

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie

Zentrumsleiter: Univ.-Prof. Dr. med. Alwin E. Goetz
Klinikleiter: Prof. Dr. med. Christian Zöllner

Entschlüsselung der Rolle der mitochondrialen Isocitrat- Dehydrogenase im Prozess der Kohlenstoffdioxid-Registrierung in Alveolarepithelzellen *in vitro*

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Paula Keller
aus Berlin

Hamburg 2018

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.04.2019

Veröffentlicht mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Rainer Kiefmann

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Marcus Nalaskowski

Meinen Eltern

„Dem Anwenden muss das Erkennen vorausgehen.“

Max Planck

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	10
1.1 Ventilations-Perfusions-Missverhältnis	10
1.2 Anpassung an Ventilationsstörungen	10
1.3 Anpassung an Perfusionsstörungen	11
1.4 Kohlenstoffdioxid	14
1.5 Calcium	15
1.6 Mitochondrien	17
1.7 Fragestellung und Zielsetzung	19
2 Material und Methodik	22
2.1 Zelllinie	22
2.2 Zellkultivierung	22
2.2.1 Geräte und Zubehör	22
2.2.2 Sterile Verbrauchsmaterialien	23
2.2.3 Reagenzien	23
2.2.4 Durchführung	23
2.3 Transfektion	25
2.3.1 Geräte und Zubehör.....	25
2.3.2 Sterile Verbrauchsmaterialien	25
2.3.3 Reagenzien	26
2.3.4 Durchführung	26
2.4 Pufferherstellung	29
2.4.1 Geräte und Zubehör	29
2.4.2 Sterile Verbrauchsmaterialien	29
2.4.3 Reagenzien	30
2.4.4 Konstruktion zur Pufferbegasung	30
2.4.5 HBS-Pufferansatz	31
2.4.6 Präparation des Glasgefäßes zur Pufferherstellung	32
2.4.7 Ermittlung der optimalen Versuchsdauer	33
2.5 Fluoreszenzmikroskopie	34
2.5.1 Geräte und Zubehör	34
2.5.2 Sterile Verbrauchsmaterialien	35
2.5.3 Reagenzien	36

2.5.3.1	Aufbereitung der Agenzien	36
2.5.3.1.1	ATP	36
2.5.3.1.2	Rotenon	37
2.5.4	Fluoreszenzindikatoren	37
2.5.4.1	Aufbereitung der Fluoreszenzindikatoren	38
2.5.4.1.1	Fura-2-AM	38
2.5.4.1.2	Rhod-2-AM	38
2.5.4.1.3	TMRM ⁺	39
2.5.5	Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie	39
2.5.5.1	Messung der [Ca ²⁺] _{zyt}	41
2.5.5.2	Messung der [Ca ²⁺] _{mito}	43
2.5.5.3	Messung des ΔΨ _{mito}	43
2.5.5.4	Messung der [NADH]	44
2.5.6	Versuchsabläufe	44
2.5.6.1	Native A549-Zellen	45
2.5.6.1.1	Messung der [Ca ²⁺] _{zyt}	45
2.5.6.1.2	Messung der [Ca ²⁺] _{mito}	47
2.5.6.1.3	Messung des ΔΨ _{mito}	50
2.5.6.1.4	Messung der [NADH]	51
2.5.6.2	Transfizierte A549-Zellen	53
2.5.6.2.1	Messung der [Ca ²⁺] _{zyt}	54
2.5.6.2.2	Messung des [Ca ²⁺] _{mito}	55
2.5.6.2.3	Messung der ΔΨ _{mito}	56
2.5.6.2.4	Messung der [NADH]	57
2.6	NADH-Assay	58
2.6.1	Geräte und Zubehör	58
2.6.2	Sterile Verbrauchsmaterialien	59
2.6.3	Reagenzien	60
2.6.4	Durchführung	60
2.6.4.1	Inhalt des Kits	60
2.6.4.2	Vorbereitung der Zellen	61
2.6.4.3	NADH-Extraktion	62
2.6.4.4	Standardkurve	63
2.6.4.5	Reaktionslösung	63

2.6.4.6 Reaktion und Messung	64
2.6.4.7 Berechnung der [NADH]	65
2.7 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	65
2.7.1 Geräte und Zubehör	65
2.7.2 Sterile Verbrauchsmaterialien	66
2.7.3 Reagenzien	67
2.7.4 Primer	68
2.7.5 Durchführung	68
2.7.5.1 RNA-Aufbereitung	68
2.7.5.1.1 Inhalt des Kits	68
2.7.5.1.2 Details der RNA-Isolation	69
2.7.5.2 RNA-Mengenbestimmung	70
2.7.5.3 cDNA-Synthese	70
2.7.5.3.1 Inhalt des Kits	70
2.7.5.3.2 Reverse Transkription	71
2.7.5.4 Polymerase-Kettenreaktion	71
2.7.5.5 Agarose-Gelelektrophorese	73
2.8 Western Blot	74
2.8.1 Geräte und Zubehör	74
2.8.2 Sterile Verbrauchsmaterialien	75
2.8.3 Reagenzien	76
2.8.4 Puffer	77
2.8.5 Durchführung	77
2.8.5.1 Proteinextraktion	78
2.8.5.2 Proteinmengenbestimmung	78
2.8.5.2.1 Inhalt des Kits	78
2.8.5.2.2 Standardverdünnungskurve und Reaktionslösung	79
2.8.5.2.3 Reaktion und Messung	79
2.8.5.3 Western Blot	81
2.8.5.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	81
2.8.5.3.2 Immundetektion	82
2.9 Grafische Darstellung und Statistik	83
3 Ergebnisse	84

3.1 Der Einfluss von Hypokapnie auf die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in A549-Zellen <i>in vitro</i>	84
3.1.1 Native A549-Zellen	84
3.1.2 Transfizierte A549-Zellen	88
3.2 Der Einfluss von Hypokapnie auf die $[Ca^{2+}]_{mito}$ in A549-Zellen <i>in vitro</i>	92
3.2.1 Native A549-Zellen	92
3.2.2 Transfizierte A549-Zellen	96
3.3 Der Einfluss von Hypokapnie auf das $\Delta\Psi_{mito}$ in A549-Zellen <i>in vitro</i> ..	100
3.3.1 Native A549-Zellen	100
3.3.2 Transfizierte A549-Zellen	104
3.4 Der Einfluss von Hypokapnie auf die [NADH] in A549-Zellen <i>in vitro</i> .	107
3.4.1 Native A549-Zellen	107
3.4.2 Transfizierte A549-Zellen	112
3.5 Transfektionsnachweise	116
3.6 $[Ca^{2+}]$ -Oszillationen	119
4 Diskussion	120
4.1 Versuchslimitationen	120
4.2 Die Rolle der mitochondrialen Isocitrat-Dehydrogenase im Prozess der Kohlenstoffdioxid-Registrierung in Alveolarepithel- zellen <i>in vitro</i>	121
4.2.1 Eine Hypokapnie verursacht eine Abnahme der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ bei gleichzeitiger Zunahme der $[Ca^{2+}]_{mito}$ in A549-Zellen <i>in vitro</i>	121
4.2.2 Die Aufnahme von zytosolischem Ca^{2+} in die Mitochondrien unter Hypokapnie beruht auf einer IDH3-vermittelten Steigerung der [NADH] mit konsekutiver Zunahme der Negativität des $\Delta\Psi_{mito}$ in A549-Zellen <i>in vitro</i>	125
4.2.3 Die Bedeutung der Ergebnisse für die Hypothese der mitochondrialen CO_2 -Registrierung in Alveolarepithelzellen	
5 Zusammenfassung	135
6 Anhang	140
6.1 Abkürzungsverzeichnis	140
6.2 Literaturverzeichnis	144
6.3 Abbildungsverzeichnis	154
6.4 Tabellenverzeichnis	158

6.5 Danksagung	159
6.6 Lebenslauf	160
6.7 Eidesstattliche Versicherung	162

1 Einleitung

1.1 Ventilations-Perfusions-Missverhältnis

Eine der Ursachen für Gasaustauschstörungen in der Lunge kann ein Missverhältnis zwischen alveolärer Ventilation und Perfusion sein. Dies ist eine typische Komplikation bei kritisch kranken Patienten und führt zu einer Reduktion des Sauerstoffangebots im systemischen Kreislauf. Um dieses Missverhältnis gering zu halten und somit mögliche Folgen daraus abzuwenden, existieren in der Lunge spezifische Kompensationsmechanismen. Während der Mechanismus des Euler-Liljestrand-Reflexes als Perfusionsanpassung auf Ventilationsstörungen bekannt ist, konnte bislang noch nicht entschlüsselt werden, welche biochemischen Prozesse der Ventilationsanpassung bei Perfusionsstörungen zugrunde liegen.

1.2 Anpassung an Ventilationsstörungen

Ventilationsstörungen, wie sie beispielsweise bei Pneumonien und Atelektasen auftreten, führen zu einer lokalen alveolären Hypoxie. Als Folge der lokalen Hypoxie kommt es über die Zunahme der pulmonalen Shuntperfusion zur systemischen Hypoxämie [1]. Um dieser entgegenzuwirken, reagieren die Pulmonalarterien betroffener Lungenareale mit Vasokonstriktion. Diese hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion (HPV) führt durch die Verschiebung des Blutflusses weg von minderventilierten Lungenarealen hin zu Arealen mit physiologischen Ventilationsverhältnissen zu einer Wiederherstellung des zuvor gestörten Gasaustauschs [2].

Bereits Moore, Humphreys und Cochran entdeckten 1934 in Versuchen an Hunden, dass die Blockade eines Bronchus zur Umverteilung der Perfusion führte [3]. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde 1946 von Euler und Liljestrand beschrieben und nachfolgend als Euler-Liljestrand-Reflex benannt [4]. 1984 verifizierten Nagasaka und Kollegen, dass die Pulmonalarterien Hauptort der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion sind [5]. Auslöser dieses Mechanismus ist die Abnahme des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2), welche in den Mitochondrien der glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien (*pulmonary artery smooth muscle cells* = PASMC) registriert wird [6]. Dort kommt es über die Abnahme des mitochondrialen Elektronentransports zu einer Konzentrationsänderung von reaktiven Sauerstoff-

spezies (*reactive oxygen species*, ROS). Dies führt zu einer Freisetzung von freien Calcium-Ionen (Ca^{2+}) aus Inositol-1,4,5-trisphosphat-sensitiven intrazellulären Speichern und somit zur Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$), was wiederum das Schließen von spannungsabhängigen Kaliumkanälen nach sich zieht. Die daraus resultierende Depolarisation führt zur Öffnung spannungsabhängiger L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und zu einer weiteren Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$, was eine Aktivierung der Calmodulin-abhängigen Myosin-Leichtketten-Kinase (MLK) zur Folge hat. Die daraus folgende Interaktion von Aktin und Myosin führt zur Kontraktion der glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien und somit zur Vasokonstriktion [2, 7, 8].

1.3 Anpassung an Perfusionsstörungen

Perfusionsstörungen, wie sie beispielsweise im Rahmen von pulmonalen Thrombembolien auftreten, führen zu einer Reduktion der Ventilation in den betroffenen Lungenarealen. Eine Verlagerung der Ventilation hin zu Lungenarealen mit physiologischen Perfusionsbedingungen und somit eine Reduktion des Ventilations-Perfusions-Missverhältnisses mit einer Verbesserung des zuvor gestörten Gasaustauschs ist die Folge.

Dieses Phänomen, welches dem Euler-Liljestrand-Reflex entgegenzustehen scheint, wurde erstmals im Jahr 1934 von Moore, Humphreys und Cochran beschrieben. Der vorübergehende Verschluss einer Pulmonalarterie führte in Versuchen an Hunden zur Abnahme des Tidalvolumens auf der ipsilateralen Seite, während eine Zunahme des Tidalvolumens in der kontralateralen Lunge beobachtet wurde [3]. Carlens und Kollegen konnten dies 1951 durch Versuche an Hunden und Menschen verifizieren. Nach Okklusion einer Pulmonalarterie beobachteten sie eine Reduktion der ipsilateralen Sauerstoffaufnahme bei gleichbleibender Gesamt-sauerstoffaufnahme und begründeten dies mit einer Ventilationsumverteilung nach Perfusionsstopp [9]. Auch Venrath et al. konnten dies 1952 belegen. Sie imitierten Pulmonalarterienverschlüsse mittels Ballonokklusion und beobachteten eine ipsilaterale Reduktion der Ventilation und der Sauerstoffaufnahme. Zusätzlich dazu konnten sie zeigen, dass nach erneuter Öffnung der Pulmonalarterien eine Normalisierung eintrat [10]. Darüber hinaus gelang es ihnen erstmals Kohlenstoffdioxid (CO_2) als einen möglichen Stimulus für die beobachtete Ventilations-

verlagerung zu identifizierten, indem sie nachweisen konnten, dass eine Perfusionsunterbindung keine Ventilationsänderung nach sich zog, wenn sie die Inspirationsluft auf der blockierten Seite mit 6-8 % CO₂ anreicherten [10]. Dass die Zugabe von CO₂ zur Inspirationsluft keine Veränderung der Ventilation trotz Perfusionsunterbrechung nach sich zieht und CO₂ eine wichtige Schlüsselfunktion im Prozess der Ventilationsverlagerung zur Optimierung des Gasaustausches bei pulmonalen Perfusionsstörungen einnimmt, konnten die Arbeitsgruppen um Edward Swenson und Kollegen Anfang der 1960er Jahre belegen. Auch ihnen gelang es aufzuzeigen, dass der Vorgang der Ventilationsanpassung reversibel ist, da sich die Ventilation nach Wiederherstellung der Perfusion binnen einer Stunde normalisierte. Als zugrundeliegender Mechanismus für die Verschiebung der Ventilation nach Perfusionsokklusion wurde erstmals eine Bronchokonstriktion vermutet [11, 12]. Levy et al., welche erstmals autogenes Embolienmaterial verwendeten, gelang es aufzuzeigen, dass ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Größe des nicht-perfundierten Lungenareals und dem Ausmaß der Ventilationsverlagerung besteht [13]. Ferner konnten sie im Jahr 1974 darlegen, dass die Ventilationsverlagerung nicht nur von einem Lungenflügel zum anderen, sondern ebenfalls auf segmentaler Ebene innerhalb eines Lungenflügels stattfindet. Obwohl auch sie zunächst eine Bronchokonstriktion als zugrunde liegenden Mechanismus vermuteten, gelang es ihnen, die Bildung von Atelektasen als Ursache für die Ventilationsverlagerung zu identifizieren [14]. Bereits Bruns und Sauerbruch hatten 1911 in Tierversuchen festgestellt, dass die Unterbindung einer Pulmonalarterie zur Atelektasenbildung im dazugehörigen Lungenabschnitt führte, ohne jedoch einen Zusammenhang zur Ventilationsverlagerung herzustellen [15]. Genauere Details für die Entstehung von Atelektasen nach Perfusionsminderung und somit einen möglichen Grund für die stattfindende Ventilationsverlagerung lieferten Chernick und Kollegen 1966 durch Versuche an Hunden. So konnten sie nachweisen, dass die Atelektasenbildung, die sie nach der Ligatur einer Pulmonalarterie beobachteten, auf einem Surfactantmangel beruht und dass die Integrität von Surfactant somit vom pulmonalen Blutfluss abhängig ist [16]. Surfactant (**surface active agent**) ist für die Regulierung der pulmonalen Ventilation von besonderer Bedeutung. Das hauptsächlich aus Phosphoglyceriden mit variabler Fettsäurezusammensetzung, Cholesterin und Proteinen bestehende Agens wird in den Typ II Alveolarepithelzellen produziert und dort in speziellen Zellorganellen, den Lamellarkörperchen, gespeichert. Über

Exozytose gelangt es in die Alveole, wo es in Form von tubulärem Myelin als dünner Film an der Grenze zwischen Luft und Lungengewebe die Oberflächenspannung herabsetzt. Dies verhindert ein Kollabieren der Alveolen vor allem während der Expiration und sorgt dafür, dass auch bei niedrigem transpulmonalen Druck ein effizienter Gasaustausch stattfinden kann [17]. Shepard et al. gelang es 1982 mit Hilfe von mikroskopischen Untersuchungen isolierter, non-perfundierter Hundelungen zu zeigen, dass die Atelektasenbildung nach pulmonaler Perfusionsminderung auf eine Reduktion der Dichte der Lamellarkörperchen in den Typ II Alveolarepithelzellen und somit auf eine quantitative Dysfunktion des pulmonalen Surfactant-Sekretionssystems zurückzuführen ist. Da sich dies durch die Zugabe von CO₂ in der Inspirationsluft verhindern lässt, schlussfolgerten sie, dass die Abnahme des alveolären CO₂, also eine alveoläre Hypokapnie als Folge der pulmonalen Minderperfusion, Auslöser dieser Beobachtung ist [18]. 1998 konnten Nakos und Kollegen aufzeigen, dass die Atelektasenbildung nach Unterbindung der pulmonalen Perfusion nicht nur auf quantitativen, sondern auch auf qualitativen Veränderungen des Surfactant-Sekretionssystems beruht [19]. Bei Patienten mit nachgewiesener Lungenarterienembolie (LAE) führten sie Sekretanalysen mittels bronchoalveolärer Lavage (BAL) mit Fokus auf die biochemische Zusammensetzung durch und konnten feststellen, dass sich nach stattgehabter LAE der Anteil jener Bestandteile, die für die Reduktion der Oberflächenspannung innerhalb der Alveole verantwortlich sind, deutlich verringerte. Auch Calkovska et al. bestätigten 2009, dass sowohl qualitative als auch quantitative Surfactantveränderungen nach stattgehabter LAE in Abhängigkeit von deren Ausmaß zur Atelektasenbildung in den betroffenen Lungenarealen führen [17].

Festzuhalten ist demnach, dass eine Minderung der pulmonalen Perfusion, durch beispielsweise eine LAE, eine CO₂-vermittelte Ventilationsverlagerung und damit eine Reduktion des Ventilations-Perfusions-Missverhältnisses in der Lunge nach sich zieht. Diese Ventilationsverlagerung beruht auf einer Bildung von Atelektasen im betroffenen Lungenareal, welche auf eine Dysfunktion des Surfactant-Sekretionssystems zurückzuführen ist. Welche zellulären Prozesse diesem Mechanismus zugrunde liegen, ist bislang jedoch unklar.

1.4 Kohlenstoffdioxid

Im Gegensatz zur alveolären Hypoxie, welche beim Euler-Liljestrand-Reflex die Vasokonstriktion mit nachfolgender pulmonaler Perfusionsminderung bedingt, scheint die Ventilationsanpassung bei pulmonalen Perfusionsstörungen über eine Minderung des alveolären Kohlenstoffdioxidpartialdrucks ($p\text{CO}_2$) vermittelt zu werden [10-12, 14, 20].

CO_2 ist ein Nebenerzeugnis des Metabolismus, das im Körper in der selben Rate produziert wie Sauerstoff konsumiert wird (in Ruhe: 3ml/kg Körpergewicht/min) [21]. Innerhalb der Zelle reagiert es, durch das Enzym Carboanhydrase beschleunigt, mit Wasser zu Kohlensäure (H_2CO_3), welche im chemischen Gleichgewicht mit Wasserstoffprotonen (H^+) und Hydrogencarbonat-Ionen (HCO_3^-) steht. CO_2 diffundiert von der Zelle in die Blutbahn, wo es als HCO_3^- in chemischer Verbindung mit Hämoglobin oder Plasmaproteinen aber auch in gelöster Form mit einem Partialdruck (p) von ungefähr 46 mmHg in gemischt-venösem Blut transportiert wird. Als Teil des CO_2 - HCO_3^- -Puffersystems spielt es eine wichtige Rolle in der pH-Homöostase des Blutplasmas. Unter physiologischen Bedingungen wird es über die Lunge in derselben Rate abgeatmet, wie es produziert wird, sodass in der Alveole und im arteriellen Blut ein $p\text{CO}_2$ von 40 mmHg vorherrscht. In die Zelle gelangt CO_2 durch passive Diffusion sowie über Transportproteine der Aquaporin- und der Rhesus-Protein-Familie [21].

Die Fähigkeit CO_2 zu registrieren, ist nicht nur Pflanzen vorbehalten [22], sondern wurde ebenfalls für eukaryote Zellen beschrieben [21]. Auch für den Menschen konnten spezifische Gewebearten identifiziert werden, welche in der Lage sind, Veränderungen von CO_2 wahrzunehmen und darauf entsprechend zu reagieren. Dazu gehören beispielsweise Typ I Zellen im Glomus caroticum und Mukosazellen im Ösophagus. Während in beiden Fällen der genaue zelluläre Mechanismus der CO_2 -Registrierung noch unklar ist, werden der löslichen Adenylatzyklase [21, 23] und der Carboanhydrase [24] besondere Rollen im Sinne von molekularen Sensoren zugeschrieben. Auch in der Lunge scheint es spezielle Mechanismen bezüglich der Detektion von CO_2 zu geben, sind doch ihre Reaktionen auf Veränderungen des alveolären $p\text{CO}_2$ vielfältig. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der $p\text{CO}_2$ erhebliche Einflüsse auf die pulmonale Perfusion [25-27] und die glatte Muskulatur der Bronchien hat [20, 26]. Mit Beginn der 2000er Jahre gelang es mehreren

Arbeitsgruppen um Jacob Sznajder erstmals die Entschlüsselung der Auswirkungen von pulmonalen $p\text{CO}_2$ -Veränderungen auf zellulärer Ebene entscheidend voranzutreiben und dabei Ca^{2+} als einen zentralen Mediator zu identifizieren. Bei der Klärung der Frage, warum es beim akuten Lungenversagen zur Akkumulation von Flüssigkeit in den Atemwegen und somit zur Beeinträchtigung des Gasaustauschs kommt, konnten sie an A549- und primär isolierten Typ II Alveolarepithelzellen zeigen, dass die Erhöhung des $p\text{CO}_2$, also eine alveoläre Hyperkapnie, über die quantitative Reduktion von basolateral gelegenen Natrium-Pumpen (Na^+ - K^+ -ATPasen) auf der Grundlage einer Ca^{2+} -vermittelten Endozytose Funktionseinbußen der Alveolarepithelzellen hinsichtlich ihrer Rolle in der Ödem-Beseitigung nach sich zieht [28-32].

Dass Ca^{2+} auch die CO_2 -abhängige Atelektasenbildung als Kompensationsreaktion auf eine pulmonale Minderperfusion vermittelt, konnten Vorversuche unserer Arbeitsgruppe an isoliert-perfundierten Rattenlungen *in situ* und an Kaninchen *in vivo* aufdecken, in denen sich eine direkte Beziehung zwischen der intraalveolären CO_2 -Konzentration ($[\text{CO}_2]_{\text{ia}}$) und der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ in Typ II Alveolarepithelzellen nachweisen ließ [33].

1.5 Calcium

Freie Ca^{2+} -Ionen kontrollieren und beeinflussen eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie beispielweise die Muskelkontraktion, die Genexpression, den Energiemetabolismus, die Proliferation, die Sekretion und den Zelltod. Seine chemischen Eigenschaften machen Ca^{2+} zu einem vielseitigen Liganden, der dazu fähig ist, sich sehr irregulären Bindungen anzupassen, welche ihm in der intrazellulären Umgebung angeboten werden [34]. Gerade aus diesem Grund stellt die Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ einen der häufigsten und fundamentalsten Mechanismen der intra- und interzellulären Signalvermittlung dar [35]. Ca^{2+} -Signale können dabei auf Mikrodomänen beschränkt sein, sich global in der gesamten Zelle ausbreiten oder über intrazelluläre Grenzen hinaus multizelluläre Prozesse koordinieren [36, 37]. Sie sind variabel in der Dauer und reichen von einfachen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Erhöhungen bis hin zu Oszillationen mit variabler Frequenz [38]. $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Oszillationen stellen dabei die häufigste Form der Ca^{2+} -Signalvermittlung in nicht-erregbaren Zellen dar. Sie werden mithilfe des sekundären Botenstoffs Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) durch die Mobilisation von Ca^{2+} aus dem

endoplasmatischen Retikulum (ER) generiert und beruhen auf positiven und negativen Rückkopplungsmechanismen auf das Ca^{2+} -Ausschüttungssystem [39]. Vor allem die Interaktion von IP_3 und Ca^{2+} am endoplasmatischen IP_3 -Rezeptor (IP_3R) formt das Bild der Oszillationen [35, 40, 41]. Um sicher zu stellen, dass die Ca^{2+} -Signale die angestrebten Zielorganellen erreichen, existieren verschiedene Mechanismen der Signalverwaltung. So lassen sich durch die Modulation der Oszillationsfrequenz Organellen gezielt ansteuern. Auch die strategische Lokalisation von Organellen und Ionenkanälen zueinander [42, 43] und die Fähigkeit einiger Zielorganellen, empfangene Signale zu modulieren oder gar zu beenden, dienen der Koordination von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Oszillationen [44].

In den meisten Zellen herrscht eine sehr niedrige Ruhe- $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ von ungefähr 100 nM [38]. Nur so kann Ca^{2+} als intrazelluläres Signalsystem fungieren, welches bereits durch minimale Änderungen der umgebenen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ ein- und ausgeschaltet werden kann. Da Ca^{2+} kontinuierlich in die Zelle diffundiert, bedarf es mehrerer, teils gewebespezifischer Mechanismen zur Aufrechterhaltung dieser Ruhekonzentration [34]. Dazu zählt unter anderem die Ausschleusung von Ca^{2+} aus der Zelle über Ca^{2+} -ATPasen oder Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher, aber auch die intrazelluläre Ca^{2+} -Speicherung in Zellorganellen oder durch Komplexbildung. So gibt es innerhalb der Zelle eine große Anzahl nicht-membrangebundener Liganden, die in der Lage sind, Ca^{2+} zu binden und somit die Konzentration von freiem Ca^{2+} niedrig zu halten [34, 38]. Als intrazelluläre Speicher dienen vor allem Zellorganellen wie das ER, die Mitochondrien und gewebespezifische Granula. Insbesondere das ER und die Mitochondrien gelten dabei nicht nur als reine Ca^{2+} -Speicher, sondern stellen aktive Protagonisten der intrazellulären Kommunikation mittels Ca^{2+} dar.

Auch für den energieabhängigen Sekretionsprozess von Surfactant gilt Ca^{2+} als wichtiger *Second Messenger*. Dabei ist unter anderem die Fusion der Lamellarkörperchen mit der Alveolarepithelmembran und somit die Freisetzung ihrer Inhalte in die Alveole direkt Ca^{2+} -abhängig [45-47]. Neben der eigentlichen Exozytose stimuliert Ca^{2+} die mitochondriale Adenosintriphosphat-(ATP)-Produktion und ist somit indirekt für den ATP-abhängigen Transport von Surfactant innerhalb der Typ II Alveolarepithelzellen verantwortlich [48]. Zusätzlich dienen Ca^{2+} -Oszillationen der Kommunikation zwischen Typ I und Typ II Alveolarepithelzellen über *Gap Junctions* (GJ), ist doch die Sekretion von Surfactant ein multizellulärer Prozess, der einer interzellulären Kommunikation zwischen intraazinären Alveoli unterliegt [45-47, 49].

Durch *in-situ*-Versuche unserer Arbeitsgruppe an isoliert-perfundierten Rattenlungen konnte gezeigt werden, dass die Hypokapnie-bedingte Dysfunktion des Surfactant-Sekretionssystems, welche eine Atelektasenbildung nach Perfusionsminderungen nach sich zieht, auf einer Reduktion des $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in Typ II Alveolarepithelzellen beruht. Dabei konnte außerdem aufgedeckt werden, dass Mitochondrien eine zentrale Rolle im Prozess der alveolären CO_2 -Registrierung einnehmen, da die Reduktion des $[Ca^{2+}]_{zyt}$ aus einer Aufnahme von zytosolischem Ca^{2+} in die Mitochondrien resultiert [33].

1.6 Mitochondrien

Mitochondrien stellen wichtige aktive Teilnehmer in dem interkompartimentären Netzwerk des zellulären Ca^{2+} -Signalsystems dar, deren Aufgabenspektrum weit über die alleinige Aufrechterhaltung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ hinausreicht [50]. So zählen die Produktion von ATP durch oxidative Phosphorylierung, die Modulation von Zell-Signalen durch Aufnahme, Speicherung und Abgabe von zytosolischem Ca^{2+} sowie die partielle Kontrolle über die Zell-Apoptose zu ihren Hauptaufgaben. Alle diese Funktionen beruhen auf einem engen Zusammenspiel von Mitochondrien mit Ca^{2+} , dessen Ausmaß gewebespezifisch ist und selbst in ein und derselben Zelle variieren kann [51-54].

