die gegen den Fc Teil der Pecam1 Antikörper gerichtet waren. Diese Antikörper waren nun kovalent an ferromagnetischen Partikeln (DynaL Karlsbad) gekoppelt. Die CD 144 positiven Zellen konnten nun mittels eines Magneten separiert und in die Zellkultur überführt werden. Um Kontamination mit Fremdzellen, hauptsächlich Fibroblasten, zu reduzieren, erfolgte unter der ersten Passage ein erneuter Separations- und Reinigungsschritt.

2.2.12. Kryokonservierung kultivierter Zellen

Zellen können durch das Verfahren der Kryokonservierung für mehrere Jahre unbeschadet gelagert werden. Um bei dem Prozess des Einfrierens die Bildung von Wasserkristallen in der Membran und damit eine Zerstörung der Zellen zu verhindern, werden sie in einer DMSO-haltigen Lösung mit einer Temperaturerniedrigung von 1 °C/min eingefroren.

Im einzelnen wurden Zellen einer 75 cm² Flasche für eine Kryokonservierung zuerst trypsinisiert, anschließend durch 5-minütige Zentrifugation bei 3000 x g pelletiert und in 4 ml Kulturmedium mit 10% DMSO resuspendiert. Ein ml Aliquots der so aufgearbeiteten Zellen wurden in einem mit Isopropanol gefüllten Gefäß auf -80 °C

2. Material und Methoden

heruntergekühlt, bevor sie schließlich in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt und gelagert wurden.

2.2.13. Integration von cDNAs in primäre Zellen mittels Infektion durch rekombinate Adeno-Assoziierte- (AAV) und Lenti-Viren

Infektionen von PASMIC aus TRPC6-defizienten Mäusen wurden mit einem viralen Vektor-TRPC6-GFP (grün fluoreszierendes Protein)-Konstrukt durchgeführt.

Die rekombinanten adeno-assoziierten Viren (AAV), die den TRPC6-Kationenkanal fusioniert mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) exprimierten, wurden von Dr. Olaf Pinkenburg bereitgestellt. Die PASMIC aus den TRPC6^{-/-}-Mäusen wurden mindestens drei Tage vor Versuchsbeginn infiziert. Für die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ wurden nur PASMIC verwendet, bei denen eine Fluoreszenzemission nach Exzitation bei 470 nm durch das grün-fluoreszierende Protein nachweisbar war. Die Überprüfung der korrekten plasmamembranären Lokalisation der TRPC6-Kanäle in den PASMIC erfolgte mittels eines konfokalen Laserscanning Mikroskops (Zeiss LSM 510 Meta, Jena).

Die Lentiviren wurden gemäß Protokoll des etablierten und kommerziell erhältlichen Systems von Didier Trono (Naldini, Blomer et al. 1996) in HEK293T Zellen produziert. Als Oberflächenprotein der Virushülle kam das Glykoprotein 1 des Vesikulo Stomatitis Virus zum Einsatz. Die Infektion erfolgte mit mindestens 5×10^6 infektiösen Einheiten analog zum AAV-Protokoll.

2.2.14. Transiente Transfektion

HEK293T Zellen wurden mit rekombinanten Vektoren mittels kationischer Lipide (Trans-It Mirrus Bio, Madison, USA) gemäß Herstellerangaben im Verhältnis 1:3 transfiziert.

2. Material und Methoden

2.3 Funktionelle Meßmethoden

2.3.1. Messung der normobaren Sauerstoffkonzentration des hypoxischen Perfusats

Für die Untersuchung der Hypoxieantwort der PASMC mit Hilfe des *Ca²⁺-Imaging Systems* wurde ein Perfusionssystem mit Glassäulen zur Begasung verwendet. Zur Schaffung der hypoxischen Bedingung für die PASMC in der Zellkammer wurde in den Experimenten das Perfusat, das durch die Zellkammer geleitet wurde, je nach seiner Zusammensetzung mit 5% Kohlendioxid, Rest Stickstoff bzw. mit 100% Stickstoff begast.

Zur Bestimmung der normobaren Sauerstoffkonzentration des über die PASMC fließenden Perfusats wurde ein System verwendet, das aus einer Sauerstoffnadelelektrode, einer Kalibrierkammer und einem Verstärker (Firma Science Products GmbH, Hofheim) bestand. Für die Messung der normobaren Sauerstoffkonzentration, nachfolgend als O₂-Konzentration benannt, wurde das Perfusat über einen Zeitraum von 1 Stunde mit 100% Stickstoff begast. Nach einer Zwei-Punkt-Kalibrierung (0% und 21% Sauerstoff) der Sauerstoffnadelelektrode bei 36°C wurde die Elektrode im Perfusionsschlauch direkt nach der Zellkammer luftdicht fixiert, so dass die O₂-Konzentration des aus der Kammer fließenden Perfusats gemessen wurde. Eine direkte Messung in der Zellkammer war nicht möglich, da die Zellkammer ein geschlossenes System war. Nach einer fünfminütigen normoxischen Perfusion wurde auf hypoxische Perfusion mittels des Drei-Wege-Hahns umgestellt und die Sauerstoffmessung gestartet. In den ersten drei Minuten wurde halbsminütig gemessen und danach für weitere 17 Minuten alle 15 Sekunden (siehe Abb 10I). Da die Messung in dem der Kammer nachgeschalteten Perfusionsschlauch stattfand, hatte dies die Konsequenz, dass der Abfall der O₂-Konzentration zeitlich verschoben gegenüber den Werten in der Kammer gemessen wurde. Die Perfusion vom Ausgang der Zellkammer bis zur Sauerstoffelektrode dauerte etwa 1 Minute.

2. Material und Methoden

2.3.2. Konfokale Mikroskopie

Zur Herstellung von Schichtbildern wurde ein konfokales Laser-Scan-Mikroskop (LSM 510 Meta, 63x Fluar DIC Öl, Carl Zeiss, Oberkochen) mit einem Argon-Laser benutzt. Laserleistung, Detektorempfindlichkeit und Hintergrundsubtraktion wurden derart justiert, daß bei einem *pinhole*-Durchmesser von 50-100 μm , was einer optischen Schichtdicke von ca. 0,8 μm entspricht, bei nicht-transfizierten Zellen keine Eigenfluoreszenz detektiert wurde. Das Anregungslicht des Lasers mit einer Wellenlänge von 488 nm wurde durch einen 488 nm-Farbteiler auf das Objekt, die Fluoreszenzsignale über einen 505 nm-Langpaßfilter zum Detektor geleitet. Die räumliche Auflösung in den beiden anderen Raumrichtungen betrug (durch die Wellenlänge des Lichtes limitiert) ca. 0,2 μm , wobei die Digitalisierung in 0,125 μm -Abständen erfolgte. Die einzelnen Zeilen des Scans wurden 8-fach gemittelt, um das Hintergrundrauschen zu minimieren. Für jede Transfektion wurden mindestens drei repräsentative Zellen oder Zellverbände als Bilder gespeichert.

2.3.3. Transfektion und Detektion eines Diacylglycerin (DAG) Sensormoleküls

Die C1-Domäne der Proteinkinase-C δ (PKC δ) bindet DAG und kann als DAG-Sensormolekül in der Zelle eingesetzt werden (Botelho, Teruel et al. 2000). Ein Fusionsprotein dieser Domäne mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) wurde als DAG-Translokationssensor in die Zielzellen entweder viral oder per liposomaler Transfektion eingebracht. Grün-fluoreszierende Zellen, die den Sensor exprimierten, wurden einem normoxischen oder hypoxischen Perfusat ausgesetzt. Die Helligkeitsverteilung wurde mittels konfokaler Mikroskopie an fixierten Proben oder bei ausreichender Schichtdicke an der lebenden Zelle ermittelt. Zur Quantifizierung wurde das Verhältnis zwischen zytosolischer und plasmamembranärer Fraktion berechnet.

2. Material und Methoden

2.3.4. Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit Fura-2

Fura-2 ist ein fluoreszierender Calciumchelator, der durch Bindung von Calcium bei nahezu identischem Emissionsspektrum sein Exzitationsmaximum von 380 nm nach 340 nm verschiebt. Der isosbestrische Punkt, d.h. die Wellenlänge, welche gegenüber Calciumionenkonzentrationen indifferent ist, liegt in Abhängigkeit vom optischen Apparat bei 358-362 nm.

Unter Verrechnung der Fluoreszenzsignale der beiden differenten Wellenlängen (340 und 380 nm) läßt sich unabhängig von Änderungen der absoluten Fura-2 Fluoreszenz (z. B. durch Bleichen, Leck, Bewegungsartefakt) die freie Calciumkonzentration nach folgender Formel berechnen:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K \times (R - R_{\text{min.}}) / (R - R_{\text{max.}}) \times F_{380\text{min.}} / F_{380\text{max.}}$$

Wobei R (*ratio*) für das Verhältnis der Fluoreszenzen $F(340\text{nm}) / F(380\text{nm})$ bei der zu bestimmenden Calciumkonzentration steht. $R_{\text{min.}}$ und $R_{\text{max.}}$ bezeichnen die *ratio* unter calciumfreien Bedingungen bzw. Calciumsättigung. $F_{380\text{min.}}$ und $F_{380\text{max.}}$ stehen für die absoluten Fluoreszenzintensitäten bei 380 nm unter den genannten Extrembedingungen. K ist die Dissoziationskonstante von Fura-2 für Calciumionen und beträgt bei Raumtemperatur (22 °C) 264 nM. Fura-2 wird als hydrophile Substanz zum Zweck der zytosolischen Farbstoffladung durch Veresterung aller vier Karbonsäurereste zum lipophilen Acetoxymethylester (Fura-2-AM) derivatisiert. Diese membranpermeable Form wird im Zytosol durch verschiedene ubiquitär exprimierte Esterasen zum freien Fura-2 verseift. Die Ladung von Zellen mit Fura-2-AM erfolgte für 30 min bei 37 °C mit einer 5 μM Lösung in Meßpuffer (Hepes Ringer, 140 mM NaCl, 6 mM KCl, 1,25 mM CaCl_2 , 1,25 mM MgCl_2 , 5,5 mM Glucose, 0,1 % BSA, 10 mM HEPES, pH 7,4).

2.3.5. Vorbereiten der Zellen zur Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit Fura-2

Pro Loch einer 6-Lochplatte werden $2,5 \times 10^6$ der jeweiligen Zellen in Kulturmedium auf runde Glasobjektträger der Dicke null ausgesät und wie beschrieben inkubiert.

2. Material und Methoden

2.3.6. Beladung der transfizierten Zellen mit dem Calciumindikator Fura2-AM

Das normale Zellkulturmedium wird von den Zellen abpipettiert und durch 1 ml HBS (Messmedium) ersetzt.

Es werden nach dem Abpipettieren der HBS-Waschlösung 1,5 ml Fura-2-AM/HBS/ Ca^{2+} -Lösung dazupipettiert. Nach 15 min – 30 min Inkubation in der Dunkelheit werden die Zellkulturplättchen in die Messapparatur eingespannt und gemäß Protokoll vermessen.

2.3.7. Manganionen-„Quenching“

Um eine Aussage über die biophysikalischen Eigenschaften der in die Plasmamembran eingebauten TRPC-Kanäle zu erhalten, ist es wichtig, den von ihnen verursachten Ioneneinstrom funktionell vom Calciumionenausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum zu trennen.

Eine funktionelle Trennung gelingt im so genannten Manganionen-Quench-Experiment. Hierbei wird ausgenutzt, dass Mn^{2+} -Ionen in der Lage sind, die Fluoreszenz des Fura-2 am isosbestrischen Punkt bei 360 nm unabhängig von Ca^{2+} zu vermindern also zu „quenchen“. Da TRPC-Kanäle nicht rein selektiv für Calciumionen sind, sondern auch andere Ionen wie Mangan- und Strontiumionen in das Cytoplasma der Zelle fließen lassen, läßt sich dies für eine funktionelle Trennung im Mn^{2+} -Quench-Experiment ausnutzen. Die Zellen werden wie beschrieben mit Fura-2 beladen, und bei 360 nm gemessen. Die Abnahme des Fluoreszenzsignals steht nun in direkter Korrelation zur Aktivität der untersuchten Kanäle.

Nach dem Einspannen der Zellen in die Messkammer erfolgt die Zugabe einer physiologischen HBS/ Ca^{2+} -Lösung. Nach Messung des Ruhezustandes und der basalen Fluoreszenz erfolgt nach 60 Sekunden die Zugabe von Mn^{2+} -Lösung in HBS-Lösung zu einer finalen Konzentration von 2 mM.

Nun wurde über 10 Minuten der basale Mn^{2+} -Einstrom aufgezeichnet. Danach erfolgte die digitale Auswertung am Computer.

2. Material und Methoden

2.3.8. Impedanzmessung

Die Widerstandseigenschaften einer Zelle hängen von ihrer Oberflächenbeschaffenheit, der Zusammensetzung von Zytosol und Plasmamembran sowie ihrer dreidimensionalen Struktur relativ zu einem angelegten elektrischen Feld ab. Durch Applikation eines hochfrequenten Wechselstromfeldes über ein Substrat auf dem sich ein Zellrasen befindet, lassen sich, indem man die zugehörige Änderung der Impedanz zwischen behandelten und unbehandelten Zellen mißt, zwar generalisierte aber sehr sensitive Aussagen über Konformationsänderungen der Zellen treffen. Primär gewonnene murine pulmonale Endothelzellen (LEC) wurden trypsinisiert in einem Heamocytometer gezählt und in die Kavitäten eines 10E *Impedanzarrays* (IBIDI, München) ausgesät (15.000 Zellen / Kavität). Nach 12h erfolgte ein Mediumwechsel. Vor dem Experiment erfolgte ein Austausch des Zellkulturmediums gegen normal oxygenierte Hapes-Ringer-Lösung bei Raumtemperatur. Nach einer 15 minütigen Equilibrierungsphase wurden die Zellen mit hypoxischen, normoxischen oder mit Agonisten versehenen Puffern überschichtet. Die Datenaufzeichnung erfolgte kontinuierlich mittels eines Computers in einer Intervallzeit von 1 Minute. Die Werte wurden normalisiert, gemittelt und graphisch aufbereitet.

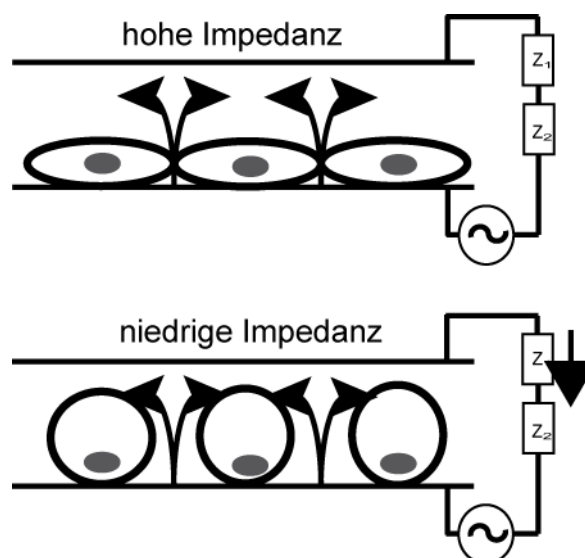


Abb.6: Darstellung des generellen Prinzips einer Impedanzmessung.

Eine morphologische Änderung der zellulären Struktur wird als Änderung ihres Wechselstromwiderstandes gemessen.

2. Material und Methoden

2.4 Statistik

Die Daten wurden als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die Summe aller gemessenen PASMIC wird als n-Zahl angegeben. Zur Feststellung einer statistischen Signifikanz wurde bei einem Vergleich von zwei Gruppen der zweiseitige t-Test verwendet. Bei einem Vergleich zwischen mehr als zwei Gruppen wurde der Student-Newman-Keuls-post-hoc-Test benutzt. Alle p-Werte $< 0,05$ galten als signifikant.

3. Ergebnisse

3. Ergebnisse

3.1. Isolation von glatten Muskelzellen und Endothelzellen aus der Lunge

Durch die im Abschnitt „Material und Methoden“ dargestellten Verfahren wurden präkapilläre pulmonale arterielle glatte Muskelzellen (*precapillary pulmonary arterial smooth muscle cells* = PASMOC) und murine Endothelzellen der Lunge (*lung endothelial cells* = LEC) isoliert. Da die zu untersuchenden Zellen mittels immunzytochemischer und physikalischer Methoden aus komplexen, multizellulären Strukturen herausgelöst wurden, ist es notwendig ihre zelluläre Identität zu überprüfen. Daher wurden zellspezifische Proteine wie das Aktin und Myosin der glatten Muskelzellen sowie der von-Willebrand-Faktor (vWF) und das PECAM-I (*platelet/endothelial cell adhesion molecule-I*) Antigen der Endothelzellen durch spezifische Antikörper nachgewiesen (siehe Abb. 6).

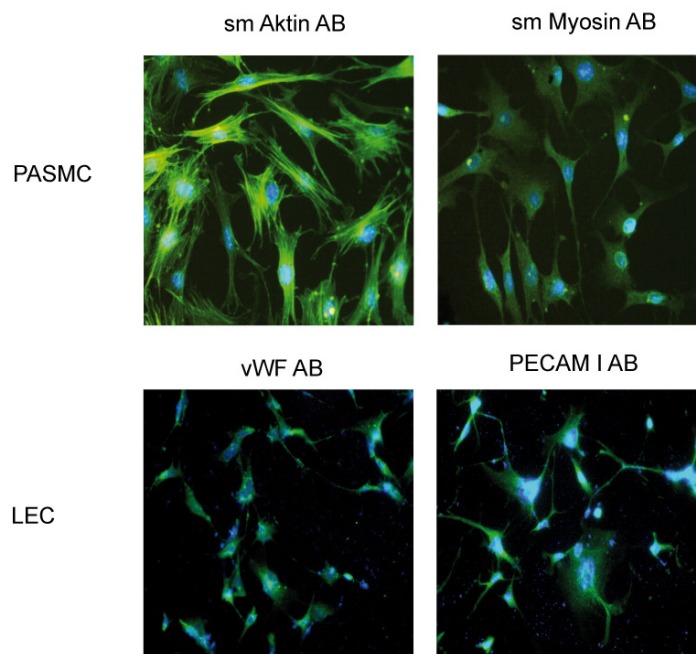


Abbildung 7: Immunzytochemischer Nachweis von glatten Muskelzellen (PASMOC) und Endothelzellen der Lunge (LEC).

Die Färbung der Zellen erfolgte mit monoklonalen Antikörpern, die das Aktin (Sigma M7786) und Myosin (Sigma A2547) der glatten Muskelzellen (PASMOC) sowie den von-Willebrand-Faktor (vWF) (1284924 Boehringer Mannheim) und das PECAM-I Protein (M20 SC-1506 Santa Cruz) spezifisch erkennen. Als Sekundärantikörper diente ein Alexa 488 gekoppelter Ziege-anti-Maus Antikörper. Als Gegenfärbung wurden die Kerne mittels 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) kontrastiert. AB = Antikörper

3. Ergebnisse

3.2. Expression von TRPC-Kanälen in pulmonalen glatten Muskelzellen (PASMC) und Endothelzellen der Lunge (MLEC)

Zur Analyse der TRPC-Expression in PASMC und MLEC wurden spezifische für TRPC-Proteine kodierende mRNAs mittels quantitativer PCR identifiziert und quantifiziert (Abb.7).

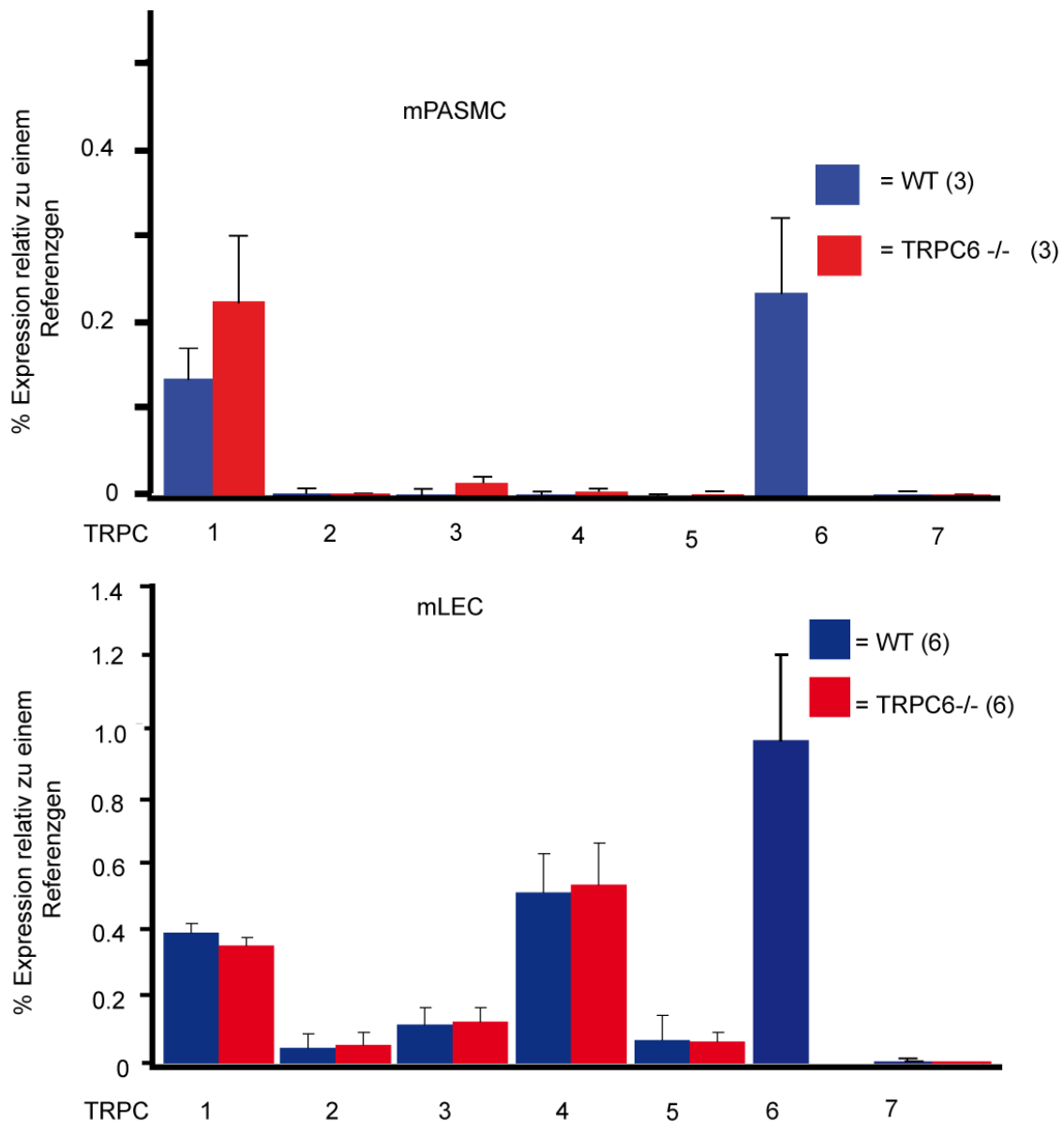


Abbildung 8: Expressionsniveaus der einzelnen Mitglieder der TRPC Kanalfamilie.