Die Aufnahme von Ca^{2+} aus dem Zytosol in die Mitochondrienmatrix erfolgt über den Ca^{2+} -Uniporter (*mitochondrial calcium uniporter*, MCU), der sich an der inneren Mitochondrienmembran befindet. Der Ca^{2+} -Uniporter ermöglicht die Diffusion von Ca^{2+} entlang des elektrochemischen Gradienten ohne die Hilfe anderer Ionen oder Energiequellen. Die treibende Kraft für diese elektrogene Aufnahme von Ca^{2+} ist das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_{mito}$). Zusätzlich dazu ist der passive Influx von Ca^{2+} in die Mitochondrienmatrix von der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ abhängig. So findet trotz des sehr negativen $\Delta\Psi_{mito}$ von -180 mV in Ruhe aufgrund einer Inhibierung des Ca^{2+} -Uniporter kein Einstrom von Ca^{2+} in die Mitochondrien statt [50]. Erst $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Oszillationen führen zur Aktivierung des Ca^{2+} -Uniporters und zur Fortleitung dieser innerhalb der Mitochondrien in Form von $[Ca^{2+}]_{mito}$ -Oszillationen, wo sie zur Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Dehydrogenasen führen [55]. Non-oszillierende $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Veränderungen werden von den Mitochondrien ausfiltert und finden keine Beantwortung [44, 56, 57]. Da der Ca^{2+} -Uniporter zwar eine hohe Kapazität, jedoch eine niedrige Affinität

besitzt, werden für die Aufnahme von Ca^{2+} sehr hohe $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ in unmittelbarer mitochondrialer Umgebung benötigt. Durch die vorübergehende Erschaffung von Mikrodomänen mit hoher $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ wird die Aufnahme erleichtert [58, 59]. Dies gelingt einerseits dadurch, dass Mitochondrien enge Verbindungen mit Ca^{2+} -speichernden Organellen wie vor allem dem ER eingehen [35, 52, 60-62]. Zusätzlich dazu begünstigt Ca^{2+} die Effektivität seiner eigenen Aufnahme in die Mitochondrien dadurch, dass es die Bewegung von Mitochondrien innerhalb der Zelle inhibiert. [63, 64]. Darüber hinaus verringert der Einstrom von Ca^{2+} über den Ca^{2+} -Uniporter direkt das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ und begrenzt somit initial seine eigene Aufnahme [61, 65]. Unter physiologischen Bedingungen wird so eine Überladung von Mitochondrien mit Ca^{2+} mit konsekutiver Apoptoseinduktion verhindert. Die Ca^{2+} -bedingte Aktivierung der mitochondrialen Dehydrogenasen mündet letztendlich in einem erneuten Aufbau des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ und somit in einer ungehinderten Funktionstüchtigkeit der Mitochondrien [61].

Der Übertritt von Ca^{2+} aus den Mitochondrien ins Zytosol findet über einen sekundär-aktiven Transport mithilfe von Ionenaustauschern statt. Sowohl der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX_{mito}) als auch der H^+ - Ca^{2+} -Austauscher befinden sich wie der Ca^{2+} -Uniporter an der inneren Mitochondrienmembran. Der Ca^{2+} -Transport über die Austauscher ist dem elektrochemischen Gradienten entgegengesetzt und spannungsabhängig. Dabei wird der Einfluss des Ionenaustausches auf das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ durch den Export von H^+ in der Atmungskette kompensiert [66]. Im Gegensatz zur Ca^{2+} -Aufnahme über den Ca^{2+} -Uniporter, welche z.B. in Herz- und Leberzellen eine Maximalgeschwindigkeit von 10-30 nmol/s erreichen kann, ist der Ca^{2+} -Efflux deutlich langsamer [50]. Durch die langsamere Abgabe von Ca^{2+} aus den Mitochondrien ins Zytosol kommt es zu einer Verzögerung der kompletten Erholung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$. Dies führt einerseits zur Verlängerung Ca^{2+} -abhängiger Prozesse und vereinfacht auf der anderen Seite die Wiederauffüllung intrazellulärer Speicher [50, 67].

In der Mitochondrienmatrix stimuliert Ca^{2+} die oxidative Phosphorylierung, in dem es sowohl die Schlüsselenzyme des Citratzyklus als auch die $\text{F}_0\text{-F}_1\text{-ATPase}$ aktiviert [68, 69]. Über die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der Pyruvat-Dehydrogenase, der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase und der Isocitrat-Dehydrogenase entstehen vermehrt Reduktionsäquivalente in Form von $\text{NADH}+\text{H}^+$, mit deren Hilfe an Komplex I, III und IV der Atmungskette Protonen (H^+) aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum gepumpt werden. Der Ausstoß der Protonen resultiert in dem Aufbau eines

elektrochemischen H^+ -Gradienten, der aus einer chemischen (ΔpH) und einer elektrischen Komponente ($\Delta \Psi$) besteht. Bei Komplex IV fließen die Protonen über die F_0-F_1 -ATPase entlang ihres Gradienten zurück in die Mitochondrienmatrix und sind damit treibende Kraft für die Synthese von ATP. Eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{mito}$ führt somit über eine gesteigerte Enzymaktivität zur vermehrten Anhäufung des Schlüsselzwischenprodukts $NADH+H^+$, welches Reduktionsäquivalente für die Atmungskette liefert und so die ATP-Synthese unterhält [44].

1.7 Fragestellung und Zielsetzung

Die Vorversuche unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass Mitochondrien neben ihrer Funktion als ATP-Lieferanten für die Surfactantsekretion auch eine zentrale Rolle im Prozess der alveolären CO_2 -Registrierung einzunehmen scheinen, da die Hypokapnie-bedingte Atelektasenbildung bei pulmonalen Perfusionsstörungen auf einer mitochondrialen Aufnahme von zytosolischem Ca^{2+} beruht [33]. Ziel dieser Arbeit ist, diese bislang unbeschriebene Funktion der Mitochondrien näher zu untersuchen. Dabei soll im speziellen die Rolle der mitochondrialen Isocitrat-Dehydrogenase 3 (IDH3) beleuchtet werden. Diese katalysiert Ca^{2+} -abhängig als mitochondrienspezifisches heterodimeres Enzym die oxydative Decarboxylierung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat innerhalb des Citratzykluses. Dabei wird NAD^+ zu $NADH+H^+$ reduziert sowie CO_2 produziert [70]. Bereits der Mechanismus des Euler-Liljestrand-Reflexes zeigt, dass die Registrierung von Gasveränderungen in der Lunge dort stattfindet, wo das registrierte Gas unter physiologischen Umständen in biochemischen Prozessen als Edukt genutzt wird oder als Produkt anfällt [71]. In Anbetracht dieser Beobachtung und in der Annahme, dass CO_2 im Sinne des Massewirkungsgesetzes Einfluss auf seine eigene Produktion haben könnte, ergibt sich für die Rolle der Mitochondrien im Prozess der alveolären CO_2 -Registrierung folgende Hypothese. Ein pulmonaler Perfusionsstopp führt zu einer Abnahme des pCO_2 in den betroffenen Arterien sowie den angrenzenden Alveolen und wird von den Mitochondrien der Typ II Alveolarepithelzellen wie folgt registriert: Das verminderte angebotene Produkt CO_2 führt über eine positive Rückkopplung zu einer Aktivitätssteigerung der Isocitrat-Dehydrogenase. Dies führt einerseits zu einer gesteigerten Produktion von CO_2 zum Zwecke der Wiederherstellung des gestörten Reaktionsgleichgewichts. Andererseits mündet die Aktivitätssteigerung der Isocitrat-

Dehydrogenase über die vermehrte Produktion von Reduktionsäquivalenten in einer Negativitätssteigerung des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$, welche eine vermehrte Aufnahme von Ca^{2+} über den Ca^{2+} -Uniporter in die Mitochondrien und somit eine Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ zur Folge hat.

Zur Untersuchung dieser Hypothese sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Welchen Einfluss hat eine Hypokapnie auf die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$, die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$, das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ und die $[\text{NADH}]$ in A549-Zellen *in vitro*?
2. Inwiefern ändert sich der Einfluss der Hypokapnie auf die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$, die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$, das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ und die $[\text{NADH}]$ in A549-Zellen *in vitro* nach Herunterregulierung der mitochondrialen IDH3 mittels *Gen-Knock-Down*?

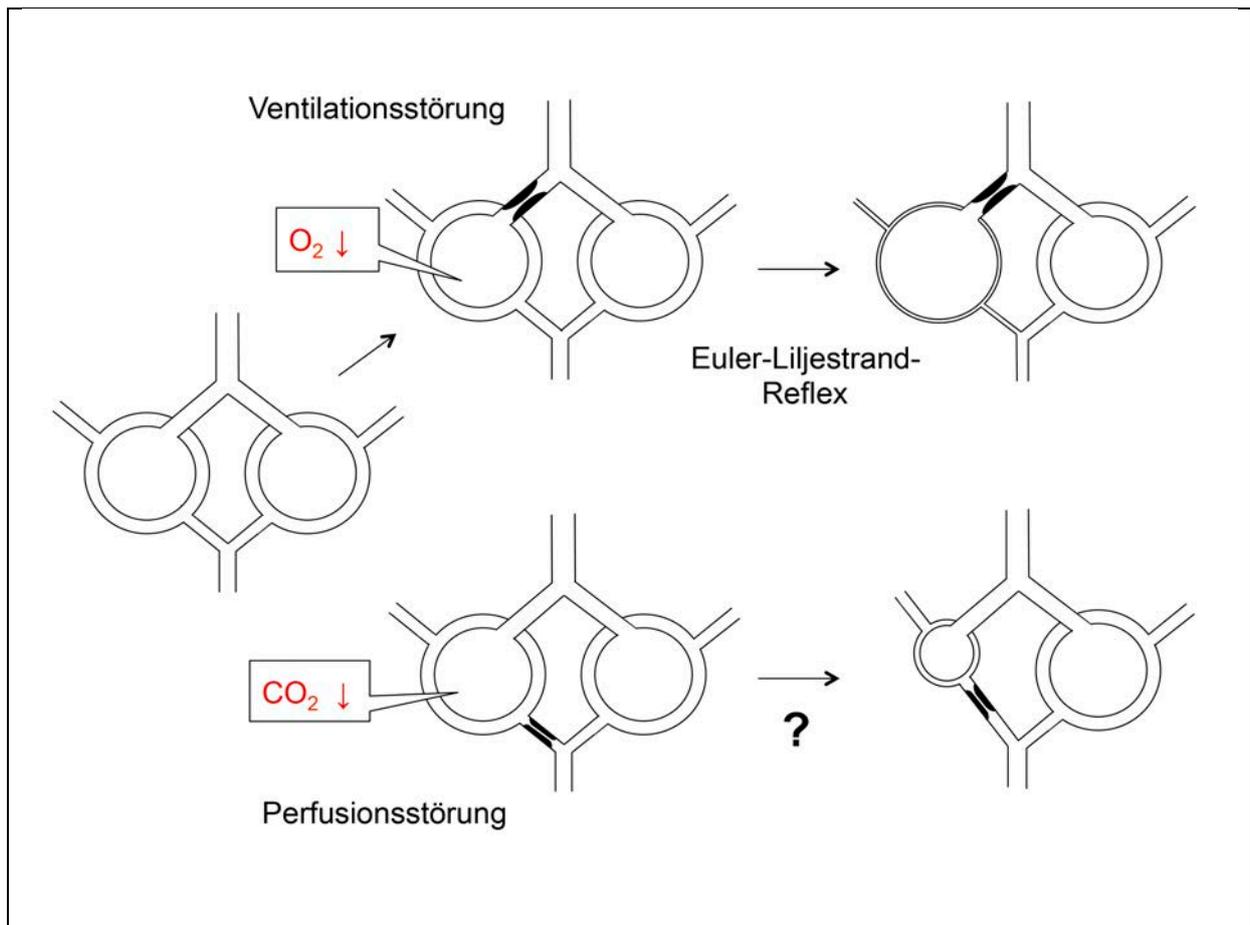


Abbildung 1: Schematische Darstellung von Ventilations-Perfusions-Missverhältnissen. Bei Ventilationsstörungen führt der Euler-Liljestrand-Reflex zur Perfusionsanpassung und somit zu einer Minimierung des Ventilations-Perfusions-Missverhältnisses (oben). Der zelluläre Mechanismus, welcher zur Ventilationsanpassung bei Perfusionsstörungen führt, ist im Gegensatz dazu bislang ungeklärt (unten).

2 Material und Methodik

2.1 Zelllinie

Die *in-vitro*-Versuche wurden an humanen adenokarzinomatösen Epithelzellen alveolären Ursprungs des Typs A549 durchgeführt, welche von der Firma DSMZ aus Braunschweig in Deutschland bezogen wurden. Diese Zelllinie repräsentiert entsprechend ihren Eigenschaften Typ II Alveolarepithelzellen, deren physiologische Aufgabe unter anderem die Surfactant-Synthese und -Sekretion ist.

2.2 Zellkultivierung

2.2.1 Geräte und Zubehör

CO ₂ -Inkubatoren (37 °C, 21 % O ₂ , 5 % CO ₂)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf, Deutschland
Mechanischer Zähler	Baumer IVO GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen, Deutschland
Mikroskop für Zellkultur Olympus CK30	Olympus, Hamburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer mit Deckplättchen	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Pipetten - Eppendorf research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Sicherheitsbank (sterile Werkbank mit Lamina flow)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Vortex	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen: Centrifuge 54717R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Universal 32	Hettrich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

Heraeus Pico 17

Thermo Scientific, Braunschweig,
Deutschland

2.2.2 Sterile Verbrauchsmaterialien

1-Kammer Objektträger (8,6 cm²)
(Falcon Chambered Cell Culture Slides)

BD Biosciences, Franklin Lakes,
NJ/USA

Kulturflaschen (T25, T75)

Sarstedt Inc., Newton, NC/USA

Pipettenspitzen: Biosphere Filtertips

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht,
Deutschland

epT.I.P.S. Standard

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf-Tube)

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht,
Deutschland

Rundbodenröhrchen BD Falcon (14 ml)

BD Biosciences, Franklin Lakes,
NJ/USA

Transferringpipetten/Serological Pipette

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht,
Deutschland

Zellkulturplatte (6-well) Falcon

BD Biosciences, Franklin Lakes,
NJ/USA

2.2.3 Reagenzien

Dulbecco's PBS (DPBS)

Biochrome AG, Berlin, Deutschland

F-12K Medium (Nährmedium)

ATCC, Manassas, VA/USA

FBS

Biochrome AG, Berlin, Deutschland

Penicillin/Streptomycin 10000 µg/ml

Biochrome AG, Berlin, Deutschland

Trypanblau 0.4 % Lösung

Sigma-Aldrich, Saint Louis, Mo/USA

(aufbereitet in 0.81 % NaCl & 0.06 % K₃PO₄)

Trypsin / EDTA Solution

Biochrome AG, Berlin, Deutschland

2.2.4 Durchführung

Humane adenokarzinomatöse Epithelzellen alveolären Ursprungs des Typs A549 wurden in T75-Kulturflaschen in einem Nährmedium bestehend aus F-12K Medium,

10 % fetalem Kälberserum (*fetal bovine serum*, FBS) und einer 1%igen Antibiotikaauslösung (Penicillin/Streptomycin) im CO₂-Inkubator (Raumluft (RL) + 5 % CO₂, 37 °C) kultiviert. Die Zellaussaat erfolgte in einer Dichte von 20.000 - 25.000 Zellen pro cm². Das Nährmedium wurde dreimal pro Woche gewechselt. Bei einer Konfluenz von 90 % wurden die Zellen subkultiviert. Zur Subkultivierung der A549-Zellen wurde zuerst das Nährmedium mit Hilfe einer Transferpipette abgesaugt und verworfen. Um abgestorbene Zellen und Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Zellen anschließend dreimal mit 10 ml kalter, phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen. Um die Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen, wurden diese anschließend mit 3 ml Trypsin für 4 Minuten im CO₂-Inkubator bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle bezüglich der Ablösung der Zellen. Hatten sich alle Zellen vom Boden der Flasche gelöst, wurde die Wirkung des Trypsins durch die Zugabe von 7 ml FBS gestoppt. Für ein besseres Ablösen der Zellen wurde die Zellsuspension (ZS) in der Flasche mittels einer 25 ml Transferpipette angesaugt und der Flaschenboden mit dieser ausgespült. Die Zellsuspension wurde in ein 14 ml Zentrifugenröhrchen (Rundbodenröhrchen) transferiert und für 5 Minuten mit 1000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands erfolgte eine Resuspendierung des im Konus befindlichen Zellpellets mit 3 ml Nährmedium sowie eine Zellzählung. Zu diesem Zwecke wurde eine Färbelösung in einer 1:10 Verdünnung bestehend aus 90 µl PBS und 10 µl Trypanblau vorbereitet. Von den 100 µl Lösung wurden 20 µl verworfen und durch 20 µl Zellsuspension ersetzt. Daraus ergab sich ein Verdünnungsfaktor von fünf. 10 µl der so angefertigten Zellsuspension-Färbelösung wurden nun auf eine Neubauer-Platte pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop erfolgte die Zählung der Zellen in den vier Großquadranten. Entsprechend der unten stehenden Formel wurden so die Zellzahl in der Zellsuspension und die für die Aussaat benötigte Menge an Zellsuspension errechnet.

$$\text{Zellen/ml in ZS} = \left(\frac{\text{Anzahl der Zellen in den 4 Großquadranten} \times \text{VF}}{4} \right) \times 10.000$$

Nach Zellzahlbestimmung wurden die Zellen erneut mit einer Dichte von 20.000 - 25.000 Zellen pro cm² in eine T75-Kulturflasche ausgesät und somit eine neue Passage begonnen.

Zur Aussaat der Zellen auf 1-Kammer Objektträger wurden jeweils 2,5 ml des Nähmediums auf die entsprechenden Objektträger pipettiert. Je nach gewünschter Zellmenge bzw. Konfluenz der Zellen nach 48 Stunden Inkubation ergab sich folgende Formel zur Errechnung der benötigten Menge an Zellsuspension:

$$\text{benötigte Menge an ZS } (\mu\text{l}) = \left(\frac{\text{gewünschte Zellmenge pro Objektträger} \times \text{Anzahl Objektträger}}{\text{Zellzahl in ZS auf 100 } \mu\text{l}} \right)$$

Der Erfolg der fluoreszenzmikroskopischen Versuche unterlag einer entsprechenden Zellkonfluenz. Diese wurde bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden am besten durch eine Aussaat von durchschnittlich 75.000 Zellen pro 1-Kammer Objektträger erreicht.

2.3 Transfektion

2.3.1 Geräte und Zubehör

CO ₂ -Inkubatoren (37°C, 21 % O ₂ , 5 % CO ₂)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf, Deutschland
Pipetten - Eppendorf research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Sicherheitsbank (sterile Werkbank mit Lamina flow)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

2.3.2 Sterile Verbrauchsmaterialien

Kulturflaschen (T25, T75)	Sarstedt Inc., Newton, NC/USA
Pipettenspitzen: Biosphere Filtertips	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
epT.I.P.S. Standard	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf-Tube)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Rundbodenröhrchen BD Falcon (14 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ/USA
Transferpipetten (Serological Pipette)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte (6-well) Falcon	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ/USA

2.3.3 Reagenzien

Annealing Buffer	Invitrogen, Carlsbad, CA/USA
Dulbecco's PBS (DPBS)	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
F-12K Medium (Nährmedium)	ATCC, Manassas, VA/USA
Gibco Opti-MEM	Life Technology, Paisley, UK
Lipofectamine RNAiMAX (Transfektionsmittel)	Invitrogen, Carlsbad, CA/USA
RNase-freies Wasser	QIAGEN Sciences, MD/USA
Stealth Select RNAi siRNA (HSS142601)	Invitrogen, Carlsbad, CA/USA
Stealth Select RNAi siRNA (HSS142601) + Alexa Fluor 488	Invitrogen, Carlsbad, CA/USA
Stealth RNAi Negative Control Hi GC (12935-400) (= Scrambled siRNA)	Invitrogen, Carlsbad, CA/USA

2.3.4 Durchführung

Zur Entschlüsselung des Mechanismus der CO₂-Registrierung in Typ II Alveolarepithelzellen wurde ein Gen-*Knock-Down* der IDH3, einem Schlüsselenzym des Citratzyklus, mittels *Stealth* siRNA durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine reverse Transfektion. Zum Zwecke der Konservierung wurde die Duplex-siRNA mit RNase-freiem Wasser zu einer 20 µM Lösung resuspendiert (entspricht 20 pmol/µl). Entsprechend dem Herstellerprotokoll erfolgte die Transfektion von A549-Zellen mit einer 10 nM Lösung Stealth siRNA. Dazu wurde die Stealth siRNA in 100 µl Opti-MEM[®] Medium verdünnt und zusammen mit dem Transfektionsmittel Lipofectamine[®]

RNAiMAX vermischt. Daraufhin erfolgte eine Inkubation ohne Nährmedium für 20 Minuten bei Raumtemperatur in den jeweiligen Zellkulturgefäßen unter der sterilen Werkbank. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von Nährmedium und einer entsprechenden Menge Zellsuspension (siehe Methodik Zellkultur 2.2.4 bzw. Pipettierschemata in den Tabellen 1-3). Zur Vermeidung einer möglichen Interaktion wurde auf die Zugabe von Antibiotika im Nährmedium verzichtet. Die Zellen wurden daraufhin für 48 Stunden bei 37 °C im CO₂-Inkubator gezüchtet und konnten im Anschluss daran für die verschiedenen Versuchsmethoden genutzt werden.

Parallel zu den Versuchsreihen mit transfizierten Zellen wurden immer auch Negativkontrollen mit einer entsprechenden *Scrambled* siRNA und Kontrollen mit nativen Zellen durchgeführt. Alle Zellen einer Versuchsreihe entstammten dabei derselben Passage. Die Vorbereitung der Negativkontrollen folgte demselben Schema wie die Vorbereitung der transfizierten Zellen (siehe oben). Die nativen Zellen wurden wie unter 2.2.4 beschrieben vorbereitet.

Die Überprüfung der Wirksamkeit der Transfektion erfolgte auf mRNA-Ebene mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR), auf Proteinebene mittels Western Blot sowie auf visueller Ebene mittels einer fluoreszenzmarkierten IDH3G-siRNA. Sowohl die Transfektion als auch die Zellaufbereitung erfolgte wie oben beschrieben. Die Anzucht der Zellen erfolgte für die RNA-Extraktion als Vorbereitung auf die PCR in 6-*well*-Zellkulturplatten (9,5 cm² pro *well*/Näpfchen). Für den Western Blot wurden T25-Flaschen (25 cm²) und für die Fluoreszenzmikroskopie 1-Kammer-Objektträger (8,6 cm²) verwendet. Für die jeweiligen Versuchsmethoden ergaben sich folgende Pipettierschemata:

Tabelle 1: Pipettierschema zur Vorbereitung von A549-Zellen für die PCR

PCR	IDH3G-siRNA	<i>scrambled</i> siRNA (Negativkontrolle)	Kontrolle (nativ)
Opti-MEM	552 μ l	μ l	-
Stealth Select RNAi siRNA (HSS142601)	5,5 μ l	-	-
Stealth RNAi Negative Control Hi GC (12935-400)	-	5,5 μ l	-
Annealing Buffer	49,7 μ l	49,7 μ l	-
Lipofectamine RNAiMAX	5,5 μ l	5,5 μ l	-
20 Minuten Inkubation unter der sterilen Werkbank danach Zugabe von:			
F-12K Medium + 5% FBS	2,4 ml	2,4 ml	3 ml
Zellsuspension	auf 1×10^6 Zellen pro Näpfchen (9,5 cm ²) zu errechnen		

Tabelle 2: Pipettierschema zur Vorbereitung von A549-Zellen für den Western Blot

WESTERN BLOT	IDH3G-siRNA	<i>scrambled</i> siRNA (Negativkontrolle)	Kontrolle (nativ)
Opti-MEM	1453 μ l	1453 μ l	-
Stealth Select RNAi siRNA (HSS142601)	14,5 μ l	-	-
Stealth RNAi Negative Control Hi GC (12935-400)	-	14,5 μ l	-
Annealing Buffer	130,8 μ l	130,8 μ l	-
Lipofectamine RNAiMAX	14,5 μ l	14,5 μ l	-
20 Minuten Inkubation unter der sterilen Werkbank danach Zugabe von:			
F-12K Medium + 5% FBS	5547 μ l	5547 μ l	7 ml
Zellsuspension	150 μ l pro T25- Flasche	150 μ l pro T25-Flasche	150 μ l pro T25- Flasche

Tabelle 3: Pipettierschema zur Vorbereitung von A549-Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie

FLUORESZENZMIKROSKOPIE	IDH3G-siRNA	<i>scrambled</i> siRNA (Negativkontrolle)	Kontrolle (nativ)
Opti-MEM	500 µl	500 µl	-
Stealth Select RNAi siRNA (HSS142601)	5 µl	-	-
Stealth RNAi Negative Control Hi GC (12935-400)	-	5 µl	-
Annealing Buffer	45 µl	45 µl	-
Lipofectamine RNAiMAX	5 µl	5 µl	-
20 Minuten Inkubation unter der sterilen Werkbank danach Zugabe von:			
F-12K Medium + 5% FBS	2 ml	2 ml	2,5 ml
Zellsuspension	auf 75000 Zellen pro 1-Kammer-Objektträger (8,6 cm ²) zu errechnen		

2.4 Pufferherstellung

2.4.1 Geräte und Zubehör

BGA-Gerät ABL - 90 Felx	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Magnetrührer	Bibby Scientific Limited, Stone, ST/USA
pH-Meter	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Verschlussfolie Parafilm ,M'	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL/USA
Waage	BP301S, Sartorius AG Göttingen, Deutschland

2.4.2 Sterile Verbrauchsmaterialien

Becherglas, 2000 ml	SIMAX Czech Republic/Sklarny Kavalier, Sazava, CZ
Blutgasanalysespritzen (2 ml)	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark

Konische Röhrchen - BD Falcon (50 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ/USA
Spritzen: Injekt (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Sterile Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Transferpipetten (Serological Pipette)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

2.4.3 Reagenzien

Aqua ad iniectabilia	Baxter Healthcare, Zürich, Schweiz
CaCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CO ₂	TMG GmbH, Krefeld, Deutschland
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
KCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
NaCl	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
pH-Lösungen (pH 4, 7, 10)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TRIS (Trometamol-Infusionslösung)	Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland

2.4.4 Konstruktion zur Pufferbegasung

Dreiwegehähne Discifix-3	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Glasflasche mit Drehverschluss, 2000 ml	SIMAX Czech Republic/Sklarny Kavalier, Sazava, CZ
Gummischläuche	TYGON Liquid-scan GmbH & Co. KG, Überlingen, Deutschland

Heißwachspistole Pattex PXP12	Henkel GmbH & Co. KGaA, Düsseldorf, Deutschland
Übertragungsleitung green line E98-P	CODAN, Lensahn, Deutschland

2.4.5 HBS-Pufferansatz

Für den Vergleich der Auswirkungen von Normo- und Hypokapnie auf A549-Zellen *in vitro* wurden zwei *HEPES Buffered Saline* (HBS-) Puffer hergestellt, die während der Versuche im Sinne einer Blutplasmasimulation die Zellen umspülten. Bei beiden HBS-Puffern handelte es sich um laborübliche Puffer, welche entsprechend den Angaben in Tabelle 4 zunächst aus einem HBS-Stammpuffer angesetzt wurden.

Tabelle 4: Ansatz des HBS-Puffers

Substanz	MW	mM	Menge
HEPES	238,8	20	4,766 g
CaCl ₂	111	1	0,111 g
MgCl ₂	203,31	1	1,0 ml
KCl	74,55	5	0,373 g
NaCl	58,44	150	8,770 g
Glukose	180,16	10	1,800 g
Aqua ad iniectabilia			1 L

Mit Hilfe von KCl, NaOH und Einwegpipetten wurde der HBS-Stammpuffer auf einen pH-Wert von 7,4 adjustiert. Dies wurde mittels pH-Meter und Blutgasanalyse- (BGA-) Gerät kontrolliert. Anschließend erfolgte eine sterile Filtration, an welche sich eine Teilung des HBS-Stammpuffers schloss. Die eine Hälfte wurde in 50 ml konische Röhrchen gefüllt und vorerst gekühlt bzw. als Vorrat eingefroren. Aufgrund des Fehlens von CO₂ diente dieser HBS-Puffer als Surrogat für hypokapnisches Blutplasma. Die andere Hälfte des HBS-Stammpuffers wurde in einem zuvor präparierten 2000 ml Glasgefäß mit 5 % CO₂ versetzt. Der pH-Wert wurde dabei mit Tris reguliert. Am Ende ergab sich ein normokapnischer HBS-Puffer mit 5 % CO₂ und einem pH-Wert von 7,4. Die Überprüfung beider Parameter sowie der Elektrolytkonzentrationen erfolgte mittels BGA-Gerät. Der normokapnische HBS-Puffer wurde dann ebenfalls in 50 ml konische Röhrchen gefüllt und die Verschlüsse zur Vermeidung eines eventuellen Austritts von CO₂ zusätzlich mit Parafilm verschlossen, bevor auch dieser HBS-Puffer vorerst gekühlt bzw. eingefroren wurde. Vor Nutzung beider HBS-Puffer für die Experimente wurden diese in einem

Wasserbad auf 37 °C erwärmt und deren pH-Werte und Elektrolytkonzentrationen kontrolliert. Im Falle des normokapnischen HBS-Puffers erfolgte zusätzlich eine Überprüfung des pCO₂. Von der Norm abweichende HBS-Puffer wurden verworfen. Zusätzlich erfolgte zur Herstellung eines physiologischen onkotischen Drucks die Zugabe von 500 µl FBS pro 50 ml HBS-Puffer-Röhrchen (1:100 Verdünnung).