Analyse der relativen Expression einzelner Mitglieder der TRPC-Kanalfamilie in PASMC und MLEC mittels quantitativer revers-transkribierter Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR). Die Amplifikation erfolgte mittels Intron-übergreifender, kurzketziger Starternukleotide (generiert durch: universal probe library) mit einer gemeinsamen Schmelztemperatur von 62°C sowie einer mittleren Amplifikationslänge von circa 100 Basenpaaren. Als relative Referenz diente das Haushaltsgen β -Aktin. Gezeigt sind hier die Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts von mindestens 3 Einzelerperimenten.

3. Ergebnisse

Die Expression des TRPC6-Proteins in den Zellen wurde darüber hinaus im Western-Blot nachgewiesen (Abb. 8).

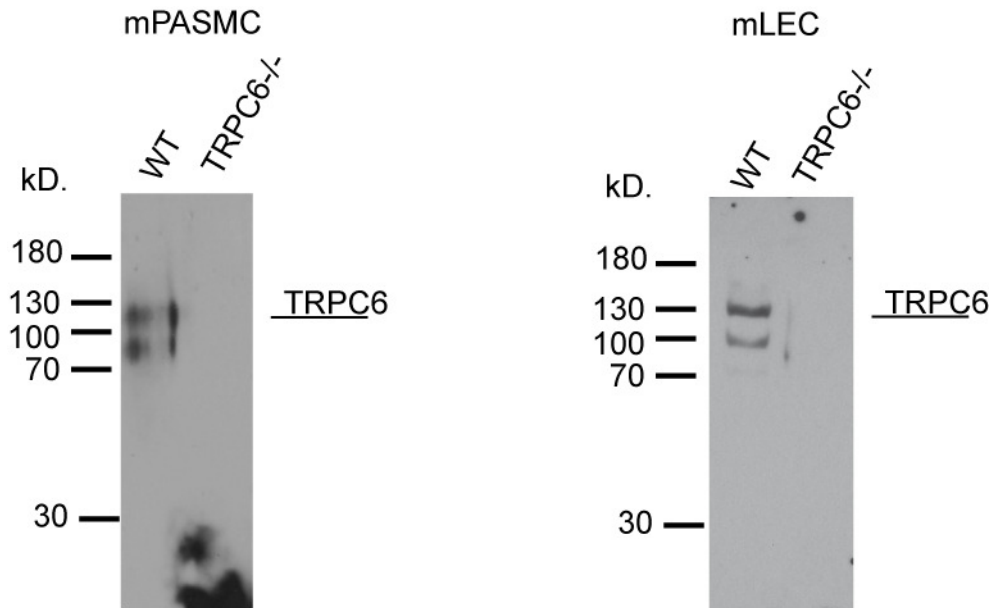


Abbildung 9: Nachweis von TRPC6 in PASM und MLEC

Zellmembranhomogenisat aus PASM und MLEC wurde mittels einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und elektrochemisch auf Nitrocellulosemembran transferiert. Das TRPC6-Protein wurde mittels eines TRPC6-spezifischen polyklonalen, affinitätsgereinigten Antiserums (Labor Prof. Flockerzi, Homburg) identifiziert. Zum Nachweis wurde ein mit Meerrettich-Peroxydase kovalent gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (Sigma) verwendet.

3.3 Etablierung eines fluorimetrischen Meßsystems mit hypoxischem Perfusat als Stimulus.

Zur weiteren Analyse der Zellen musste ein Meßsystem, das Hypoxie als Stimulus im pharmakologischen Sinn nutzt, etabliert werden. Dazu wurde eine Perfusionskammer eines Ca^{2+} -Imaging Systems der Firma Tillphotonics mit hypoxischen Pufferlösungen perfundiert. Die Kontrolle der normobaren Sauerstoffkonzentration des Perfusats ist ein kritischer Schritt. Um die genaue Kontrolle der Sauerstoffsättigung des Perfusats zu gewährleisten, wurde am Ausgang der gasdichten Perfusionskammer die Flutungskinetik mittels einer sauerstoffselektiven Nadelelektrode bestimmt. Da die Messung innerhalb der Kammer nicht möglich war, ist ein kurzer, zeitlicher Versatz von ca. 1 min, zwischen dem Erreichen der Hypoxie an den Zellen und der Elektrode zu beachten. Nach Umstellung der Perfusion von Normoxie auf Hypoxie, setzte eine Verminderung der Sauerstoffsättigung nach 3 min ein. Der Sauerstoffpartialdruck unterschritt nach 6 Minuten den kritischen 5% Wert und erreichte schließlich bei 2,3% sein Minimum (Abb. 10).

3. Ergebnisse

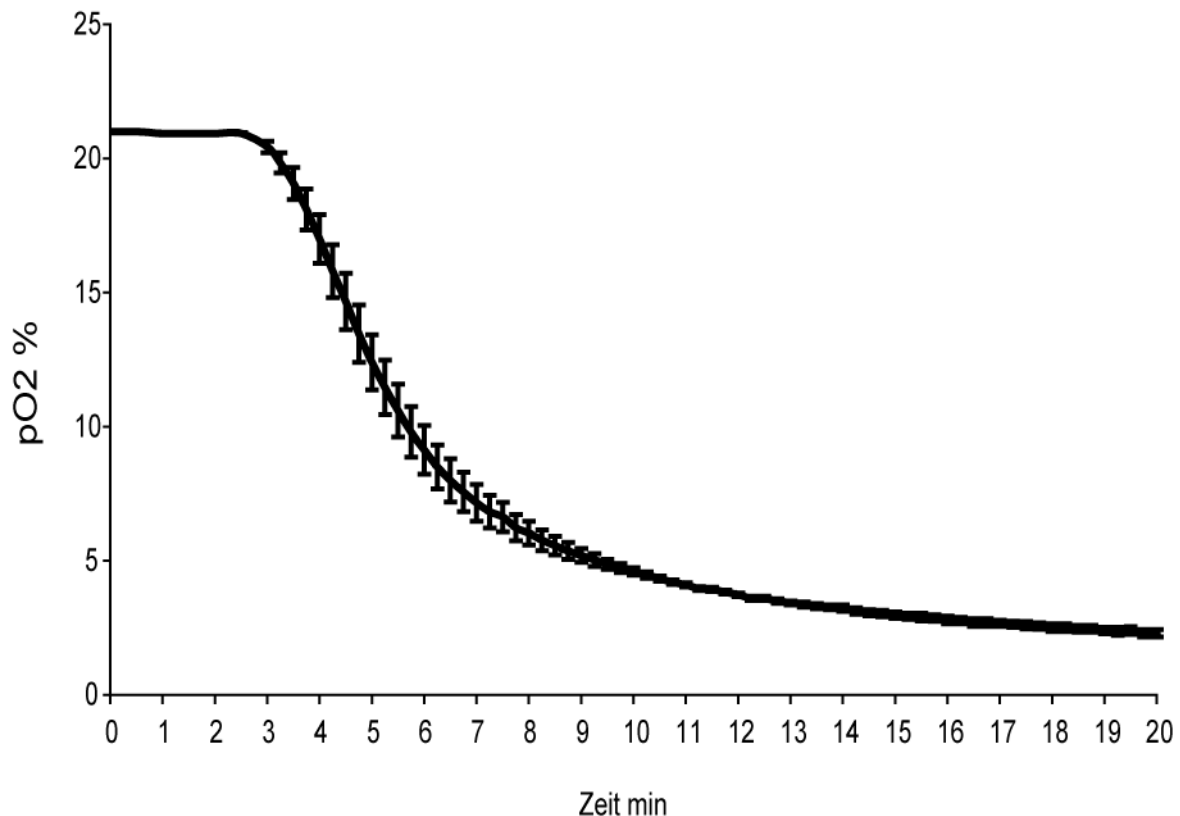


Abbildung 10: Kinetik der Entwicklung des Sauerstoffpartialdruckes im verwendeten Perfusat. Es wurden 3 unabhängige Messungen mittels einer sauerstoffsensitiven Nadelelektrode durchgeführt. Der verwendete Puffer wurde mindestens eine Stunde mit Stickstoff begast.

3.4. Untersuchungen zum Hypoxie-induzierten Kationeneinstrom in PASMC aus TRPC6-defizienten und Wildtyp- Mäusen

Nach Klärung der Identität der isolierten Zellen und dem Nachweis der Expression der TRPC-Kationenkanäle in diesen Zelltypen, sollte nun die TRPC-Aktivität direkt bestimmt werden. Dies geschah mit Hilfe der Fura2-AM basierten Calcium-Fluorimetrie. Als Agonist zur basalen Aktivierung („priming“) der Phospholipase C (PLC) diente für die PASMC Endothelin-1 (ET-1) und für die MLEC Histamin. In (Abbildung 11) werden die Mittelwerte der Einzelspuren sowie die Standardabweichung des Mittelwerts gezeigt.

In Analogie zum Ganztierexperiment zeigt sich, dass es in den glatten Muskelzellen aus Wildtyp-Mäusen zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) kommt, wenn ein hypoxischer Stimulus nach dem „priming“ appliziert wird. Dieser erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fehlt jedoch vollständig in den PASMC aus TRPC6-defizienten Mäusen.

3. Ergebnisse

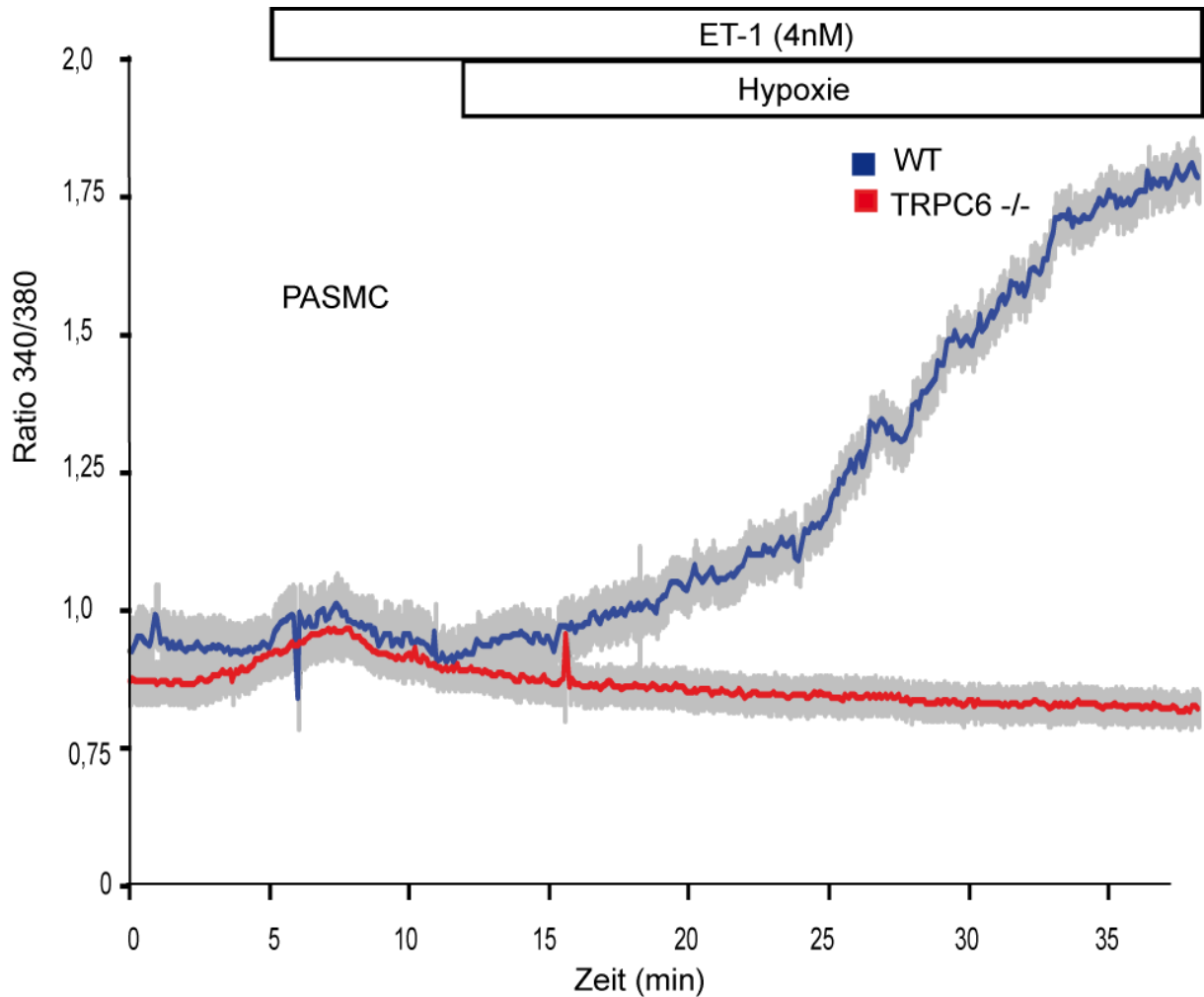


Abbildung 11: Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Hypoxie in PASMC.

Mit Fura-2-AM beladene PASMC aus Wildtyp- oder TRPC6-defizienten Tieren wurden mittels Echtzeit-Videomikroskopie untersucht. Die Zellen wurden nach dem „priming“ (HBSS mit 4 nM ET-1) mit hypoxischem Perfusat umspült.

Um nähere Informationen über den Ursprung des einströmenden Ca^{2+} zu erlangen, also um eine Differenzierung zwischen Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum und Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum zu erhalten, wurde ein klassisches Mn^{2+} -Einstrom-Experiment durchgeführt. Hierbei zeigt sich, dass es in Wildtyp-Zellen unter Hypoxie zur Öffnung eines Kationen-permeablen Kanals in der Plasmamembran der PASMC und einer damit verbundenen Reduktion der intrazellulären Fluoreszenz kommt. In TRPC6-defizienten Zellen ließ sich dieser Einstrom nicht beobachten (Abb.12).

3. Ergebnisse

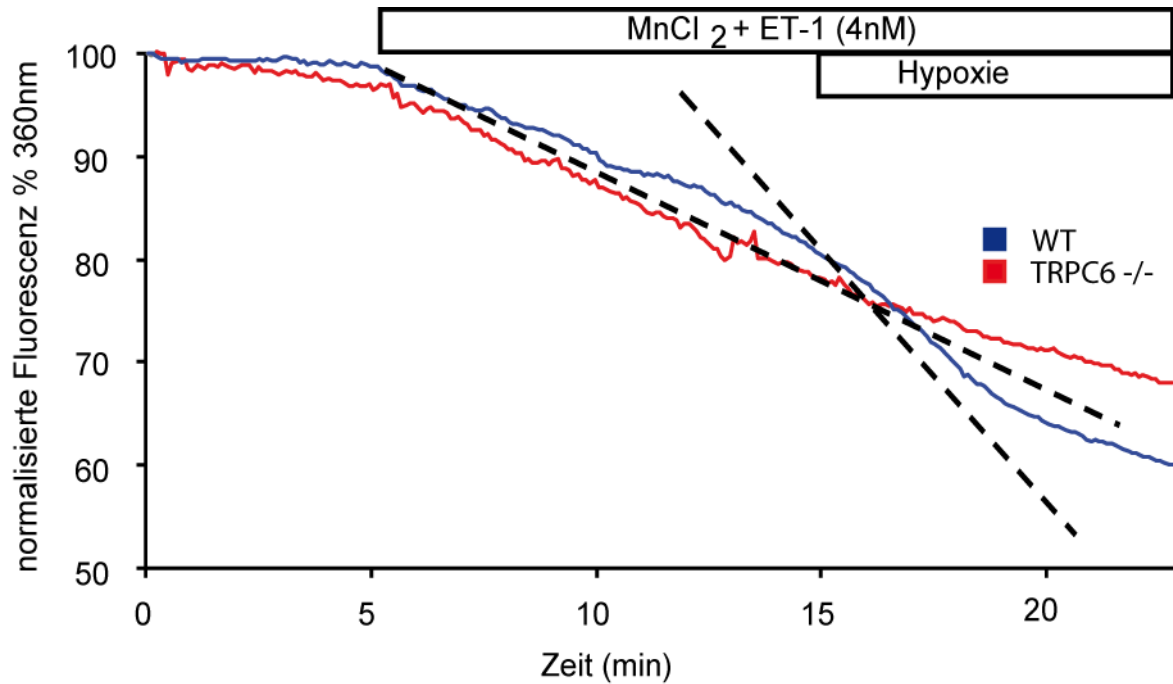


Abbildung 12: Nachweis des Einstroms bivalenter Kationen in PASMIC nach Applikation von Hypoxie.

Mittels Echtzeit-Videomikroskopie wurde die Abnahme der Fura-2 Fluoreszenz am isosbestischen Punkt (360 nm) durch Einstrom von extrazellulären Manganionen untersucht.

Um eine eventuelle Beteiligung von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen nachzuweisen, wurden ähnliche Experimente wie in Abb. 10 in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} und Anwesenheit des Chelators EDTA (2 mM) durchgeführt. Das hypoxische Perfusat war nun nicht mehr in der Lage eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auszulösen (Abb. 13). Eine Beteiligung der Ca^{2+} -Speicher des endoplasmatischen Retikulums ist also unwahrscheinlich.

3. Ergebnisse

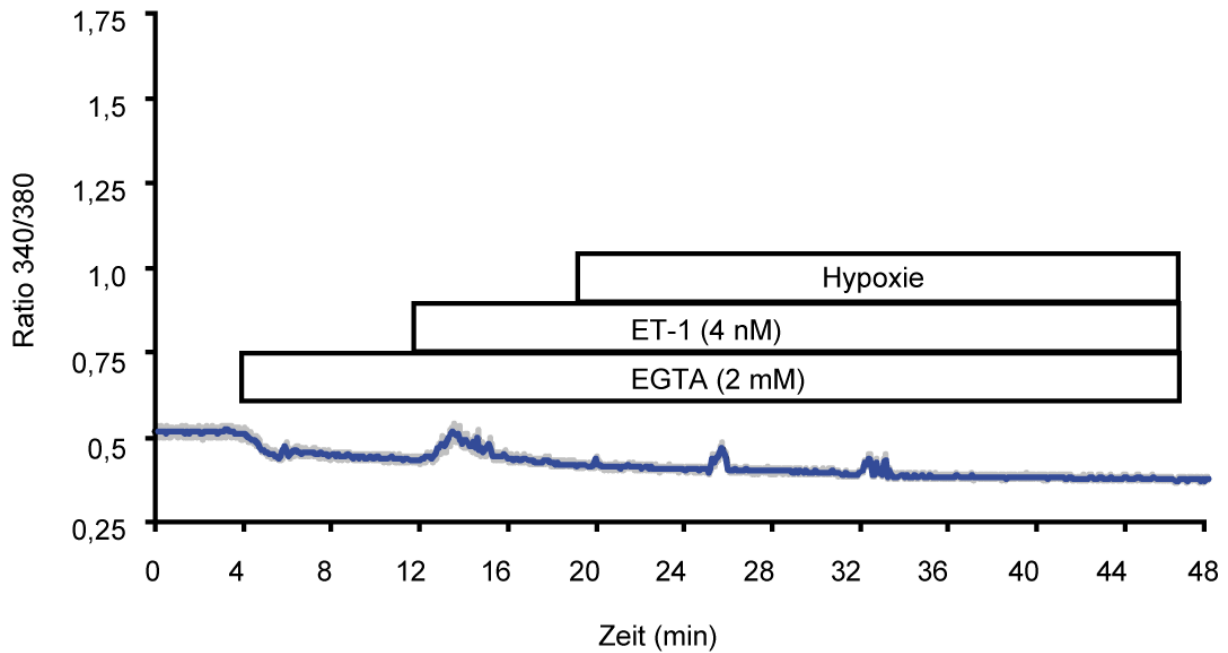


Abbildung 13: Untersuchung des Hypoxie-vermittelten intrazellulären Ca^{2+} -Anstiegs in PSMC unter Abwesenheit von extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen.

PASMC aus Wildtyp-Mäusen in Ca^{2+} -freiem Puffer unter Anwesenheit von EGTA (2 mM) wurden mit 4 nM ET-1 voraktiviert und danach mit hypoxischem Perfusat perfundiert.

Misst man nun jedoch den Füllungsstatus der intrazellulären Calciumspeicher fluorimetrisch indem man in calciumfreiem extrazellulärem Medium die ET-1-induzierte Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch einen Ca^{2+} -Austrom aus den intrazellulären Ca^{2+} -Speicher von Wildtyp- und TRPC6-defizienten Zellen vergleicht, stellt man keine Unterschiede in der Kinetik des Einstroms fest (Abb. 14).

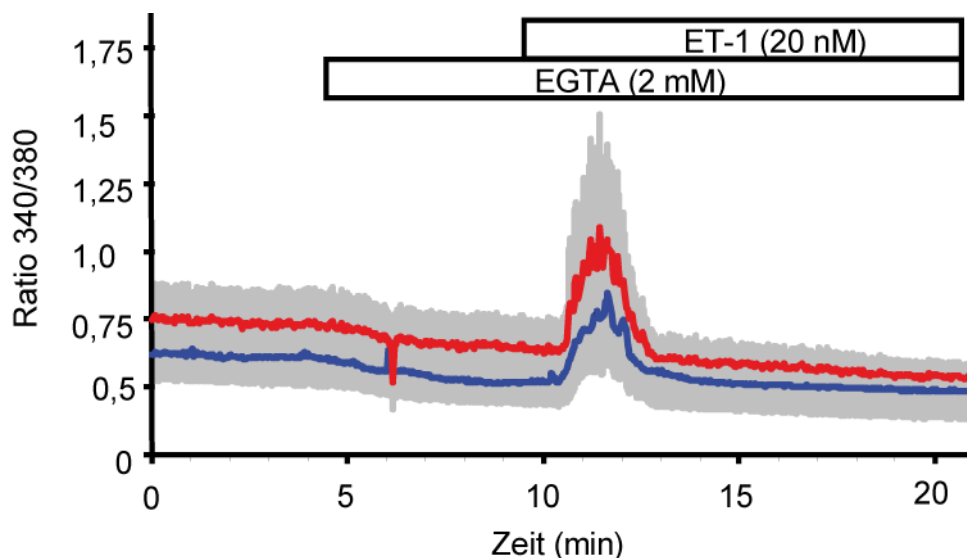


Abbildung 14: Analyse des Ca^{2+} -Gehalts der internen Ca^{2+} -Speicher in PSMC aus Wildtyp- und TRPC6-defizienten Mäusen. Die Zellen wurden mit nominell calciumfreiem EGTA-haltigem Puffer umspült. Als Stimulus wurde eine 20 nM ET-1-Agonistenlösung eingesetzt

3. Ergebnisse

Darüber hinaus stellt sich nun auch die Frage, ob die TRPC Kationenkanäle alleine in der Lage sind die für die Kontraktion notwendige Mengen an intrazellulärem Ca^{2+} zur Verfügung zu stellen. Da in der Literatur immer wieder eine Beteiligung spannungsgesteuerter Calciumionenkanäle des L-Typs diskutiert wird, wurden die fluorometrischen Ca^{2+} -Einstrom-Experimente nun in Gegenwart des hochpotenten Calciumkanalblockers Nicardipin durchgeführt. Dabei zeigt sich, dass die Blockierung dieser Kanäle zu einem vollständigen Verlust des Hypoxie-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms führt (Abb. 15). In weiterführenden elektrophysiologischen Experimenten konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass es unter Hypoxie auch zu einem Einstrom monovalenter Kationen (hauptsächlich Na^+) in Wildtypzellen kommt, die in TRPC6-defizienten Zellen vollständig fehlt.

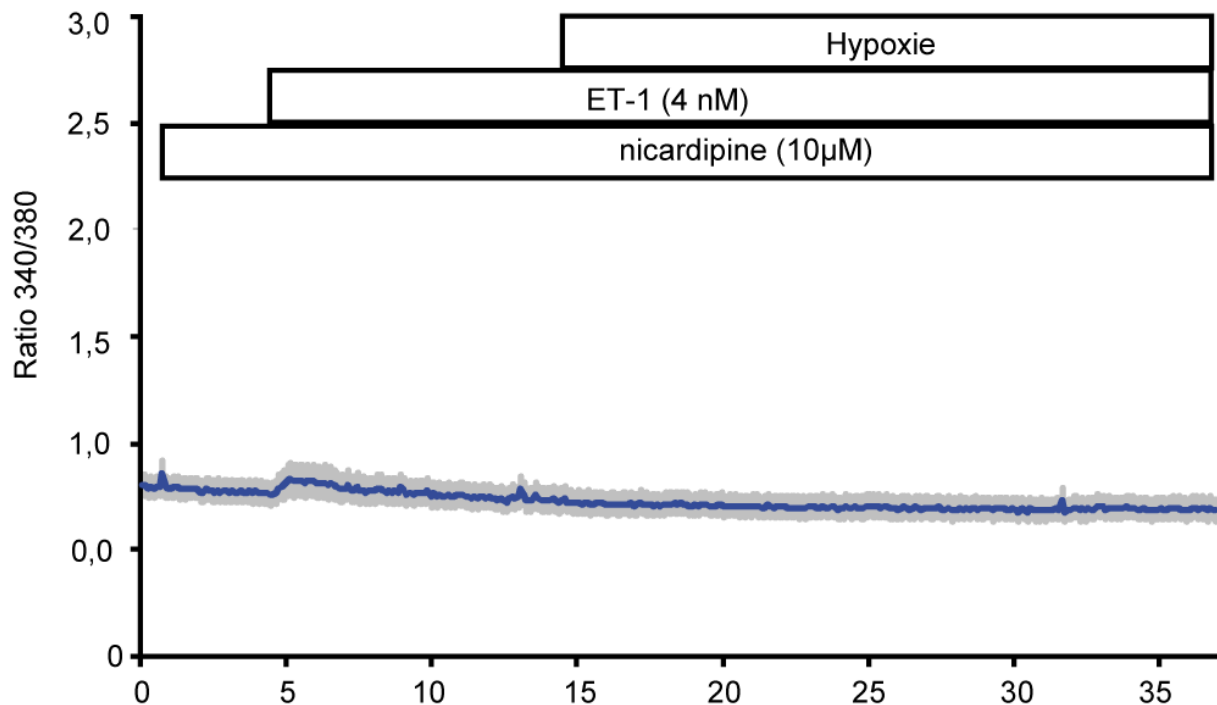


Abbildung 15: Inhibition des Ca^{2+} -Einstrom in PSMC unter Hypoxie durch die Blockade spannungsgesteuerter Kalziumkanäle.

PASMC wurden im wie oben beschriebenen Perfusionsexperiment mit dem potenten L-Typ Calciumkanalblocker Nicardipin vorbehandelt.

In der glatten Muskelzelle folgt also auf die Hypoxie-induzierte Aktivierung von TRPC6 eine hauptsächlich durch Na^+ -getragene Membrandepolarisation, die durch Aktivierung von L-Typ Calciumkanälen zu einem verstärkten Ca^{2+} -Einstrom führt, der dann die Kontraktion auslöst. Eine Erhöhung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt über die Bildung von Ca^{2+} -Calmodulin zur Aktivierung der Kinase der leichten Kette des Myosins. Durch die Phosphorylierung des Myosins kommt es schließlich zur Kontraktion durch eine verstärkte Aktin-Myosin-Wechselwirkung. Eine Kontraktion der glatten Muskelzellen

3. Ergebnisse

nach Ca^{2+} -Einstrom konnte auch in den fluorimetrischen Experimenten beobachtet werden (Abb. 16).

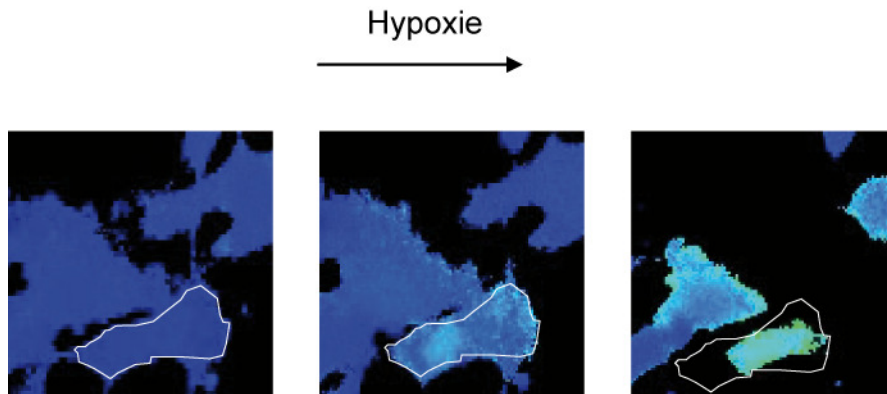


Abbildung 16: Kontraktion der PASMC nach Applikation von Hypoxie.

Die Veränderung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in PASMC von Wildtyp-Mäusen und die Veränderung der Zellform durch Kontraktion sind in Falschfarben dargestellt.

3.4 Identifikation von Komponenten der Signaltransduktionskaskade von der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies bis zur Aktivierung von TRPC6-Kanälen

Wie kommt es nun zur Hypoxie-induzierten Öffnung des TRPC6-Kanals? Mitglieder der TRPC3/6/7-Subfamilie werden durch den Signalstoff Diacylglycerin aktiviert (Hofmann, Obukhov et al. 1999), der durch eine Erhöhung der Aktivität von Mitgliedern der Familie der Phospholipasen aus Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP_2) gebildet wird. Um zu überprüfen, ob es unter Hypoxie zu einer Erhöhung der Diacylglycerin-Konzentration in der Plasmamembran kommt, wurde in den Zielzellen durch lentiviralen Gentransfer ein Diacylglycerin-Sensormolekül zur Expression gebracht. Dieser aus einer DAG-bindenden Untereinheit und einer stabilisierten Version des grün-fluoreszierenden Proteins bestehende Sensor reagiert auf die Erhöhung der plasmamembranären DAG-Konzentration mit einer Translokation vom Zytosol an die Plasmamembran. Dies kann durch Fluoreszenzmessungen im konfokalen Lasermikroskop funktionell nachgewiesen werden (Abb. 17).

3. Ergebnisse

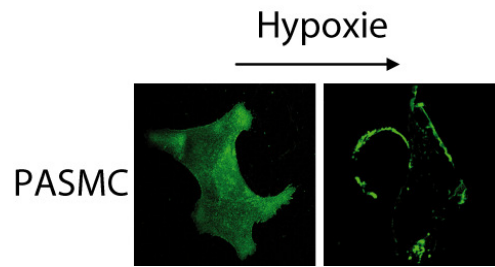


Abbildung 17: Translokation des DAG-Sensors unter Hypoxie.

In PASMC aus Wildtyp-Mäusen wurde mittels rekombinanter Lentiviren ein DAG-Sensor zur Expression gebracht. Als Oberflächenrezeptor für die Virusaufnahme diente das Glykoprotein des *vesicular stomatitis*-Virus. Die Messung der Hypoxie-vermittelten Translokation des DAG-Sensors erfolgte mittels eines konfokalen Laser-„Scanning“-Mikroskops.

Es kommt also unter Hypoxie zur Akkumulation von DAG eines direkten Aktivators von TRPC6. Wenn man nun mögliche biochemische Synthesewege betrachtet, durch die dies möglich ist, kommt entweder eine Erhöhung der Phospholipase Aktivität und eine erhöhte DAG-Produktion oder eine Verminderung der Aktivität der DAG-abbauenden Enzyme (DAG-Lipasen, DAG-Kinasen) in Betracht.

In der Tat ist es möglich, den Hypoxie-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom in Wildtyp-PASMC (WT) durch die Applikation eines spezifischen Inhibitors der DAG-Kinasen R59949 (100 μM) zu imitieren (Abb. 18), während in TRPC6-defizienten (TRPC6^{-/-}) Zellen dieser Einstrom vollständig fehlt.

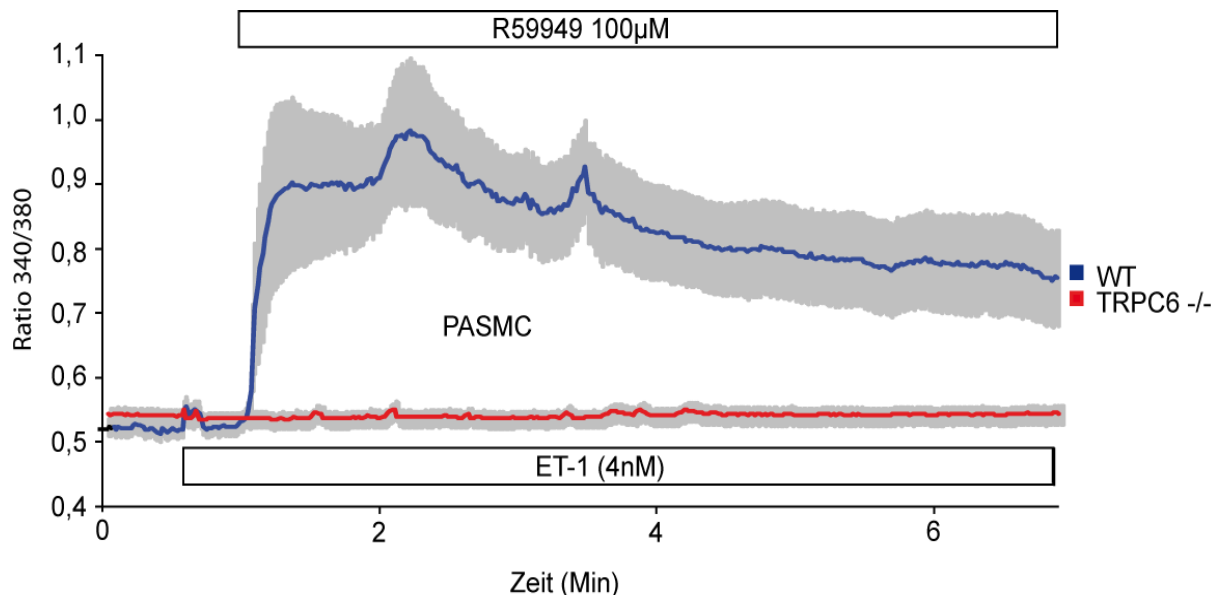


Abbildung 18: Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Wildtyp (WT)-PASMC nach Applikation eines Hemmers der DAG-Kinasen (R59949).

PASMC wurden nach dem initialen „priming“ mit ET-1 mit dem Inhibitor der DAG-Kinasen (R59949) behandelt.

3. Ergebnisse

Wie in der Einleitung beschrieben kommt es unter Hypoxie zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Sauerstoffradikalen. Wir testeten nun, ob Radikale eine Aktivierung von TRPC6 vermitteln können. Eine Applikation der membrangängigen Donatoren für Sauerstoffradikale tertiäres Butylhydroperoxyd (t-BHP) oder Wasserstoffsuperoxyd (H_2O_2) führt in glatten Muskelzellen zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 19).

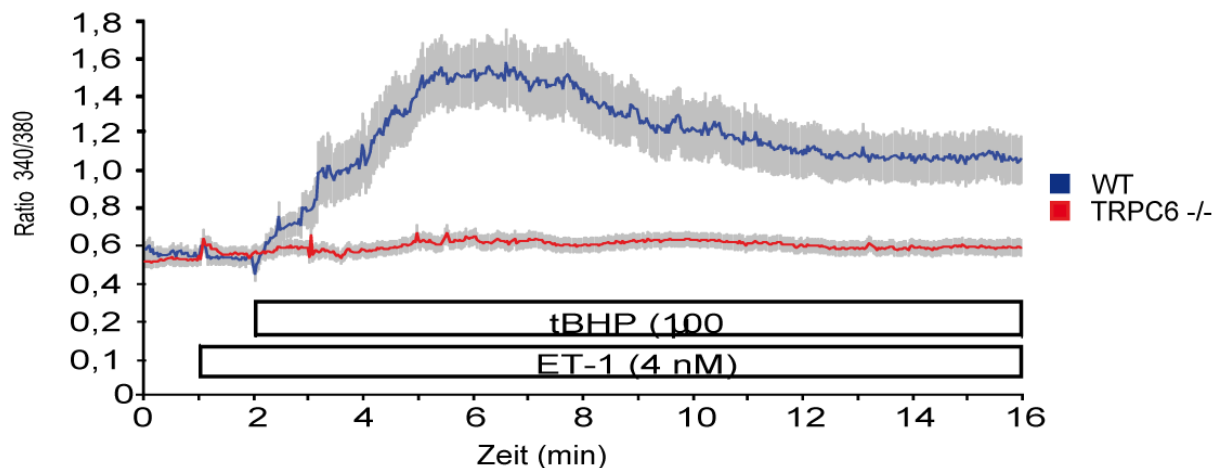


Abbildung 19: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Wildtyp-PASMC durch O- Radikale

Die Applikation des Donators für Sauerstoffradikale t-BHP löst in PASMC aus WT Mäusen (WT) eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ aus. In TRPC6-defizienten PASMC (TRPC6^{-/-}) kann dies nicht beobachtet werden.

Das fehlende TRPC6-Protein kann auch durch adenoviralen Gentransfer in PASMC aus TRPC6-defizienten Mäusen rekonstituiert werden (Abb. 19), um so einen Ca^{2+} -Einstrom nach Hypoxieapplikation in diesen Zellen wieder herzustellen.

3. Ergebnisse

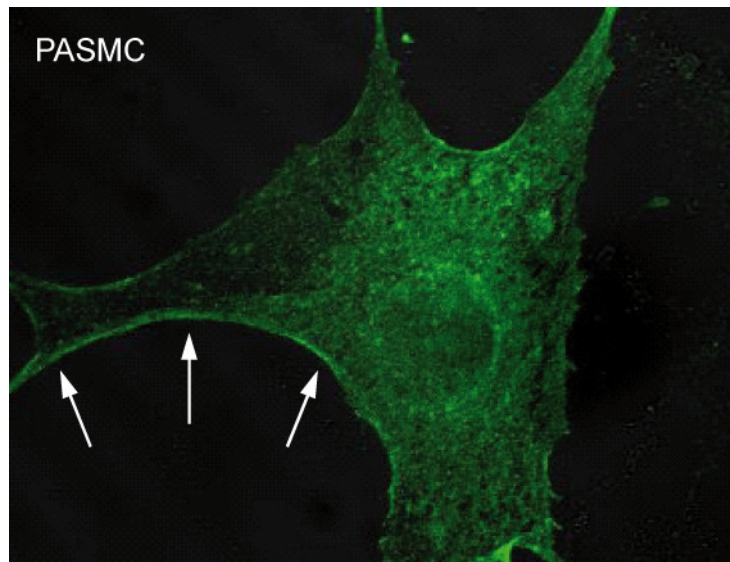


Abbildung 20: Nachweis eines grün-fluoreszierenden TRPC6-Proteins (TRPC6eGFP) in PASMC. Ein TRPC6eGFP kodierendes Konstrukt wurde mittels rekombinanter adenoassoziierter Viren in PASMC aus TRPC6 defizienten Mäusen zur Expression gebracht.

In HEK293 Zellen überexprimierte TRPC Kationenkanäle ließen sich jedoch nicht direkt durch Hypoxie, t-HBP oder H_2O_2 aktivieren, so dass der Kanal selber also nicht direkt durch Hypoxie oder Sauerstoffradikale aktiviert werden kann (Abb. 20).

3. Ergebnisse

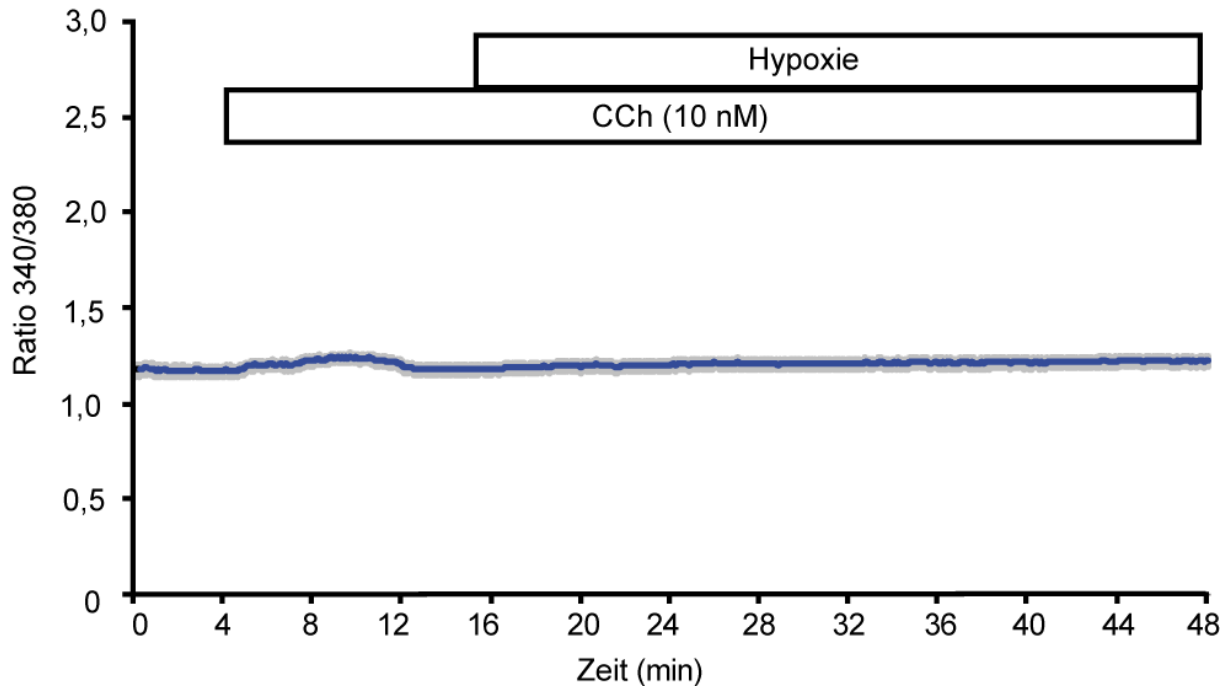


Abbildung 21: Hypoxiesensitivität überexprimierter TRPC6-Kanäle

HEK293 Zellen wurden mit der cDNA für die murine Variante von TRPC6 transfiziert und im Anschluss in einem bildgebenden Hypoxieexperiment eingesetzt. Das „priming“ wurde durch eine niedrige Dosis von Carbachol simuliert. Es ließ sich keine Reaktion auf Hypoxie beobachten.

3.5. Untersuchungen zum Hypoxie-induzierten Kationeneinstrom in Endothelzellen aus TRPC6-defizienten und Wildtyp- Mäusen

Analoge Experimente können nun mit den aus den Mausmodellen gewonnenen LEC durchgeführt werden. Unter Hypoxie erhöht sich in gleicher Weise die $[Ca^{2+}]_i$ isolierter Endothelzellen aus Wildtyp-Mäusen. Dieser Einstrom fehlt wieder in den TRPC6-defizienten Zellen (Abb. 22).

3. Ergebnisse

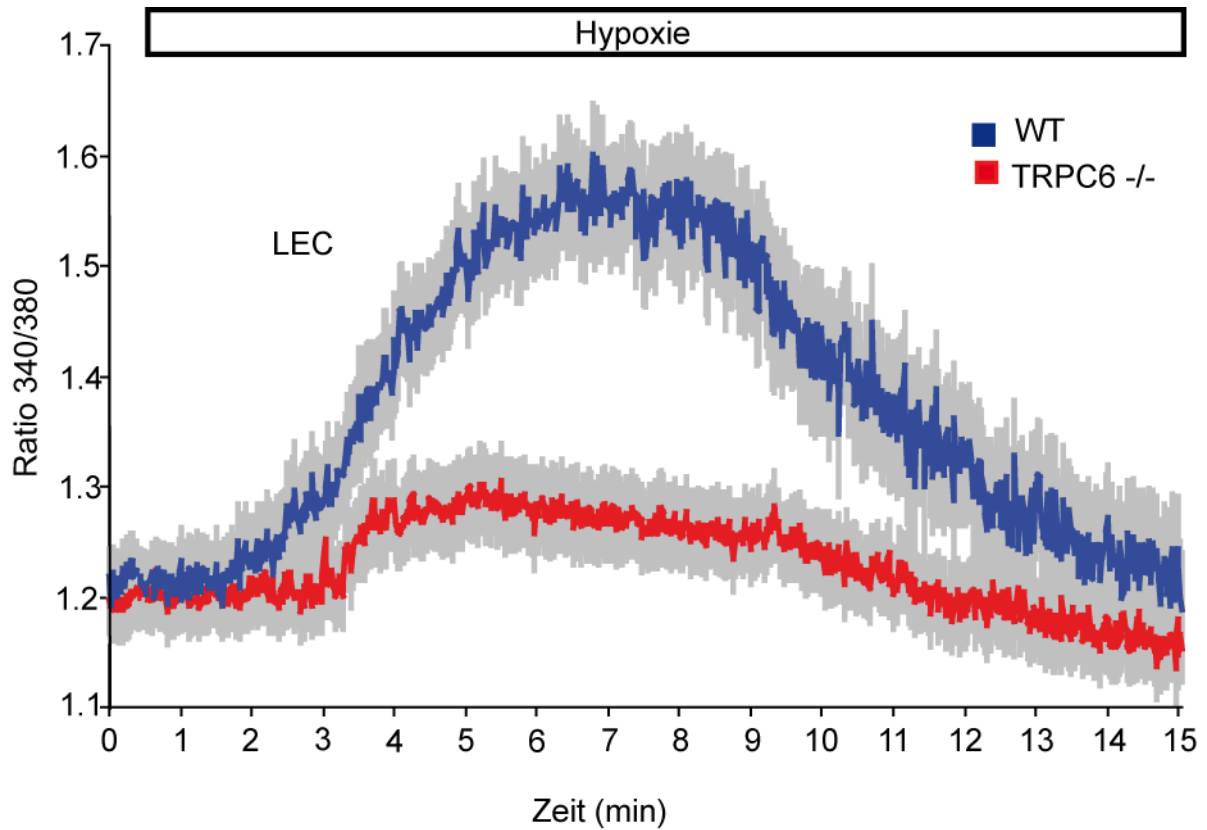


Abbildung 22: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in LEC durch Applikation von Hypoxie.