2.4.6 Präparation des Glasgefäßes zur Pufferherstellung

Zur Herstellung des normokapnischen HBS-Puffers wurde ein 2000 ml Glasgefäß mit Drehverschluss wie folgt präpariert: In den Drehverschluss wurden drei Löcher mit einem Durchmesser von 9 mm, 8 mm und 5 mm gebohrt. Zur Sicherstellung einer effektiven Druckentlastung während der Begasung wurde durch das 9 mm große Loch ein flexibler Gummischlauch mit einem Durchmesser von 9 mm, einem Lumen von 5 mm und einer Länge von 70 cm so gezogen, dass 8 cm des Schlauches in das Gefäß durch das Loch und 62 cm nach außen ragten. Die Längen der beiden Enden war dabei theoretisch vernachlässigbar. Wichtig war lediglich, dass der in das Gefäß ragende Teil des Schlauches bei Befüllung oberhalb des HBS-Pufferspiegels lag. Um die Zugabe von Tris und die Abnahme von angereichertem HBS-Puffer zur pH-Wert- und pCO₂-Kontrolle zu gewährleisten, wurde ein ebenfalls flexibler Gummischlauch mit einem Durchmesser von 5 mm, einem Lumen von 2,5 mm und einer Länge von 24 cm durch das 5 mm große Loch im Drehverschluss gezogen. Dieser Gummischlauch wurde mit einem Drei-Wege-Hahn am herausragenden Ende versehen, um sowohl eine einfache Pufferentnahme zu ermöglichen als auch dem Verlust von Gas aus dem HBS-Puffer entgegenzuwirken. Dieser Schlauch ragte ca. 20 cm in das Glasgefäß und somit bei Befüllung des Glasgefäßes in den HBS-Puffer hinein. Das CO₂ wurde über einen Gummischlauch durch eine Hahnenbank bestehend aus sechs ineinander verschraubten Drei-Wege-Hähnen geleitet. Der mediane Anschluss jedes Drei-Wege-Hahns wurde mit je einem Überleitungsschlauch des Typs *green line*[®] der Firma CODAN verbunden. Der untere Anschluss des untersten Drei-Wege-Hahns wurde zusätzlich mit einem weiteren Überleitungsschlauch verbunden. Diese Konstruktion wurde nun so in das dritte, 8 mm große Loch des Drehverschlusses gefügt, dass alle sieben Übergangsschläuche durch das Loch in das Glasgefäß und bei Befüllung in den HBS-Puffer hinein ragten, und dass der unterste der Drei-Wege-Hähne bündig mit dem Loch auf dem Drehverschluss abschloss, so dass alle nach

außen ragenden Drei-Wege-Hähne senkrecht auf dem Drehverschluss standen. Die Ventile der Drei-Wege-Hähne wurden so eingestellt, dass das durchströmende Gas über die Übergangsschläuche in den HBS-Puffer gelangte. Die so herbeigeführte Vergrößerung der Begasungsfläche resultierte in einer effektiveren Karbonisierung des HBS-Puffers. Alle drei in den Drehverschluss gefügten Teile wurden auf der oberen, äußeren Drehverschlussseite mithilfe von Heißwachs aus einer Heißwachspistole fixiert und abgedichtet. Abbildung 2 veranschaulicht den Aufbau des Puffer-Begasungssystems.

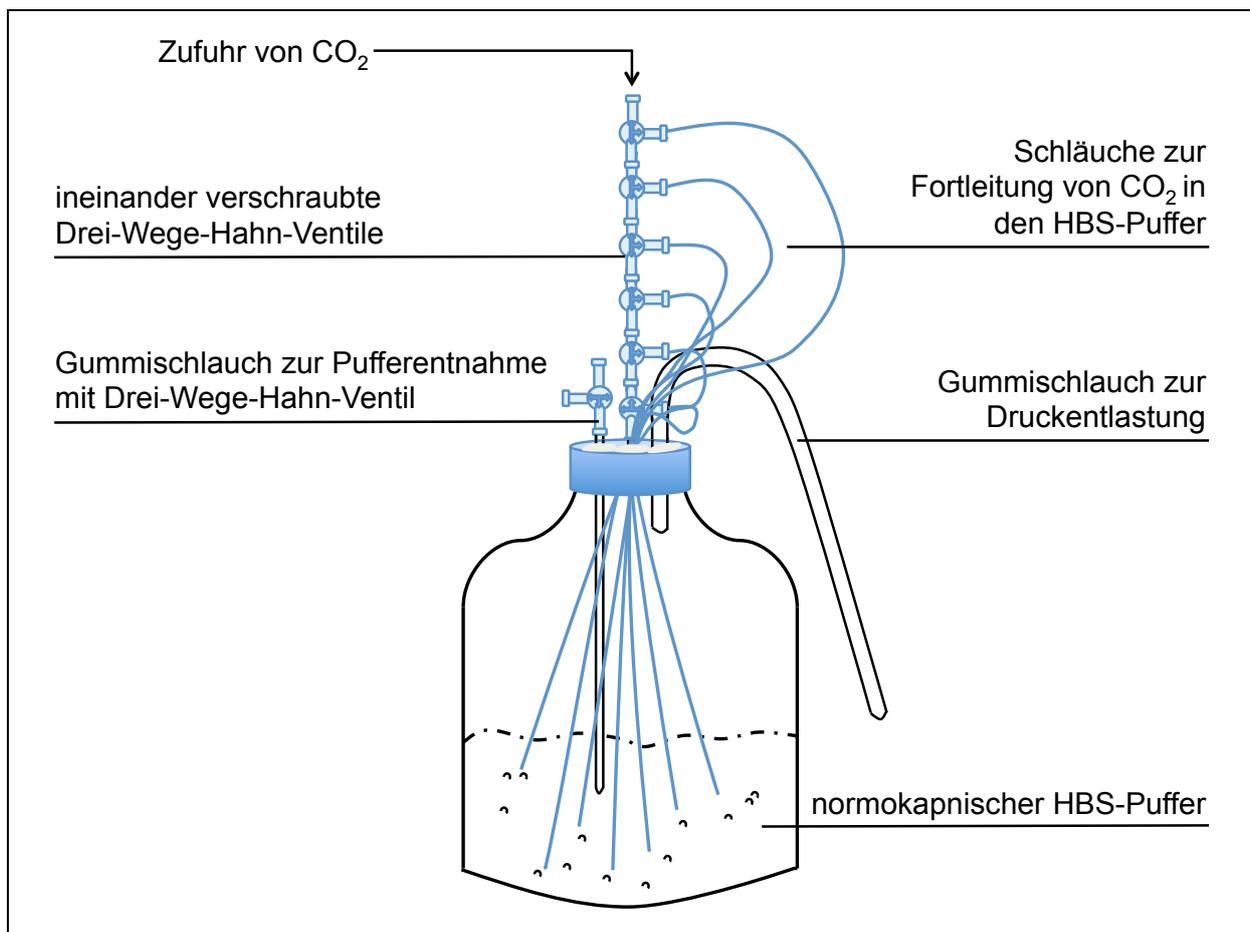


Abbildung 2: 2000 ml Glasgefäß mit präpariertem Aufsatz zur Herstellung des normokapnischen HBS-Puffers

2.4.7 Ermittlung der optimalen Versuchsdauer

Zur Ermittlung der optimalen Versuchsdauer bezüglich der Beständigkeit des pH-Werts und des pCO₂ im HBS-Puffer wurde ein 1-Kammer-Objektträger mit 4 ml des normokapnischen HBS-Puffers versehen und beide Parameter, wie in Tabelle 5 dargestellt, alle 5 Minuten über einen Zeitraum von 35 Minuten hinweg gemessen.

Tabelle 5: Messung von pH-Wert und pCO₂ im HBS-Puffer über Zeit

Zeit (min)	pH-Wert	pCO ₂ (mmHg)
0	7,43	40,0
5	7,45	38,5
10	7,45	37,7
15	7,46	36,2
20	7,47	34,6
25	7,48	33,2
30	7,50	30,4
35	7,51	28,8

Durch diese Überprüfung konnte festgestellt werden, dass nach Ablauf von 10 - 15 Minuten ein Austausch des normokapnischen HBS-Puffers auf den A549-Zellen erfolgen musste, um eine Beständigkeit des pH-Werts und des pCO₂ zu gewährleisten.

2.5 Fluoreszenzmikroskopie

2.5.1 Geräte und Zubehör

AC-Power Adapter	Power-Win Technology Corp., Taiwan, ROC
CO ₂ -Inkubatoren (37 °C, 21 % O ₂ , 5 % CO ₂)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf, Deutschland
CoolSnap HQ ² Digitalkamera	Photometrics, Tucson, AZ/USA
Filtersätze	Carl Zeiss Microscopy, Göttingen, Deutschland
Filterset für Fura-2 f71-000	Carl Zeiss Microscopy, Göttingen, Deutschland
FlexiLux 600 longlife Kaltlichtquelle 150 W	Schölly Fiberoptic GmbH, Denzlingen, Deutschland
Lambda 10-2 Optical Filter Changer System	Shutter Instrument Company, Novato, CA/USA

LCD-Monitor	Fujitsu Computers München, Deutschland	Siemens,
LCD-Monitor Imaging Microscopy	Visitron Systems, Deutschland	Puchheim,
MetaFluor Imaging Software	Molecular Devices Corp., CA/USA	Sunnyvale,
Microsoft Office 2003	Microsoft, Redmond, WA/USA	
Mikroskop Axiotech Vario	Carl Zeiss Microscopy, Deutschland	Göttingen,
Objektiv: Achroplan 100x / 1,0 W	Olympus, Hamburg, Deutschland	
Achroplan 40x / 0,8 W	Olympus, Hamburg, Deutschland	
Olympus BX40 Mikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland	
Olympus U-RFL-T Power Supply Unit	Olympus, Hamburg, Deutschland	
Olympus U-UHL	Olympus, Hamburg, Deutschland	
PC Imaging Microscopy	Visitron Systems, Puchheim, Deutschland	
Pipetten - Eppendorf research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	
Quecksilber Dampfbrenner	Olympus, Hamburg, Deutschland	
Reflektorschieber 2 FL	Carl Zeiss Microscopy, Göttingen, Deutschland	
SigmaPlot, Version 12	Systat Software Inc., San Jose, CA/USA	
SigmaStat, Version 3	Systat Software Inc., San Jose, CA/USA	
Vortex	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland	
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland	

2.5.2 Sterile Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen: Biosphere Filtertips	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland	
epT.I.P.S. Standard	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	

Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf-Tube) Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

2.5.3 Reagenzien

ATP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Dulbecco's PBS (DPBS)	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
HBS-Puffer	siehe 2.4
Rotenon	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Mo/USA
Thapsigargin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Mo/USA

2.5.3.1 Aufbereitung der Reagenzien

2.5.3.1.1 ATP

Molekulare Masse: 551,14 g/mol

Um am Ende jedes Versuches die Vitalität der Zellen und dementsprechend die Gültigkeit des Versuchs zu überprüfen, erfolgte die Zugabe von 100 μM ATP. Dazu wurde in einem ersten Schritt eine 50 mM Stammlösung aus 25 mg ATP gelöst in 907 μl *Aqua ad iniectabilia* hergestellt. Die Stammlösung wurde in zwei Teile zu einmal 800 μl und einmal 107 μl geteilt. Die 800 μl wurden auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf-Tubes) mit jeweils 8 μl aufgeteilt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor jedem Versuch wurde jeweils ein Aliquot aufgetaut und auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgewärmt. Die darin enthaltenen 8 μl der ATP-Stammlösung wurden dann auf die bereits im Objektträger befindlichen 4 ml HBS-Puffer pipettiert und die Reaktion der A549-Zellen, also eine entsprechende Änderung des jeweils fluoreszenzmikroskopisch gemessenen Parameters, abgewartet; die Endkonzentration von ATP entsprach nun 100 μM . Die restlichen 107 μl der Stammlösung wurden in gesamter

Menge in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und als Reserve bei ebenfalls -20 °C eingefroren.

2.5.3.1.2 Rotenon

Molekulare Masse: 394,4 g/mol

Zur Überprüfung der Rolle von NADH+H⁺ im Prozess der alveolären CO₂-Registrierung erfolgte eine Inhibierung des NADH-vermittelten mitochondrialen Elektronentransports mittels Rotenon, einem den Komplex I der Atmungskette blockierenden Pyranofurochromon-Derivat. Für die fluoreszenzmikroskopischen Versuche wurde zunächst eine 1000 µM Stammlösung bestehend aus 1,97 mg Rotenon und 5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt, welche in Aliquots á 200 µl aufgeteilt und, ohne zuvor erneut verdünnt zu werden, eingefroren wurde. Eine Verdünnung der Stammlösung mit HBS-Puffer vor dem Einfrieren konnte nicht vollzogen werden, da Vorversuche gezeigt hatten, dass das Rotenon nach einem erneuten Auftauen Kristalle bildete und für die Versuche unbrauchbar wurde. Vor Versuchsbeginn erfolgte dann eine erste Verdünnung auf 400 µM, indem ein 200 µl Aliquot Rotenon mit 300 µl HBS-Puffer dilutiert und mittels Vortex vermischt wurde. Sollte der Komplex I der Atmungskette bereits mit Beginn der Versuchsaufzeichnung blockiert sein (bspw. bei der Bestimmung der [Ca²⁺]_{mito}), so wurden 500 µl dieser Lösung dann erneut in 3,5 ml normokapnischem HBS-Puffer auf 50 µM dilutiert und die daraus resultierenden 4 ml Rotenonlösung 5 Minuten vor Versuchsbeginn auf die A549-Zellen pipettiert. Nach 5 Minuten startete die Versuchsaufzeichnung. Wurde Rotenon während des laufenden Versuchs appliziert (TMRM⁺- und NADH-Versuche), so wurden 500 µl der 400 µM Rotenonlösung (erste Verdünnung der Stammlösung) zu den bereits im 1-Kammer-Objekträger enthaltenen 3,5 ml des normokapnischen HBS-Puffers pipettiert. Dies ergab ebenfalls eine Endkonzentration von 50 µM.

2.5.4 Fluoreszenzindikatoren

Fura-2-AM (F-1221)	Invitrogen, Eugene, OR/USA
Pluronic	Invitrogen, Eugene, OR/USA
Rhod-2-AM (R-1245 MP)	Invitrogen, Eugene, OR/USA
TMRM ⁺ (T-668)	Invitrogen, Eugene, OR/USA

2.5.4.1 Aufbereitung der Fluoreszenzindikatoren

Für die fluoreszenzmikroskopischen *in-vitro*-Versuche an A549-Zellen wurden die Indikatoren wie nachstehend beschrieben aufbereitet. Tabelle 6 fasst die Eigenschaften der einzelnen Fluoreszenzindikatoren zusammen.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Eigenschaften der Fluoreszenzindikatoren

Fluoreszenz-indikator	Molekulare Masse (g/mol)	Lösungs-mittel	Konzentration	Färbezeit (min)	Wellenlänge Exzitation - Emission (nm)	
Fura-2-AM	1001,86	Pluronic	10 μ M	40	340/380	510
Rhod-2-AM	1123,96	DMSO	20 μ M	40	545	560
TMRM⁺	500,93	DMSO	20 nM	20	560	590
NADH	663,43	-	-	-	360	510

2.5.4.1.1 Fura-2-AM

Molekulare Masse: 1001,86 g/mol

Unter Lichtausschluss wurden 50 μ g Fura-2-AM in 10 μ l Pluronic in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gelöst, mittels Vortex gemischt und kurz zentrifugiert um randständige Flüssigkeit von der Gefäßwand zu lösen. Anschließend wurde die so entstandene 5 mM Lösung mittels 90 μ l HBS-Puffer auf 500 μ M diluiert sowie erneut mittels Vortex vermischt und anschließend zentrifugiert. Unmittelbar vor der Beladung der Zellen wurden 20 μ l der 500 μ M Fura-2-AM-Lösung erneut mittels 1 ml HBS-Puffer auf 10 μ M verdünnt und auf die in den 1-Kammer-Objektträgern befindlichen A549-Zellen pipettiert. Es folgte eine 40-minütige Inkubation im CO₂-Inkubator.

2.5.4.1.2 Rhod-2-AM

Molekulare Masse: 1123,96 g/mol

Zur Messung der $[Ca^{2+}]_{mito}$ in A549-Zellen mittels Rhod-2-AM wurde zunächst eine 1000 μ M Stammlösung angesetzt. Hierzu wurden 250 μ g Rhod-2-AM (entspricht fünf 1,5 ml-Reaktionsgefäßen á 50 μ g) in 222,6 μ l DMSO gelöst. Es erfolgte eine Vermischung mittels Vortex und eine kurze Zentrifugation zur Lösung randständiger

Flüssigkeit. 200 μl dieser Stammlösung wurden anschließend in 8800 μl HBS-Puffer verdünnt. Die so entstandene 20 μM Rhod-2-AM-Lösung wurde auf Aliquots á 1000 μl aufgeteilt und als Vorrat eingefroren. Für die fluoreszenzmikroskopischen Versuche wurde je ein aufgetautes und auf 37 °C erwärmtes Aliquot á 1000 μl auf einen 1-Kammer-Objektträger mit A549-Zellen pipettiert und für 40 Minuten im CO₂-Inkubator inkubiert.

2.5.4.1.3 TMRM⁺

Molekulare Masse: 500,93 g/mol

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ mittels TMRM⁺ wurde zunächst eine 5 μM Stammlösung bestehend aus 12,52 μg TMRM⁺ gelöst in 5 ml DMSO angesetzt. Anschließend erfolgte eine Verdünnung auf 20 nM. Dazu wurden je 4 μl dieser Stammlösung in 996 μl HBS-Puffer dilutiert und in Aliquots á 1000 μl pipettiert. Die Aliquots wurden anschließend als Vorrat eingefroren. Für die fluoreszenzmikroskopischen Versuche wurde je ein aufgetautes und auf 37 °C erwärmtes 1000 μl Aliquot mit der 20 nM TMRM⁺-Lösung auf einen 1-Kammer-Objektträger mit A549-Zellen pipettiert und für 20 Minuten im CO₂-Inkubator inkubiert. Um ein Auswaschen von TMRM⁺ während der Versuche zu verhindern, wurden die benutzten Puffer ebenfalls mit TMRM⁺ versehen. Dazu wurden je 200 μl der Stammlösung in je 49,80 ml des verwendeten HBS-Puffers gegeben.

2.5.5 Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Tatsache, dass mithilfe spezieller Fluoreszenzindikatoren Vorgänge in bspw. Zellen sichtbar gemacht werden können. Die verwendeten Indikatoren werden dazu mit Licht einer bestimmten Wellenlänge erregt und emittieren daraufhin Licht einer anderen Wellenlänge, welches durch die Verwendung spezieller Filter sichtbar gemacht werden kann. Je nach Untersuchung und Fragestellung gibt es diverse Indikatoren mit spezifischen Eigenschaften. Im speziellen Falle der fluoreszenzmikroskopischen *in-vitro*-Untersuchungen von A549-Zellen im Rahmen dieser Arbeit sollten Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$, der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$, des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ und der $[\text{NADH}]$ quantifiziert werden. Dazu wurden die Fluoreszenzindikatoren Fura-2-AM, Rhod-2-AM und

TMRM⁺ verwendet, da sie durch ihre lipophilen Eigenschaften in der Lage sind, die Zellmembran zu überqueren und somit spezifisch für die Messung intrazellulärer Vorgänge geeignet sind.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse auf Einzelzellebene wurden die A549-Zellen nach Aussaat auf einem 1-Kammer-Objektträger für 48 Stunden kultiviert bis sie eine Dichte von 80 % erreicht hatten. Um abgestorbene Zellen und Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Zellen anschließend zweimal mit 2500 µl HBS-Puffer gewaschen. Daraufhin erfolgte die Zugabe des jeweiligen Fluoreszenzindikators auf die Zellen und anschließend eine erneute Inkubation im CO₂-Inkubator. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurde überschüssiger Farbstoff erneut durch eine zweimalige Waschung mit 2500 µl HBS-Puffer entfernt. Nach Abschluss der Inkubations- und Waschphase erfolgte die Zugabe von 4000 µl des normokapnischen HBS-Puffers. Daraufhin wurde der Objektträger unter einem Auflichtfluoreszenzmikroskop positioniert.

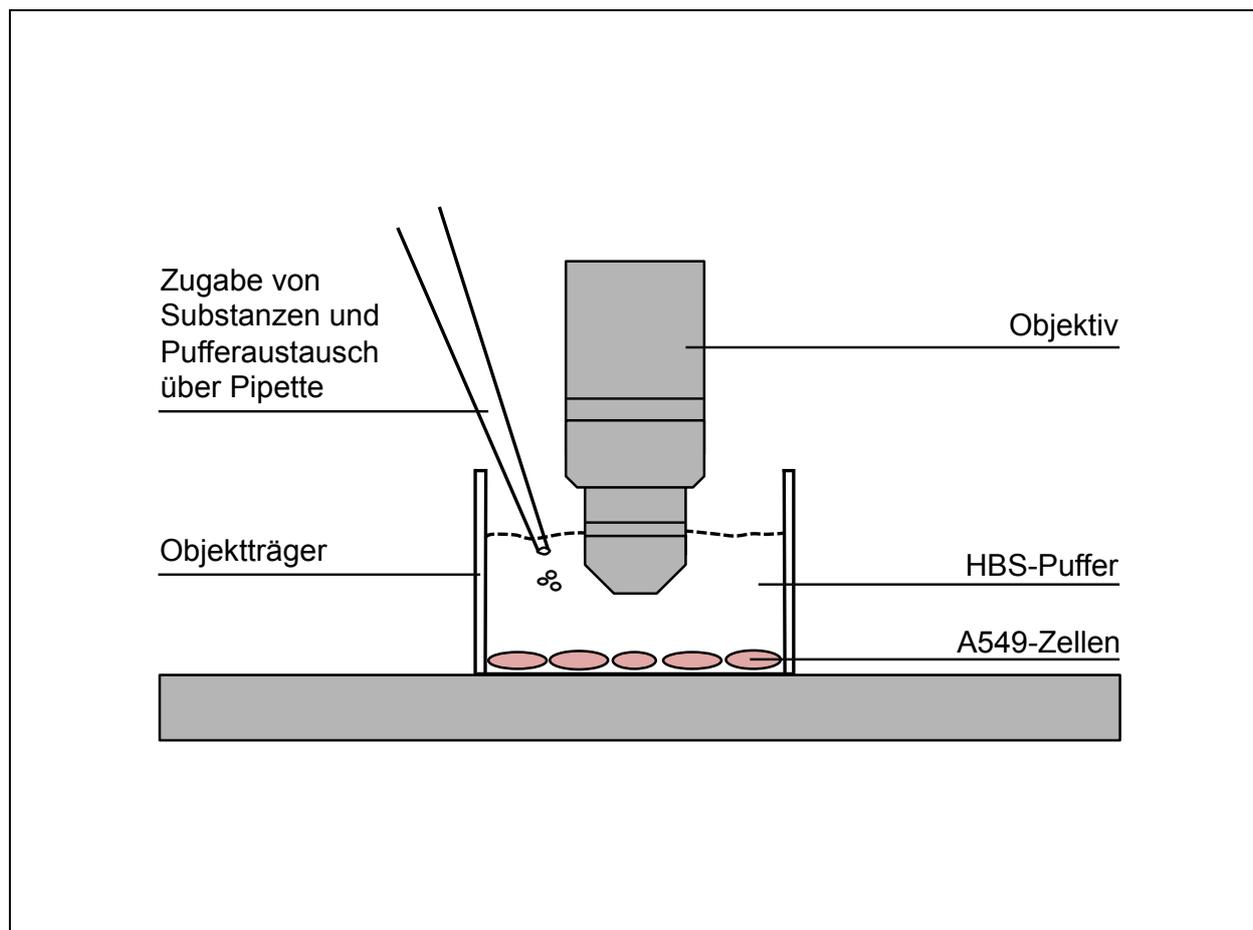


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus (Fluoreszenzmikroskopie)

Als Lichtquelle des Mikroskops diente eine 100 Watt Quecksilberlampe. Über ein Filterrad konnten entsprechende Filtersätze in den Strahlengang des Mikroskops eingebracht und die applizierten Fluoreszenzindikatoren selektiv angeregt werden. Das von den A549-Zellen emittierte Licht wurde von Objektiven gebündelt und gelangte durch einen Reflexionspassfilter zum Okular bzw. zu einer hochauflösenden Digitalkamera. Die Umstellung von Okular auf Digitalkamera und *vice versa* erfolgte manuell. Die digitalen Bilder wurden mithilfe der *MetaFluor® Imaging Software* der Firma *Molecular Devices* verarbeitet, auf einem externen Speichermedium archiviert und später *offline* in einer Einzelbildanalyse ebenfalls mithilfe der *MetaFluor® Imaging Software* analysiert und ausgewertet.

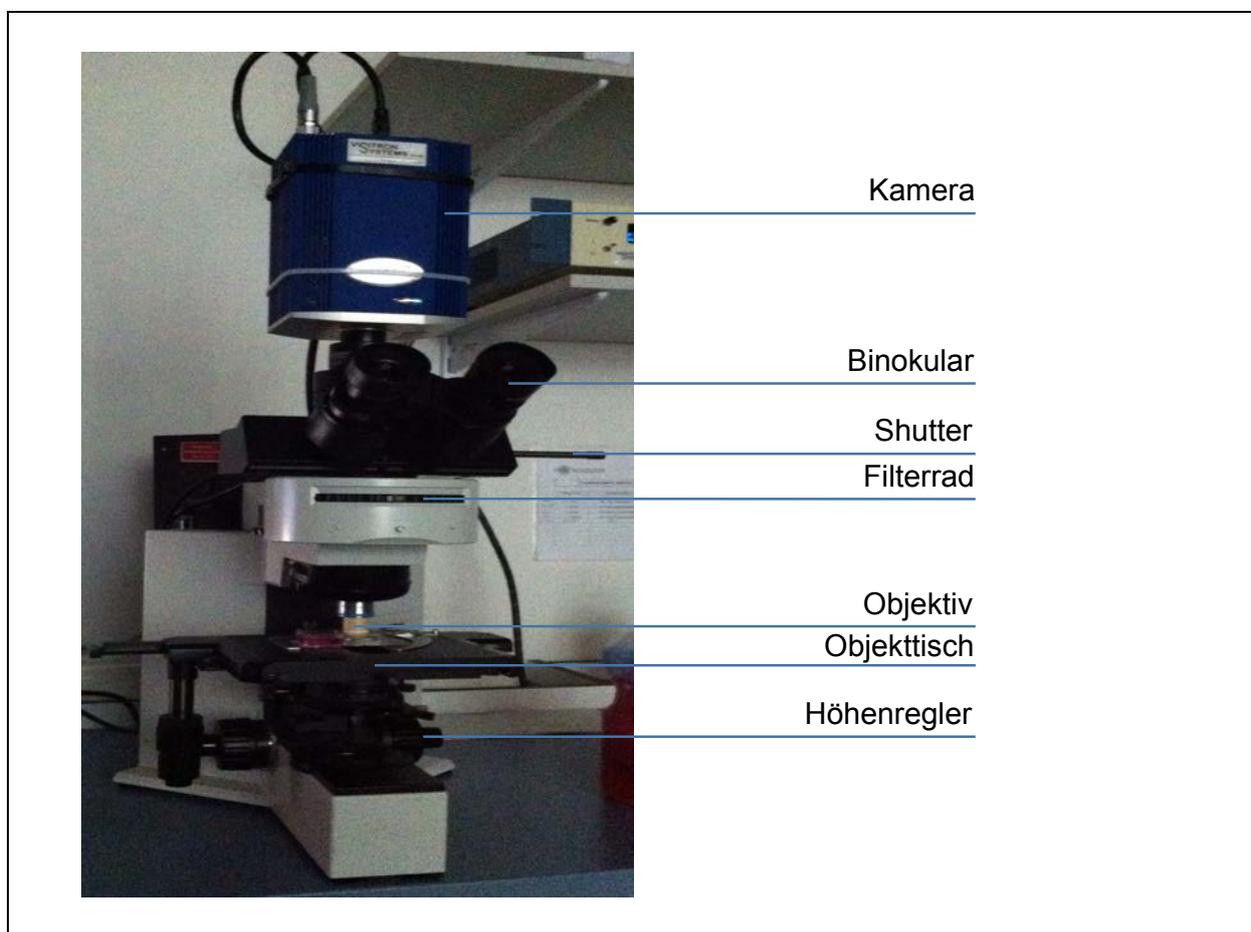


Abbildung 4: Aufbau des Lichtmikroskops

2.5.5.1 Messung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$

Für die Messung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ wurden die A549-Zellen mit dem spezifischen Indikator Fura-2-AM beladen und alternierend mit zwei Lichtwellenlängen von 340 nm und

380 nm angeregt. Dies begründet sich darin, dass Fura-2 ein Chelatkomplex ist, der durch die Bindung von intrazellulärem Ca^{2+} seine Konformation und damit auch sein Anregungsmaximum ändert. Die maximale Anregung von Fura-2 in Ca^{2+} -reicher Umgebung liegt bei 335 nm und in Ca^{2+} -freier Umgebung bei 363 nm. Mithilfe des Quotienten (*Ratio*) aus der Verrechnung beider Anregungswellenlängen kann dann die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ ermittelt werden.

$$\text{Ratio} \left(\frac{340}{380} \right) = \frac{\text{Fluoreszenz (340 nm)} - \text{Autofluoreszenz (340 nm)}}{\text{Fluoreszenz (380 nm)} - \text{Autofluoreszenz (380 nm)}}$$

Ein hoher Quotient ist mit einer hohen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ gleichzusetzen und ein niedriger Quotient mit einer niedrigen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$. Da Fura-2 aufgrund seiner Hydrophilie die Zellmembran nicht passieren kann, muss es für die Messung von intrazellulärem Ca^{2+} zunächst an das lipophile Esterderivate Acetoxymethyl (AM) gebunden werden. Gemeinsam gelingt die Diffusion durch die Zellmembran. Im Zytosol wird Acetoxymethyl durch unspezifische Esterasen hydrolysiert. Fura-2 liegt dann nicht nur wieder in seiner aktiven Form vor, sondern kann das Zytosol aufgrund seiner Hydrophile auch nicht mehr verlassen [72].