Mit Fura-2-AM beladene LEC aus Wildtyp- oder TRPC6-defizienten Tieren wurden mittels Echtzeit-Videomikroskopie untersucht. Nach Etablierung einer stabilen Basislinie in den strömungssensitiven Endothelzellen wurden die Zellen mit hypoxischem Puffer perfundiert.

In analogen Mn^{2+} -Quench-Experimenten findet sich ebenfalls ein deutlicher Unterschied im Kationeneinstrom zwischen Wildtyp- und TRPC6-defizienten Zellen (Abb. 23).

3. Ergebnisse

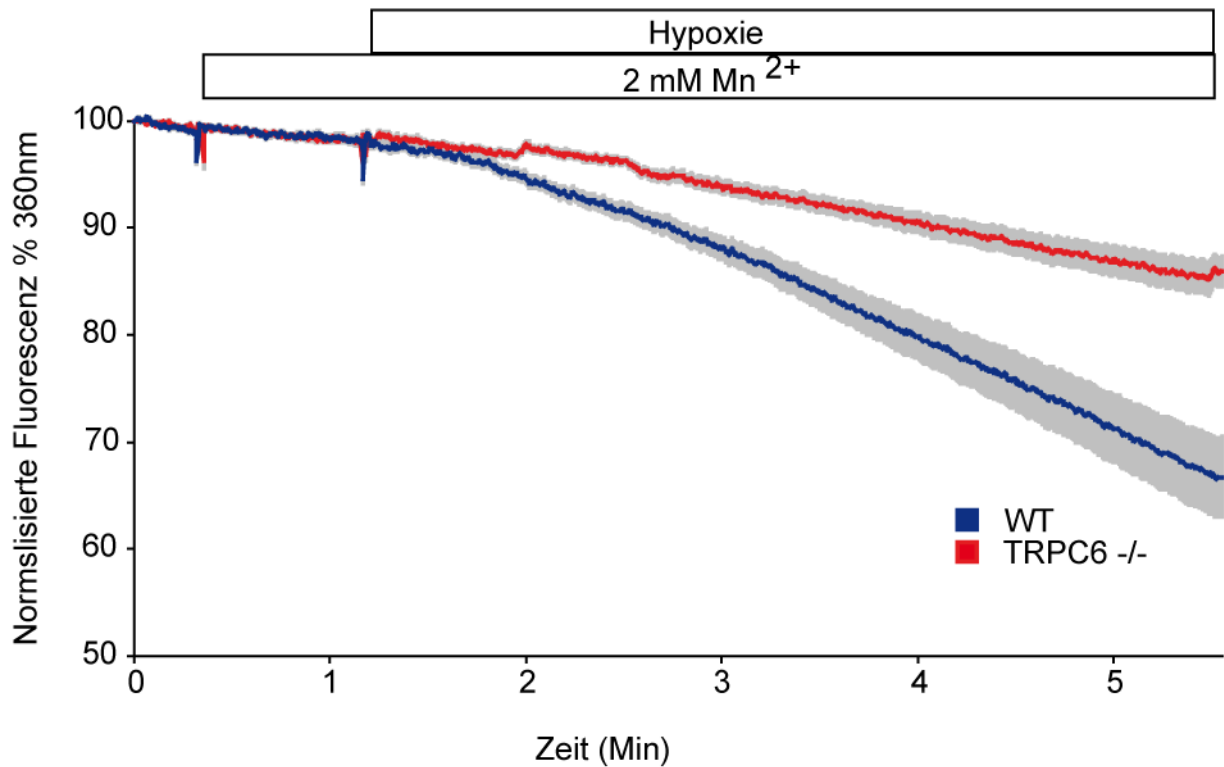


Abbildung 23: Nachweis der Erhöhung der Permeation bivalenter Kationen unter Hypoxie in LEC.

Mittels Echtzeit-Videomikroskopie wurde die Abnahme der Fura-2 Fluoreszenz am isosbestrischen Punkt (360 nm) durch Bindung von Manganionen untersucht

Umspült man nun LEC aus wt Mäusen mit hypoxischem Perfusat sowie zusätzlich 2 mM EGTA wird die Bedeutung des extrazellulären Calciums noch deutlicher.

3. Ergebnisse

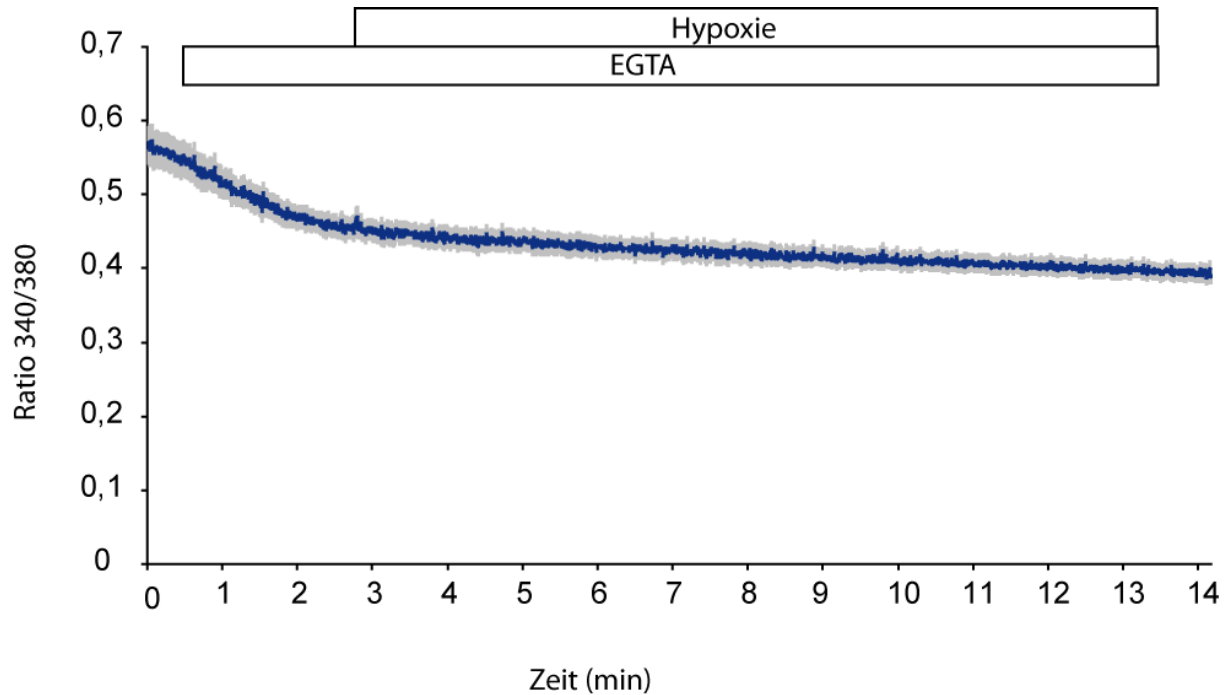


Abbildung 24: Nachweis des Einstroms bivalenter Kationen in MLEC nach Applikation von Hypoxie.

Mittels Echtzeit-Videomikroskopie wurde die Abnahme der Fura-2 Fluoreszenz am isosbestischen Punkt (360 nm) durch Einstrom von extrazellulären Manganionen untersucht.

Wie für die PASMC lassen sich auch bei den MLEC keine Indizien für die Beteiligung der intrazellulären Speicher am Hypoxie-induzierten Ca^{2+} -Einstrom finden. Unterschiede im Füllungsgrad der internen Ca^{2+} -Speicher im endoplasmatischen Retikulum (ER) mit Hilfe des Blockers der ER- Ca^{2+} -Pumpen Thapsigargin lassen sich nicht detektieren (Abb. 25).

3. Ergebnisse

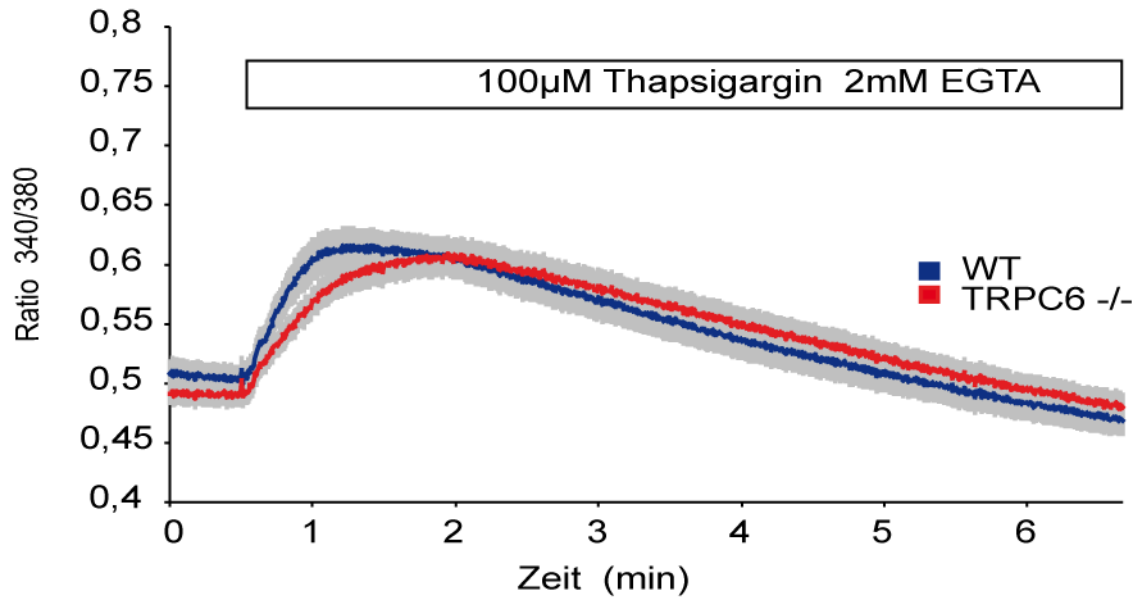


Abbildung 25: Kontrolle des Füllungszustands der intrazellulären Calciumspeicher in LEC.

LEC aus Wildtyp- und TRPC6-defizienten Mäusen wurden mit nominell calciumfreiem, EGTA (2mM)-haltigem Puffer perfundiert. Nach Einwaschen von 100 µM Thapsigargin wurde eine langsame Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher beobachtet.

3.6. Bedeutung des Ca^{2+} -Einstroms für den Verlust der pulmonalen Endothelzellbarriere

Da die Endothelzelle im klassischen Sinne keine kontraktile Struktur bildet, sind weitere Untersuchungen notwendig um zu klären, wie es durch eine Hypoxie-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration zum Verlust der Barrierefunktion der Kapillaren kommen kann. Um sich dem molekularen Mechanismus zu nähern, der dem Ischämie/Reperfusionsschaden zugrunde liegt, war es notwendig, ein Messsystem zur Quantifizierung der Durchlässigkeit der Endothelzellschicht zu etablieren. Misst man die Impedanzeigenschaften eines Endothelzellrasens kommt es in Wildtypzellen nach Applikation von Hypoxie zu einer Impedanzreduktion, wenn eine Auflockerung der endothelialen Zell-Zellkontakte ausgelöst wird. Dies lässt sich in einem Zellrasen bestehend aus TRPC6-defizienten Zellen nicht in dem Maße beobachten (Abb. 26).

3. Ergebnisse

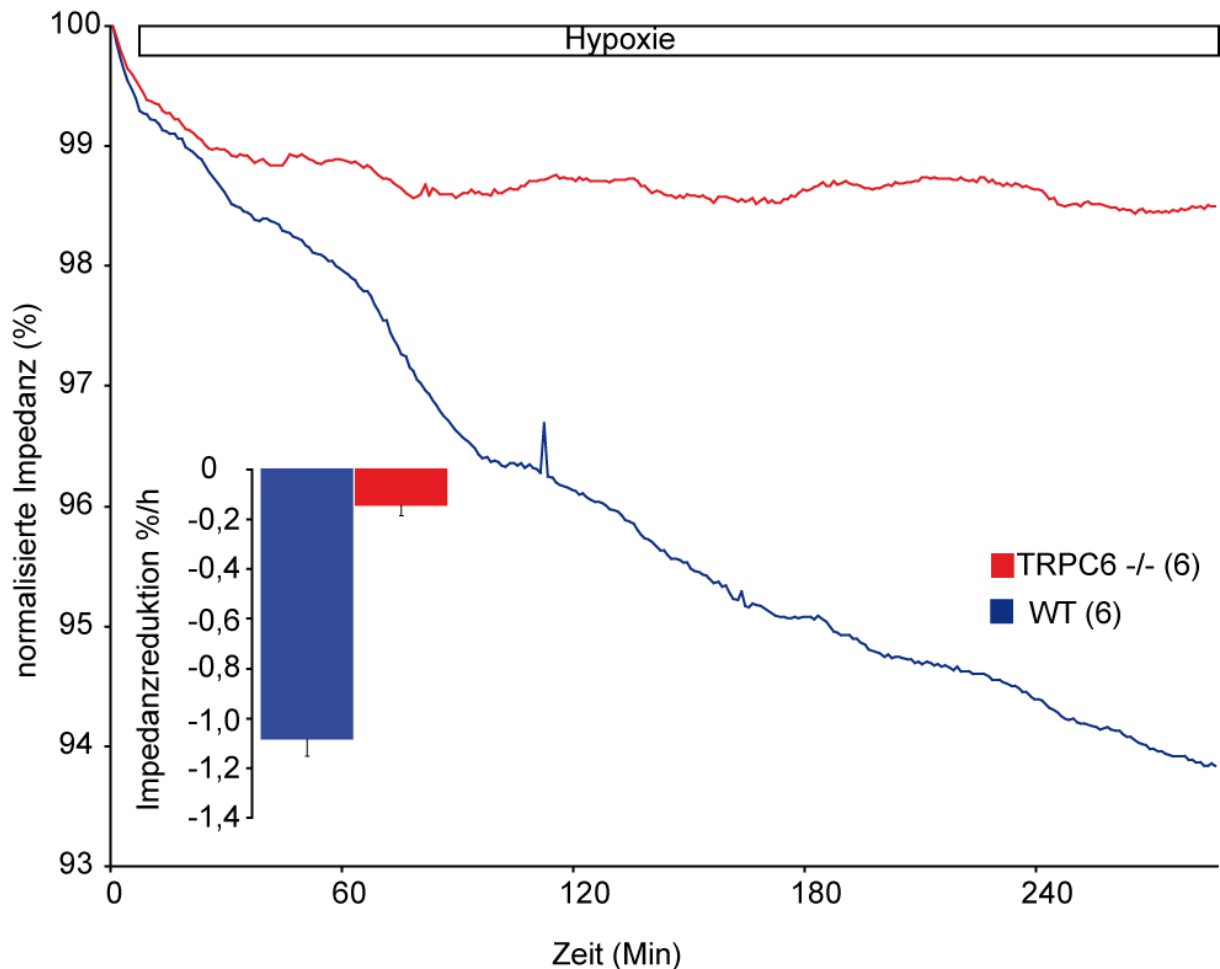


Abbildung 26: Messung der Impedanzeigenschaften eines Zellrasens aus Endothelzellen.

Endothelzellen aus Wildtyp (WT) oder TRPC6-defizienten (TRPC6^{-/-}) Zellen wurden auf Impedanzmesselektroden ausgesät und nach Bildung eines konfluenten Zellrasens mit hypoxischem Perfusat überschichtet. In dem Säulendiagramm ist der statistische Mittelwert der Steigungsänderung von sechs Einzelmessungen zusammengefasst.

Rekonstituiert man jedoch TRPC6 in den Endothelzellen aus TRPC6-defizienten Mäusen, lässt sich dieser Mechanismus wieder herstellen (Abb. 27). Im Gegensatz zu den glatten Muskelzellen wurde hier das mTRPC6eGFP-Expressionskonstrukt mittels Elektroporation in die Zielzellen eingebracht (Abb. 28).

3. Ergebnisse

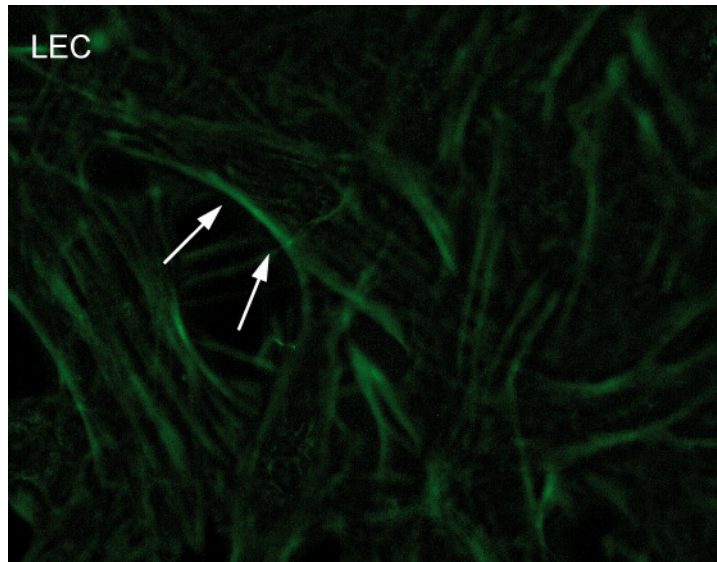


Abbildung 27: Nachweis eines grün-fluoreszierenden TRPC6-Proteins (TRPC6eGFP) in LEC. Ein TRPC6eGFP kodierendes Konstrukt wurde mittels Elektroporation in LEC aus TRPC6-defizienten Mäusen zur Expression gebracht.

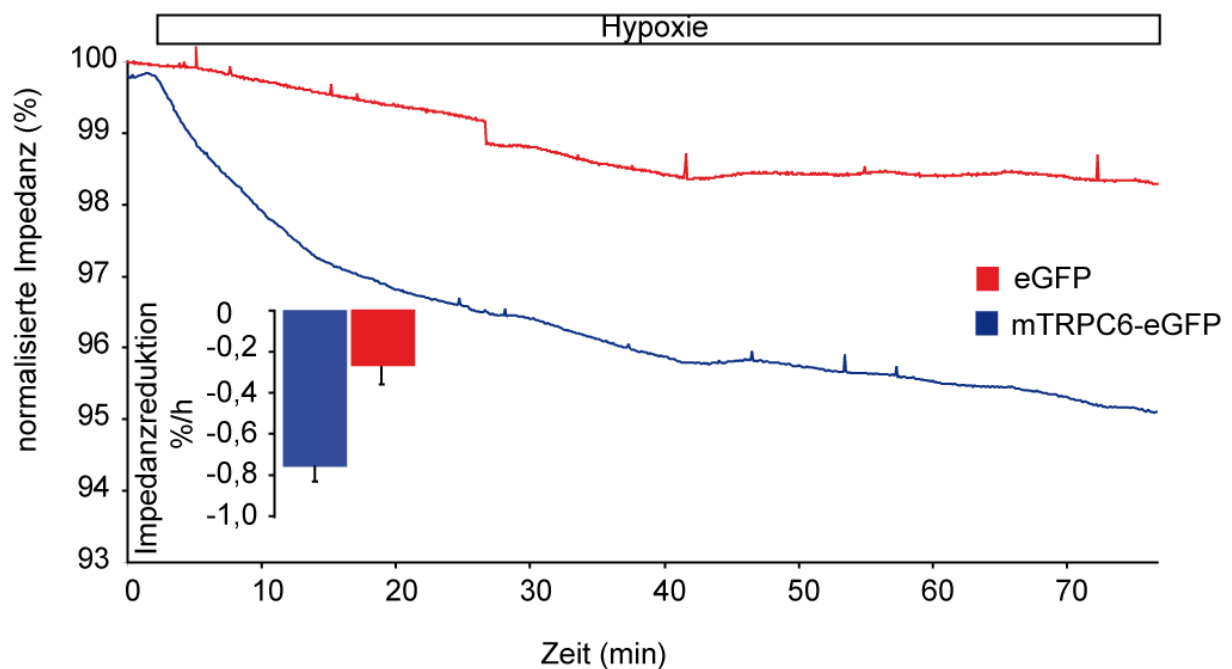


Abbildung 28: Messung der Impedanzeigenschaften eines Zellrasens aus Endothelzellen.

Endothelzellen aus TRPC6-defizienten Zellen wurden mit einem TRPC6EGFP oder einem eGFP-Konstrukt elektroporiert und auf Impedanzmesselektroden ausgesät. Nach Bildung eines konfluenten Zellrasens wurden sie mit hypoxischem Perfusat überschichtet. In dem Säulendiagramm ist der statistische Mittelwert der Steigungsänderung von sechs Einzelmessungen zusammengefasst.

In nicht generell kontraktile Zellen muss eine solche Veränderung der Zellmorphologie stets mit einer Umlagerung des Zytoskeletts und damit einer Veränderung des Polymerisationsgrades von Aktin einhergehen. Um dies zu

3. Ergebnisse

quantifizieren, wurden nun die Hypoxie- und Normoxie-vermittelte Bildung von F-Aktin analysiert. Dazu wurde das polymerisierte Aktin mit dem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Alkaloid des grünen und weißen Knollenblätterpilzes (Phalloidin) markiert. Es zeigt sich, dass die Hypoxie-vermittelte Polymerisationsänderung in TRPC6-defizienten Endothelzellen nicht nur reduziert ist, sondern dass der Verlust von TRPC6 auch gravierende Auswirkung auf den Polymerisationsgrad hat (Abb. 29).

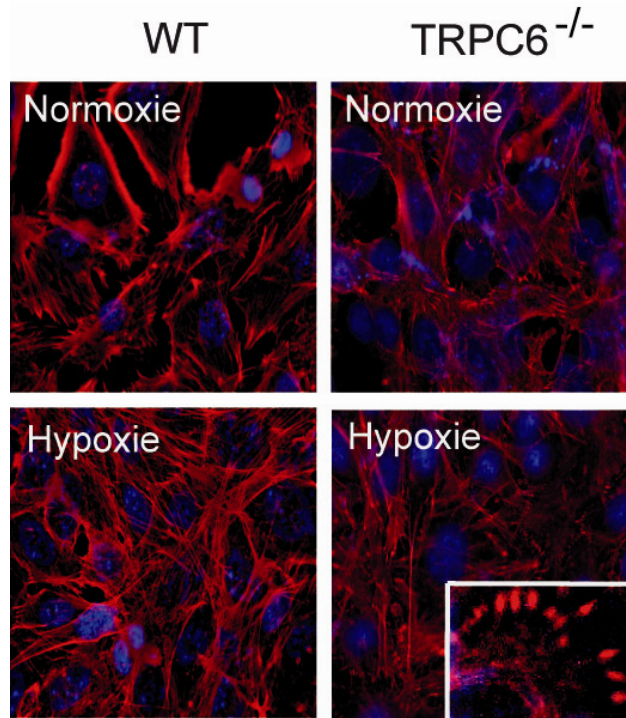


Abbildung 29: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des polymerisierten Aktins in Endothelzellen. Endothelzellen aus Wildtyp- und TRPC6-defizienten Tieren wurden mit hypoxischen und normoxischen Puffern inkubiert und im Anschluß fixiert. Mittels eines fluoreszenzmarkierten Phalloidins wurde das polymerisierte Aktin markiert. Als Gegenfärbung wurde die zelluläre DNA mittels DAPI kontrastiert. Der Ausschnitt zeigt die unvollständige Bildung von Aktinpolymeren in TRPC6-defizienten Zellen.

Dieses Phänomen ließ sich nicht nur qualitativ, sondern auch durch eine fluometrische Quantifizierung des eingelagerten fluoreszierenden Phalloidins nachweisen (Abb. 30).

3. Ergebnisse

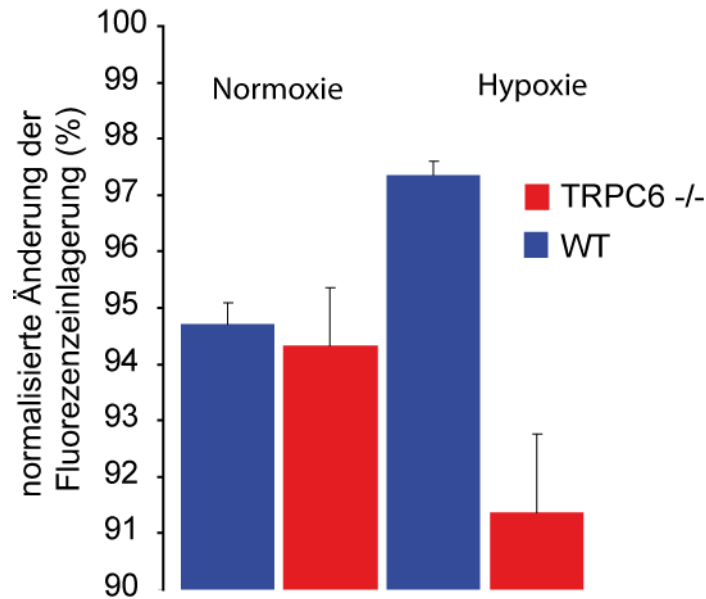


Abbildung 30: Quantifizierung der Aktinpolymerisation durch einen normalisierten, fluorimetrischen Assay.

3.7 Identifizierung von Komponenten der Signaltransduktion zur Aktivierung von TRPC6 in Endothelzellen

Was passiert nun nach der Applikation von Hypoxie in den Endothelzellen? Ein in der Literatur häufig diskutiertes Phänomen ist die Erhöhung der Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Zellen, die einem hypoxischen Stimulus ausgesetzt sind. Um diese Theorie zu testen, brachten wir ein Biosensor-Detektionsmolekül zur Bestimmung der Konzentration der intrazellulären O_2^- Radikale in den Endothelzellen zur Expression. Unter Hypoxie kommt es eindeutig zu einer Erhöhung der intrazellulären ROS-Konzentration, die nach Applikation von Normoxie wieder rückgängig gemacht werden kann (Abb. 31).

3. Ergebnisse

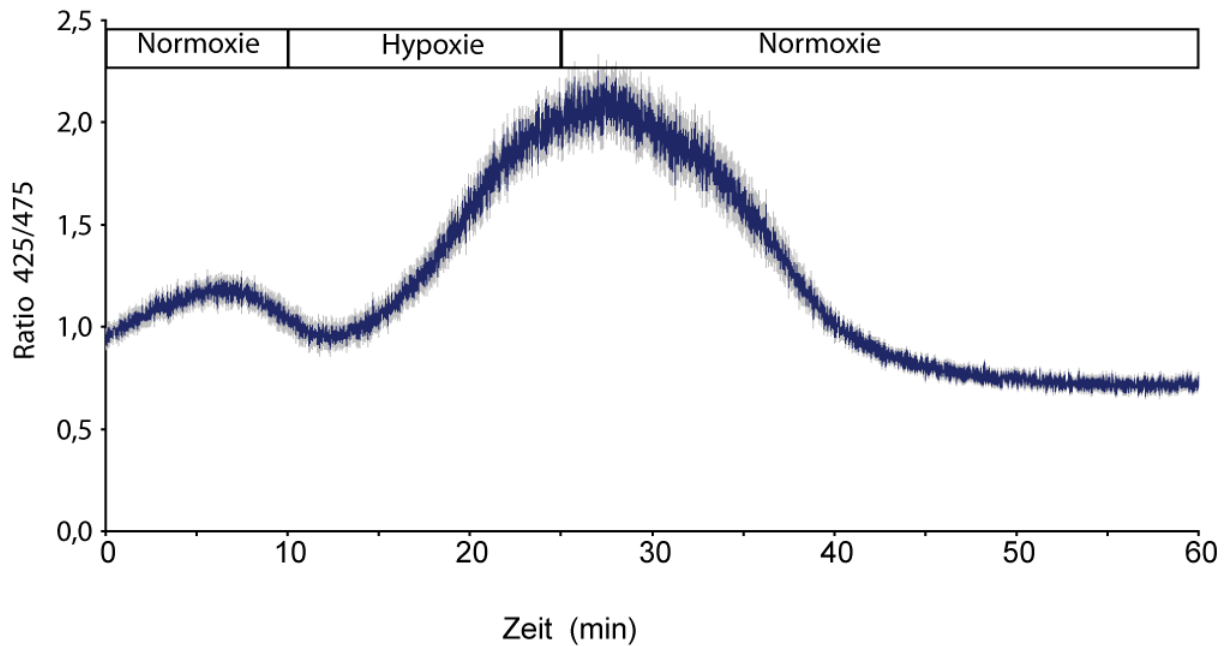


Abbildung 31: ROS Produktion unter hypoxischer Perfusion

In Endothelzellen wurde mittels lentiviralen Gentransfers das ROS Detektionskonstrukt HyPer zur Expression gebracht. Nach Applikation eines hypoxischen Perfusats konnte ein Anstieg der Konzentration von O_2^- -Radikalen beobachtet werden.

Auch die Anwendung des DAG-Kinase Inhibitors führte zu analogen Ergebnissen wie sie bereits für die glatten Muskelzellen beobachtet wurden (Abb. 32).

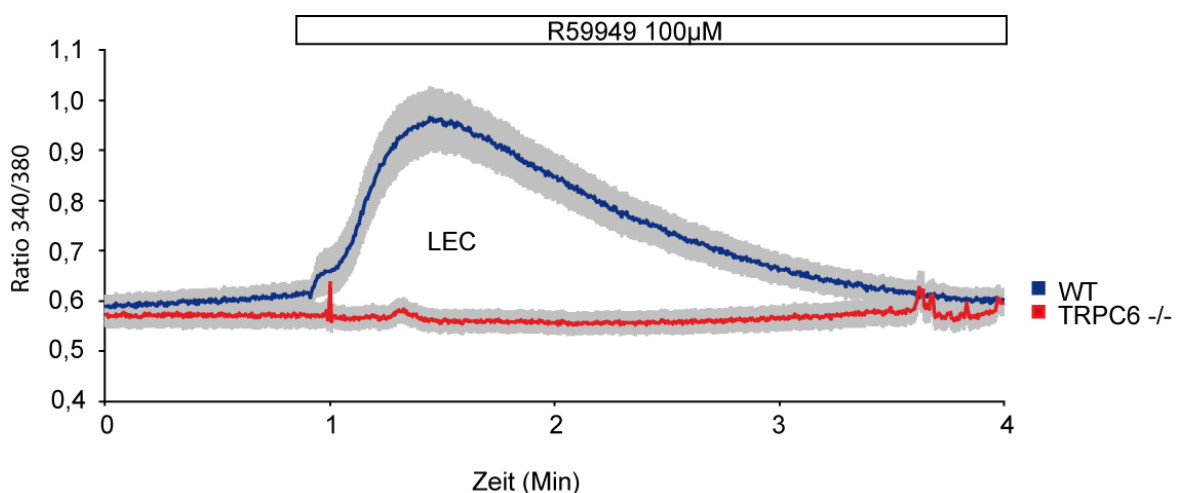


Abbildung 32: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Wildtyp (WT)-LEC nach Applikation eines Hemmers der DAG-Kinasen (R59949).

LEC wurden nach dem initialen „priming“ mit ET-1 mit dem Inhibitor der DAG-Kinasen (R59949) behandelt.

3. Ergebnisse

Zusätzlich zeigte eine Inhibition der Phospholipasen keine Auswirkung auf die Hypoxie-vermittelte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 33), so dass eine Hemmung der DAG-Kinasen als Ursache der DAG-Akkumulation wahrscheinlicher ist.

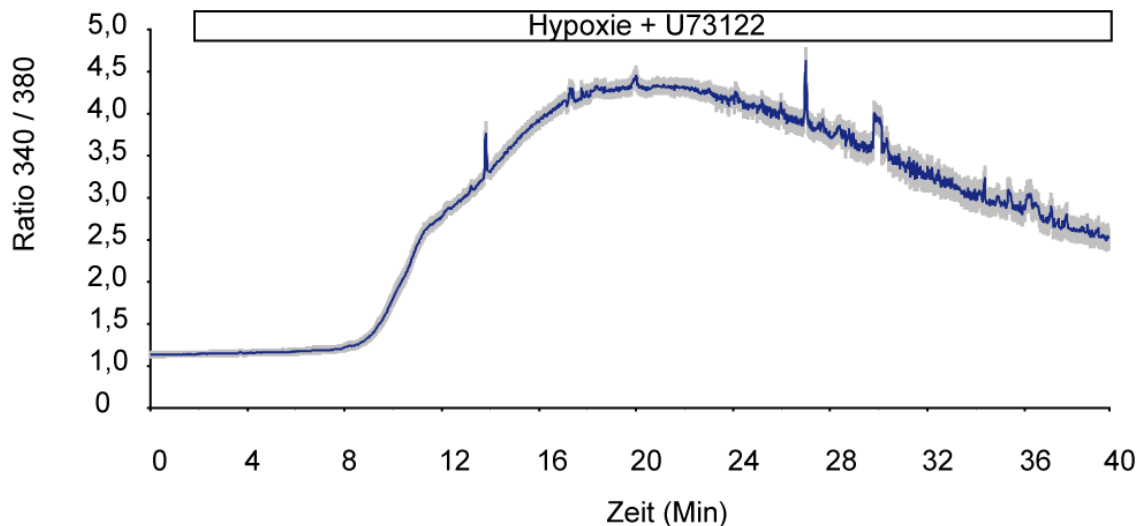


Abbildung 33: Hypoxie vermittelte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ unter Hemmung der Phospholipasen.

LEC wurden nach Inkubation mit dem nicht selektiven PLC Inhibitor U73122 einem hypoxischen Perfusionsexperiment unterzogen. Es kam unter Hypoxie zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, der mit dem unbehandelten Zellen vergleichbar ist.

Weitere Experimente zeigten, dass es auch in LEC zu einer Akkumulation von DAG kommt. Hierzu setzten wir den bereits charakterisierten DAG-Sensor erneut ein (Abb. 34).

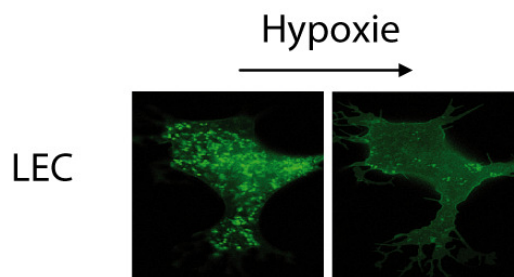


Abbildung 34: Translokation des DAG-Sensors unter Hypoxie.

In LEC aus Wildtyp-Mäusen wurde mittels Elektroporation ein DAG-Sensor zur Expression gebracht. Die Messung der Hypoxie-vermittelten Translokation des DAG-Sensors erfolgte mittels eines live cell imaging“-Mikroskops.

Aufgrund der günstigeren Zellmorphologie war es dieses Mal jedoch möglich, auch direkte, quantitative Messungen vorzunehmen (Abb. 35).

3. Ergebnisse

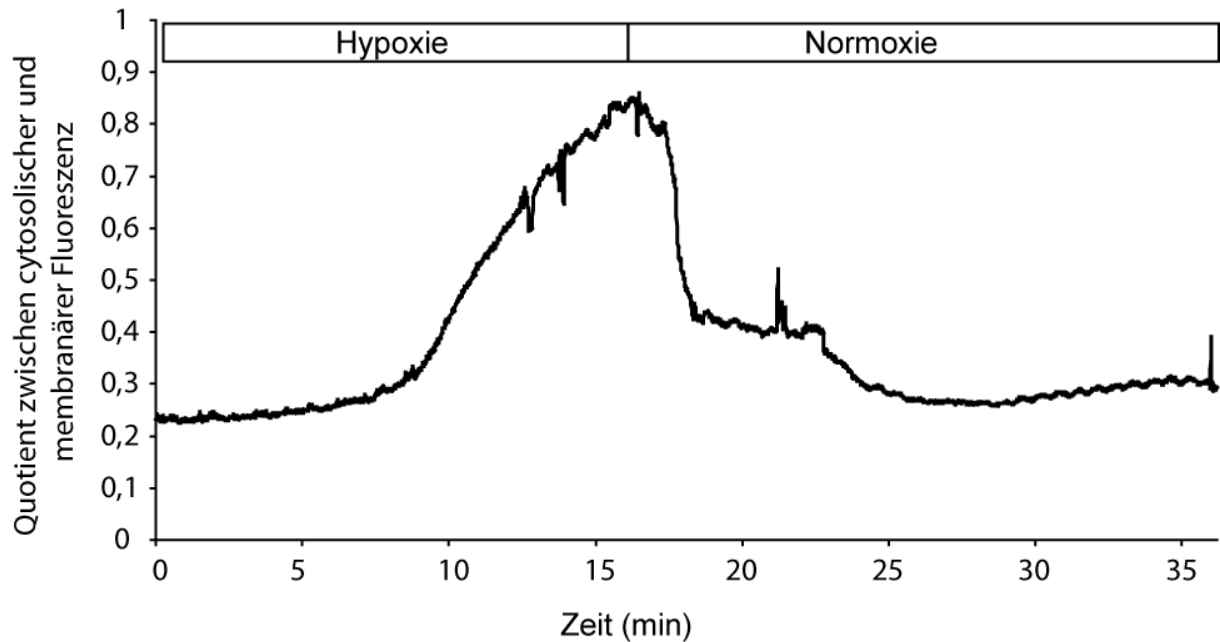


Abbildung 35: Kinetische Messung der Translokation des DAG-Sensors.

Der in LEC zur Expression gebrachte DAG-Sensor konnte mittels Echtzeit-Videomikroskopie in seinem Translokationsverhalten beobachtet werden.

3.8 Untersuchungen zur Rolle von DAG-Kinasen bei der Hypoxie-induzierten Aktivierung von TRPC6

Da eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ auch durch Inhibitoren der DAG-Kinasen ausgelöst werden kann (siehe Abb. 18 und 32), ist eine Beteiligung der Inhibition der DAG-Kinasen, die zur DAG-Akkumulation und TRPC6-Aktivierung führt, wahrscheinlich. Aus diesem Grund erschien eine vergleichende Bestimmung der Expressionsniveaus von DAG-Kinasen in PSMC, LEC und HEK293 Zellen sinnvoll (Abb. 36). Der Vergleich erfolgte mittels quantitativer RT-PCR (wie in Abb. 8).

3. Ergebnisse

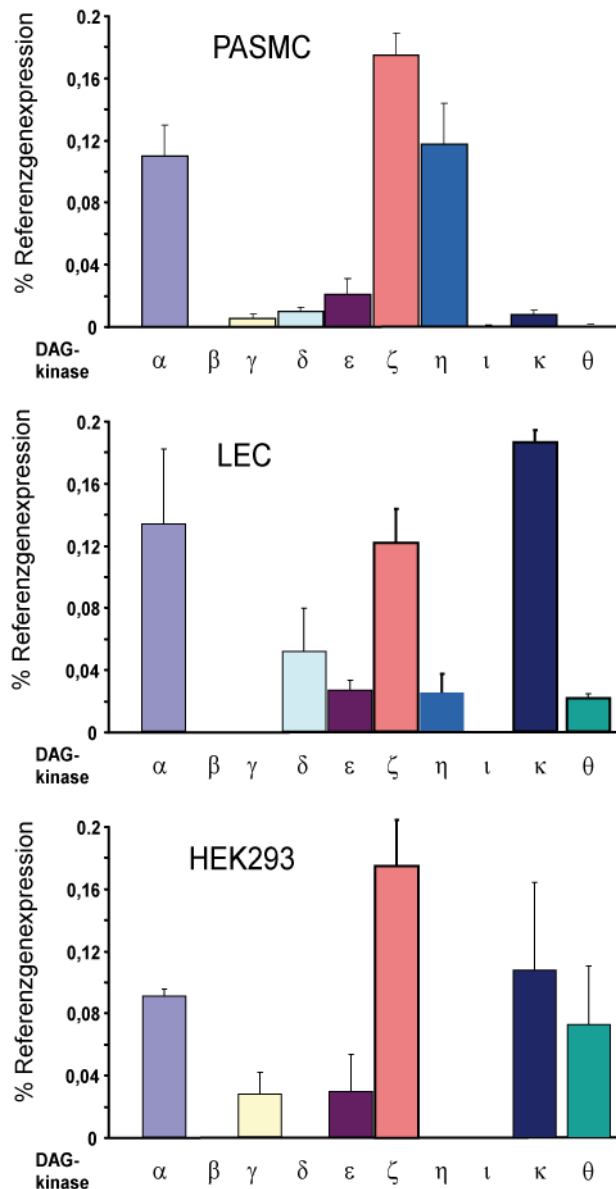


Abbildung 36: Expressionsniveaus der einzelnen Mitglieder der DAG-Kinasen.

Analyse der relativen Expression einzelner Mitglieder der DAG-Kinasen in PASM, LEC und HEK293 Zellen mittels quantitativer revers-transkribierter Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR). Die Amplifikation erfolgte mittels Intron-übergreifender, kurzketziger Starternukleotide (generiert durch: universal probelibrary) mit einer gemeinsamen Schmelztemperatur von 62°C sowie einer mittleren Amplifikationslänge von circa 100 Basenpaaren. Als relative Referenz diente das Haushaltsgen β -Aktin. Gezeigt sind hier die Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts von mindestens 3 Einzelexperimenten.

Wie Abb. 36 zeigt sind die DAG-Kinase Isoformen ξ und η besonders stark in PASM exprimiert. Da DAG-Kinase ξ vorwiegend im Zellkern lokalisiert ist, schied sie jedoch als möglicher Kandidat aus, so dass sich die weiteren Untersuchungen auf die DAG-Kinase η beschränkten. Interessanterweise zeigte sich nach Applikation des Donors reaktiver Sauerstoffradikale H_2O_2 eine Translokation überexprimierter fluoreszenz-markierter DAG-Kinase η in intrazelluläre Vesikel von COS7-Zellen (Abb. 37).

3. Ergebnisse

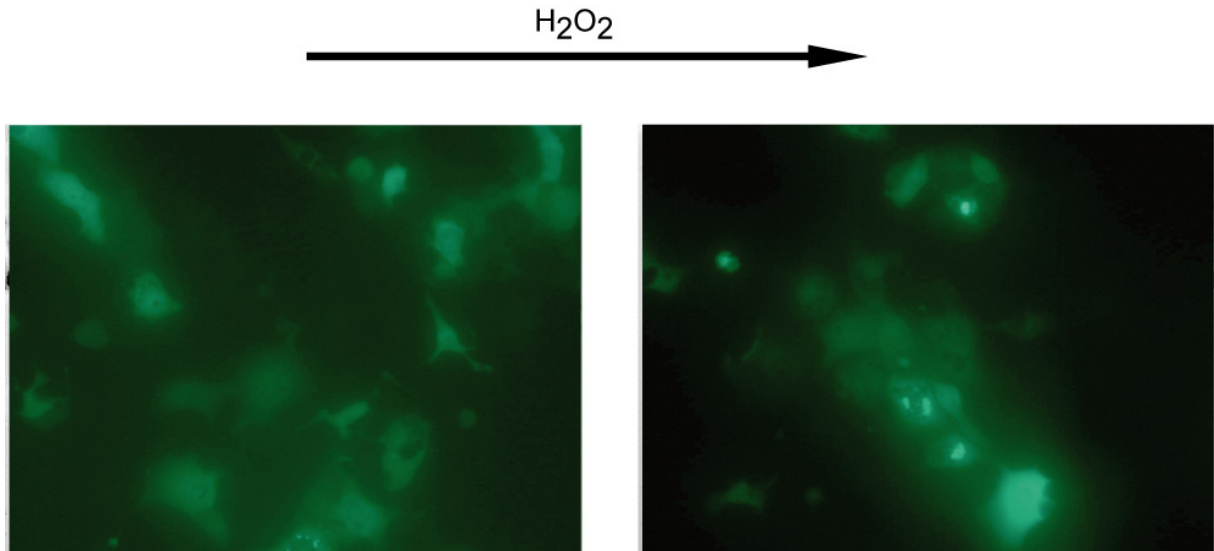


Abbildung 37: Translokation überexprimierter fluoreszenzmarkierter DAG-Kinase η nach 20 minütiger Inkubation mit H_2O_2 in intrazelluläre Vesikel von COS7 Zellen.

Die DAG-Kinase-Aktivität, die aus DAG durch Phosphorylierung Phosphatidsäure erzeugt, lässt sich auch *in-vitro* quantifizieren. Im Gegensatz zu den DAG-Kinasen α , β , und γ (Abb. 38), wurden die DAG-Kinase η Isoformen η_1 und η_2 durch die Applikation des Donors reaktiver Sauerstoffspezies H_2O_2 in ihrer Aktivität inhibiert (Abb. 39).