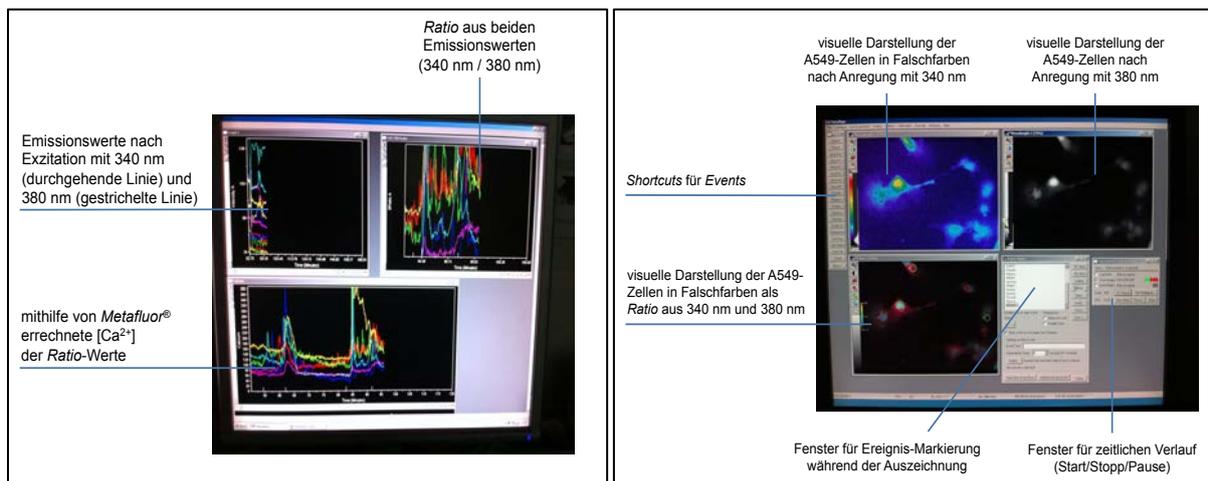


Abbildung 5: Darstellung der *MetaFluor® Imaging Software* während einer Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ mittels Fura-2. Links: Grafische Darstellung der Messwerte. Rechts: Visuelle Darstellung der A549-Zellen nach Emission von 520 nm nach Exzitation mit 340 nm und 380 nm.

2.5.5.2 Messung der $[Ca^{2+}]_{mito}$

Rhod-2 ist ebenso wie Fura-2 ein hochaffiner Ca^{2+} -Indikator im langwelligen Wellenlängenbereich, der als Ergänzung zur Fura-2-vermittelten Bestimmung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ als Indikator zur Messung der $[Ca^{2+}]_{mito}$ verwendet wurde. Eine Exzitation der mit Rhod-2 beladenen Zellen mit einer Wellenlänge von 545 nm führt zu einer Lichtemission von 560 nm. Da Rhod-2 nur mit einer Wellenlänge angeregt wird, berechnet sich seine Konzentrationsänderungen nicht aus einem Quotienten, sondern entspricht den jeweiligen Grauwertintensitätsveränderungen. Eine Zunahme der $[Ca^{2+}]_{mito}$ spiegelt sich in der Zunahme der Rhod-2-Fluoreszenzintensität wieder. Ebenso wie Fura-2 ist Rhod-2 ein hydrophiles Molekül, welches die Zellmembran nicht passieren kann. Um die Diffusion in die Zelle zu ermöglichen, wird Rhod-2 ebenfalls zunächst an Acetoxymethyl gebunden. Aufgrund des kationischen AM-Esters kommt es zu einer Potential-getriebenen Aufnahme in die anionische Mitochondrienmatrix. Durch die Hydrolyse von Acetoxymethyl durch unspezifische Esterasen wird Rhod-2 aktiviert; unter dem Fluoreszenzmikroskop imponiert entsprechend ein getüpfeltes Muster.

2.5.5.3 Messung des $\Delta\Psi_{mito}$

TMRM⁺ ist ein Rhodamin-Fluoreszenzfarbstoff, der sowohl die Zellmembran als auch die Mitochondrienmembran passieren kann und sich entsprechend seinen kationischen Eigenschaften zur Messung von Potentialänderungen entlang der Mitochondrienmembran eignet. Je negativer das $\Delta\Psi_{mito}$, desto größer die Akkumulation des positiv geladenen Farbstoffs. Änderungen des $\Delta\Psi_{mito}$ verursachen Änderungen der TMRM⁺-Fluoreszenz. Seine besonderen Eigenschaften wie bspw. die gute Membranpermeabilität, seine geringe Membranbindung, seine kräftige Fluoreszenz sowie seine umgebungsunabhängigen Spektromeigenschaften machen ihn zu einem häufig eingesetzten Indikator für mikroskopische Messungen des $\Delta\Psi_{mito}$ [73]. Im Gegensatz zu anderen gebrauchsblichen $\Delta\Psi$ -Indikatoren wie Rhodamin 123 (R123) und Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) hat TMRM⁺ in geringen Konzentrationen keinen Einfluss auf die Funktion der Mitochondrien [74, 75]. Eine Exzitation der mit TMRM⁺ beladenen Zellen mit einer Wellenlänge von 560 nm führt zu einer Lichtemission von 590 nm. Da TMRM⁺ innerhalb der Zellen keine

spezifischen Bindungen eingeht, sondern konzentrationsabhängig innerhalb anionischer Zellareale akkumuliert, wurden die verwendeten HBS-Puffer ebenfalls mit TMRM⁺ in entsprechender Konzentration angereichert, um ein Auswaschen und folglich falsche Ergebnisse zu verhindern.

2.5.5.4 Messung der [NADH]

NADH ist die reduzierte Form des in jeder Körperzelle physiologisch vorhandenen Koenzyms NAD⁺. Aufgrund seiner Autofluoreszenz entfiel eine Anfärbung der A549-Zellen zur Messung der [NADH] mit einem speziellen Indikator. Eine Exzitation der Zellen mit einer Wellenlänge 360 nm führt zu einer Emission von Licht mit einer Wellenlänge von 510 nm.

2.5.6 Versuchsabläufe

Vor Versuchsbeginn erfolgte zuerst die Erwärmung aller Substanzen im Wasserbad auf 37 °C. Nach Entnahme der 48 Stunden zuvor auf 1-Kammer-Objektträgern ausgesäten A549-Zellen aus dem CO₂-Inkubator erfolgte eine zweimalige Waschung der Zellen mit jeweils 2500 µl HBS-Puffer zur Entfernung von abgestorbenen Zellen und Zelltrümmern. Nach anschließender Zugabe der jeweiligen Indikatorstoffe wurden die Zellen wie oben beschrieben erneut inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die zügige Entnahme der 1-Kammer-Objektträger mit den darin befindlichen A549-Zellen aus dem CO₂-Inkubator. Um überschüssigen Indikatorfarbstoff zu entfernen, wurden die Zellen im Anschluss daran zweimal mit dem normokapnischem HBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 4000 µl des normokapnischen HBS-Puffers auf die Zellen pipettiert und der Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop platziert. Nach zuvor standardisierter Einstellung der Zellen unter dem Objektiv bezüglich der Schärfe, der Lichtexzitation und -Emission sowie der Vergrößerung begannen die jeweiligen Versuche.

Die Umstellung von einer Normo- auf eine Hypokapnie und umgekehrt erfolgte nach standardisiertem Vorgehen unabhängig vom jeweiligen Indikatorfarbstoff und Zellzustand durch einen manuellen Austausch des im Objektträger befindlichen HBS-Puffers. Dazu wurden 2500 µl des auf den Zellen befindlichen HBS-Puffers bis auf einen dünnen Film über den Zellen (1500 µl) mittels Pipette abgesaugt. 2500 µl des

nun gewünschten HBS-Puffers (je nach Messung entweder normo- oder hypokapnisch) wurden anschließend auf die Zellen pipettiert. Es folgte eine behutsame Mischung des hinzugefügten HBS-Puffers mit dem auf den Zellen verbliebenen Puffer am Rand des Objektträgers. 2500 µl der so entstandenen Mischung aus beiden HBS-Puffern wurde anschließend erneut abpipettiert, so dass wiederum 1500 µl der Puffermischung als dünner Film über den Zellen verblieben. Erneut wurden 2500 µl des gewünschten HBS-Puffers auf die Zellen gegeben und es erfolgte abermals eine vorsichtige Mischung des hinzugefügten HBS-Puffers mit dem im Objektträger befindlichen Puffer. Diese Art des Pufferwechsels wurde ein drittes Mal durchgeführt, bevor der entsprechende HBS-Puffer endgültig auf den Zellen verblieb. Der gesamte Vorgang des Pufferwechsels geschah so sorgsam wie möglich, um keinen Scherstress auf die Zellen auszuüben und somit Artefakte oder ungewollte Zellantworten, wie bspw. Ca^{2+} -Ausschüttungen, zu vermeiden. Zur Überprüfung der gewünschten Gas-, pH-Wert- und Elektrolytparameter wurde eine kleine Probe des nun auf den A549-Zellen befindlichen HBS-Puffers im BGA-Gerät analysiert. Ein dreimaliger Austausch der Pufferlösung genügte in der Regel zur Herstellung der angestrebten Konditionen. Entsprachen die mithilfe des BGA-Geräts analysierten Parameter nicht den gewünschten Anforderungen, wurde die Messung gestoppt und der Versuch verworfen.

Die Nativ- und Kontrollversuche sowie die Transfektions- und deren dazugehörige Kontrollversuche wurden jeweils mit A549-Zellen derselben Passage unter identischen Bedingungen durchgeführt.

2.5.6.1 Native A549-Zellen

2.5.6.1.1 Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$

Zur Messung des Einflusses einer Hypokapnie auf die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ wurden die nativen A549-Zellen zunächst wie oben beschrieben für 40 Minuten mit Fura-2-AM inkubiert. Danach erfolgte eine zweimalige Waschung der Zellen mit normokapnischem HBS-Puffer. Nach Zugabe von 4000 µl des normokapnischen HBS-Puffers startete die Messung (= 0* min im Diagramm). Nach 10 Minuten Normokapnie erfolgte eine Umstellung auf Hypokapnie (= Pufferwechsel im Diagramm). Der dafür durchgeführte Pufferwechsel erfolgte wie unter 2.5.6 erläutert. Nach 10-minütiger Hypokapnie

erfolgte eine erneute Umstellung auf Normokapnie (= Pufferwechsel im Diagramm). Der Pufferwechsel wurde ebenso wie der oben beschriebene Wechsel von Norm- auf Hypokapnie durch sorgfältigen Austausch der Pufferlösungen vollzogen. Nach abermals 10-minütiger Normokapnie wurde die Messung beendet. Zur Überprüfung der gewünschten Gas-, pH-Wert- und Elektrolytparameter wurde nach jedem Pufferwechsel eine Probe des auf den Zellen befindlichen HBS-Puffers im BGA-Gerät analysiert.

Die Kontrollreihe zur Messung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in nativen A549-Zellen erfolgte in Anlehnung an die oben beschriebene Versuchsweise. Nach 40-minütiger Inkubation mit Fura-2-AM sowie anschließender zweimaliger Waschung der Zellen startete die Messung mit der Zugabe des normokapnischen HBS-Puffers auf die Zellen (= 0* min im Diagramm). Nach 10-minütiger Normokapnie erfolgte ein Pufferwechsel. Um zu überprüfen, inwiefern ein Pufferwechsel an sich Einfluss auf die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ hatte bzw. um auszuschließen, dass der Vorgang des Pufferaustauschs den Zellmetabolismus veränderte, erfolgte keine Umstellung von Normo- auf Hypokapnie, sondern eine erneute Zugabe des normokapnischen HBS-Puffers nach Absaugung des bereits auf den Zellen befindlichen normokapnischen HBS-Puffers. Nach weiteren 10 Minuten Normokapnie erfolgte zur Überprüfung der Vitalität der Zellen eine Zugabe von 100 μ M ATP. Reagierten die Zellen auf die Zugabe von ATP mit einer Zunahme der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ um mindestens 50% im Vergleich zur unmittelbar vorher gemessenen $[Ca^{2+}]_{zyt}$, wurde der Versuch als gültig gewertet und in die Auswertung inkludiert. Fünf Minuten nach Zugabe von ATP wurde die Messung beendet.

Abbildung 6 fasst die Versuchsabläufe der Messungen der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in nativen A549-Zellen grafisch zusammen.

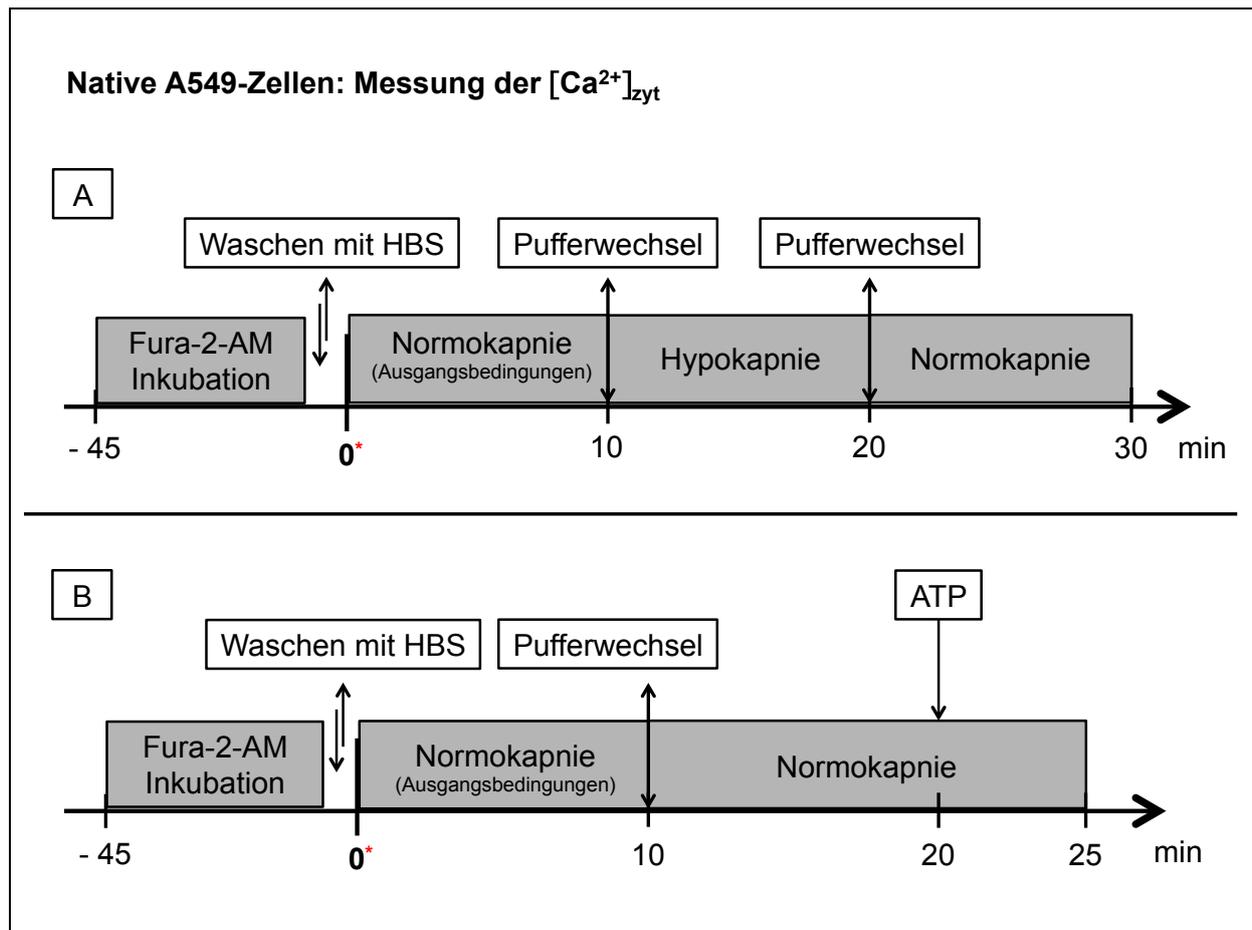


Abbildung 6: Messung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ mittels Fura-2 in nativen A549-Zellen: (A) Regulärer Versuchsablauf, (B) Versuchsablauf der Kontrollreihe

2.5.6.1.2 Messung der $[Ca^{2+}]_{mito}$

Um den Einfluss einer Hypokapnie auf die $[Ca^{2+}]_{mito}$ zu quantifizieren, wurden die nativen A549-Zellen zunächst, wie oben beschrieben, für 40 Minuten mit Rhod-2-AM inkubiert und anschließend zweimalig mit normokapnischem HBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 4000 μ l des normokapnischen HBS-Puffers startete die Messung (= 0* min im Diagramm). Nach 5-minütiger Normokapnie erfolgte eine Umstellung auf Hypokapnie (= Pufferwechsel im Diagramm). Der Pufferwechsel wurde standardisiert durch sorgfältigen, dreimaligen Austausch der HBS-Pufferlösungen durchgeführt. Eine BGA-Kontrolle zur Überprüfung der gewünschten Pufferparameter schloss sich daran an. Nach 10-minütiger Hypokapnie erfolgte eine erneute Umstellung auf Normokapnie durch den Austausch des HBS-Puffers auf den A549-Zellen (= Pufferwechsel im Diagramm). Nach weiteren 10 Minuten Normokapnie wurde die Messung beendet.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde eine Blockade der Atmungskette durch die Zugabe von Rotenon herbeigeführt. Nach Inkubation mit Rhod-2-AM und anschließender Waschung der A549-Zellen wurden 500 μl der 400 μM Rotenonlösung erneut in 3500 μl HBS-Puffer auf 50 μM verdünnt und die gesamten 4000 μl auf die A549-Zellen pipettiert. Im Anschluss daran startete die Messung (= 0* min im Diagramm). Nach 5-minütiger Normokapnie erfolgte ein Pufferwechsel zur Hypokapnie und nach weiteren 10 Minuten Hypokapnie ein erneuter Wechsel zur Normokapnie. Nach 10-minütiger Normokapnie wurden die Messungen beendet.

Abbildung 7 fasst die Versuchsabläufe der Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ in nativen A549-Zellen grafisch zusammen.

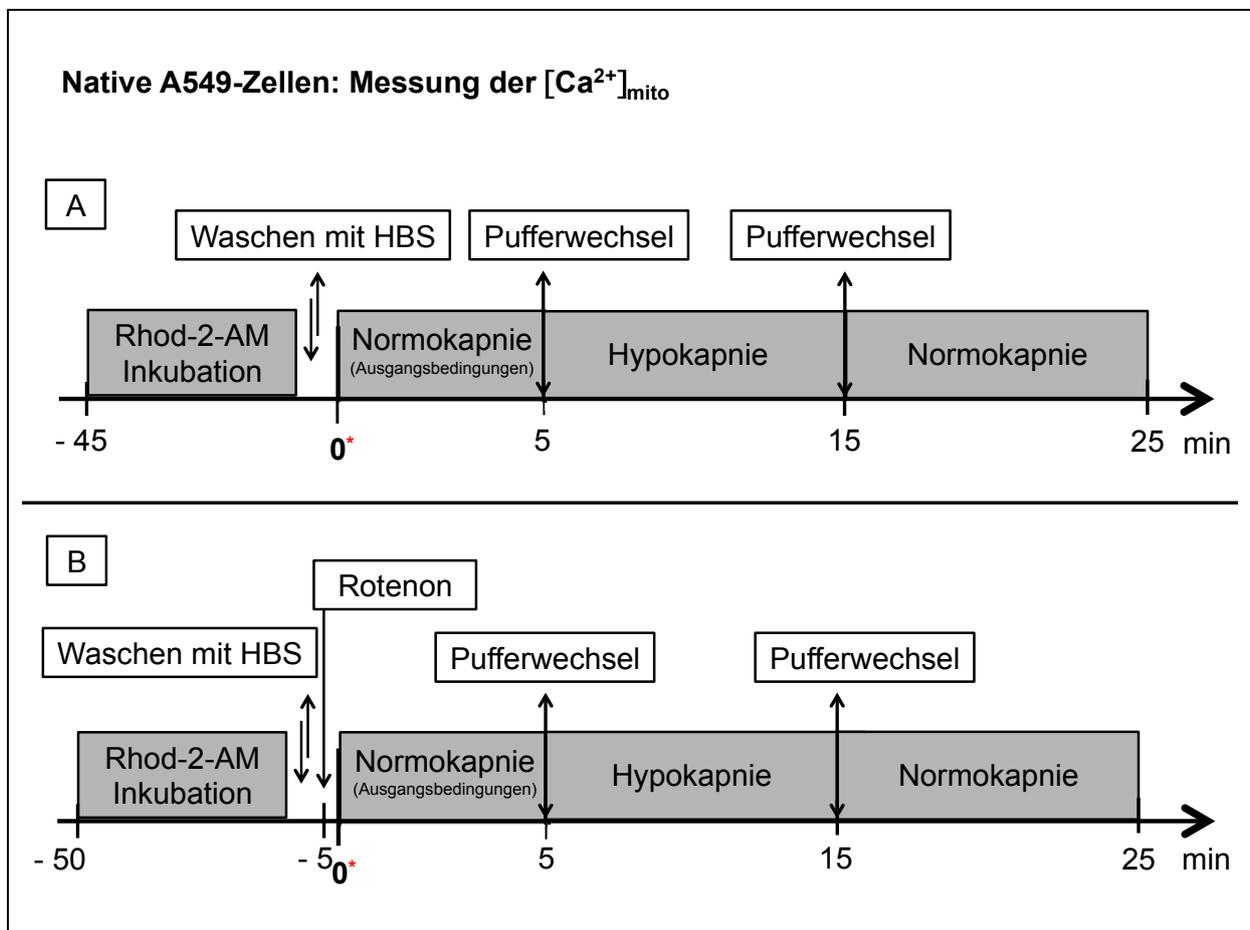


Abbildung 7: Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ mittels Rhod-2 in nativen A549-Zellen: (A) ohne Blockade der Atmungskette mittels Rotenon, (B) Blockade der Atmungskette mittels Rotenon.

Die Kontrollreihe zur Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ in nativen A549-Zellen erfolgte in Anlehnung an die oben beschriebene Versuchsweise. Nach 40-minütiger Inkubation mit Rhod-2-AM sowie anschließender Waschung der Zellen startete die Messung mit

der Zugabe des normokapnischen HBS-Puffers auf die Zellen (= 0* min im Diagramm). Nach 10-minütiger Normokapnie erfolgte ein Pufferwechsel. Wie schon bei den Kontrollversuchen der Versuche mit Fura-2-AM sollte auch hier überprüft werden, inwiefern der alleinige Vorgang des Pufferwechsels einen Einfluss auf die $[Ca^{2+}]_{mito}$ hat (bzw. sollte die Provokation einer Zellantwort durch den Vorgang des Pufferaustausches ausgeschlossen werden). Dementsprechend erfolgte auch hier lediglich ein Austausch des normokapnischen HBS-Puffers durch erneut normokapnischen HBS-Puffer nach standardisiertem Vorgehen. Nach 10-minütiger Normokapnie endete auch hier die Messung 5 Minuten nach Zugabe von 100 μM ATP zur Überprüfung der Vitalität der Zellen. Abbildung 8 fasst den Versuchsablauf der Kontrollversuche zur Messung der $[Ca^{2+}]_{mito}$ in nativen A549-Zellen grafisch zusammen.

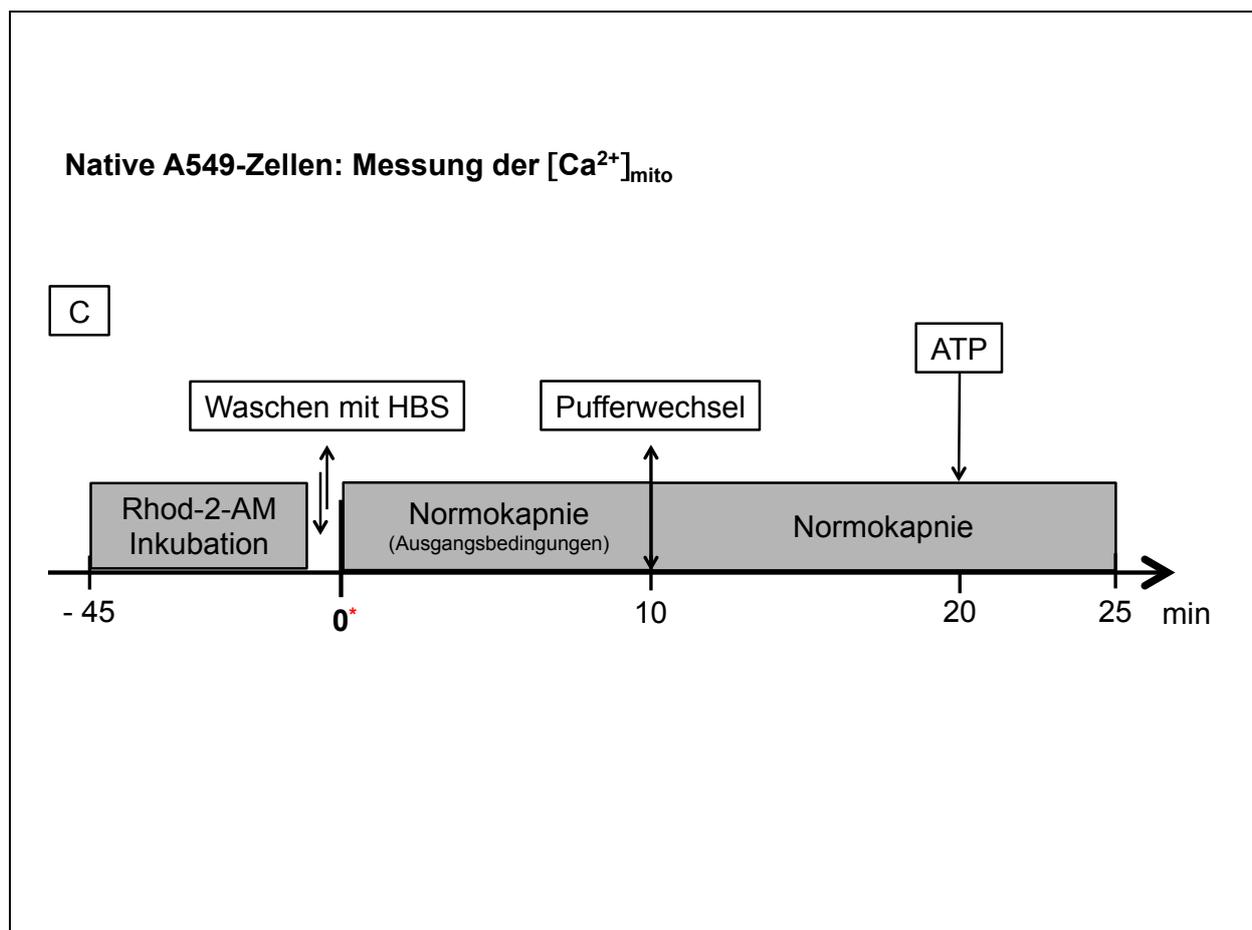


Abbildung 8: Messung der $[Ca^{2+}]_{mito}$ mittels Rhod-2 in nativen A549-Zellen: (C) Versuchsablauf der Kontrollreihe.