3. Ergebnisse

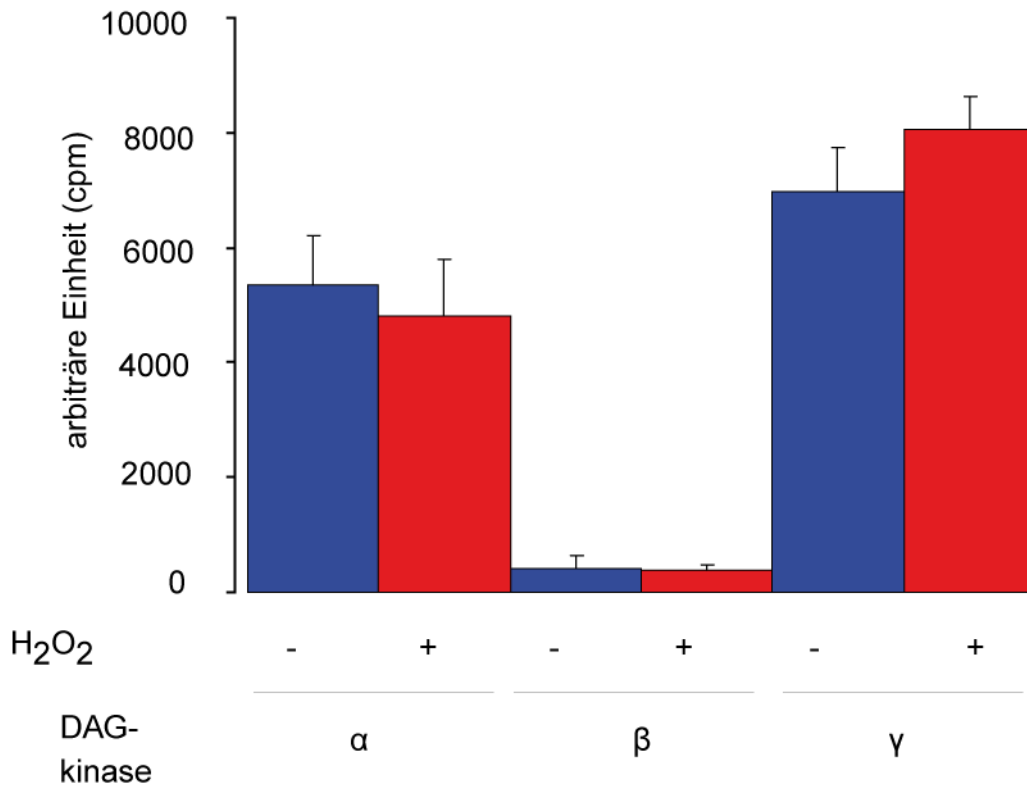


Abbildung 38: Aktivität der DAG-Kinasen α , β und γ nach Applikation des Donors reaktiver Sauerstoffspezies H_2O_2 .

Die Aktivität von DAG-Kinase Isoformen wurde in An- und Abwesenheit von Wasserstoffsuperoxid gemessen.

3. Ergebnisse

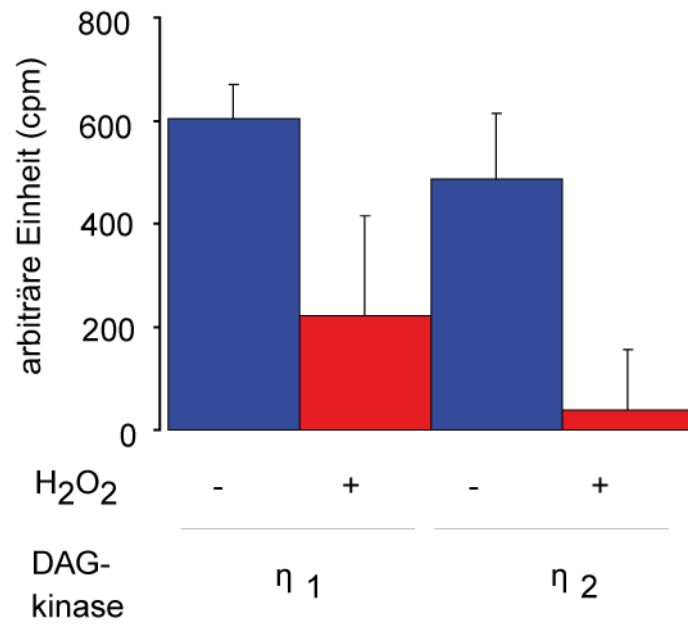


Abbildung 39: Aktivität der DAG-Kinase Isoformen η_1 und η_2 nach Applikation des Donors reaktiver Sauerstoffspezies H_2O_2 .
Die Aktivität von DAG-Kinase Isoformen wurde in An- und Abwesenheit von Wasserstoffsuperoxid gemessen.

4. Diskussion

4. Diskussion

4.1 Zelluläre Isolationstechniken

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden präkapilläre pulmonale glatte Muskelzellen (PASMC) und pulmonale Endothelzellen (LEC) aus TRPC6-defizienten und Wildtyp-Mäusen isoliert und vergleichend analysiert. Obwohl beide Isolationsmethoden sowohl für die PASMC als auch für die LEC gut in der Literatur dokumentiert und in vielen Laboratorien etabliert sind, handelt es sich doch um Verfahren, die aus einem multizellulären Organ verschiedene zelluläre Bestandteile anreichern (Kovitz, Aleskowitch et al. 1993). Der Klärung der zellulären Identität kommt nun eine entscheidende Bedeutung zu, da es sich hierbei um die Basis für alle nachfolgenden Experimente handelt. Die hier verwendeten Antikörper sowohl bei den PASMC als auch bei den LEC sind monoklonal und zeichnen sich durch eine größtmögliche Spezifität aus. Sie sind gut etabliert und werden routinemäßig diagnostisch eingesetzt. Es kann also davon ausgegangen werden, daß es sich bei den aufgereinigten Zellen tatsächlich um die jeweils geforderten Zelltypen handelt. Das gilt auch, da entsprechende mitgeführte Kontrollen immer wie erwartet negativ waren. Des Weiteren kann man aus dem geringen Prozentsatz an Kontaminanten ableiten, daß beide Methoden, also sowohl die Selektion nach dem Gefäßdurchmesser bei den PASMC als auch die Affinitätsreinigung durch PECAM1 bei den Endothelzellen, eine hochspezifische Zellanreicherung erlauben. In Zahlen betrug die Anzahl falsch isolierter Zellen weniger als 1%. Außerdem weisen die jeweiligen Zelltypen eine eindeutige Morphologie auf, die mit ihrem hohen Grad an Spezialisierung einhergeht. Selbst wenn sich in einer Messung kontaminierende primäre Zellen befinden würden, wären sie sehr leicht visuell zu identifizieren und

4. Diskussion

könnten aus den Einzelzellmessungen ausgeschlossen werden. Bei den nicht visuellen Messverfahren, die eine größere Zellzahl bedingen, führt der geringe Prozentsatz an artfremden Zellen zu keiner Veränderung des Gesamtergebnisses.

4.2 Nachweis von TRPC6 in den Zielzellen

Der Nachweis der Expression von TRPC-Kanälen in den isolierten Zellen wurde sowohl durch Quantifizieren spezifischer mRNA als auch durch den Nachweis des gebildeten Proteins im sog. „Western Blot“ erbracht. Durch diese Methoden ist es nicht nur möglich, eine eventuelle Expression des TRPC6-Proteins in TRPC6-defizienten Mäusen auszuschließen, sondern auch eine kompensatorische Überexpression anderer Mitglieder der TRPC-Familie nachzuweisen (Dietrich, Mederos et al. 2005). Das Phänomen, dass es durch den Verlust eines spezifischen Proteins zu einer kompensatorischen Expressionserhöhung eines nahen Verwandten kommt, wurde bereits für die Mitglieder der TRPC Subfamilie 3/6/7 in der glatten Muskulatur der thorakalen Aorta beschrieben (Weissmann, Grimminger et al. 2001; Dietrich, Mederos et al. 2005; Waypa and Schumacker 2005; Wolin, Ahmad et al. 2005). Die Resultate der quantitativen RT-PCR in den PASMC und LEC der Lungenstrombahn zeigen dies jedoch nicht. So kam es weder in den PASMC noch in den LEC von TRPC6-defizienten Mäusen zu einer signifikanten Erhöhung der Expressionsrate der TRPC3/7 Familienmitglieder. Es handelt sich also um zwei Zellmodelle, die frei von Kompensationsartefakten der untersuchten Kanäle sind.

Das Vorhandensein eines Transkriptes alleine sagt aber nichts über die Notwendigkeit des Proteins für eine Signaltransduktionskaskade oder über seine funktionelle Aktivierbarkeit aus. So könnte es zum Beispiel durch endogen vorkommende dominant negativ wirkende Varianten zu einer permanent inhibierten Aktivität der Kanalkomplexe kommen. Auch könnte das Fehlen des Kanals zu einem

4. Diskussion

funktionellen Verlust weiterer Mitglieder der Signaltransduktionskaskade führen. Eine Überprüfung der generellen Kanalaktivität ist somit entscheidend. In den hier durchgeführten Versuchen wurde nun die komplette Signaltransduktionskaskade nach Rezeptorstimulation untersucht. Für die glatten Muskelzellen war dies durch den physiologischen Agonisten Endothelin-I für die Endothelzellen mit Histamin möglich. Hierbei zeigte es sich, daß in beiden Zelltypen aus Wildtyp und TRPC6-defizienten Tieren eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration durch Entleerung der internen Ca^{2+} -Speicher bei Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} möglich war. Diese Signalkaskade war also intakt und braucht kein funktionelles TRPC6-Protein. Dies wurde auch mit anderen Agonisten (Angiotensin II und ATP) bestätigt (Daten nicht gezeigt). In unserer Arbeitsgruppe ebenfalls durchgeführte Ganzzelleableitungen mittels der Patch-Clamp Technik unter dem membranpermeablen DAG-Analog OAG oder SAG hingegen zeigten Rezeptor-induzierte TRPC6-typische Kationenströme an der Plasmamembran, die in den TRPC6-defizienten Zellen fehlen (Daten nicht gezeigt). Die in den Wildtyp-Zellen detektierten TRPC6-Proteine scheinen also funktionell aktiv zu sein.

4.3 Etablierung des hypoxischen Meßsystems

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten weitere Teile der Signaltransduktionskaskade aufgeklärt werden, die auf einen hypoxischen Stimulus zu einer Vasokonstriktion (PASMC) oder zu einer verminderten Barrierefunktion (LEC) in Blutgefäßen der Lungenstrombahn führen. Dazu ist es nötig, die hypoxische bzw normoxische Konfiguration des Meßsystems genau zu kontrollieren. Notwendig war zum einen die maximale Sauerstoffverdrängung zu bestimmen und gleichzeitig sicherzustellen, dass das gesamte für die Versuche benutzte Perfusionssystem gegen Sauerstoff diffusionsdicht war, was mit Hilfe einer sauerstoffsensitiven

4. Diskussion

Nadelelektrode gelang. So war es nicht nur möglich, den Sauerstoff teilweise aus dem Perfusat zu verdrängen, sondern auch einen maximal hypoxischen Sauerstoffpartialdruck (PO_2) von circa 2% zu erreichen, der deutlich innerhalb des pathophysiologischen Bereiches lag, der unter hypoxischen Ereignissen auftreten kann. Es war außerdem sichergestellt, daß es zu einem langsamen aber steten Absinken der Sauerstoffsättigung im Perfusat der Zellen vergleichbar mit der Situation in der Lungenstrombahn kommt. Auch nach langanhaltender Perfusion kommt es nicht zu einer Reoxygenierung der Perfusionskammer, so dass das verwendete System in allen Komponenten gasdicht ist. Das System stellt so also eine valide Möglichkeit dar, Hypoxie im Sinne eines pharmakologischen Stimulus einzusetzen. Durch die Tatsache, dass für den Austausch von Sauerstoff das inerte Stickstoff benutzt wurde, und die Perfusionslösung stark gepuffert war, kann ein Auftreten von pH-Wert-Schwankungen weitestgehend ausgeschlossen werden, wie sie sonst bei der Verwendung von Kohlendioxid als Perfusionsgas auftritt.

4.4 Hypoxie-induzierter Ca^{2+} -Einstrom in präkapilläre pulmonale arterielle glatte Muskelzellen (PASMC)

Die isolierten PASMC wurden nun in einem bildgebenden Fluoreszenzmessexperiment mit Hypoxie als Stimulus eingesetzt. Es kam zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Wildtypzellen, nicht jedoch in Zellen aus TRPC6-defizienten Tieren. Allerdings war in den glatten Muskelzellen allein durch Hypoxie keine Reaktion auslösbar. Dieser in der Literatur beschriebene, aber wenig verstandene Mechanismus, das sogenannte „priming“ (Sham, Crenshaw et al. 2000; Leach, Hill et al. 2001; Waypa, Chandel et al. 2001) war also essentiell. Er besteht aus der Inkubation der Zellen mit einer nanomolaren Konzentration eines Agonisten für einen Gq-gekoppelten Rezeptor, im Falle der PASMC Endothelin-I

4. Diskussion

oder Angiotensin-II. Folgt dieser Präinkubation nun eine Applikation von Hypoxie, so kommt es zu einem deutlichen Ca^{2+} -Einstrom in die glatte Muskelzelle (Shimoda, Sham et al. 2002). Unsere Versuche bestätigten also die Hypothese, dass eine basale Rezeptor-induzierte Phospholipase C-Aktivierung zwingend für einen Hypoxie-bedingten Ca^{2+} -Einstrom erforderlich ist. Nun galt es herauszufinden, ob dieses Phänomen durch den Versuchsaufbau bedingt ist, oder sich auch unter physiologischen Bedingungen ein Korrelat dieses „primings“ findet. Die Literatur dazu ist äußerst kontrovers. In einigen Studien konnte gezeigt werden, daß eine Entfernung des Endothels ein Einsetzen der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) verhindert (Holden and McCall 1984). Eine vergleichbare Anzahl an Veröffentlichungen zeigte allerdings das genaue Gegenteil (Archer, Weir et al. 2000). Dabei scheint die akute Phase relativ unabhängig vom Endothel zu funktionieren, wohingegen für die Modifikationsprozesse der protrahierten HPV exogene Faktoren von Bedeutung sind (Robertson, Aaronson et al. 1995; Shimoda, Sham et al. 2002). So konnte die Arbeitsgruppe um Kourembanas (Kourembanas 2002) zeigen, dass es unter Hypoxie zu einer Ausschüttung von Endothelin-1 aus Endothelzellen kommt, was langfristig zu Modifikationen in den direkt darunter gelegenen glatten Muskelzellen führen kann. Dafür spricht auch, daß man bei Patienten mit einer primären oder sekundären pulmonalen Hypertonie einen erhöhten Spiegel an Endothelin-1 in der Zirkulation nachweisen kann (Aaronson, Robertson et al. 2002). Auch konnte das Einsetzen der HPV in intakten Tieren durch Applikation von Endothelin-1 Antagonisten inhibiert werden (Aaronson, Robertson et al. 2002). Einen Einfluß des Endothels und des dort gebildeten Endothelins-1 lässt sich auch durch das notwendige „priming“ in unseren Versuchen bestätigen. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration muss aber nicht unbedingt immer mit einer Aktivierung von TRPC Kanälen einhergehen. Es können sowohl die

4. Diskussion

internen Ca^{2+} -Speicher im endoplasmatischen Retikulum (ER) als auch spannungsabhängige Calciumkanäle beteiligt sein. Obwohl es sich bei TRPC6 um einen an der Plasmamembran lokalisierten Kanal handelt, gibt es in der Literatur viele kontroverse Hinweise darauf, dass TRPC Kanäle direkt oder indirekt mit dem Füllungsgrad der internen Calciumspeicher assoziiert sein können (Wes, Chevesich et al. 1995). Auch eine Beteiligung des ER an der HPV wird diskutiert (Wang, Shimoda et al. 2005; Ward, Robertson et al. 2005; Weigand, Foxson et al. 2005). In unseren Experimenten konnten wir eine Beteiligung der internen Ca^{2+} -Speicher jedoch eindeutig ausschließen. Diese Diskrepanz lässt sich dadurch erklären, dass wir nur die kleinen, pulmonalen Arterien (kleiner $10\mu\text{m}$), die für die eigentliche Erhöhung des pulmonalen Blutdrucks verantwortlich sind, untersucht haben. Es konnte auch gezeigt werden, dass Hypoxie in glatten Muskelzellen aus Ratte, Kaninchen und Hund eine Ca^{2+} -Freisetzung aus ryanodinsensitiven Quellen bewirkt. Aber auch diese hier untersuchten großen Lungengefäße sind an der akuten Phase der HPV nicht beteiligt (McDaniel, Platoshyn et al. 2001; Lin, Leung et al. 2004). Auf ähnliche Weise konnte eine Beteiligung der Inositoltrisphosphat (IP_3)-sensitiven Speicher für die protrahierte Phase der HPV gezeigt werden (Dipp and Evans 2001; Dipp, Nye et al. 2001). Um die Aktivität eines Ionenkanals an der Plasmamembran direkt messen zu können, bietet sich ein sogenanntes Mn^{2+} -Quench Experiment an. Kommt es in Anwesenheit von extrazellulärem Mn^{2+} -Ionen unter Hypoxie zu einer Reduktion der Fura-2-Fluoreszenz, bedeutet dies, dass sich ein nicht-selektiver TRPC-Kanal in der Plasmamembran der Zelle geöffnet hat (Estacion, Sinkins et al. 2006). Dies ließ sich für PAMSC aus Wildtyp-Mäusen nachweisen, die Reaktion fehlte jedoch komplett in den entsprechenden TRPC6-defizienten Zellen. Diese Signaltransduktionskaskade lässt sich durch die Wiedereinführung des TRPC6-Kanalproteins rekonstituieren.

4. Diskussion

In *patch-clamp*-Experimenten, die in unserer Arbeitsgruppe ausgeführt wurden, konnten wir darüber hinaus einen Hypoxie-induzierten Strom in PASMC durch Applikation von OAG nicht weiter potenzieren. Die Kinetik dieser Calciumerhöhung deckt sich nun mit den physiologischen Ganztierexperimenten, die in unserer Arbeitsgruppen und in der Arbeitsgruppe von Prof. Weissmann durchgeführt wurden. Es scheint sich bei dem membranpermeablen DAG-Analog OAG also um den natürlichen Aktivator des TRPC6-Kanals während der HPV zu handeln.

4.5 Hypoxie-induzierter Ca^{2+} -Einstrom in Lungenedothelzellen (LEC)

In Analogie zu den an den glatten Muskelzellen durchgeführten Experimenten, wollten wir nun einen weiteren auf Hypoxie reagierenden Zelltyp der Lunge, die Endothelzellen (LEC) untersuchen (Tiruppathi, Minshall et al. 2002; de Perrot, Liu et al. 2003).

Endothelzellen reagieren bereits auf Perfusion mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, was die beschriebene Mechanosensitivität dieser Zellen bestätigt (Folgering, Sharif-Naeini et al. 2008). Es kommt in diesen Zellen durch das Anlegen einer konstanten Flussrate bereits zu einer Rezeptor-induzierten Aktivierung von Phospholipasen und somit zum Ca^{2+} -Einstrom. Vielleicht übernehmen also hier Scherkräfte an mechanosensitiven Rezeptoren die Aufgabe des sog. „primings“. Die Änderung der Zellmorphologie ist in den LEC ein eher transientser Prozess, der sich über einen Zeitraum mehrerer Minuten erstreckt und der im Gegensatz zu den glatten Muskelzellen mit einem klassischen, schnellen Kontraktionsapparat mit einer Reorganisation des Cytoskeletts verbunden ist.

Mit Ausnahme des perfusionsbedingten Ca^{2+} -Einstroms, verhält sich die Hypoxie-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration der LEC analog zu der in

4. Diskussion

PASMC. Auch hinsichtlich des TRPC6-vermittelten Einstromverhaltens von Manganionen unter Hypoxie lässt sich kein Unterschied zu PASMC feststellen.

Reichen nun die extrazellulären Ca^{2+} -Ionen aus, um eine HPV Reaktion auszulösen oder ist es nur ein Initialereignis, das durch Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER verstärkt wird? Die hier durchgeführten Experimente in Ca^{2+} -freiem Perfusat zeigen, dass allein extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen für die akute HPV ausreichend sind. Da TRPC-Proteine lange Zeit als sogenannte „Speicher-operierte“ Kanäle für das Wiederauffüllen der internen Speicher mit Ca^{2+} -Ionen verantwortlich gemacht wurden, könnte eine fehlende Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in den TRPC6-defizienten Zellen auch auf leere Ca^{2+} -Speicher in diesen Zellen hindeuten. Da durch Thapsigarginbehandlung oder Rezeptor-induzierte Entleerung der Ca^{2+} -Speicher aber keine Unterschiede im Füllungszustand detektiert werden konnten, können wir diese Möglichkeit ausschließen. Wir können bisher also feststellen, dass es unter Hypoxie zu einem Einstrom von Calciumionen ausschließlich aus dem Extrazellulärraum über den nicht-selektiven TRPC6-Kanal kommt, der gänzlich unabhängig von den internen Ca^{2+} -Speichern ist.

4.6 Ionenkanäle in PASMC und LEC für den Hypoxie-induzierten Ca^{2+} -Einstrom

Ist TRPC6 nun alleine für die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verantwortlich? In der glatten Gefäßmuskulatur gibt es eine Vielzahl von Ca^{2+} -leitenden Kanälen. Die wichtigsten sind die spannungsgesteuerten Calciumionenkanäle, zum Beispiel der $\text{Ca}_v1.2$. Eine ganze Medikamentenklasse, die Dihydropyridine, die als blutdrucksenkende Mittel verschrieben werden, kann diese Kanäle hemmen. Es lag also nahe, die Bedeutung Ca_v -Kanäle für die HPV zu untersuchen (Gudermann, Mederos y Schnitzler et al. 2004; Soboloff, Spassova et

4. Diskussion

al. 2005; Estacion, Sinkins et al. 2006). Tatsächlich kommt es unter Präinkubation der PSMC mit dem photostabilen Dihydropyridin-Derivat Nicardipin zu einer vollständigen Inhibition der Hypoxie-vermittelten Vasokonstriktion. Da TRPC6 als nicht selektiver Kationenkanal neben Ca^{2+} - auch Na^{+} -Ionen leitet, die eine starke Depolarisation der Zellmembran verursachen (Estacion, Sinkins et al. 2006), liegt die Annahme nahe, dass mit Hilfe dieser Membrandepolarisation Ca_V -Kanäle aktiviert werden, so dass die zur Kontraktion notwendige Ca^{2+} -Ionen erst sekundär über die calciumselektiven spannungsgesteuerten Calciumionenkanäle einströmen.

Eine Beteiligung Ca_V -Kanäle an dem Hypoxie-induzierten Ca^{2+} -Einstrom in die Endothelzellen kann jedoch ausgeschlossen werden, da in diesen Zellen nur spannungsgesteuerte Calciumionenkanäle vom T-Typ exprimiert werden. So zeigte auch ein der Vollständigkeit halber durchgeführtes Experiment unter der Anwesenheit von Nicardipin in LEC keine Veränderung des Hypoxie-induzierten Ca^{2+} -Einstroms. Außerdem ist zu beachten, dass diese Zellen im Vergleich zur glatten Muskelzelle keinen schnellen kontraktilem Apparat besitzen, so dass die für eine Aktinumlagerung benötigte Menge an Ca^{2+} -Ionen wesentlich geringer sein kann.

4.7 Auswirkungen des Hypoxie-induzierten Ca^{2+} -Einstroms auf die Morphologie der PSMC und LEC

Führt nun die Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration auch tatsächlich zu einer Kontraktion der Zellen? Für die glatte Muskelzelle ist dies relativ einfach direkt im Mikroskop zu beobachten, da ihre Kontraktion schnell und gut sichtbar abläuft. Der Effekt erreicht hierbei ein solches Ausmaß, dass die Zellen sich teilweise vom Glassubstrat ablösen. Dies kann dann zu einem weiteren Einstrom von Calcium führen. Im Ganztierexperiment, findet die Kontraktion der Glatten

4. Diskussion

Muskelzellen ihren Ausdruck in der akuten Phase der pulmonalen Vasokonstriktion unter Hypoxie. Diese Phase ist in TRPC6-defizienten Mäusen nicht mehr vorhanden. Diese Tiere sind also nicht in der Lage, auf eine Verminderung der alveolären Oxygenierung, zum Beispiel durch Installation von Salzlösung in Teile der Lunge mit einem HPV-Reflex zu reagieren. Es kommt so bei einer partiellen Blockade der Lunge zu einem lebensbedrohlichen Absinken des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes in diesen Tieren (Weissmann, Dietrich et al. 2006).

In einer nichtkontraktilen Zelle wie der Endothelzelle wird hingegen eine Morphologieänderung über eine Änderung des Polymerisationsgrades des Aktins bedingt (Tirupathi, Minshall et al. 2002; Singh, Knezevic et al. 2007). Ein klassisches Experiment ist also die Menge an polymerisiertem F-Aktin, die sogenannten Stressfibern, zu messen. Die Analyse der Stressfiber-Bildung zeigt nun eine deutliche Umlagerung des Zytoskeletts durch einen hypoxischen Stimulus in Zellen aus Wildtyp-Tieren, die in den TRPC6-defizienten Tieren signifikant reduziert ist. Dies ist jedoch noch kein Beweis für eine erfolgte Kontraktion da viele andere Noxen und physiologische Signalwege in der Lage sind, Stressfibern zu generieren, ohne dass sich an der Morphologie der Zelle etwas ändert.

Ein weiteres Maß, nämlich die Barrierefunktion oder Permeabilität eines Endothelzellrasens, muss also herangezogen werden. Die Messung dieses Parameters gelang mit Hilfe eines Impedanzmessgeräts. Es zeigte sich unter Hypoxie eine deutliche Abnahme der Impedanz, die aus einer Verminderung der Barrierefunktion oder einer größeren Permeabilität der Endothelzellen folgt. Als Kontrolle wurde ein fluoreszenzmarkiertes TRPC6-Konstrukt in TRPC6-defizienten Zellen zur Expression gebracht, wodurch sich sowohl die Hypoxie-induzierte als auch die OAG-induzierte Permeabilitätserhöhung in den Endothelzellen wieder herstellen

4. Diskussion

ließ. TRPC6-defiziente Tiere sind also vor der Ausbildung eines Ischämie-Reperfusionsschadens und der nachfolgenden Ödembildung geschützt.

4.8 Akkumulation von DAG und Modulation der DAG-Kinasen durch Hypoxie

Wie kann nun das Fehlen von Sauerstoff in eine Aktivierung eines DAG-aktivierten TRPC6-Kanals münden? Nachdem im rekombinanten System ausgeschlossen werden konnte, dass TRPC6 direkt durch Hypoxie aktivierbar ist, erscheint es sinnvoll, die Produktion und den Abbau des direkten Aktivators DAG näher zu analysieren. Durch ein rekombinant exprimiertes DAG-Sensormolekül ist es möglich, eine DAG-Akkumulation an der Plasmamembran der PASMCMC und der LEC unter Hypoxie zu beobachten (Botelho, Teruel et al. 2000). Da die LEC bedingt durch ihre günstigere Morphologie einem funktionellen Bildgebungsansatz eher zugänglich waren als die PASMCMC, konnte hier eine genauere Quantifizierung der DAG-Anreicherung erfolgen. Außerdem konnte der Nachweis erbracht werden, daß die Hypoxie-induzierte DAG-Akkumulation unter Normoxie reversibel ist.

Als nächstes stellt sich nun die Frage nach dem Ursprung dieser DAG-Akkumulation. Es könnte zu einer Aktivitätssteigerung der DAG-bildenden Enzyme also der Phospholipasen kommen, oder die Aktivität der DAG-modifizierenden bzw. DAG-abbauenden Enzyme wird inhibiert. Eine Aktivitätssteigerung der Phospholipasen erscheint insofern unwahrscheinlich, da es unter Hypoxie kaum zu einer Entleerung der IP₃-sensitiven Ca²⁺-Speicher kommt, obwohl bei der Spaltung von PIP₂ neben DAG auch äquimolare Mengen an IP₃ gebildet werden. Leider stehen keine wirklich spezifischen PLC-Blocker zur Verfügung, um diese Hypothese genauer zu testen, denn alle bekannten blockenden Agentien (zum Beispiel U73122) zeichnen sich durch ein hohes Maß an Unspezifität aus, so dass die mit ihnen durchgeführten Versuche eher geringe Aussagekraft haben. Auf der Seite der DAG-abbauenden

4. Diskussion

Enzyme stehen uns jedoch potente und spezifischere Inhibitoren zur Verfügung. Inkubiert man nun die glatten Muskelzellen nach erfolgtem „priming“ mit einem DAG-Kinase-Inhibitor, so lässt sich ein von seiner Kinetik ähnlicher Ca^{2+} -Einstrom wie durch Hypoxie auslösen. Aus diesem Grund ist eine Hypoxie-induzierte Reduktion der Aktivität DAG-abbauender Enzyme wahrscheinlich der Auslöser der DAG-Akkumulation.

Wie wird nun eine Erniedrigung der Aktivität der DAG-Kinasen unter Hypoxie ausgelöst? In der Literatur wird diskutiert, dass es unter Hypoxie zur Bildung von Sauerstoffradikalen in der Zelle kommt. Sowohl NADPH-Oxidasen als auch Bestandteile der mitochondrialen Atmungskette sind dazu in der Lage (Groschner, Rosker et al. 2004; Weissmann, Sommer et al. 2006). Die Mitochondrien produzieren einen Großteil der Sauerstoffradikale, indem sie Elektronen von NADH und FADH entlang eines Redoxgradienten in den einzelnen Komplexen der Elektronentransportkette (ETC) auf den molekularen Sauerstoff übertragen. Das Ausmaß der Radikalbildung kann an der Tatsache abgelesen werden, dass eine kurzfristige Inhibition der ETC das Einsetzen der HPV unterdrücken kann. Auch zeigen PASMC die mit Entkopplern der ETC inkubiert wurden keine HPV mehr. Entlang der ETC kann es jedoch auch zu einem Ein-Elektronenübergang auf molekularen Sauerstoff kommen, wodurch ein Superoxidradikal O_2^- gebildet wird. Dies kann nun durch die Superoxiddismutase (SDM) in diffusionsfähiges H_2O_2 umgewandelt werden.

Bei den NADPH-Oxidasen handelt es sich um Enzyme, die H_2O_2 als antimikrobielles Agens produzieren. So verwundert es nicht, dass sie zuerst in Leukozyten beschrieben wurden. Sie bestehen klassischer Weise aus zwei membranständigen und drei zytosolischen Untereinheiten, die nach Phosphorylierung an der Plasmamembran Komplexe bilden und aktiviert werden. In den letzten Jahren

4. Diskussion

wurden neben den klassischen Formen, die mitunter massive Mengen an H_2O_2 zur Bakterienabtötung produzieren, auch Formen beschrieben deren Radikalemission in einem für Zellen tolerablen Bereich liegt. Für die HPV hatten Inhibitoren der NADPH-Oxidasen in isolierten Lungen einen inhibierenden Effekt (Selemidis 2008).

Durch die bereits mehrfach herausgestellten optischen Vorzüge der LEC war es in diesen Zellen auch möglich, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) direkt zu messen. Hierzu wurde ein erst kürzlich beschriebener Radikal-Sensor in den LEC zur Expression gebracht, mit dem sich ein Anstieg des intrazellulären ROS Niveaus unter Hypoxie nachweisen lässt.

Darüber hinaus kann man durch Applikation mit Donatoren von Sauerstoffradikalen wie dem tertiären Butylhydroperoxid ebenfalls eine TRPC6-Aktivierung in PASMC erreichen, was die Rolle der ROS in der Signaltransduktionskaskade von der Hypoxie zur Kontraktion erneut unterstreicht.

Da es sich bei den nun zu betrachtenden Zielmolekülen der DAG-Kinasen um eine große Familie mit mannigfachen Funktionen handelt, ist es nötig zuerst deren Expressionsrate in PASMC genauer zu untersuchen. Besonders stark wurden die DAG-Kinasen α , η , ξ in PASMC exprimiert. Da die DAG-Kinase ξ vorwiegend im Nucleus aktiv ist, wurden im Weiteren nur die beiden anderen DAG-Kinase-Isoformen näher untersucht. Eine *in-vitro* Analyse der DAG-Kinase-Aktivität zeigte eine deutliche Inhibition der DAG-Kinase η Isoformen 1 und 2 durch H_2O_2 . Ausserdem konnte eine in der Literatur beschriebene Translokation dieser DAG-Kinase Isoform durch H_2O_2 (Murakami, Sakane et al. 2003) mit Hilfe einer rekombinanten Expression von fluoreszenzmarkierten DAG-Kinasen bestätigt werden.

4. Diskussion

4.9 Abschließende Betrachtung und Ausblick

Betrachtet man die erhobenen Daten nun im Kontext ergibt sich folgende Signaltransduktionskaskade. Unter Hypoxie kommt es zur Bildung von Sauerstoffradikalen, die eine Verminderung der Aktivität der DAG-Kinasen auslösen. Das durch den basalen Grundumsatz produzierte DAG wird nicht mehr durch diese Kinasen in Phosphatidsäure umgewandelt, und kann sich in der Plasmamembran der Zellen anreichern. Daraufhin kommt es zu einer Aktivierung von TRPC6-Kanalproteinen, und einem Einstrom von Na^+ -Ionen in die PASM. Diese Membrandepolarisation ermöglicht die Aktivierung von spannungsgesteuerten Calciumkanälen in PASM und damit die Kontraktion der Zelle als akute HPV. In Endothelzellen führt hingegen der Ca^{2+} -Einstrom direkt zu einer veränderten Aktinstruktur und damit zu einer geringeren Barrierefunktion der Zellen was eine Ödembildung und damit einen Ischämie-Reperfusionsschaden auslöst (siehe Abb. 40).

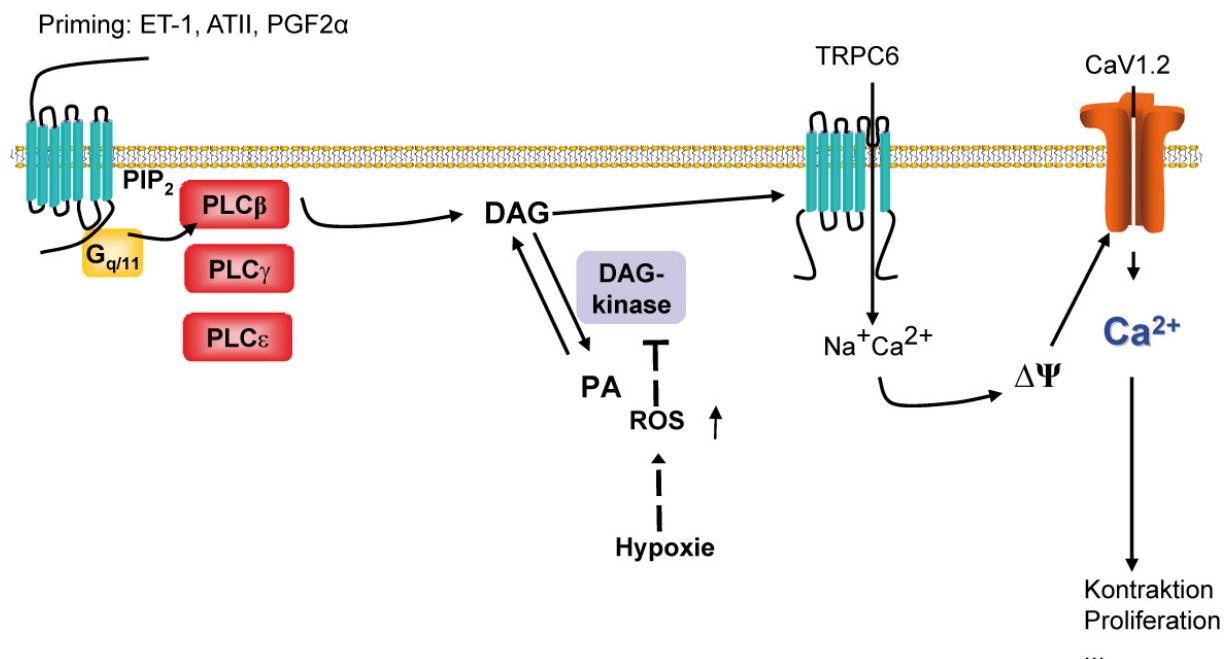


Abbildung 40

Vereinfachte Darstellung der Signaltransduktionskaskade zur Anreicherung von DAG unter Hypoxie in PASM, die zur Aktivierung von TRPC6 führt. Siehe Text für nähere Erläuterungen.

4. Diskussion

Alle in dieser Arbeit erhobenen Daten finden ihre Entsprechung in den Ganztierexperimenten, die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Weissmann durchgeführt wurden.

Der Verlust von TRPC6 kann also einerseits durch das Fehlen einer akuten HPV in den PASMCM eine lebensbedrohliche arterielle Hypoxämie auslösen. Andererseits sind TRPC6-defiziente Tiere vor einem Ischämie-Reperfusionsschaden geschützt, so dass der TRPC6-Kanal ein wichtiges sogenanntes pharmakologisches „target“ darstellt. Auch wenn eine generalisierte Anwendung eines TRPC6-Blockers aufgrund der vielfältigen Funktionen in verschiedenen Organen eher unwahrscheinlich ist, könnte man sich eine lokale Anwendung, z.B. in der Transplantationsmedizin oder bei der Bekämpfung von Folgeschäden eines Schlaganfalles durchaus vorstellen. Ein Spenderorgan könnte so z.B. während des Transportes mit einem Blocker perfundiert werden um es vor Ödembildung und einem Ischämie-Reperfusionsschaden zu schützen. Andererseits könnten TRPC6-Aktivatoren eine lebensrettende akute HPV bei einer partiellen Lungenblockade z.B. als Folge einer Lungensepsis auslösen. Aus diesem Grund ist die Suche nach spezifischen Aktivatoren und Inhibitoren des TRPC6-Kanals nicht nur für die Grundlagenforschung, sondern auch für die Entwicklung von hochwirksamen Pharmakotherapeutika essentiell.

5. Zusammenfassung

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekularen Mechanismen der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion in präkapillären pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) sowie des Ischämie-Reperfusionsschadens in den Endothelzellen (LEC) der Säugerlunge zu untersuchen. Da beide fundamentale Mechanismen in TRPC6-defizienten Mäusen nicht mehr auftreten, mussten ihnen eine TRPC6-Aktivierung zugrunde liegen. Zur Aufklärung der Mechanismen auf zellulärer Ebene wurden zuerst PASMC und LEC isoliert und durch Bindung charakteristischer Antikörper identifiziert. Die Identifikation von Signalkomponenten in beiden Zelltypen gelang außerdem durch die Messung der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Perfusion eines hypoxischen Puffers. Durch Applikation spezifischer pharmakologischer Inhibitoren und Indikatoren gelang es schließlich, Hinweise zum Ablauf der Signaltransduktionskaskaden zu sammeln. In PASMC wird während des sogenannten „priming“ durch eine geringe Rezeptoraktivierung eine basale Konzentration an Diacylglycerin, dem physiologischen Aktivator von TRPC6, gebildet, die jedoch durch die Aktivität von DAG-abbauenden DAG-Kinasen so reduziert wird, dass eine TRPC6-Aktivierung nicht möglich ist. Nach Applikation von Hypoxie führt eine postulierte Erhöhung der reaktiven Sauerstoffradikale in der Zelle jedoch zu einer Inhibition von DAG-Kinasen, zur DAG-Akkumulation und zur TRPC6-Aktivierung. In PASMC werden durch den folgenden Na^+ -Einstrom spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ aktiviert, die den eigentlichen Ca^{2+} -Einstrom zur Zellkontraktion einleiten. In LEC konnte eine ähnliche Signaltransduktionskaskade identifiziert werden, auch wenn hier die Notwendigkeit eines „primings“ nicht geklärt werden konnte und der Ca^{2+} -Einstrom durch TRPC6-Kanäle verläuft, da keine spannungsabhängigen Calciumkanäle vom L-Typ exprimiert werden. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass der TRPC6-Kanal einen wichtigen pharmakologischen Angriffspunkt für beide Signaltransduktionskaskaden darstellt.

The aim of this study was to clarify the molecular mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction in precapillary arterial pulmonary smooth muscle cells (PASMC) and ischemia-reperfusion injury in lung endothelial cells (LEC). TRPC6-activation is essential for both mechanisms, because they are abolished in TRPC6-deficient mice.

5. Zusammenfassung

To investigate the mechanisms at the cellular level PASMIC and LEC were isolated and their identity confirmed by specific antibodies. Components of the signalling cascade in both cell types were identified by monitoring the Ca^{2+} -increase in response to the application of hypoxic solutions. Important key components of the signal transduction cascades in addition to TRPC6 were identified by the application of specific inhibitors and sensors to the cells. In summary, activation of receptors by nanomolar agonist concentrations (priming) results in a low level of diacylglycerol (DAG) production, which is not able to activate TRPC6 channels, but is rapidly degraded by DAG-kinases. After application of hypoxia, however, production of reactive oxygen species results in DAG-kinase inhibition and sufficient DAG-accumulation to induce TRPC6-activation. The bulk of Ca^{2+} influx in PASMIC responsible for contraction enters through L-type voltage gated Ca^{2+} channels. These are activated by the depolarisation resulting from Na^+ influx through TRPC6-channels. A similar signal transduction cascade exists in LEC, although it is unclear whether a priming event is necessary. In these cells, TRPC6 channels mediate the Ca^{2+} influx, because L-type voltage gated calcium channels are not expressed. Therefore, TRPC6 is an important perspective pharmacological target for acute hypoxic pulmonary vasoconstriction in PASMIC and ischemia-reperfusion injury in LEC.

6. Literaturverzeichnis

6. Literaturverzeichnis

- Aaronson, P. I., T. P. Robertson, et al. (2002). "Endothelium-derived mediators and hypoxic pulmonary vasoconstriction." Respir Physiol Neurobiol **132**(1): 107-20.
- Archer, S. and E. Michelakis (2002). "The mechanism(s) of hypoxic pulmonary vasoconstriction: potassium channels, redox O(2) sensors, and controversies." News Physiol Sci **17**: 131-7.
- Archer, S. L., E. Souil, et al. (1998). "Molecular identification of the role of voltage-gated K⁺ channels, Kv1.5 and Kv2.1, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes." J Clin Invest **101**(11): 2319-30.
- Archer, S. L., E. K. Weir, et al. (2000). "Molecular identification of O₂ sensors and O₂-sensitive potassium channels in the pulmonary circulation." Adv Exp Med Biol **475**: 219-40.
- Bellone, R. R., S. A. Brooks, et al. (2008). "Differential gene expression of TRPM1, the potential cause of congenital stationary night blindness and coat spotting patterns (LP) in the Appaloosa horse (*Equus caballus*)." Genetics **179**(4): 1861-70.
- Berridge, M. J., P. Lipp, et al. (2000). "Signal transduction. The calcium entry pas de deux." Science **287**(5458): 1604-5.
- Birnbaumer, L., X. Zhu, et al. (1996). "On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15195-202.
- Botelho, R. J., M. Teruel, et al. (2000). "Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis." J Cell Biol **151**(7): 1353-68.
- Boulay, G., D. M. Brown, et al. (1999). "Modulation of Ca(2⁺) entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca(2⁺) entry." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 14955-60.
- Boulay, G., X. Zhu, et al. (1997). "Cloning and expression of a novel mammalian homolog of *Drosophila* transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein." J Biol Chem **272**(47): 29672-80.
- Burke-Wolin, T. and M. S. Wolin (1989). "H₂O₂ and cGMP may function as an O₂ sensor in the pulmonary artery." J Appl Physiol **66**(1): 167-70.
- Chubanov, V., K. P. Schlingmann, et al. (2007). "Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia due to a missense mutation in the putative pore-forming region of TRPM6." J Biol Chem **282**(10): 7656-67.
- Cioffi, D. L., K. Lowe, et al. (2008). "TRPing on the lung endothelium. Calcium channels that regulate barrier function." Antioxid Redox Signal.
- Clapham, D. E. (1996). "TRP is cracked but is CRAC TRP?" Neuron **16**(6): 1069-72.
- Clapham, D. E. (2002). "Sorting out MIC, TRP, and CRAC ion channels." J Gen Physiol **120**(2): 217-20.
- Clapham, D. E. (2003). "TRP channels as cellular sensors." Nature **426**(6966): 517-24.
- Dawson, C. A., D. J. Grimm, et al. (1978). "Influence of hypoxia on the longitudinal distribution of pulmonary vascular resistance." J Appl Physiol **44**(4): 493-8.

6. Literaturverzeichnis

- de Perrot, M., M. Liu, et al. (2003). "Ischemia-reperfusion-induced lung injury." Am J Respir Crit Care Med **167**(4): 490-511.
- Dietrich, A., H. Kalwa, et al. (2007). "In vivo TRPC functions in the cardiopulmonary vasculature." Cell Calcium **42**(2): 233-44.
- Dietrich, A., M. Mederos y Schnitzler, et al. (2003). "N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity." J Biol Chem **278**(48): 47842-52.
- Dietrich, A., Y. S. M. Mederos, et al. (2005). "Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice." Mol Cell Biol **25**(16): 6980-9.
- Dipp, M. and A. M. Evans (2001). "Cyclic ADP-ribose is the primary trigger for hypoxic pulmonary vasoconstriction in the rat lung in situ." Circ Res **89**(1): 77-83.
- Dipp, M., P. C. Nye, et al. (2001). "Hypoxic release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of pulmonary artery smooth muscle." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**(2): L318-25.
- Dumas, J. P., M. Bardou, et al. (1999). "Hypoxic pulmonary vasoconstriction." Gen Pharmacol **33**(4): 289-97.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, et al. (2002). "Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs." Methods **26**(2): 199-213.
- Estacion, M., W. G. Sinkins, et al. (2006). "Human TRPC6 expressed in HEK 293 cells forms non-selective cation channels with limited Ca²⁺ permeability." J Physiol **572**(Pt 2): 359-77.
- Fishman, A. P. (1976). "Hypoxia on the pulmonary circulation. How and where it acts." Circ Res **38**(4): 221-31.
- Fleming, I., A. Rueben, et al. (2007). "Epoxyeicosatrienoic acids regulate Trp channel dependent Ca²⁺ signaling and hyperpolarization in endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(12): 2612-8.
- Folgering, J. H., R. Sharif-Naeini, et al. (2008). "Molecular basis of the mammalian pressure-sensitive ion channels: focus on vascular mechanotransduction." Prog Biophys Mol Biol **97**(2-3): 180-95.
- Freichel, M., S. Philipp, et al. (2004). "TRPC4 and TRPC4-deficient mice." Novartis Found Symp **258**: 189-99; discussion 199-203, 263-6.
- Freichel, M., S. H. Suh, et al. (2001). "Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice." Nat Cell Biol **3**(2): 121-7.
- Ghofrani, H. A., F. Reichenberger, et al. (2004). "Sildenafil increased exercise capacity during hypoxia at low altitudes and at Mount Everest base camp: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial." Ann Intern Med **141**(3): 169-77.
- Groschner, K., C. Rosker, et al. (2004). "Role of TRP channels in oxidative stress." Novartis Found Symp **258**: 222-30; discussion 231-5, 263-6.
- Gudermann, T., M. Mederos y Schnitzler, et al. (2004). "Receptor-operated cation entry--more than esoteric terminology?" Sci STKE **2004**(243): pe35.
- Gudermann, T., T. Schoneberg, et al. (1997). "Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors." Annu Rev Neurosci **20**: 399-427.
- Hambraeus-Jonzon, K., L. Bindslev, et al. (1997). "Hypoxic pulmonary vasoconstriction in human lungs. A stimulus-response study." Anesthesiology **86**(2): 308-15.
- Hillier, S. C., J. A. Graham, et al. (1997). "Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules." J Appl Physiol **82**(4): 1084-90.