2.5.6.1.3 Messung des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$

Um den Einfluss von Hypokapnie auf das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ zu untersuchen, wurden die nativen A549-Zellen zunächst, wie oben beschrieben, für 20 Minuten mit TMRM⁺ inkubiert und anschließend zweimalig mit normokapnischem HBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 4000 μl des normokapnischen HBS-Puffers startete die Messung (= 0* min im Diagramm). Nach 5-minütiger Normokapnie erfolgte eine Umstellung auf Hypokapnie (= Pufferwechsel im Diagramm). Der Pufferwechsel erfolgte standardisiert, wie oben detailliert beschrieben. Nach 10-minütiger Hypokapnie erfolgte ein erneuter Pufferwechsel hin zur Normokapnie. Nach weiteren 5 Minuten Normokapnie wurde die Messung beendet.

Die Kontrollreihe zur Messung des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ in nativen A549-Zellen erfolgte durch eine Blockade der Atmungskette mittels Rotenon. Nach 20-minütiger Inkubation mit TMRM⁺ sowie anschließender Waschung der Zellen startete die Messung mit der Zugabe von 3500 μl des normokapnischen HBS-Puffers auf die Zellen (= 0* min im Diagramm). Nach 5-minütiger Normokapnie erfolgte die Zugabe von 500 μl Rotenon (Endkonzentration 50 μM). Weitere 5 Minuten später erfolgte ein Pufferwechsel mit anschließender Hypokapnie nach standardisiertem Vorgehen (= Pufferwechsel im Diagramm). Nach weiteren 15 Minuten wurde die Messung beendet.

Abbildung 9 fasst die Versuchsabläufe der Messungen des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ in nativen A549-Zellen grafisch zusammen.

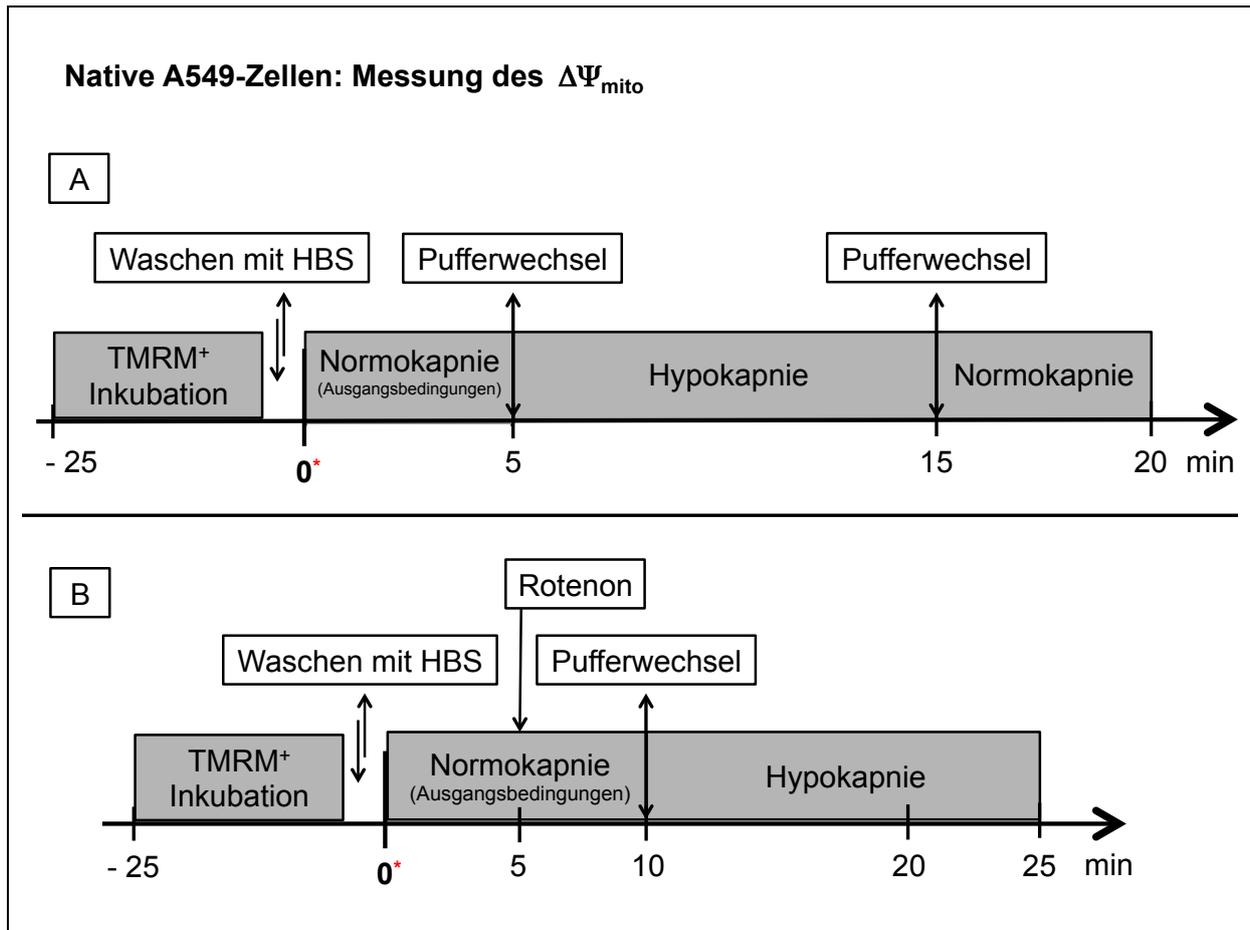


Abbildung 9: Messung des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ mittels TMRM⁺ in nativen A549-Zellen: (A) Regulärer Versuchsablauf, (B) Versuchsablauf der Kontrollreihe

2.5.6.1.4 Messung der [NADH]

Die Quantifizierung des Einflusses einer Hypokapnie auf die [NADH] erfolgte mit Hilfe eines Assays (siehe 2.6). Die Kontrollversuche hingegen wurden fluoreszenzmikroskopisch durchgeführt. Aufgrund der Autofluoreszenz von NADH entfiel eine vorherige Inkubation mit einem Indikatorfarbstoff. Nach Entnahme der Zellen aus dem Inkubator erfolgte lediglich eine zweimalige Waschung der Zellen zur Entfernung von abgestorbenen Zellen und Zelltrümmern. Nach Zugabe von 4000 μl des normokapnischen HBS-Puffers startete die Messung (= 0* min im Diagramm). Nach 15-minütiger Normokapnie erfolgte ein Pufferwechsel mit erneuter Normokapnie (= Pufferwechsel im Diagramm). Der Pufferwechsel erfolgte standardisiert, wie oben detailliert beschrieben. Nach weiteren 15 Minuten Normokapnie erfolgte die Zugabe von ATP. 5 Minuten nach ATP-Zugabe wurde die Messung beendet.

In einer zweiten Kontrollreihe wurde die Atmungskette durch die Zugabe von Rotenon geblockt. Eine Färbung entfiel auch hier aufgrund der Autofluoreszenz von NADH, sodass die Messung nach zweimaliger Waschung der Zellen und anschließender Zugabe von 3500 μl normokapnischen HBS-Puffers startete (= 0* min im Diagramm). Nach 5 Minuten erfolgte die Zugabe von 500 μl der 400 μM Rotenonlösung zum normokapnischen HBS-Puffer auf den A549-Zellen. Nach weiteren 10 Minuten erfolgte ein standardisierter Pufferwechsel mit anschließend erneuter Normokapnie. Nach weiteren 15 Minuten erfolgte die Zugabe von 100 μM ATP. Weitere 5 Minuten nach ATP-Zugabe wurde die Messung beendet.

Abbildung 10 fasst die Versuchsabläufe der Kontrollversuche zur Messung der [NADH] in nativen A549-Zellen grafisch zusammen.

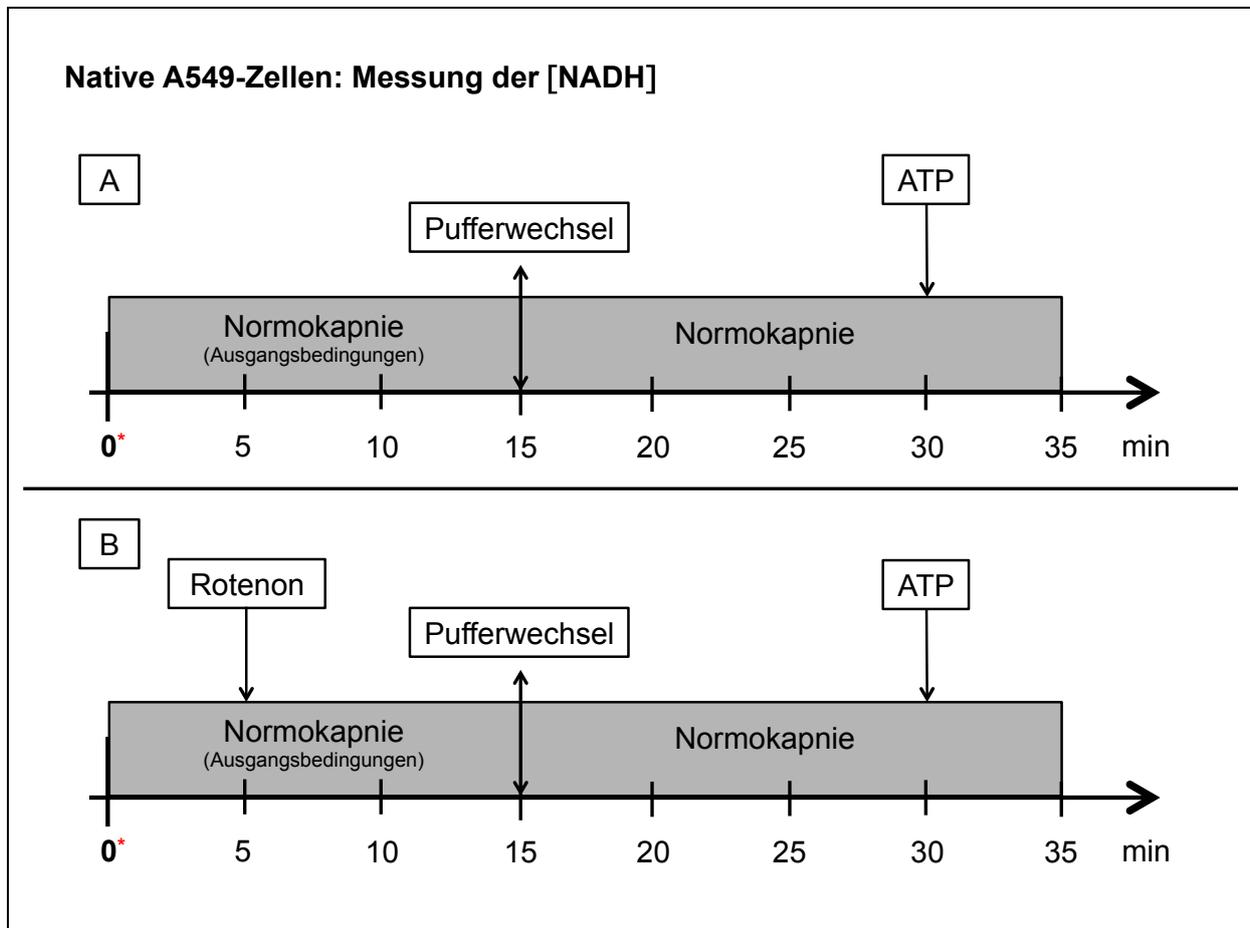


Abbildung 10: Versuchsabläufe der Kontrollreihen im Rahmen der Messung der [NADH] in nativen A549-Zellen: (A) ohne Blockade der Atmungskette durch Rotenon, (B) Blockade der Atmungskette durch Rotenon

2.5.6.2 Transfizierte A549-Zellen

Zur Entschlüsselung des Mechanismus der CO₂-Registrierung in Typ II Alveolarepithelzellen wurde eine Herunterregulierung der mitochondrialen IDH3 mittels *Gen-Knock-Down* durchgeführt. Als Vorbereitung auf die Fluoreszenzmikroskopie wurden native A549-Zellen zunächst, wie unter 2.3.4 beschrieben, für 48 Stunden mit einer IDH3G-siRNA inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte nach zweimaliger Waschung der A549-Zellen mit HBS-Puffer die Zugabe des jeweiligen Fluoreszenzindikators. Nach Ablauf der Färbezeit mit anschließender Waschung und Zugabe des normokapnischen HBS-Puffers starteten die Messungen. Umstellungen von Normo- auf Hypokapnie und *vice versa* erfolgten wie unter 2.5.6 beschrieben. Als Kontrollen dienten einerseits A549-Zellen derselben Passage, welche parallel mit einer *scrambled* siRNA inkubiert wurden. Diese Negativkontrollen wurden wie in 2.3.4 beschrieben vorbereitet. Zusätzlich dazu wurde eine zweite Kontrollreihe mit nativen A549-Zellen derselben Passage vorbereitet. Sowohl die Versuche der Negativkontrollen mit der *scrambled* siRNA als auch die mit nativen A549-Zellen verliefen nach demselben Schema wie die Versuche der mit IDH3G-siRNA inkubierten A549-Zellen.

Im Rahmen der Messung der $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$ in transfizierten A549-Zellen wurden fluoreszenzmikroskopische Kontrollen der Transfektionsqualität und Transfektionsstabilität mithilfe einer fluoreszenzmarkierten IDH3G-siRNA durchgeführt. Bei dieser handelte es sich um die gleiche IDH3G-siRNA mit der Oligo ID HSS142601 der Firma *Invitrogen*TM, welche auch für die übrigen Transfektionsversuche verwendet wurde. Zusätzlich wurde diese siRNA jedoch mit dem blaugrünligen Fluoreszenzfarbstoff *Alexa Fluor*[®] 488 versehen. Eine Exzitation der Zellen, welche mit der fluoreszierenden siRNA inkubiert wurden, mit einer Wellenlänge von 495 nm führte zu einer Lichtemission mit einer Wellenlänge von 519 nm. Mithilfe der fluoreszenzmarkierten siRNA war es möglich, die Aufnahme der siRNA in die A549-Zellen unter dem Mikroskop zu visualisieren. So wurde einerseits zu Beginn der Versuche die Qualität der Transfektion überprüft. Zusätzlich konnte mithilfe dieser siRNA der Einfluss der CO₂-Umstellungen sowie der Einfluss der gebrauchten Reagenzien auf die Transfektion untersucht werden.

2.5.6.2.1 Messung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$

Zur Messung des Einflusses einer Hypokapnie auf die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in transfizierten A549-Zellen wurden diese nach 48-stündiger IDH3-Herunterregulierung zunächst für 40 Minuten mit Fura-2-AM inkubiert und anschließend zweimal mit normokapnischem HBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 4000 μ l des normokapnischen HBS-Puffers startete die Messung (= 0* min im Diagramm). Nach 10-minütiger Normokapnie erfolgte eine Umstellung auf Hypokapnie (= Pufferwechsel im Diagramm). Nach 10-minütiger Hypokapnie wurde die Messung beendet. Auch hier erfolgten Kontrollversuche mit der Negativkontrolle (*scrambled* siRNA) und mit nativen A549-Zellen derselben Passage nach demselben Schema. Abbildung 11 fasst den Versuchsablauf der Messung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in transfizierten A549-Zellen und deren Kontrollen grafisch zusammen.

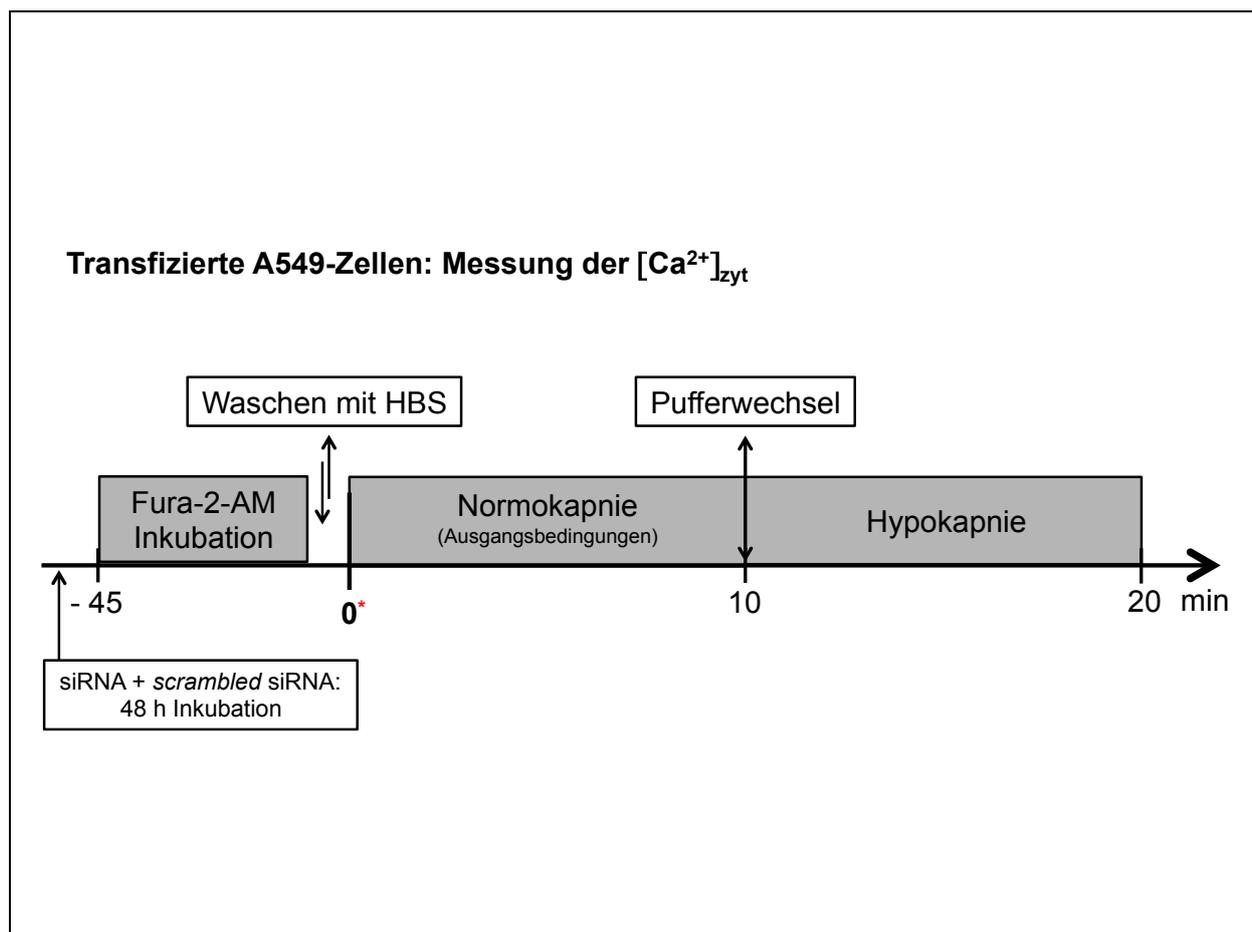


Abbildung 11: Messung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ mittels Fura-2 in transfizierten A549-Zellen und deren Kontrollen

Wie bereits unter 2.5.6.2 erwähnt, wurden im Rahmen der Messungen der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ Qualitätskontrollen der Transfektion durchgeführt. Dazu wurden die A549-Zellen mit einer speziellen IDH3G-siRNA inkubiert, welche mit dem Fluoreszenzindikator *Alexa Fluor*[®] 488 markiert wurde. Die Transfektion und Vorbereitung der A549-Zellen erfolgten standardisiert nach demselben Schema wie das der regulär transfizierten A549-Zellen. Vor Beginn sowie nach Beendigung der eigentlichen Messung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ erfolgte eine Exzitation der A549-Zellen mit einer Wellenlänge von 495 nm. Das daraufhin von den Zellen mit einer Wellenlänge von 519 nm emittierte Licht wurde nach Bündelung durch das Objektiv von der Digitalkamera aufgenommen und mithilfe der *MetaFluor*[®] *Imaging Software* visualisiert. So konnte die Transfektionsqualität zu Beginn als auch die Transfektionsstabilität im Verlauf beurteilt werden.

2.5.6.2.2 Messung der $[Ca^{2+}]_{mito}$

Um den Einfluss einer Hypokapnie auf die $[Ca^{2+}]_{mito}$ in transfizierten A549-Zellen zu quantifizieren, wurden diese nach 48-stündiger IDH3-Herunterregulierung zunächst wie oben beschrieben für 40 Minuten mit Rhod-2-AM inkubiert und anschließend zweimalig mit normokapnischem HBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 4000 μ l des normokapnischen HBS-Puffers startete die Messung (= 0* min im Diagramm). Nach 5-minütiger Normokapnie erfolgte eine Umstellung auf Hypokapnie (= Pufferwechsel im Diagramm). Nach 10-minütiger Hypokapnie erfolgte eine erneute Umstellung auf Normokapnie (= Pufferwechsel im Diagramm). Nach weiteren 10 Minuten Normokapnie wurde die Messung beendet. Ebenso wie bei den Messungen der [NADH] und dem $\Delta\Psi_{mito}$ wurden auch hier Kontrollreihen mit der Negativkontrolle (*scrambled* siRNA) und mit nativen A549-Zellen derselben Passage nach demselben Schema durchgeführt. Abbildung 12 fasst den Versuchsablauf der Messung des $[Ca^{2+}]_{mito}$ in transfizierten A549-Zellen und deren Kontrollen grafisch zusammen.

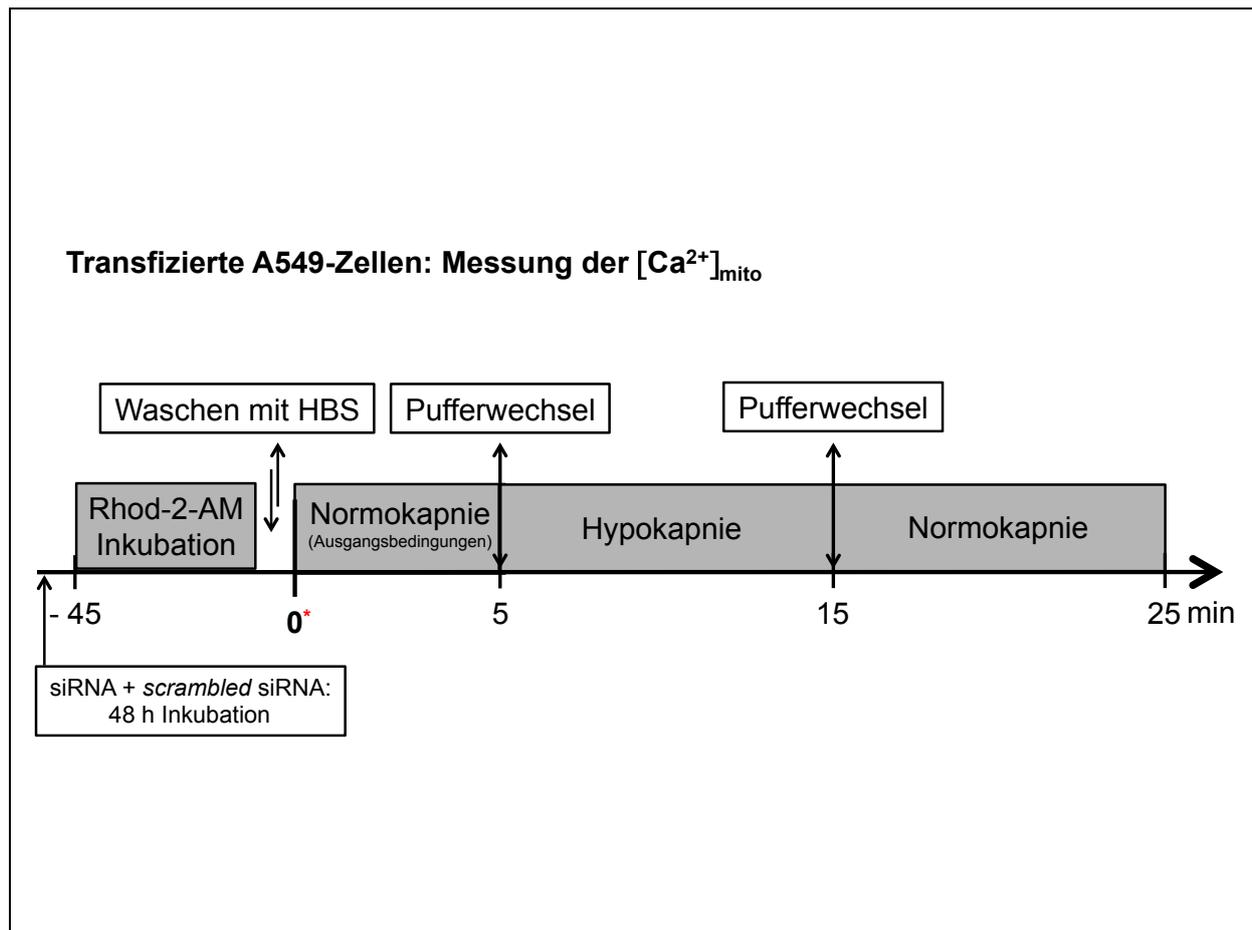


Abbildung 12: Messung der $[Ca^{2+}]_{mito}$ mittels Rhod-2 in transfizierten A549-Zellen und deren Kontrollen

2.5.6.2.3 Messung des $\Delta\Psi_{mito}$

Zur Messung des Einflusses einer Hypokapnie auf das $\Delta\Psi_{mito}$ in transfizierten A549-Zellen wurden diese nach 48-stündiger IDH3-Herunterregulierung zunächst für 20 Minuten mit TMRM⁺ inkubiert und anschließend zweimalig mit normokapnischem HBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 4000 μ l des normokapnischen HBS-Puffers startete die Messung (= 0* min im Diagramm). Nach 5-minütiger Normokapnie erfolgte eine Umstellung auf eine Hypokapnie (= Pufferwechsel im Diagramm). Der Pufferwechsel erfolgte standardisiert wie unter 2.5.6 detailliert beschrieben. Nach 10-minütiger Hypokapnie erfolgte ein erneuter Pufferwechsel hin zur Normokapnie. Nach 5-minütiger Normokapnie wurde die Messung beendet. Auch hier wurden Kontrollreihen mit der Negativkontrolle (*scrambled* siRNA) und mit nativen Zellen durchgeführt, welche demselben Schema folgten. Abbildung 13 fasst

den Versuchsablauf der Messungen des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ in transfizierten A549-Zellen und deren Kontrollen grafisch zusammen.

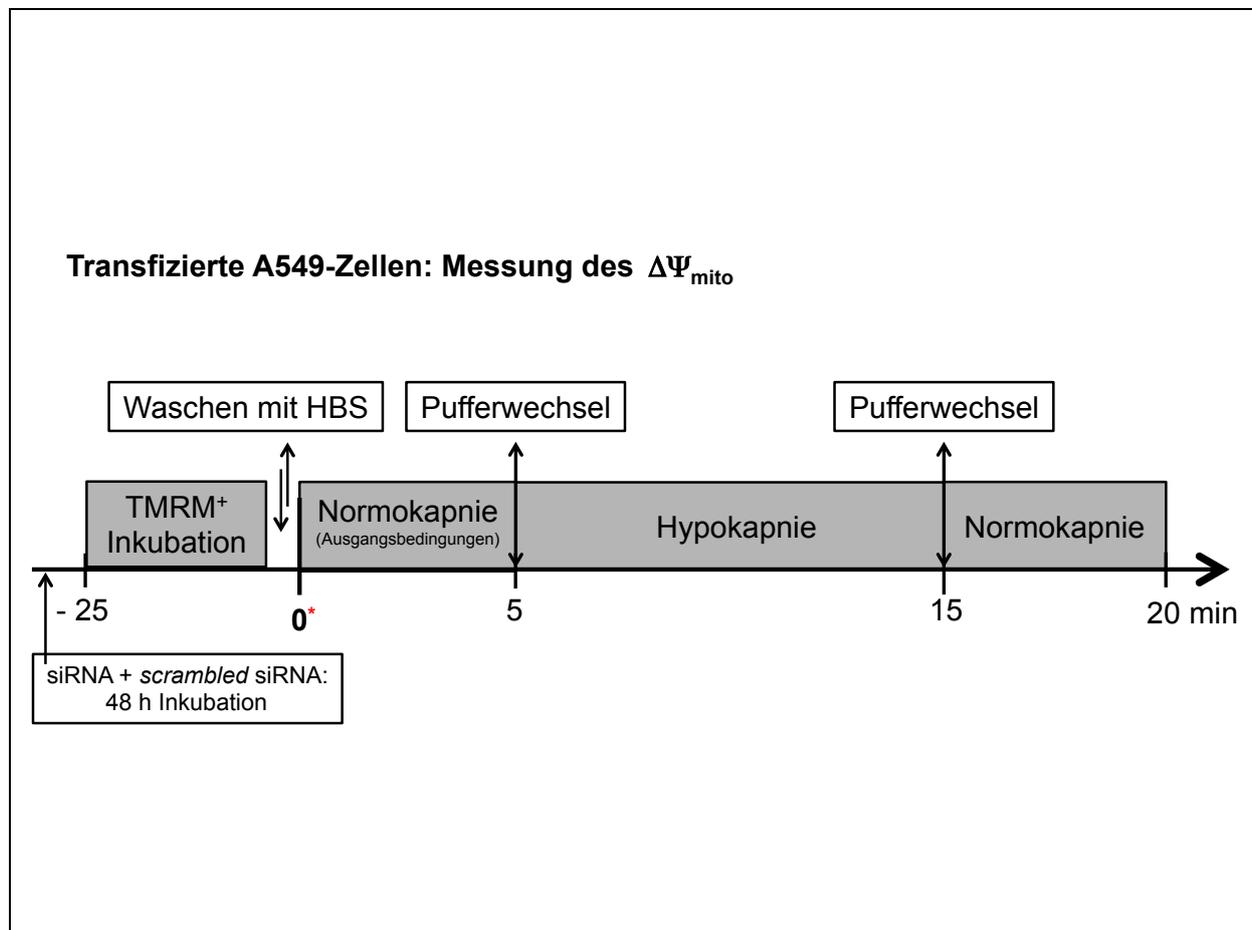


Abbildung 13: Messung des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ mittels TMRM⁺ in transfizierten A549-Zellen und deren Kontrollen

2.5.6.2.4 Messung der [NADH]

Zur Untersuchung des Einflusses einer Hypokapnie auf die [NADH] in transfizierten A549-Zellen wurden die Zellen nach Inkubation zweimalig mit normokapnischem HBS-Puffer gewaschen. Eine Anfärbung entfiel auch hier aufgrund der Autofluoreszenz von NADH. Nach Zugabe von 3500 μl des normokapnischen HBS-Puffers startete die Messung (= 0* min im Diagramm). Nach 5 Minuten erfolgte die Zugabe von 500 μl der 400 μM Rotenonlösung auf die Zellen (Rotenon-Endkonzentration 50 μM). Nach weiteren 15 Minuten erfolgte ein standardisierter Pufferwechsel mit anschließender Hypokapnie. Nach 10-minütiger Hypokapnie erfolgte eine erneute Umstellung auf Normokapnie. Nach 10 Minuten Normokapnie wurden die Messungen beendet. Sowohl die Negativkontrollen (*scrambled* siRNA)

als auch die Kontrollversuche mit nativen A549-Zellen folgten demselben Schema und entstammten derselben Passage. Abbildung 14 fasst die Versuchsabläufe der Messungen der [NADH] in transfizierten A549-Zellen und deren Kontrollen grafisch zusammen.

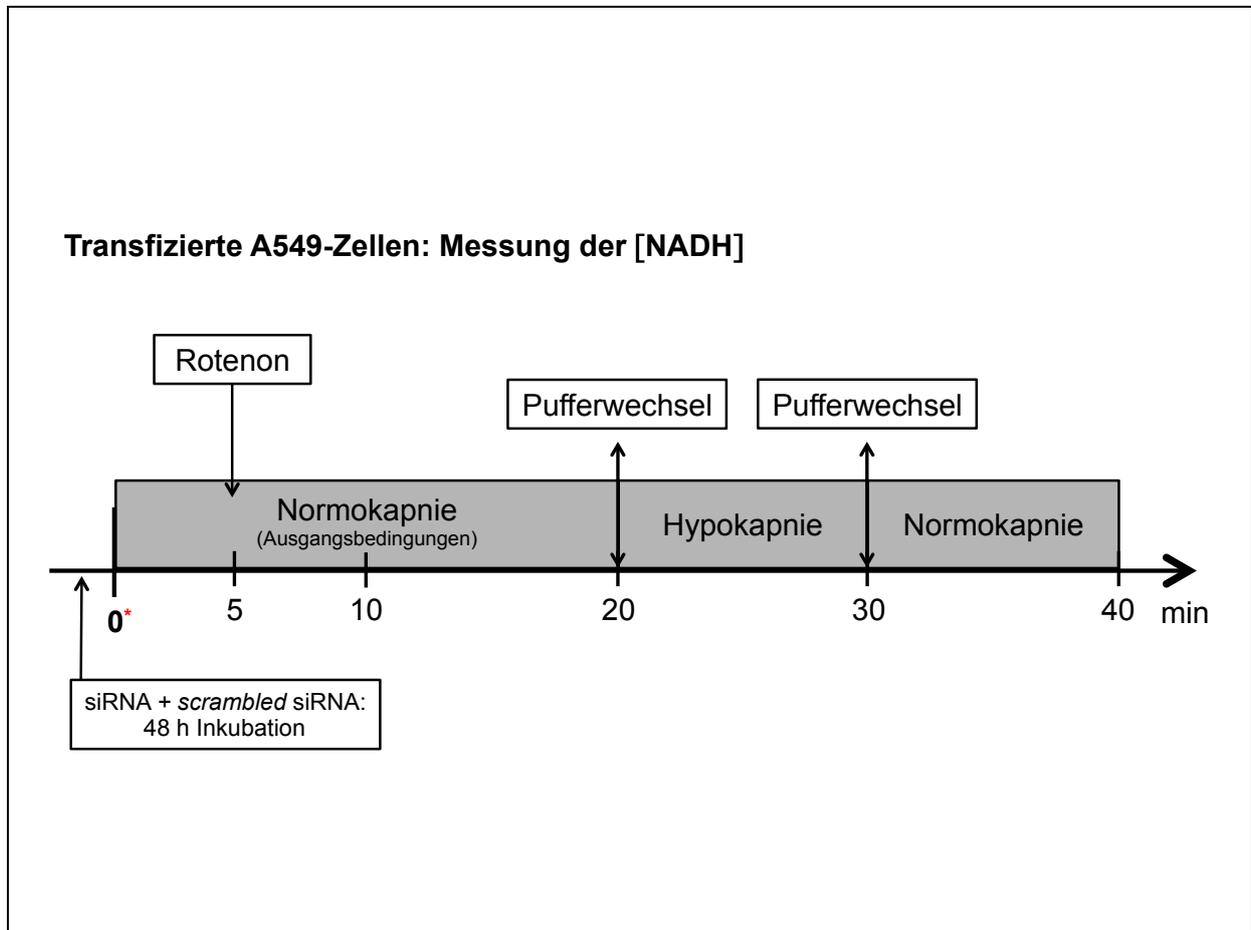


Abbildung 14: Messung der [NADH] in transfizierten A549-Zellen und deren Kontrollen

2.6 NADH-Assay

2.6.1 Geräte und Zubehör

ama-digit ad 20th

(elektronisches Digitalthermometer)

CO₂-Inkubatoren (37 °C, 21 % O₂, 5 % CO₂)

Amarell GmbH & Co. KG,

Kreuzwertheim, Deutschland

Heraeus Holding GmbH, Hanau,
Deutschland

Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad
Nenndorf, Deutschland

Heizplatte – Heatplate Stuart SBH130DC	Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire, UK
Multiskan Spectrum	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA
Skantl for MSS 2.2 (Software)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA
Pipetten - Eppendorf research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Vortex	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Zentrifugen: Centrifuge 54717R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Universal 32	Hettrich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Heraeus Pico 17	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland

2.6.2 Sterile Verbrauchsmaterialien

Kulturflaschen (T75)	Sarstedt Inc., Newton, NC/USA
Mikrotiterplatte: MicroWell (96-well) Platte	Flat Bottom Cell+, Sarstedt Inc., Newton, NC/USA
Pipettenspitzen: Biosphere Filtertips	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
epT.I.P.S. Standard	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf- <i>Tube</i>)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Transferpipetten/Serological Pipette	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Verschlussfolie Parafilm ,M'	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL/USA

2.6.3 Reagenzien

Aqua ad iniectabilia	Baxter Healthcare, Zürich, Schweiz
Dulbecco's PBS (DPBS)	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
EnzyChrom NAD ⁺ /NADH Assay Kit (E2ND-100)	BioAssay Systems, Hayward, CA/USA
FBS	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
HBS-Puffer	siehe 2.4.
Rotenon	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Mo/USA
Trypsin/EDTA Solution	Biochrome AG, Berlin, Deutschland

2.6.4 Durchführung

Die Quantifizierung des Einflusses einer Hypokapnie auf die [NADH] in nativen A549-Zellen wurde mit dem *EnzyChromTM NAD⁺/NADH Assay Kit* der Firma *BioAssay Systems* durchgeführt. Dieses kolorimetrische NADH-Assay basiert auf einer Recycling-Reaktion der Lactat-Dehydrogenase, in der das produzierte NADH zu einer Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) führt. Ein Farbumschlag von gelb zu violett-blau ist die Folge. Die bei 565 nm mit Hilfe des Spektralphotometers gemessene optische Dichte ist abhängig von der Farbtintensität des reduzierten MTT, welche proportional zur [NADH] in der gemessenen Probe ist. Die Analyse und Berechnung erfolgte mithilfe der *Skant[®]-Software* von *Thermo Fisher Scientific*.

2.6.4.1. Inhalt des Kits

Im *Kit* enthalten waren 10 ml Assay-Puffer, 1,5 ml Lactat, 1,5 ml MTT-Lösung, 120 µl Enzym A, 120 µl Enzym B, 0,5 ml NAD-Standard (1mM), 12 ml NAD-Extraktionspuffer, 12 ml NADH-Extraktionspuffer sowie ein Versuchsprotokoll vom Hersteller. Alle weiteren Materialien und Analysegeräte mussten vom Untersucher gestellt werden.

2.6.4.2 Vorbereitung der Zellen

Für die Durchführung des NADH-Assays wurden pro Versuchsreihe native A549-Zellen in jeweils vier T75-Flaschen zu einer Konfluenz von 80% herangezüchtet. Diese wurden zur gleichen Zeit vorbereitet und entstammten derselben Passage. Pro Versuchsreihe erfolgte die Einteilung am Versuchstag in Gruppen wie folgt:

Gruppe 1:	Normokapnie	→	1 x T75-Flasche
Gruppe 2:	Hypokapnie	→	1 x T75-Flasche
Gruppe 3:	Normokapnie und Rotenon	→	1 x T75-Flasche
Gruppe 4:	Hypokapnie und Rotenon	→	1 x T75-Flasche

Pro Versuch erhielt jede Gruppe jeweils eine entsprechend markierte T75-Flasche mit A549-Zellen. Aus jeder T75-Flasche wurde das Nährmedium mithilfe einer 10 ml Transferpipette abgesaugt und verworfen. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von Puffer und Reagenzien auf die Zellen in den T75-Flaschen wie folgt:

Auf die A549-Zellen der **Gruppe 1** wurden mit Hilfe einer 10 ml Transferpipette 7 ml des normokapnischen HBS-Puffers gegeben. Danach erfolgte eine 15-minütige Inkubation im CO₂-Inkubator. Auf die A549-Zellen der **Gruppe 2** wurden 7 ml des hypokapnischen HBS-Puffers pipettiert. Der Verschluss der T75-Flasche wurde zusätzlich mit Parafilm abgeklebt, um jegliches Eindringen von CO₂ im Inkubator zu vermeiden. Danach erfolgte auch hier eine 15-minütige Inkubation. Auf die A549-Zellen der **Gruppe 3** wurden 6 ml des normokapnischen HBS-Puffers und zur Blockade der Atmungskette zusätzlich 50 µM Rotenon pipettiert. Anschließend wurde die Flasche ebenfalls für 15 Minuten inkubiert. Auch die A549-Zellen der **Gruppe 4** wurden zunächst mit 6 ml des normokapnischen HBS-Puffers und 50 µM Rotenon zur Blockade der Atmungskette behandelt. Nach 7-minütiger Inkubation im CO₂-Inkubator wurde der Überstand in der Flasche dann wieder abgesaugt und verworfen. Die A549-Zellen wurden daraufhin zweimal mit hypokapnischem HBS-Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 7 ml des hypokapnischen HBS-Puffers auf die A549-Zellen und eine weitere, 15-minütige Inkubation. Der Verschluss der T75-Flasche wurde auch hier zum Schutz vor einem möglichen Eindringen von CO₂ mit Parafilm abgeklebt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die A549-Zellen in den Flaschen zweimalig mit 7 ml kaltem PBS gewaschen. Daraufhin wurden jeweils 3 ml Trypsin in jede

Flasche pipettiert und die Flaschen für 4 Minuten im Inkubator inkubiert. Die Flaschen der Hypokapnie-Gruppen (**Gruppe 2 und 4**) wurden dafür zusätzlich erneut mit Parafilm abgeklebt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde mit allen Versuchsgruppen nach demselben Standard wie folgt verfahren. Zunächst erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle bezüglich der Ablösung der Zellen. Hatten sich alle Zellen vom Boden der Flasche gelöst, wurde die Wirkung des Trypsins durch eine Zugabe von 7 ml FBS gestoppt. Für ein besseres Ablösen der Zellen wurde die Zellsuspension in der Flasche mittels einer 25 ml Transferpipette angesaugt und der Flaschenboden mit dieser ausgespült. Die Zellsuspension wurde anschließend mit derselben Pipette in ein 14 ml Rundbodenröhrchen pipettiert und für 5 Minuten mit 1000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, wobei der Überstand verworfen wurde. Das übrig gebliebene Zellpellet wurde nun in 1000 μ l kaltem PBS resuspendiert. Die gesamte Suspension wurde anschließend in ein lichtundurchlässiges 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf-*Tube*) pipettiert, welches entsprechend der Versuchsgruppen-zugehörigkeit beschriftet wurde. Die 1,5 ml-Reaktionsgefäße wurden erneut für 5 Minuten mit 1000 rpm bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Am Ende dieser Vorbereitungsphase erhielt man so entsprechend den vier Versuchsgruppen vier 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit präparierten nativen A549-Zellen.

2.6.4.3 NADH-Extraktion

Der weitere Versuchsablauf erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers des NADH-Assay *Kits*. Demnach wurde zunächst NADH aus den nativen A549-Zellen extrahiert. Dazu wurden jeweils 100 μ l des NADH-Extraktionspuffers in jedes der vier 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und anschließend homogenisiert. Es folgte eine Erhitzung der Reaktionsgefäße für 5 Minuten bei 60°C zur Zerstörung der Zellmembranen und Zusammenführung des Extraktionspuffers mit dem in den Zellen enthaltenen NADH. Anschließend wurden je 20 μ l des Assay-Puffers und 100 μ l des zweiten Extraktionspuffers (NAD⁺) zur Neutralisierung in die vier Reaktionsgefäße pipettiert. Es erfolgte eine kurze Durchmischung im Vortex. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße mit 14.000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur erneut zentrifugiert. Der Überstand jedes Reaktionsgefäßes wurde in je einem neuen 1,5 ml-Reaktionsgefäße gesammelt und bis auf weiteres auf Eis gekühlt.

2.6.4.4 Standardkurve

Zwischenzeitlich wurde die Standardkurve vorbereitet. Dazu wurde zunächst eine 10 μM Vormischung bestehend aus 5 μl der 1 mM NAD-Standard-Lösung und 495 μl *Aqua ad iniectabilia* hergestellt. Diese wurde in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Mithilfe der Vormischung erfolgte entsprechend folgendem Pipettierschema die Anfertigung der Standardkurve. Die einzelnen Lösungen wurden zunächst in nummerierten Reaktionsgefäßen auf Eis gelagert.

Tabelle 7: Pipettierschema der Standardkurve (NADH-Assay)

Nr.	Vormischung + <i>Aqua ad iniectabilia</i>	Volumen (μl)	[NAD] (μM)
1	100 μl + 0 μl	100	10
2	80 μl + 20 μl	100	8
3	60 μl + 40 μl	100	6
4	40 μl + 60 μl	100	4
5	30 μl + 70 μl	100	3
6	20 μl + 80 μl	100	2
7	10 μl + 90 μl	100	1
8	0 μl + 100 μl	100	0

2.6.4.5 Reaktionslösung

Als nächstes erfolgte die Vorbereitung der Reaktionslösung. Diese wurde an jedem Versuchstag neu hergestellt und, bis alle Vorbereitungen abgeschlossen waren, kurzzeitig in einem lichtundurchlässigen Reaktionsgefäß ebenfalls auf Eis gelagert. In Tabelle 8 ist die Zusammensetzung der Reaktionslösung aufgeführt.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Reaktionslösung (NADH-Assay)

	pro Nöpfchen einer Mikrotiterplatte	pro einfache Versuchsreihe (entspricht 12 Nöpfchen einer Mikrotiterplatte)
Assay-Puffer	60 μl	720 μl
Enzym A	1 μl	12 μl
Enzym B	1 μl	12 μl
Lactat	14 μl	168 μl
MTT	14 μl	168 μl
Gesamtmenge	90 μl	1080 μl

2.6.4.6 Reaktion und Messung

Nach Beendigung der Vorbereitungen folgte die spektralphotometrische Bestimmung der [NADH]. Zu diesem Zwecke wurde eine flache, transparente 96-well-Mikrotiterplatte, wie in Abbildung 15 dargestellt, bestückt. In der Regel erfolgte pro Versuchstag die Durchführung einer doppelten Versuchsreihe, wie sie auch in der Abbildung dargestellt ist.

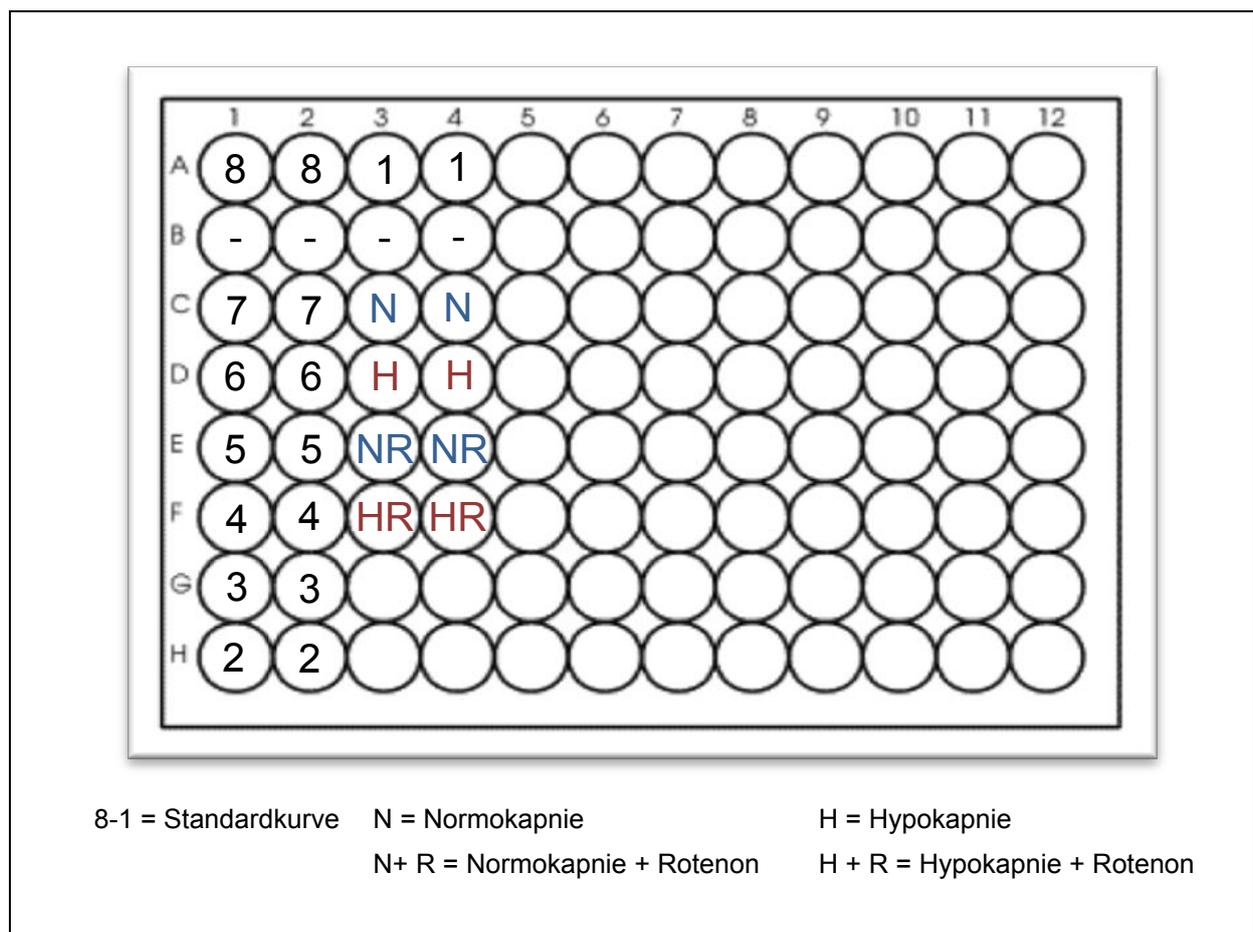


Abbildung 15: Pipettierschema NADH-Assay (doppelte Versuchsreihe)

Zunächst wurden je 40 μl der vorbereiteten Standards 1 bis 8 in absteigender Reihenfolge in die Näpfchen pipettiert. Danach erfolgte die Zugabe der vorbereiteten Proben in separate Näpfchen. Anschließend wurden je 80 μl der Reaktionslösung sowohl in die Näpfchen mit den Standards als auch in die Näpfchen mit den Proben pipettiert und die Platte zügig im *Multiskan[®] Spectrum* bei 565 nm analysiert. Die Messung der [NADH] bzw. der optischen Dichte (OD) nach Passage des Lichts durch die in den Näpfchen enthaltenen Reagenzien erfolgte sofort nach Zugabe der

Reaktionslösung und Platzierung der Platte im Analysegerät (OD₀) sowie nach 15 Minuten (OD₁₅).

2.2.4.7 Berechnung der [NADH]

Für die Berechnung der [NADH] wurde zunächst ΔOD ermittelt. Dafür wurde der Wert OD₀ vom Wert OD₁₅ sowohl für die Standards und als auch für die Probenwerte abgezogen. Danach erfolgte die Erstellung der Standardkurve sowie die Ermittlung der Steigung der linearen Gleichung mithilfe der ΔOD -Werte der Standards. Die Berechnung der [NADH] der einzelnen Proben erfolgte durch die Nutzung der linearen Gleichung der Form $y = nx + c$, des Wertes für die Steigung n sowie der ΔOD -Werte der Proben und der Leerwerte nach folgender Gleichung:

$$[\text{NADH}] (\mu\text{M}) = \frac{\Delta OD_{\text{Probe}} - \Delta OD_{\text{Blank}}}{\text{Steigung der Geraden}}$$

2.7 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Im Rahmen dieser Dissertation sollte mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (*reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR), einer speziellen Form der PCR, der Transfektionserfolg des Gen-*Knock-Down* der IDH3 in A549-Zellen überprüft werden. Die RT-PCR dient dem Nachweis von RNA und basiert darauf, dass zunächst RNA mittels reverser Transkription in DNA umgeschrieben und die so entstandene cDNA durch eine Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert wird. Eine qualitative Analyse der amplifizierten cDNA erfolgte im Falle dieser Arbeit mittels Agarose-Gelelektrophorese.

2.7.1 Geräte und Zubehör

Becherglas mit Schraubdeckel, 250 ml	Schott, Mainz, Deutschland
Consort Electrophoresis Power Supply E835 (Stromquelle für Elektrophorese)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Gelkammer und Gelkämme	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

GeneGenius Gel Imaging System	Syngene, Cambridge, UK
Heizplatte – Heatplate Stuart SBH130DC	Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire, UK
IKA MS 1 Shaker (kreisender Schüttler)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen, Deutschland
NanoDrop 1000 Spektrometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA
Pipetten - Eppendorf research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermal Cycler P2X (PCR-/Thermocycler)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA
Verschlussfolie Parafilm ,M'	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL/USA
Vortex	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Zentrifugen: Centrifuge 54717R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Universal 32	Hettrich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Heraeus Pico 17	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland

2.7.2 Sterile Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen: Biosphere Filtertips	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
epT.I.P.S. Standard	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Probensammelröhrchen:	
Collection Tubes	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAshredder (+ Zentrifugationssäulen)	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Reaktionsgefäße:	
1,5 ml (Eppendorf-Tube)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Multiply-Pro Gefäß 0,2 ml, PP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Zellkulturplatte (6-well) Falcon	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ/USA
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

2.7.3 Reagenzien

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Agarose	Invitrogen, Carlsbad, CA/USA
Aqua ad iniectabilia	Baxter Healthcare, Zürich, Schweiz
dNTP Set 100 mM	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
GelPilot 100 bp Plus Ladder	QIAGEN, Hilden, Deutschland
HotStarTaq DNA Polymerase	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Omniscript Reverse Transcriptase Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
PCR-Puffer	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Primer p(dT) ₁₅ für cDNA-Synthese	Roche, Mannheim, Deutschland
Protector RNase Inhibitor (40 U/µl)	Roche, Mannheim, Deutschland
Q-Solution	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RNase-freies Wasser	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RNase-Inhibitor	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RNaseZAP (Reinigungsmittel)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
RNeasy Plus Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Roti-GelStain	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Acetat-EDTA-(TAE-)Puffer (pH 8,3)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.7.4 Primer

IDH3-hu	sc-62493-PR	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX/USA
<i>forward:</i> 5'-GGA ACA CCG GCA AGA GUA UCG CCA A-3' <i>reverse:</i> 5'-UUG GCG AUA CUC UUG CCG GUG UUC C-3'		
GAPDH-hu	H713_31-1356-1/4//2/4	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
<i>forward:</i> 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' <i>reverse:</i> 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'		

2.7.5 Durchführung

Sowohl die Anzucht der Zellen als auch deren Transfektion erfolgten wie unter 2.2 und 2.3 beschrieben in 6-*well*-Zellkulturplatten (9,5 cm² pro Näpfchen). Für die RT-PCR wurden je zwei Näpfchen mit nativen A549-Zellen und vier Näpfchen mit transfizierten A549-Zellen vorbereitet, von denen zwei mit IDH3G-siRNA und zwei weitere mit *scrambled* siRNA (= Kontrolle) inkubiert wurden; es ergaben sich so drei Versuchsgruppen mit je zwei Versuchsreihen. Die Anzucht der Zellen erfolgte zu einer Konfluenz von 80%. Die Zellen wurden zur gleichen Zeit vorbereitet und entstammten derselben Passage. Alle Versuchsgruppen und -Reihen wurden identisch wie nachfolgend beschrieben behandelt, wobei nachfolgende Angaben, wenn nicht anders erläutert, exemplarisch für eine Probe stehen.

2.7.5.1 RNA-Aufbereitung

In einem ersten Schritt erfolgte die Isolation von RNA aus den A549-Zellen. Diese wurde mithilfe des *RNeasy*[®] *Plus Mini Kit* von QIAGEN entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

2.7.5.1.1 Inhalt des Kits

Im *RNeasy*[®] *Plus Mini Kit* enthalten waren *gDNA Eliminator Mini Spin Columns* (= Zentrifugationssäulen in 2 ml Probensammelröhrchen), *RNeasy Mini Spin Columns* (= Zentrifugationssäulen in 2 ml Probensammelröhrchen), *Collection Tubes* 1,5 ml

und 2 ml (Probensammelröhrchen), RLT Plus Puffer, RW1-Puffer, RPE-Puffer, RNase-freies Wasser und eine Anleitung. Alle weiteren Materialien und Analysegeräte mussten vom Untersucher gestellt werden.

2.7.5.1.2 Details der RNA-Isolation

Zunächst wurde das auf den A549-Zellen befindliche Medium mithilfe einer Pipette abgetragen. Als nächstes erfolgte die Herstellung eines Lyse-Puffers. Dazu wurden 10 ml des im *Kit* enthaltenen RLT Plus Puffers mit 100 μ l 2-Mercaptoethanol vermischt. Daraufhin wurden jeweils 350 μ l des Lyse-Puffers in jedes der 6 Nöpfchen der Zellkulturplatte pipettiert. Es folgte eine 10-minütige Inkubation mit ständiger Durchmischung der A549-Zellen innerhalb der Nöpfchen mit dem Lyse-Puffer. Anschließend wurden die A549-Zellen mithilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturplatten gelöst, für 2 Minuten mittels Zentrifuge homogenisiert, in 2 ml Probensammelröhrchen mit Zentrifugationssäulen (*gDNA Eliminator Mini Spin Column*) überführt und für 15 Sekunden bei 12.000 rpm erneut zentrifugiert. Die Säulen wurden anschließend entfernt und verworfen, und 350 μ l Ethanol zum Durchfluss in jedes Probensammelröhrchen pipettiert. Es folgte eine 10-malige Durchmischung mittels Pipette. Als nächstes wurden die Proben in neue 2 ml Probensammelröhrchen mit Zentrifugationssäulen (*RNeasy Mini Spin Column*) überführt und für 15 Sekunden bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend verworfen und die Säulen wie folgt gewaschen. Zunächst wurden 700 μ l des RW1-Puffers in die Probensammelröhrchen mit den Säulen pipettiert und diese für 15 Sekunden bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 500 μ l des RPE-Puffers in die Probensammelröhrchen pipettiert und diese erneut für 15 Sekunden bei 12.000 rpm zentrifugiert. Hieran schloss sich ein erneutes Verwerfen des Überstandes an. Anschließend wurden abermals 500 μ l des RPE-Puffers in die Probensammelröhrchen pipettiert und diese nun für 2 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulen sorgsam aus den Röhrchen genommen, in neue 2 ml Probensammelröhrchen überführt und für eine Minute bei 14.000 rpm trocken zentrifugiert. In einem abschließenden Schritt wurden die Säulen abermals in neue 2 ml Probensammelröhrchen überführt, 30 μ l RNase-freies Wasser direkt auf die Säulen pipettiert und die Röhrchen für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. In den Probensammelröhrchen befand sich nun die isolierte

RNA der A549-Zellen. Alle nachfolgenden Arbeiten erfolgten zum Schutz der isolierten RNA auf Eis.