6. Literaturverzeichnis

- Hofmann, T., A. G. Obukhov, et al. (1999). "Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol." Nature **397**(6716): 259-63.
- Hofmann, T., M. Schaefer, et al. (2000). "Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry." J Mol Med **78**(1): 14-25.
- Holden, W. E. and E. McCall (1984). "Hypoxia-induced contractions of porcine pulmonary artery strips depend on intact endothelium." Exp Lung Res **7**(2): 101-12.
- Inoue, R., T. Okada, et al. (2001). "The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular $\alpha(1)$ -adrenoceptor-activated $Ca(2+)$ -permeable cation channel." Circ Res **88**(3): 325-32.
- Jabr, R. I., H. Toland, et al. (1997). "Prominent role of intracellular Ca^{2+} release in hypoxic vasoconstriction of canine pulmonary artery." Br J Pharmacol **122**(1): 21-30.
- Jeffery, T. K. and J. C. Wanstall (2001). "Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension." Pharmacol Ther **92**(1): 1-20.
- Jung, C., F. Lendzian, et al. (2005). "Multi-frequency EPR and Mossbauer spectroscopic studies on freeze-quenched reaction intermediates of nitric oxide synthase." Magn Reson Chem **43 Spec no.:** S84-95.
- Kato, M. and N. C. Staub (1966). "Response of small pulmonary arteries to unilobar hypoxia and hypercapnia." Circ Res **19**(2): 426-40.
- Khvorova, A., A. Reynolds, et al. (2003). "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." Cell **115**(2): 209-16.
- Klauck, T. M., X. Xu, et al. (1996). "Cloning and characterization of a glucocorticoid-induced diacylglycerol kinase." J Biol Chem **271**(33): 19781-8.
- Kourembanas, S. (2002). "Hypoxia and carbon monoxide in the vasculature." Antioxid Redox Signal **4**(2): 291-9.
- Kovitz, K. L., T. D. Aleskowitch, et al. (1993). "Endothelium-derived contracting and relaxing factors contribute to hypoxic responses of pulmonary arteries." Am J Physiol **265**(4 Pt 2): H1139-48.
- Kunichika, N., J. W. Landsberg, et al. (2004). "Bosentan inhibits transient receptor potential channel expression in pulmonary vascular myocytes." Am J Respir Crit Care Med **170**(10): 1101-7.
- Laemmli, U. K., E. Molbert, et al. (1970). "Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4." J Mol Biol **49**(1): 99-113.
- Leach, R. M., H. M. Hill, et al. (2001). "Divergent roles of glycolysis and the mitochondrial electron transport chain in hypoxic pulmonary vasoconstriction of the rat: identity of the hypoxic sensor." J Physiol **536**(Pt 1): 211-24.
- Lin, M. J., G. P. Leung, et al. (2004). "Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca^{2+} channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension." Circ Res **95**(5): 496-505.
- Liu, Q., J. S. Sham, et al. (2001). "Hypoxic constriction of porcine distal pulmonary arteries: endothelium and endothelin dependence." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **280**(5): L856-65.
- Madden, J. A., M. S. Vadula, et al. (1992). "Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells." Am J Physiol **263**(3 Pt 1): L384-93.

6. Literaturverzeichnis

- Maruyama, Y., Y. Nakanishi, et al. (2006). "Heteromultimeric TRPC6-TRPC7 channels contribute to arginine vasopressin-induced cation current of A7r5 vascular smooth muscle cells." Circ Res **98**(12): 1520-7.
- McCulloch, K. M., C. Docherty, et al. (1998). "Endothelin receptors mediating contraction of rat and human pulmonary resistance arteries: effect of chronic hypoxia in the rat." Br J Pharmacol **123**(8): 1621-30.
- McDaniel, S. S., O. Platoshyn, et al. (2001). "Capacitative Ca²⁺ entry in agonist-induced pulmonary vasoconstriction." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **280**(5): L870-80.
- Montell, C. and G. M. Rubin (1989). "Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction." Neuron **2**(4): 1313-23.
- Morio, Y. and I. F. McMurtry (2002). "Ca²⁺ release from ryanodine-sensitive store contributes to mechanism of hypoxic vasoconstriction in rat lungs." J Appl Physiol **92**(2): 527-34.
- Murakami, T., F. Sakane, et al. (2003). "Identification and characterization of two splice variants of human diacylglycerol kinase eta." J Biol Chem **278**(36): 34364-72.
- Naldini, L., U. Blomer, et al. (1996). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." Science **272**(5259): 263-7.
- Nilius, B., G. Droogmans, et al. (2003). "Transient receptor potential channels in endothelium: solving the calcium entry puzzle?" Endothelium **10**(1): 5-15.
- Olschewski, A., Z. Hong, et al. (2002). "Graded response of K⁺ current, membrane potential, and [Ca²⁺]_i to hypoxia in pulmonary arterial smooth muscle." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(5): L1143-50.
- Oparil, S., S. J. Chen, et al. (1995). "Endothelin-A receptor antagonist prevents acute hypoxia-induced pulmonary hypertension in the rat." Am J Physiol **268**(1 Pt 1): L95-100.
- Osipenko, O. N., A. M. Evans, et al. (1997). "Regulation of the resting potential of rabbit pulmonary artery myocytes by a low threshold, O₂-sensing potassium current." Br J Pharmacol **120**(8): 1461-70.
- Park, W. S., E. A. Ko, et al. (2005). "Endothelin-1 acts via protein kinase C to block KATP channels in rabbit coronary and pulmonary arterial smooth muscle cells." J Cardiovasc Pharmacol **45**(2): 99-108.
- Peake, M. D., A. L. Harabin, et al. (1981). "Steady-state vascular responses to graded hypoxia in isolated lungs of five species." J Appl Physiol **51**(5): 1214-9.
- Post, J. M., C. H. Gelband, et al. (1995). "[Ca²⁺]_i inhibition of K⁺ channels in canine pulmonary artery. Novel mechanism for hypoxia-induced membrane depolarization." Circ Res **77**(1): 131-9.
- Robertson, T. P., P. I. Aaronson, et al. (1995). "Hypoxic vasoconstriction and intracellular Ca²⁺ in pulmonary arteries: evidence for PKC-independent Ca²⁺ sensitization." Am J Physiol **268**(1 Pt 2): H301-7.
- Robertson, T. P., P. I. Aaronson, et al. (2003). "Ca²⁺ sensitization during sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction is endothelium dependent." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284**(6): L1121-6.
- Robertson, T. P., D. Hague, et al. (2000). "Voltage-independent calcium entry in hypoxic pulmonary vasoconstriction of intrapulmonary arteries of the rat." J Physiol **525 Pt 3**: 669-80.
- Rodman, D. M., T. Yamaguchi, et al. (1989). "Hypoxic contraction of isolated rat pulmonary artery." J Pharmacol Exp Ther **248**(3): 952-9.

6. Literaturverzeichnis

- Sanchez de Leon, R., C. H. Orchard, et al. (1983). "Effect of changes in pleural pressure on fluid filtration rate in expanded and collapsed rabbit lungs." Acta Anaesthesiol Scand **27**(4): 294-8.
- Sato, K., M. Oka, et al. (1995). "Effects of separate and combined ETA and ETB blockade on ET-1-induced constriction in perfused rat lungs." Am J Physiol **269**(5 Pt 1): L668-72.
- Schermuly, R. T., E. Dony, et al. (2005). "Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition." J Clin Invest **115**(10): 2811-21.
- Selemidis, S. (2008). "Suppressing NADPH oxidase-dependent oxidative stress in the vasculature with nitric oxide donors." Clin Exp Pharmacol Physiol **35**(11): 1395-401.
- Sham, J. S., B. R. Crenshaw, Jr., et al. (2000). "Effects of hypoxia in porcine pulmonary arterial myocytes: roles of K(V) channel and endothelin-1." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(2): L262-72.
- Shimoda, L. A., J. S. Sham, et al. (2002). "Acute and chronic hypoxic pulmonary vasoconstriction: a central role for endothelin-1?" Respir Physiol Neurobiol **132**(1): 93-106.
- Singh, I., N. Knezevic, et al. (2007). "Galphaq-TRPC6-mediated Ca²⁺ entry induces RhoA activation and resultant endothelial cell shape change in response to thrombin." J Biol Chem **282**(11): 7833-43.
- Soboloff, J., M. Spassova, et al. (2005). "Role of endogenous TRPC6 channels in Ca²⁺ signal generation in A7r5 smooth muscle cells." J Biol Chem **280**(48): 39786-94.
- Theissen, I. L. and A. Meissner (1996). "[Hypoxic pulmonary vasoconstriction]." Anaesthesist **45**(7): 643-52.
- Tiruppathi, C., R. D. Minshall, et al. (2002). "Role of Ca²⁺ signaling in the regulation of endothelial permeability." Vascul Pharmacol **39**(4-5): 173-85.
- Turner, J. L. and R. Z. Kozlowski (1997). "Relationship between membrane potential, delayed rectifier K⁺ currents and hypoxia in rat pulmonary arterial myocytes." Exp Physiol **82**(4): 629-45.
- Voelkel, N. F. (1986). "Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction." Am Rev Respir Dis **133**(6): 1186-95.
- Wang, J., L. A. Shimoda, et al. (2005). "Acute hypoxia increases intracellular [Ca²⁺] in pulmonary arterial smooth muscle by enhancing capacitative Ca²⁺ entry." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **288**(6): L1059-69.
- Ward, J. P., T. P. Robertson, et al. (2005). "Capacitative calcium entry: a central role in hypoxic pulmonary vasoconstriction?" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **289**(1): L2-4.
- Waypa, G. B., N. S. Chandel, et al. (2001). "Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing." Circ Res **88**(12): 1259-66.
- Waypa, G. B. and P. T. Schumacker (2005). "Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing." J Appl Physiol **98**(1): 404-14.
- Weigand, L., J. Foxson, et al. (2005). "Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by antagonists of store-operated Ca²⁺ and nonselective cation channels." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **289**(1): L5-L13.
- Weir, E. K., J. Lopez-Barneo, et al. (2005). "Acute oxygen-sensing mechanisms." N Engl J Med **353**(19): 2042-55.
- Weissmann, N., A. Dietrich, et al. (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): 19093-8.

6. Literaturverzeichnis

- Weissmann, N., F. Grimminger, et al. (2001). "Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response?" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**(2): L314-7.
- Weissmann, N., N. Sommer, et al. (2006). "Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction." Cardiovasc Res **71**(4): 620-9.
- Weissmann, N., A. Tadic, et al. (2000). "Hypoxic vasoconstriction in intact lungs: a role for NADPH oxidase-derived H₂O₂?" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(4): L683-90.
- Weissmann, N., S. Zeller, et al. (2006). "Impact of mitochondria and NADPH oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction." Am J Respir Cell Mol Biol **34**(4): 505-13.
- Wes, P. D., J. Chevesich, et al. (1995). "TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9652-6.
- Wolin, M. S., M. Ahmad, et al. (2005). "Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms: basic concepts, current controversies, and potential importance of cytosolic NADPH." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **289**(2): L159-73.
- Yu, W., Y. Liang, et al. (2002). "The chemical syntheses and bioactivities of novel peptide-based endothelin antagonists." J Pept Res **59**(3): 134-8.
- Yu, Y., I. Fantozzi, et al. (2004). "Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(38): 13861-6.
- Yuan, X. J., W. F. Goldman, et al. (1993). "Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes." Am J Physiol **264**(2 Pt 1): L116-23.

7. Danksagung

7. Danksagung

Ohne die Unterstützung einiger Leute wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen. Daher möchte ich die Gelegenheit nutzen allen diesen Menschen meinen herzlichsten Dank dafür auszusprechen, daß Sie mich unterstützt, gefördert und vor allen Dingen beeinflußt haben.

Als erstes kommt hier mein Betreuer Prof. Dr. Alexander Dietrich der mich in den letzten neun Jahren auf jede nur denkbare Weise im Studium, während des Diploms und der Doktorarbeit unterstützt und gefördert hat.

Danke Alexander !

Auch meiner Frau Fabienne gilt meine tiefste Dankbarkeit ohne sie wäre ich nichts.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Gudermann und Prof. Dr. Frank Czubyko für die Möglichkeit, am Institut für Pharmakologie und Toxikologie meine Doktorarbeit anfertigen zu können.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Norbert Weissmann für die sehr gute Kooperation mit seiner Arbeitsgruppe. Hier verdienen natürlich Dr. Beate Fuchs und Carmen Homberger den Löwenanteil.

Danke auch an Winfried Lorenz die nachweislich "coolste Sau unter der Sonne" und der ultimate Beweis, das man im Alter nicht zwangsläufig dämlich wird. Danke daß ich bei Dir wohnen durfte, für die Hilfe im Labor und natürlich für die vielen genialen Abende mit Wein, Weib und Gesang.

Das mit dem **Wein**, Weib und Gesang gilt somit auch für Dr. Thomas Büch.

Das mit den vielen genialen Abenden gilt dann auch für Dorke Meyer, Frauke Ackermann, Heike Borth, Ellen Damm, Andreas Hock, Viola Paulus, Dr. Andreas Breit und Dr. Ingrid Boeckhoff.

Tanja Pfeffer-Eckel gilt mein besonderer Dank für all ihre Hilfe von der ersten Sekunde an.

Michael Koch danke ich dafür, daß er nicht nur ein genialer Elektroniker sondern auch ein toller Mensch ist.

Der gesamten technische Werkstatt kann ich gar nicht genug danken, für Ihre Hilfe bei der Prototypen Entwicklung und der überragenden, technischen Umsetzung der manchmal schon recht ungewöhnlichen Ideen.

Susanne Ziegler, Silke Kaske und Carsten Kamm danke ich für die geniale Hilfe und weil Ihr seid wie Ihr seid.

Daniel Beiß, Johanna Fehr, Benjamin Rost, Jürgen Solinski, Steffi Stohr, Eva Schlosser, Frauke Kepura, Meike Fahlbusch, Fatma Aktuna, Tim Mayer, Sabrina Höbel, Marga Losekam, Markus Semptner, Eva Braun, Prof. Dr. Tim Plant, Dr. Dr. Olaf Pinkenburg, Dr. Thomas Hofmann, Prof. Dr. Achim Aigner, und Prof. Dr. Frank

7. Danksagung

Czubayko möchte ich für die vielen netten kleinen und größeren Pausen, die vielen, vielen Gespräche und die Hilfe in jeder Lebenslage danken.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Carsten Culmsee für die sehr gute Kooperation mit seiner Arbeitsgruppe. Hier besonders zu erwähnen ist Dr. Amalia Dolga.

Meine Freunde (keine besondere Reihenfolge) Guido, Sabine, Maik, Benjamin, Simon, Steffi, Carsten, Christoph, Maik II, Martin, Lars, Tina, Tina II Anja, Andreas und Viola sollen hier auch nicht verschwiegen werden, schließlich sind sie es, die mich immer wieder auf den Boden zurückholen und mir Halt geben.

Meinen Schwiegereltern Irma und Marcel Schmit danke ich, weil sie mich so nett in Ihre Familie aufgenommen haben.

Meinen Eltern Hanna Kalwa und Dr. Artur Kalwa und meiner Patentante Ruth Niermann möchte ich schließlich dafür danken, daß sie mir all das erst ermöglicht haben. Sie haben sichergestellt, daß ich die besten Voraussetzungen für meinen Weg habe. Sie haben mir außerdem das wertvollste gegeben, das sie haben: Ihre Zeit.

Schlußendlich möchte ich noch allen danken, die ich hier vergessen habe.

10. Eigene Publikationen

10. Eigene Publikationen

Hermann Kalwa* Norbert Weissmann*, Akylbek Sydykov*, Ursula Storch, Beate Fuchs, Michael Mederos y Schnitzler, Friedrich Grimminger, Ralf P. Brandes, Veit Flockerzi, Ralph T. Schermuly, Werner Seeger, Hossein A. Ghofrani, Thomas Gudermann, Alexander Dietrich

Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) critically contributes to ischemia-reperfusion injury of the lung

Manuskript in Vorbereitung

Sedar Sel, Benjamin Rost, Edar Yildirim, B. Sel, **Hermann Kalwa**, Harald Fehrenbach, Harald Renz, Thomas Gudermann, Alexander Dietrich

Loss of classical transient receptor potential 6 channel reduces allergic airway response.

Clin Exp Allergy. 2008 Sep;38(9):1548-58. Epub 2008 Jul 9

Thomas Büch, Heike Biebermann, **Hermann Kalwa**, Olaf Pinkenburg, Denise Hager, Holger Barth, Klaus Aktories, Andreas Breit, Thomas Gudermann

G13-dependent activation of MAPK by thyrotropin

J Biol Chem. 2008 Jul 18;283(29):20330-41. Epub 2008 Apr 29.

Alexander Dietrich, **Hermann Kalwa**, Ursula Storch, Michael Mederos y Schnitzler, Birgit Salanova, Olaf Pinkenburg, Galyna Dubrovska, Kirill Essin, Maik Gollasch, Lutz Birnbaumer, and Thomas Gudermann

Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1

Pflügers Archiv European Journal of Physiology in Press

10. Eigene Publikationen

Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, **Kalwa H**, Ay M, Dumitrascu R, Olschewski A, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Pinkenburg O, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T

Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec 12;103(50):19093-8

Breit A, Wolff K, **Kalwa H**, Jarry H, Buch T, Gudermann T.

The natural inverse agonist agouti-related protein induces arrestin-mediated endocytosis of melanocortin-3 and -4 receptors

J Biol Chem. 2006 Dec 8;281(49):37447-56

Dietrich A, Mederos Y Schnitzler M, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovskaja G, Obst M, Yildirim E, Salanova B, **Kalwa H**, Essin K, Pinkenburg O, Luft FC, Gudermann T, Birnbaumer L.

Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice.

Mol Cell Biol. 2005 Aug;25(16):6980-9. Erratum in: Mol Cell Biol. 2005 Dec;25(24):11191

Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Emmel J, **Kalwa H**, Hofmann T, Gudermann T.

N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity.

J Biol Chem. 2003 Nov 28;278(48):47842-52. Epub 2003 Sep 11.

10. Eigene Publikationen

Übersichtsartikel

Dietrich A, **Kalwa H**, Fuchs B, Grimminger F, Weissmann N, Gudermann T.

In vivo TRPC functions in the cardiopulmonary vasculature

Cell Calcium. 2007 published ahead of print Apr 10 2008

Dietrich A, Chubanov V, **Kalwa H**, Rost BR, Gudermann T

Cation channels of the transient receptor potential superfamily: their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells

Pharmacol Ther. 2006 Dec;112(3):744-60

Dietrich A, **Kalwa H**, Rost BR, Gudermann T.

The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance.

Pflugers Arch. 2005 Oct;451(1):72-80. 2005 Jun 22.

Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, **Kalwa H**, Storch U, Gudermann T.

Functional characterization and physiological relevance of the TRPC3/6/7 subfamily of cation channels.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2005 Apr;371(4):257-65.

10. Eigene Publikationen

Kongressbeiträge (Vorträge und Poster)

Grzelinski M, Pinkenburg O, Buch T, Gold M, **Kalwa H**, Gudermann T, Aigner A

shRNA-mediated gene targeting reveals a critical role of G-alpha12 and G-alpha13 for human small cell lung cancer cell proliferation and in vivo tumor growth

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY Volume: 377
Pages: 25-26 2008 März 2008

Kalwa H, Sydykov A, Weissmann N, Ghofrani HA, Fuchs B, Grimminger F, Gudermann T, Dietrich A

An essential role of classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) in ischemia-reperfusion injury in isolated perfused murine lungs

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY Volume: 377
Pages: 35-35 März 2008

Dietrich, A; **Kalwa, H**; Fuchs, B; Weissmann, N; Gudermann, T

Regulation of classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) by diacylglycerol (DAG) kinases in pulmonary smooth muscle cells

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY, 375: 41-41
171 Suppl. 1 MAR 2007

Kalwa, H; Storch, U; Schmidt, M; Hildebrandt, F; Gudermann, T; Dietrich, A A role for **PLC epsilon in the regulation of TRPC6 mediated cation influx in glomerular podocytes**

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY, 375: 43-43
184 Suppl. 1 MAR 2007

10. Eigene Publikationen

Kalwa H, Fuchs B, Weissmann N, Gudermann T, Dietrich A

Involvement of classical transient receptor potential channel 6 in the hypoxic vasoconstriction of pulmonary smooth muscle cells

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY. 2006
May;3471(4):262

Kalwa H, Pinkenburg P, Gudermann T, Dietrich A.

Specific "Knockdown" of members of the TRPC3/6/7 subfamily in smooth muscle cells by intracellular expression of short interfering RNAs using vectors based on adeno-associated viruses

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 371: R57-R57 242
Suppl. 1 FEB 2005

Kalwa H, Gudermann T, Dietrich A

Specific "knockdown" of heterologously expressed members of the TRPC3/6/7 family in HEK 293 cells by intracellular expression of short interfering RNAs

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 367: 246 Suppl. 1
MAR 2003

11. Verzeichnis der Akademischen Lehrer

11. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herrn in Marburg :

Aigner
Aumüller
Besedowski
Biderbick
Boeckhoff
Braun
Brüsselbach
Büch
Cubayko
Daut
Delray
Dietrich
Eilers
Elsässer
Esterlund
Feuser
Fränking
Gaubertz
Gromes
Gudermann
Heeg
Herz
Jones
Junklaas
Kirchner
Lill
Lohoff
Moll
Müller
Petz
Portenier
Renz
Röper
Seitz
Stöppler
Suske
Voigt
Weihe