2.7.5.2 RNA-Mengenbestimmung

Vor der cDNA-Synthese erfolgte zunächst eine RNA-Mengenbestimmung mit dem NanoDrop-1000. Dazu wurde die optische Dichte der RNA-Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260} , entspricht dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und einer Wellenlänge von 280 nm (OD_{280} , entspricht dem Absorptionsmaximum von Proteinen) gemessen und so der Reinheitsgrad der RNA-Proben bestimmt. Dabei gelten Werte zwischen 1,8 und 2,1 als nicht verunreinigt. In Anbetracht der Tatsache, dass eine Absorption von 1 bei 260 nm einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ entspricht, ergibt sich für die Konzentrationsbestimmung von RNA folgende Formel:

$$[\text{RNA}] [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.7.5.3 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird mithilfe einer Reversen Transkriptase, also einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, einzelsträngige RNA in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die cDNA-Synthese mithilfe des *Omniscript[®] Reverse Transcriptase Kit* von QIAGEN entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Dieses Kit nutzt eine rekombinante, multifunktionale, in *E.Coli* exprimierte Reverse Transkriptase mit drei unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten. So fungiert sie als RNA-abhängige DNA-Polymerase, als Hybrid-abhängige Exoribonuklease und als DNA-abhängige DNA-Polymerase.

2.7.5.3.1 Inhalt des Kits

Im *Omniscript[®] Reverse Transcriptase Kit* enthalten waren *Omniscript Reverse Transcriptase* (Reverse Transkriptase), RT-Puffer, dNTP-Mix, RNase-freies Wasser

und eine Anleitung. Alle weiteren Materialien und Analysegeräte mussten vom Untersucher gestellt werden.

2.7.5.3.2 Reverse Transkription

Um einen Zerfall der RNA sowie eine vorzeitige und somit möglicherweise fehlerhafte cDNA-Synthese zu vermeiden, erfolgten alle Arbeiten auf Eis. Zusätzlich wurde ein separater Arbeitsplatz für die Reverse Transfektion aufgesucht, um Kontaminationen zu vermeiden.

Zunächst wurden die *Kit*-Substanzen und die RNA auf Eis aufgetaut, separat mittels Vortex durchmischt und zum Lösen möglicher Flüssigkeit von den Rändern der Röhrchen kurz anzentrifugiert. Anschließend wurde ein *Mastermix* angefertigt und ebenfalls auf Eis gelagert (siehe Tabelle 9). Gemäß den Herstellerempfehlungen wurde dabei ein größeres Volumen als eigentlich benötigt vorbereitet. Als nächstes erfolgte die Aufteilung des *Mastermix* entsprechend der Versuchsgruppenzugehörigkeit auf 200 µl-Reaktionsgefäße und die Zugabe der jeweiligen RNA-Probe zum *Mastermix* in das Reaktionsgefäß. Die Reaktionspartner wurden anschließend gründlich mittels Vortex für 5 Sekunden vermischt; zum Lösen möglicher Flüssigkeit von den Rändern der Reaktionsgefäße wurden diese daraufhin kurz anzentrifugiert. Für die cDNA-Synthese wurde eine Menge von 2 µg RNA pro Probe als Matrize genutzt. Es folgte eine Inkubation für 60 Minuten bei 37 °C.

Tabelle 9: Ansatz des *Mastermix* für die cDNA-Synthese

Substanz	Menge für eine Probe
10 x RT-Puffer	2 µl
dNTP Mix (5mM pro dNTP)	2 µl
Oligo-dT Primer [10 µM]	2 µl
RNase-Inhibitor [10 Units/µl]	1 µl
Omniscript Reverse Transkriptase	1 µl
RNase-freies Wasser	12 µl
RNA-Matrize	2 µg
Gesamtvolumen	20 µl + 2 µg RNA-Matrize

2.7.5.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR dient der Amplifikation von genau definierten DNA-Abschnitten *in vitro*. Sie findet in einem *Thermocycler* statt, in welchem, je nach DNA-Abschnitt, eine Vielzahl

von Zyklen durchlaufen wird. Jeder dieser Zyklen besteht aus den folgenden drei Schritten. Zunächst findet eine Denaturierung der cDNA statt: eine Erhitzung führt zu einer Trennung der H⁺-Brücken zwischen den DNA-Doppelsträngen und somit zu einer Separierung dieser. Um eine erneute Verbindung der DNA-Stränge zu verhindern, werden die Proben zum Ende des ersten Schrittes zügig heruntergekühlt. In einem zweiten Schritt findet eine Anlagerung der spezifischen *Primer* des zu vervielfältigenden Abschnitts an die DNA statt (Primerhybridisierung/*primer annealing*). Dies geschieht bei einer für den *Primer* spezifischen Temperatur. Der *Primer* dient als Startpunkt für die DNA-Polymerase, welche in einem letzten Schritt die DNA-Stränge mit freien Nukleotiden auffüllt. Diese sog. Elongation findet bei einer für die DNA-Polymerase spezifischen Temperatur statt. Nach Vollendung aller Zyklen kühlt das Gerät die Proben auf 4 °C herunter.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde für die PCR zunächst ein *Mastermix* angefertigt (siehe Tabelle 10). Auch hierbei wurde entsprechend den Herstellerempfehlungen ein größeres Volumen als eigentlich benötigt vorbereitet. Als nächstes erfolgte die Aufteilung des *Mastermix* entsprechend der Versuchsgruppenzugehörigkeit auf 200 µl-Reaktionsgefäße und die Zugabe von 3 µl cDNA bei einer Menge von 2 µg umgeschriebener RNA pro Probe. Die Reaktionsgefäße wurden verschlossen, mittels Vortex durchmischt und zum Lösen möglicher Flüssigkeit von den Rändern der Reaktionsgefäße kurz anzentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in den *Thermocycler* gesetzt und das in Tabelle 11 aufgeführte Programm durchlaufen.

Um die Intaktheit und Integrität des verwendeten Genmaterials (RNA und cDNA) zu überprüfen, wurde zusätzlich zur eigentlichen IDH3-PCR eine Kontroll-PCR durchgeführt, in welcher das an der Glykolyse beteiligte und ubiquitär exprimierte Enzym GAPDH amplifiziert wurde.

Tabelle 10: Ansatz des *Mastermix* für die PCR

Substanz	Menge eine Probe
10 x PCR-Puffer	5 µl
Q-Solution	10 µl
HotStarTaq DNA Polymerase	0,25 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
<i>Forward</i> Primer	1 µl
<i>Reverse</i> Primer	1 µl
Nuklease-freies Wasser	28,75 µl
cDNA-Matrize	3 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 11: PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95 °C	15 Minuten
Denaturierung	94 °C	45 Sekunden
Primerhybridisierung		
IDH3	59,4 °C	30 Zyklen
GAPDH	54 °C	30 Zyklen
Elongation	72 °C	1 Minute
Abschließende Elongation	72 °C	10 Minuten
Abkühlung und Lagerung	4 °C	∞

2.7.5.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die qualitative Analyse der amplifizierten cDNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurde ein 1%iges Agarose-Gel angefertigt, indem 666 mg Agarose in 66 ml TAE-Laufpuffer (20 ml TAE in 980 ml *Aqua ad iniectabilia*) in einem Becherglas mit Schraubdeckel in einer Mikrowelle unter wiederholtem Schwenken aufgeköcht und aufgelöst wurden. Anschließend erfolgte eine Abkühlung des Gels auf 65 °C und ein Hinzufügen von 3 µl des Fluoreszenzfarbstoffs *Roti[®]-GelStain* unter sorgsamem Rühren. *Roti[®]-GelStain* ist ein spezifischer Farbstoff zur Detektion von Nukleinsäuren. Anschließend wurde das Gel in eine zuvor zusammengestellte Gelkammer mit Gelkamm gegossen und für 15 Minuten zur weiteren Abkühlung beiseite gestellt. War das Gel abgekühlt, folgte die sorgfältige Entfernung des Gelkamms. Anschließend wurden je 6 µl der PCR-Produkt-Proben mit 3 µl TAE-Laufpuffer vermischt, und die daraus entstandene 9 µl Probenlösung in die Taschen des Agarose-Gels pipettiert. Zusätzlich wurde in die beiden äußeren Geltaschen ein molekularer Gewichtsstandard pipettiert (*GelPilot 100 bp Plus Ladder*). Die Elektrophorese erfolgte für 45 Minuten bei 120 V und 74 mA. Anschließend wurden

die DNA-Banden unter UV-Licht des *GeneGenius Gel Imaging System* sichtbar gemacht und abfotografiert.

Die Abbildung 16 fasst die Schritte der RT-PCR grafisch zusammen.

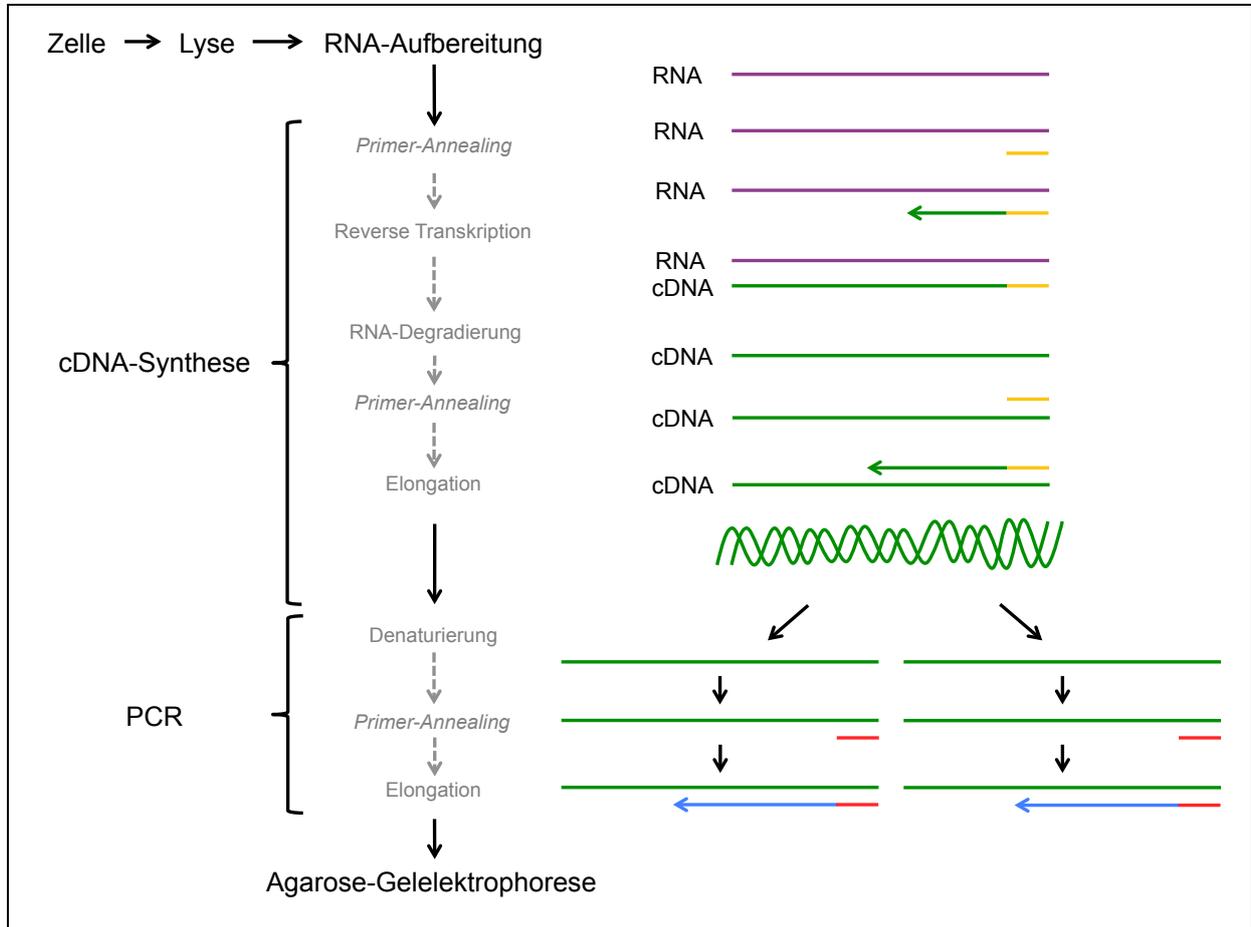


Abbildung 16: Grafische Zusammenfassung der Schritte der RT-PCR

2.8 Western Blot

2.8.1 Geräte und Zubehör

ama-digit ad 20th

(elektronisches Digitalthermometer)

Consort Electrophoresis Power Supply E835

(Stromquelle für Elektrophorese)

curix 60 (Röntgenfilmentwickler)

Heatplate Stuart SBH130DC

(Heizplatte)

Amarell GmbH & Co. KG,

Kreuzwertheim, Deutschland

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

München, Deutschland

Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgium

Bibby Scientific Limited, Stone,

Staffordshire, UK

Hypercassette	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Mini Gel Tank (Elektrophoresekammer)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA
Multiskan Spectrum	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA
Pipetten - Eppendorf research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Roto-Shake Genie (Schüttler)	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY/USA
Skant for MSS 2.2 (Software)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA
Vortex	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Zentrifugen: Centrifuge 54717R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Universal 32	Hettrich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Heraeus Pico 17	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland

2.8.2 Sterile Verbrauchsmaterialien

Amershan Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Nitrozellulosemembran	Invitrogen, Carlsbad, CA/USA
MicroWell Platte (96-well) (Mikrotiterplatte)	Flat Bottom Cell+, Sarstedt Inc., Newton, NC/USA
NuPAGE Gel Tank	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA
Kulturflaschen (T25)	Sarstedt Inc., Newton, NC/USA
Pipettenspitzen: Biosphere Filtertips	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
epT.I.P.S. Standard	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf- <i>Tube</i>)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Schämme (Sponge Pad for XCell II Blotting)	Invitrogen, Carlsbad, CA/USA
Transferringpipetten (Serological Pipette)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

2.8.3 Reagenzien

anti-rabbit IgG-Antikörper (polyklonaler 2° AK)	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Aqua ad iniectabilia	Baxter Healthcare, Zürich, Schweiz
Bench Mark Prestained Protein Ladder	Invitrogen, Carlsbad, CA/USA
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Protease-Inhibitoren)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Dulbecco's PBS (DPBS)	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
IDH3A-Antikörper (polyklonaler 1° AK)	GenWay Biotech Inc., San Diego, CA/USA
Magic Mark XP Western Standard	Invitrogen, Carlsbad, CA/USA
NuPAGE BisTris-Gel	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA
NuPAGE LDS Sample Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA
NuPAGE Sample Reducing Agent	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA
NuPAGE Transfer Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA
Pierce ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Little Chalfont, UK

2.8.4 Puffer

Für die Durchführung der Gelelektrophorese und des Western Blot wurden verschiedene Puffer verwendet, deren Zusammensetzungen in Tabelle 12 aufgeführt sind.

Tabelle 12: Pufferzusammensetzungen (Western Blot)

Puffer	Zusammensetzung
RIPA-Puffer	50 mM Tris (pH 7,4) (= 5 ml von 1 M Tris) 300 mM NaCl (= 10 ml von 3 M Stammlösung) 1 mM EDTA (= 200 µl von 0,5 M Stammlösung) 0,5 % DOC (= 5 ml von 10% Stammlösung) 0,5 % SDS (= 1 ml von 10% Stammlösung) Vor Gebrauch des RIPA-Puffers wurden Protease-Inhibitoren (½ Tablette <i>cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail</i> auf 3,5 ml RIPA-Puffer) und Dithiothreitol (DTT) (1:1000 von 1 M Stammlösung) frisch hinzugefügt.
Laufpuffer	25 ml <i>NuPAGE MOPS SDS Running Buffer</i> 500 ml <i>Aqua ad iniectabilia</i>
Waschpuffer	100 ml TBS (= 24,2 g Tris + 80,0 g NaCl) 900 ml <i>Aqua ad iniectabilia</i> 1 ml <i>Tween 20</i> (0,1%)
Transferpuffer	50 ml <i>NuPAGE Transfer Buffer</i> 100 ml Methanol 1000 ml <i>Aqua ad iniectabilia</i>
Blockierlösung (Blocking Puffer)	Waschpuffer + 5% Milchpulver

2.8.5 Durchführung

Sowohl die Anzucht der Zellen als auch deren Transfektion erfolgten wie unter 2.2 und 2.3 beschrieben in T25-Flaschen (25 cm²). Für den Western Blot wurden zwei T25-Flaschen mit nativen A549-Zellen und vier T25-Flaschen mit transfizierten A549-Zellen vorbereitet, von denen zwei mit IDH3G-siRNA und zwei weitere mit *scrambled* siRNA (= Kontrolle) inkubiert wurden; es ergaben sich so drei Versuchsgruppen mit je zwei Versuchsreihen. Die Anzucht der Zellen erfolgte zu einer Konfluenz von 80%. Die Zellen wurden zur gleichen Zeit vorbereitet und entstammten derselben Passage. Alle Versuchsgruppen und -Reihen wurden identisch wie nachfolgend beschrieben behandelt. Vor Durchführung der Gelelektrophorese und des Western Blot erfolgte eine Proteinextraktion sowie eine Proteinmengenbestimmung.

2.8.5.1 Proteinextraktion

Für die Proteinextraktion wurden die A549-Zellen in den T25-Flaschen zweimal mit 7 ml kaltem PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 250 µl RIPA-Puffer pro T25-Flasche sowie eine anschließende Inkubation der Flaschen für 30 Minuten bei 4 °C. Vor Gebrauch des RIPA-Puffers wurden Protease-Inhibitoren (½ Tablette cOmplete™ *EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* auf 3,5 ml RIPA-Puffer) und Dithiothreitol (DTT) (1:1000 von 1 M Stammlösung) frisch hinzugefügt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die lysierten A549-Zellen sorgfältig mit einem Zellschaber vom Boden der T25-Flaschen gelöst, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf-*Tubes*) überführt und für 20 Minuten mit 12.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und die darin enthaltene Proteinkonzentration mittels *Pierce*® *BCA Protein Assay Kit* der Firma *Thermo Scientific* gemäß den Herstellerangaben bestimmt.

2.8.5.2 Proteinmengenbestimmung

Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des *Pierce*® *BCA Protein Assay Kit* der Firma *Thermo Scientific*. Dieses Assay dient der kolorimetrischen Detektion und Quantifizierung von Proteinen. Es beruht auf einer Komplexbildung zwischen den Peptidbindungen der zu bestimmenden Proteine und den in einer alkalischen Lösung enthaltenen, zweiwertigen Kupfer-Ionen (Cu^{2+}). Es entsteht ein blau-violetter Farbkomplex. Die bei 562 nm mit Hilfe des Spektralphotometers gemessene optische Dichte ist abhängig von der Farbintensität des gebildeten Komplexes zwischen Peptidbindung und Cu^{2+} , welche wiederum proportional zur Proteinkonzentration in der gemessenen Probe ist. Die Analyse und Berechnung erfolgte mithilfe der *Skant*®-Software von *Thermo Fisher Scientific*.

2.8.5.2.1 Inhalt des Kits

Im *Kit* enthalten waren 1000 ml *BCA Reagent A* (bestehend aus Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchonsäure und Natriumtartrat), 25 ml *BCA Reagent B* (bestehend aus Kupfersulfat) sowie Albumin-Standard-Ampullen (Inhalt: bovines Serumalbumin (BSA) gelöst in 0,9 % Kochsalzlösung und 0,5 % Natriumazid;

2 mg/ml; = Stammlösung). Alle weiteren Materialien und Analysegeräte mussten vom Untersucher gestellt werden.

2.8.5.2.2 Standardverdünnungskurve und Reaktionslösung

Zunächst wurde die Albumin-Standardverdünnungskurve vorbereitet. Dazu wurde die in dem *Kit* enthaltene Stammlösung des BSA genutzt. Als Verdünnungslösung wurde RIPA-Puffer verwendet. Die einzelnen Lösungen wurden, wie in Tabelle 13 aufgeführt, hergestellt und bis auf weiteres in entsprechend gekennzeichneten Reaktionsgefäßen auf Eis gelagert.

Tabelle 13: Pipettierschema der Albumin-Standardverdünnungskurve

Probe	Verdünnungslösung (RIPA)	Volumen und Ursprung des BSA	BSA-Endkonzentration
A	0 µl	300 µl (<i>Stock</i>)	2000 µg/ml
B	125 µl	375 µl (<i>Stock</i>)	1500 µg/ml
C	325 µl	325 µl (<i>Stock</i>)	1000 µg/ml
D	175 µl	175 µl von Probe B	750 µg/ml
E	325 µl	325 µl von Probe C	500 µg/ml
F	325 µl	325 µl von Probe E	250 µg/ml
G	325 µl	325 µl von Probe F	125 µg/ml
H	400 µl	100 µl von Probe G	25 µg/ml
I	400 µl	0	0 µg/ml = <i>blank</i>

Als nächstes erfolgte die Vorbereitung der Reaktionslösung. Dazu wurden die Reaktionslösungen A und B (*Reagent A* und *Reagent B*) des *Kits* in einem Verhältnis von 50:1 vermischt. Die Menge der benötigten Reaktionslösung wurde zuvor wie folgt berechnet (# = Anzahl):

$$(\# \text{ Standards} + \# \text{ Unbekannten}) \times (\# \text{ Versuchsreihen}) \times (\text{Volumen der Reaktionslösung pro Probe})$$

2.8.5.2.3 Reaktion und Messung

Nach Beendigung der Vorbereitungen folgte die spektralphotometrische Bestimmung der Proteinkonzentration. Zu diesem Zwecke wurde eine flache, transparente 96-well-Mikrotiterplatte, wie in Abbildung 17 dargestellt, mit jeweils 25 µl der Standards und der Proben in zweifacher Versuchsbestimmung bestückt. Anschließend wurden

jeweils 200 μl der vorbereiteten Reaktionslösung in jedes bestückte Nöpfchen der Mikrotiterplatte pipettiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation der Mikrotiterplatte bei 37 °C. Dem schloss sich eine 5-minütige Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur sowie die zügige Messung der Proben im Analysegerät an.

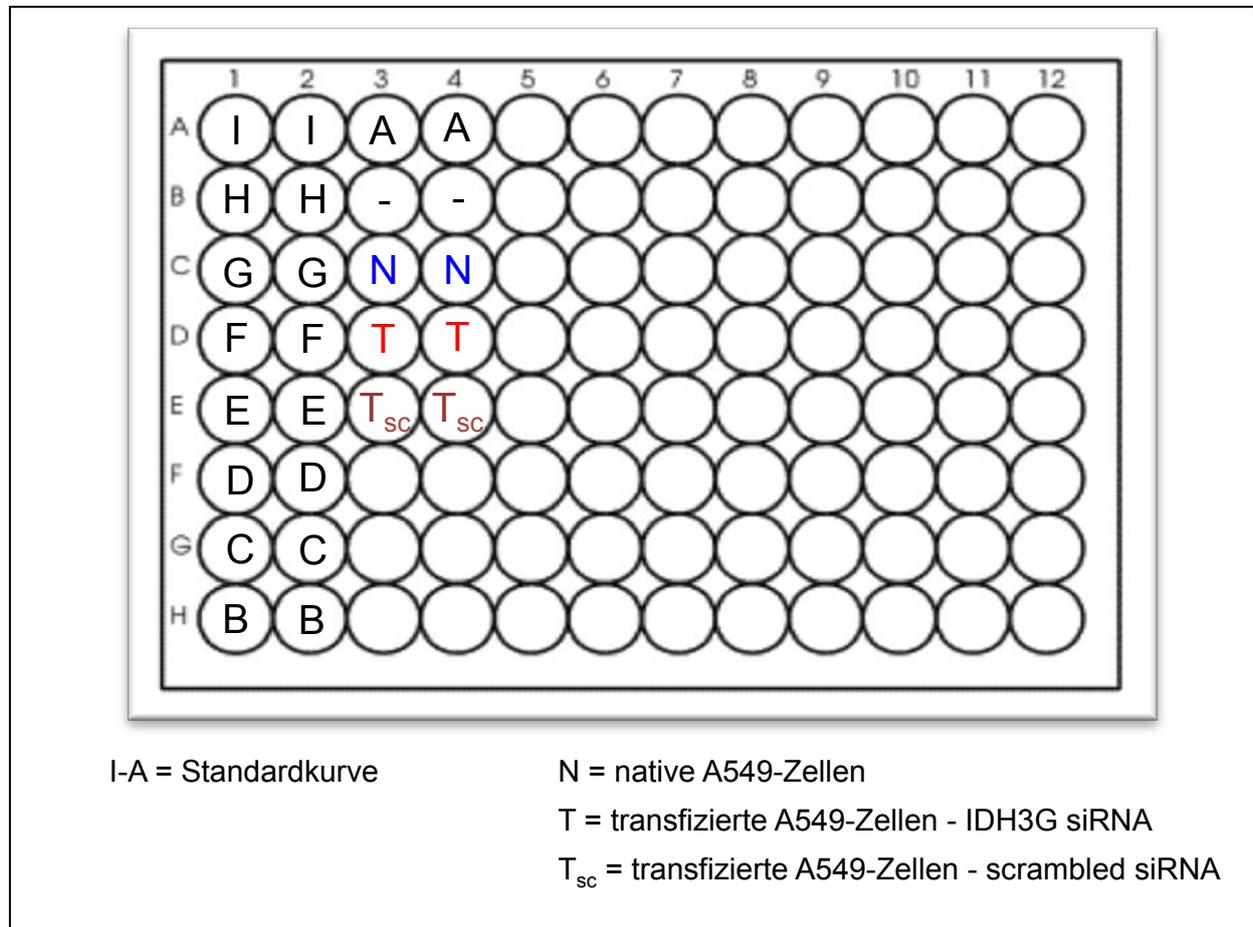


Abbildung 17: Pipettierschema des Assay zur Proteinbestimmung im Rahmen des Western Blot

Die Analyse und Berechnung erfolgte mithilfe der *SkantIt*[®]-Software von *Thermo Fisher Scientific*. Für die Berechnung der Proteinkonzentration wurde zunächst der Durchschnittswert des *blank* (= Probe I) von den Durchschnittswerten der Messungen der Standards und von den Durchschnittswerten der Proben abgezogen und eine entsprechende Standardkurve erstellt. Ziel war es, eine Proteinmenge von 20 μg aus den Lysatproben zu erhalten. Diese wurde zur Weiterverarbeitung mit *Aqua ad iniectabilia* auf eine Gesamtmenge von 20 μl verdünnt.

2.8.5.3 Western Blot

Im Rahmen dieser Dissertation sollte mittels Western Blot der Transfektionserfolg in A549-Zellen überprüft werden. Das Prinzip des Western Blot basiert darauf, dass Proteine auf eine Trägermembran übertragen, ihrer Größe nach in einem Elektrophoresegel aufgetrennt und anschließend mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Der Nachweis durch Antikörper erfolgt dabei in zwei Schritten. Zunächst bindet ein primärer Antikörper (1° AK) an die Proteine, die das von ihm zu erkennende, also das nachzuweisende Antigen enthalten. In einem zweiten Schritt bindet ein Enzym-gekoppeltes Immunkonjugat an den 1° AK. Dieses besteht aus einem signalbildenden Molekül, welches an einen weiteren, sekundären Antikörper (2° AK) gebunden ist. Durch das Enzym wird eine Chemolumineszenz-Reaktion katalysiert. Im Fall dieser Dissertation wurde ein Peroxidase-gekoppelter 2° AK verwendet. Die Peroxidase katalysiert die Oxidierung von Luminol, was letztendlich zu einer Schwärzung spezifischer Antigenbanden auf einem Röntgenfilm führt.

2.8.5.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mithilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine ihrer Molekülmasse nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Es handelt sich dabei um ein diskontinuierliches Gel-System. Im Fall dieser Dissertation wurden *NuPAGE™* BisTris-Gele von der Firma *Thermo Scientific* verwendet. Dies sind bereits vorgefertigte SDS-Polyacrylamid-Gele, welche umgehend einsetzbar sind; ein vorheriges Gießen der Gele entfiel somit. *NuPAGE™* BisTris-Gele sind Gradienten-Gele, d.h., das Gel weist einen graduell ansteigenden BisTris-Anteil von 4-12% auf. So vergrößert sich der Auftrennungsbereich. Zusätzlich zu den Gelen wurden spezielle, vorgemischte Puffer der *NuPAGE™*-Reihe verwendet.

Zunächst erfolgte die Probenaufbereitung. Dazu wurden jeweils 20 µl der Proteinproben für 5 Minuten bei 95 °C mit jeweils 5 µl des Probenpuffers (*NuPAGE™* LDS *Sample Buffer*) und 0,5 µl des *NuPAGE™* *Sample Reducing Agent* in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen inkubiert. So erfolgte einerseits die Denaturierung und somit Linearisierung der Proteine. Andererseits erhielten alle Proteine durch die Zugabe des Probenpuffers eine negative Ladung; erst so konnte eine Auftrennung der

Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts und nicht ihrer Eigenladung zufolge gewährleistet werden. Es folgte eine anschließende Kühlung der Proben auf Eis. Vor der Weiterverarbeitung wurden die Proben kurz an zentrifugiert. In einem zweiten Schritt erfolgte die Befüllung der Elektrophoresekammer mit dem Laufpuffer und die Beladung der Geltaschen des *NuPAGE™* BisTris-Gels mit den zuvor aufbereiteten Proben. Die erste Tasche wurde dabei mit einem Molekulargewichtsmarker bestehend aus 5 µl *Bench Mark Prestained Protein Ladder* und 2,5 µl *Magic Mark XP Western Standard* befüllt. Die weiteren Taschen wurden mit den aufbereiteten Proteinproben beladen. Daraufhin wurde das Gel bei 200 V für ca. 50 Minuten laufen gelassen.

2.8.5.3.2 Immundetektion

Zur Immundetektion der Proteine wurden diese nach der Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde zunächst ein Transferpuffer angesetzt und die Nitrozellulosemembran sowie die für den Transfer benötigten Schwämme und Filter in dem Transferpuffer angefeuchtet. Als nächstes erfolgte die Stapelung der Utensilien wie folgt: Schwamm-Schwamm-Filter-Gel-Membran-Filter-Schwamm-Schwamm-Schwamm. Anschließend wurden die Proteine für 75 Minuten bei 30 V geblottet.

Aufgrund der hohen Bindungskraft von Nitrozellulosemembranen für Proteine wurde diese nach dem Proteintransfer zunächst abgesättigt, um eine unspezifische Bindung des 1° AK an die Membran zu verhindern. Dazu wurde die Membran mit einer Blockierlösung (= *Blocking* Puffer) bestehend aus Waschpuffer und 5 % Milchpulver für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Als nächstes erfolgte die erste Immunreaktion. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran mit dem 1° AK über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Als 1° AK diente der IDH3A-Antikörper der Firma *GenWay Biotech*. Dies ist ein polyklonaler AK, der in Hasen hergestellt wird. Er war in einer Konzentration 1:800 mit *Aqua ad iniectabilia* und 5 % Milchpulver verdünnt worden; pro Membran wurden 10 ml dieser AK-Verdünnung verwendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran viermalig für 10 Minuten mit dem Waschpuffer auf dem Schüttler gespült. Daran schloss sich eine einstündige Inkubation der Membran mit dem 2° AK bei Raumtemperatur auf dem Schüttler an. Als 2° AK wurde ein Peroxidase-gekoppelter *anti-rabbit* IgG-AK der

Firma *GE Healthcare* verwendet. Der 2° AK wurde vor Verwendung mit der Blockierlösung in einem Verhältnis von 1:10.000 verdünnt. Es erfolgte eine weitere, viermalige Waschung der Membran mit Waschpuffer für jeweils 15 Minuten. Daran schloss sich eine einmalige Waschung mit PBS für 10 Minuten an.

Als letztes erfolgte die Detektion mit einem Elektrochemilumineszenz-(ECL-)Kit (*Pierce™ ECL Plus Western Blotting Detection Reagent*). Dazu wurden die Detektionsreagenzien A und B in einem Verhältnis von 1:40 gemischt und 2 ml davon auf die Membran gegeben. Es folgte eine 5-minütige Inkubation unter Lichtausschluss. Anschließend wurde die Membran innerhalb einer *Hypercassette™* luftblasenfrei mit einer Projekthülle abgedeckt und auf einem Röntgenfilm für 3 - 6 Minuten exponiert. Durch die elektrisch evozierte Interaktion der Reaktionspartner kam es so zu einer Lichtemission, welche durch die Schwärzung eines Röntgenfilms eine qualitative Analyse des Western Blot ermöglichte.

2.9 Grafische Darstellung und Statistik

Die grafische Darstellung der erhobenen Daten erfolgte mithilfe des Softwareprogramms *SigmaPlot* der Firma *Systat Software, Inc.* (USA). Die Daten wurden mithilfe des Computerprogramms *SigmaStat* derselben Firma auf statistische Signifikanz hin analysiert und die Werte, sofern nicht anders deklariert, als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Für Vergleiche innerhalb sowie zwischen den Gruppen wurden Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Mehrfach wiederholte Experimente wurden zusätzlich mithilfe des *Wilcoxon-Mann-Whitney*-Tests untersucht. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Der Einfluss von Hypokapnie auf die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in A549-Zellen *in vitro*

Zur Messung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ wurden sowohl die nativen als auch die transfizierten A549-Zellen und deren Kontrollen (*scrambled* siRNA) wie unter 2.2, 2.3 und 2.5 beschrieben vorbereitet. Nach 40-minütiger Inkubation mit Fura-2-AM und anschließender Waschung erfolgte die eigentliche fluoreszenzmikroskopische Messung. Durch die Anreicherung der freien Ca^{2+} -Ionen im Zytosol mit Fura-2 konnten die einzelnen Zellen voneinander abgegrenzt werden, was eine Messung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ über den gesamten Versuchsablauf hinweg ermöglichte und zusätzlich eine Beurteilung der räumlichen Veränderungen der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ im zweidimensionalen Raum in Echtzeit erlaubte. Die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ wurde mithilfe des Quotienten (*Ratio*) aus der Verrechnung beider Anregungswellenlängen (340 nm und 380 nm) ermittelt. Eine niedrige *Ratio* und somit blaue Areale stehen für Ca^{2+} -arme Zellbereiche, eine hohe *Ratio* und somit hohe $[Ca^{2+}]_{zyt}$ spiegeln sich in roten Arealen wieder.

3.1.1 Native A549-Zellen

Eine Hypokapnie führte in nativen A549-Zellen *in vitro* zu einer signifikanten Abnahme der $[Ca^{2+}]_{zyt}$. Unter Ausgangsbedingungen lag die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ durchschnittlich bei $83,41 \text{ nM} \pm 18,65 \text{ nM}$. Ein Austausch des normokapnischen HBS-Puffers durch hypokapnischen HBS-Puffer führte zu einer durchschnittlichen Abnahme der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ um $28,61 \text{ nM} \pm 3,10 \text{ nM}$ im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen. Wie die Abbildung 19 veranschaulicht, war dieser Vorgang reversibel: Ein Austausch des hypokapnischen HBS-Puffers durch normokapnischen HBS-Puffer führte zu einem erneuten Anstieg der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ auf vorherige Ausgangswerte.

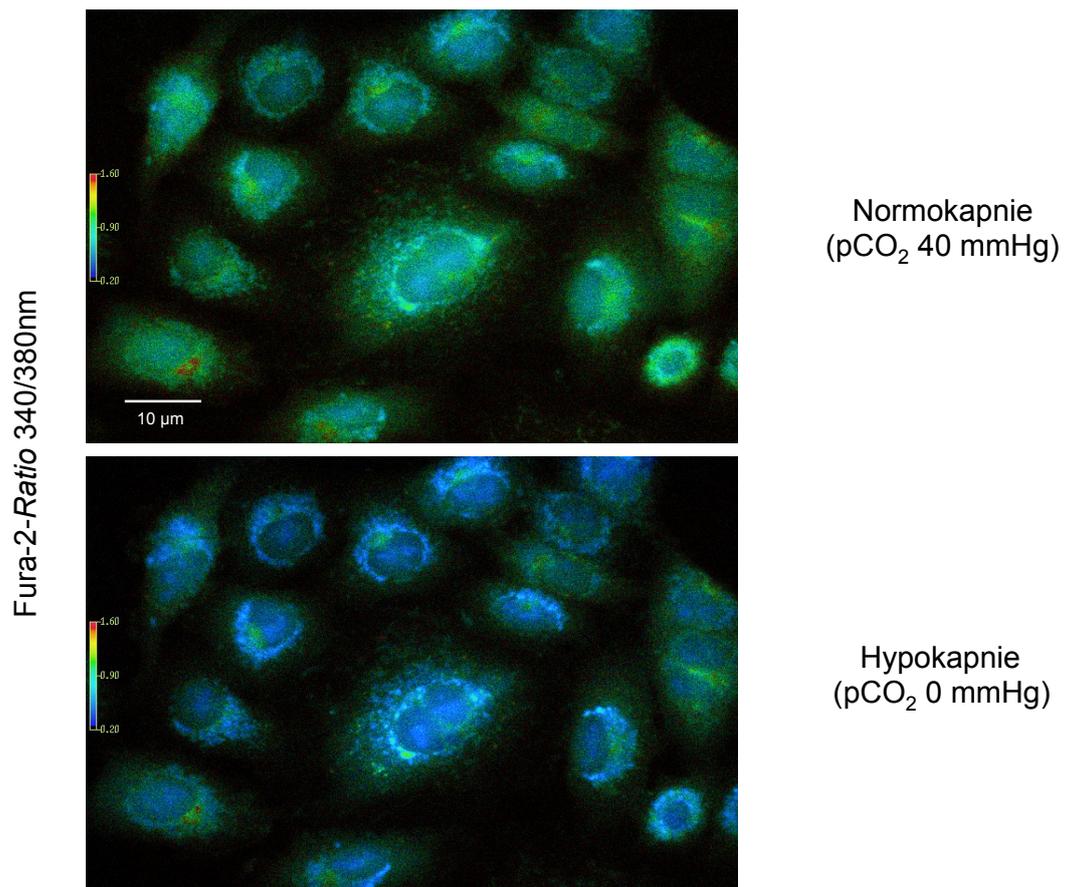


Abbildung 18: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mehrerer nativer A549-Zellen *in vitro* dargestellt als Fura-2-Ratio von 340/380 nm in Falschfarbendarstellung unter Normokapnie (oben) und Hypokapnie (unten). Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4. Die einzelnen Zellen können durch das angefärbte Ca²⁺ im Zytosol voneinander abgegrenzt werden, eine Messung der [Ca²⁺]_{zyt} in jeder einzelnen Zelle ist so möglich.

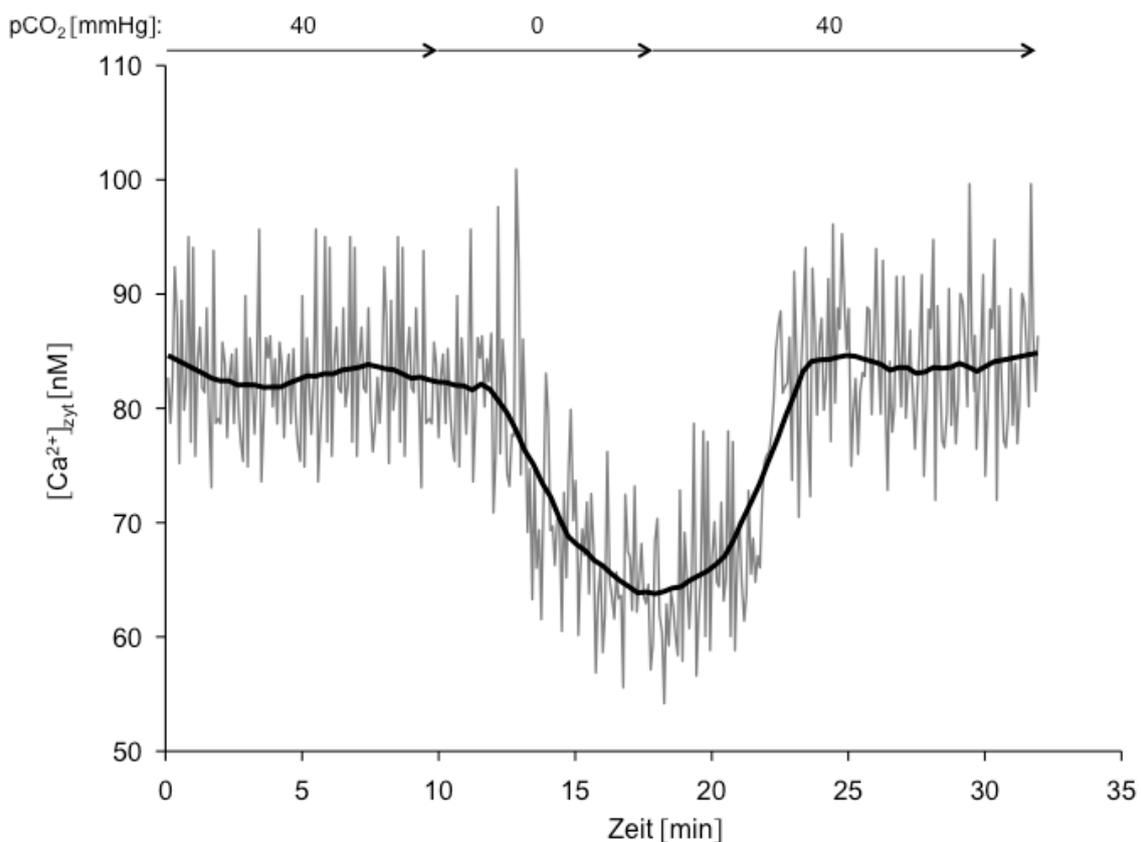


Abbildung 19: Repräsentative grafische Darstellung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in einer nativen A549-Zelle *in vitro* über die Zeit eines Versuches unter Ausgangsbedingungen (pCO_2 40 mmHg), nach Wechsel des normokapnischen HBS-Puffers durch hypokapnischen HBS-Puffer (pCO_2 0 mmHg) sowie nach erneuter Etablierung einer Normokapnie (pCO_2 40 mmHg). Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4. Graue Linie: $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Oszillationen und deren Veränderungen während des Versuchsverlaufs. Schwarze Linie: Mittelwerte der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Oszillationen.

Um sicher zu stellen, dass die gemessenen Veränderungen der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ tatsächlich auf die Hypokapnie und nicht auf den alleinigen Austausch des HBS-Puffers an sich zurückzuführen waren, wurden Kontrollversuche durchgeführt. Wie die Abbildungen 20 und 21 zeigen, führte der Austausch des normokapnischen HBS-Puffers durch erneut normokapnischen HBS-Puffer zu keiner signifikanten Änderung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen. Im Vergleich zum Ausgangswert von $83,41 \text{ nM} \pm 18,65 \text{ nM}$ betrug die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ nach erneuter Normokapnie durchschnittlich $85,34 \text{ nM} \pm 16,82 \text{ nM}$. Die Zugabe von $100 \text{ } \mu\text{M}$ ATP als Positivkontrolle zur Vitalitätsüberprüfung der Zellen führte zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ auf $543,63 \text{ nM} \pm 110,27 \text{ nM}$.

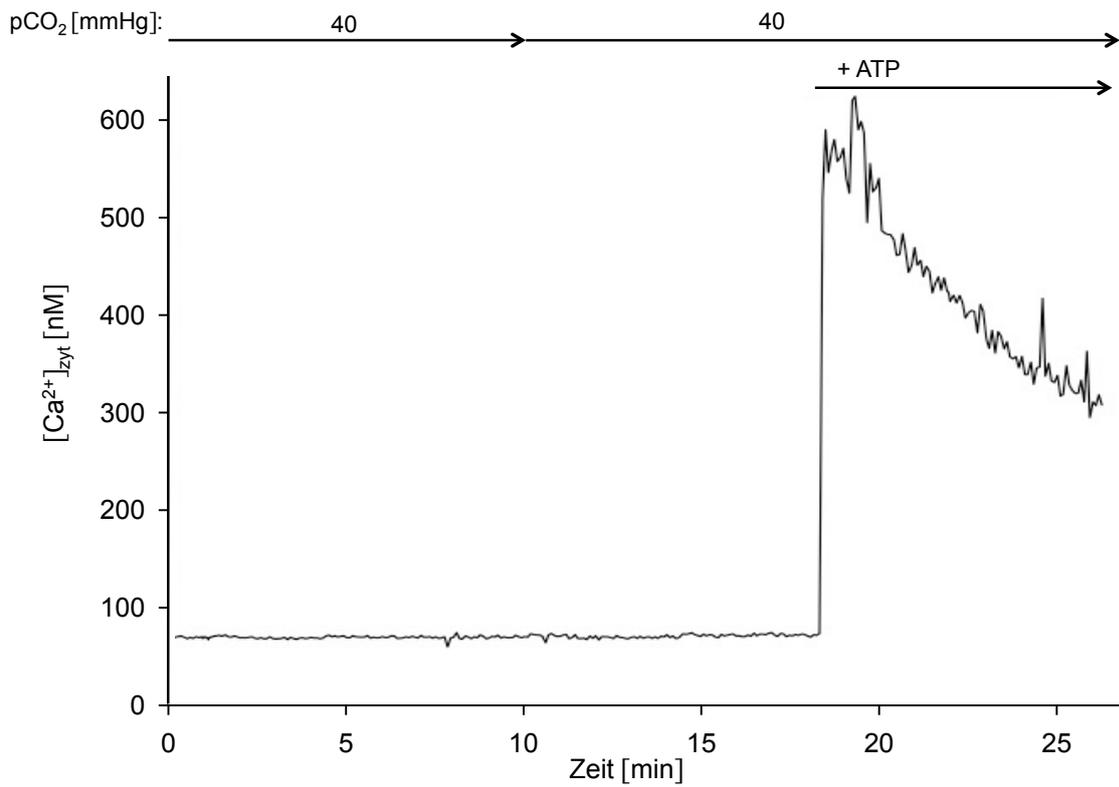


Abbildung 20: Repräsentative grafische Darstellung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in einer nativen A549-Zelle *in vitro* über die Zeit eines Versuchs unter Ausgangsbedingungen (pCO_2 von 40 mmHg), nach Wechsel des HBS-Puffers ebenfalls bei einem pCO_2 von 40 mmHg sowie nach Zugabe von 100 μM ATP (Kontrollversuche). Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4.

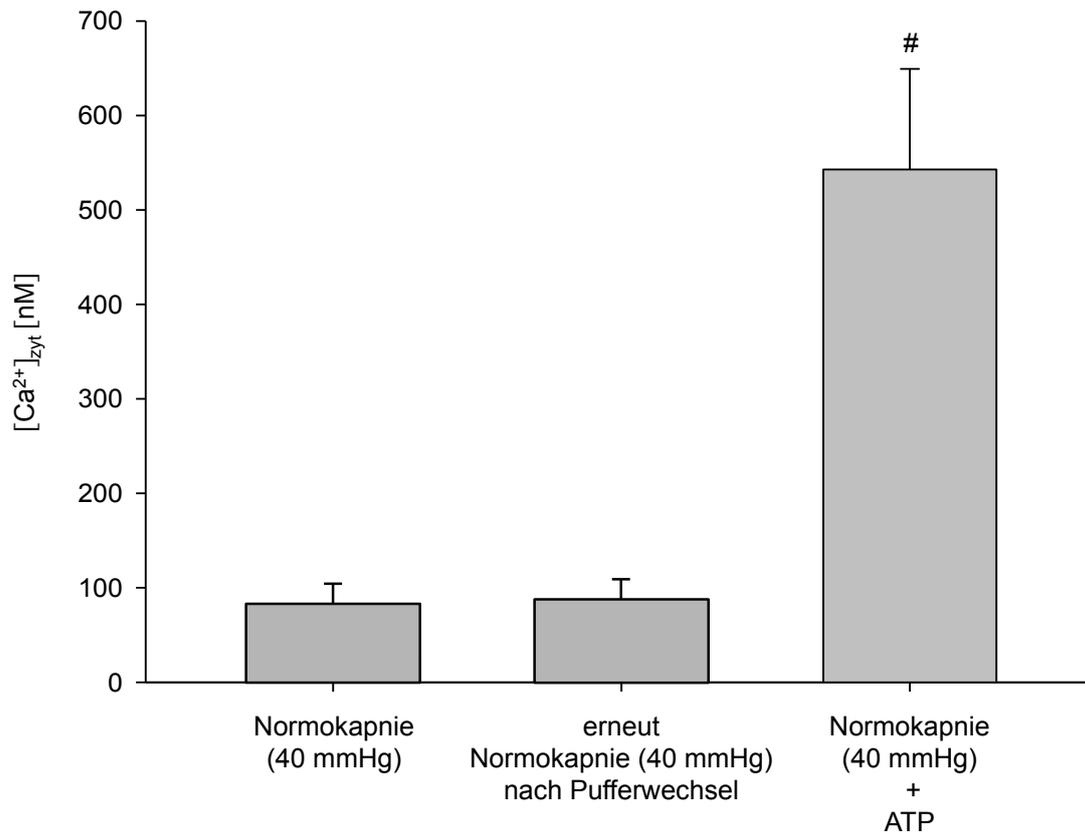


Abbildung 21: Gruppenanalyse der maximalen $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Antworten in nativen A549-Zellen *in vitro* unter Ausgangsbedingungen (Normokapnie), nach Pufferwechsel durch erneut normokapnischen HBS-Puffer und nach Zugabe von 100 μ M ATP (Kontrollversuche). Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4. Dargestellt als MW \pm SD. # = $p < 0,05$ vs. Ausgangsbedingungen. $n = 10$.

3.1.2 Transfizierte A549-Zellen

Zur Untersuchung der Rolle der mitochondrialen IDH3 im Prozess der alveolären CO₂-Registrierung wurde diese mittels *Gen-Knock-Down* herunterreguliert. Eine Hypokapnie führte in transfizierten A549-Zellen *in vitro* zu keiner signifikanten Veränderung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$. Ein Austausch des normokapnischen HBS-Puffers durch hypokapnischen HBS-Puffer resultierte lediglich in einer durchschnittlichen Abnahme der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ um 1,06 nM \pm 3,10 nM im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen (Normokapnie). Um sicherzustellen, dass die Herunterregulierung der IDH3 mittels *Gen-Knock-Down* keinen Einfluss auf andere Zellfunktionen hatte, wurden Versuche mit einer entsprechenden *scrambled* siRNA durchgeführt. Eine Hypokapnie führte in A549-Zellen mit der *scrambled* siRNA *in vitro* zu einer signifikanten Abnahme der

$[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$ um durchschnittlich $26,14 \text{ nM} \pm 3,98 \text{ nM}$ im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen (Normokapnie).

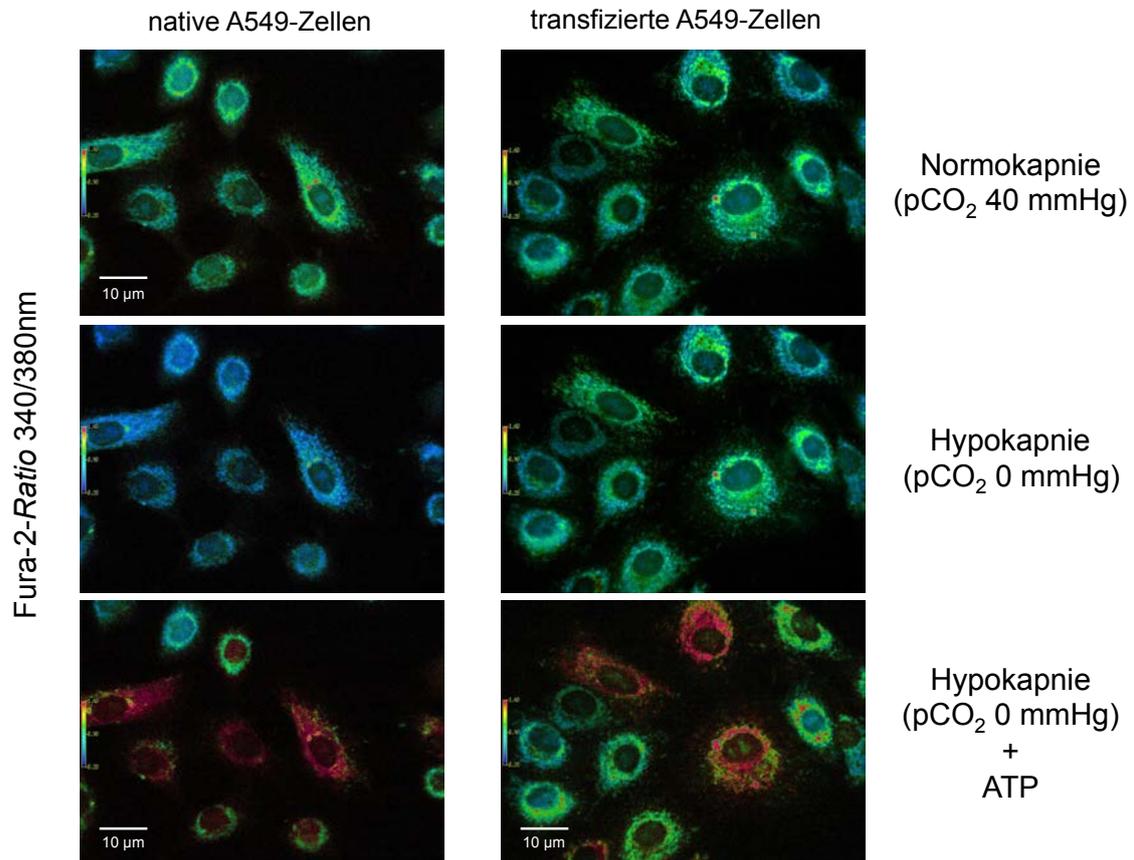


Abbildung 22: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mehrerer nativer A549-Zellen (links) im Vergleich mit transfizierten A549-Zellen (rechts) *in vitro* dargestellt als Fura-2-Ratio von 340/380 nm in Falschfarbendarstellung unter Normokapnie (oben) und Hypokapnie (Mitte) sowie unter Hypokapnie nach Zugabe von $100 \mu\text{M}$ ATP. Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4. Auch hier können die Zellen durch das angefärbte Ca^{2+} im Zytosol voneinander abgegrenzt und die $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$ in jeder einzelnen Zelle gemessen werden.

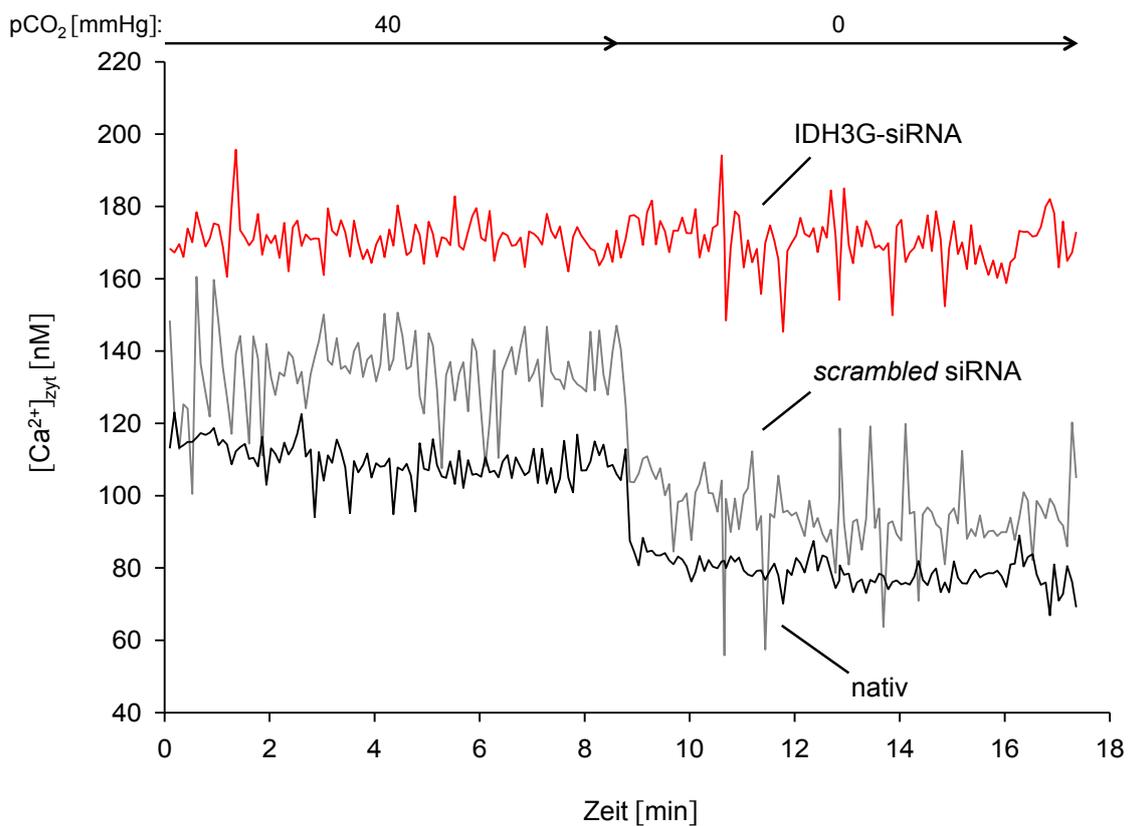


Abbildung 23: Repräsentative grafische Darstellung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ über die Zeit eines Versuches in einer nativen A549-Zelle (schwarzer Graph), in einer transfizierten A549-Zelle (IDH3G-siRNA, roter Graph) und einer Kontroll-A549-Zelle (scrambled siRNA, grauer Graph) *in vitro* unter Ausgangsbedingungen (pCO_2 40 mmHg) sowie nach Wechsel des normokapnischen HBS-Puffers durch hypokapnischen HBS-Puffer (pCO_2 0 mmHg). Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4.

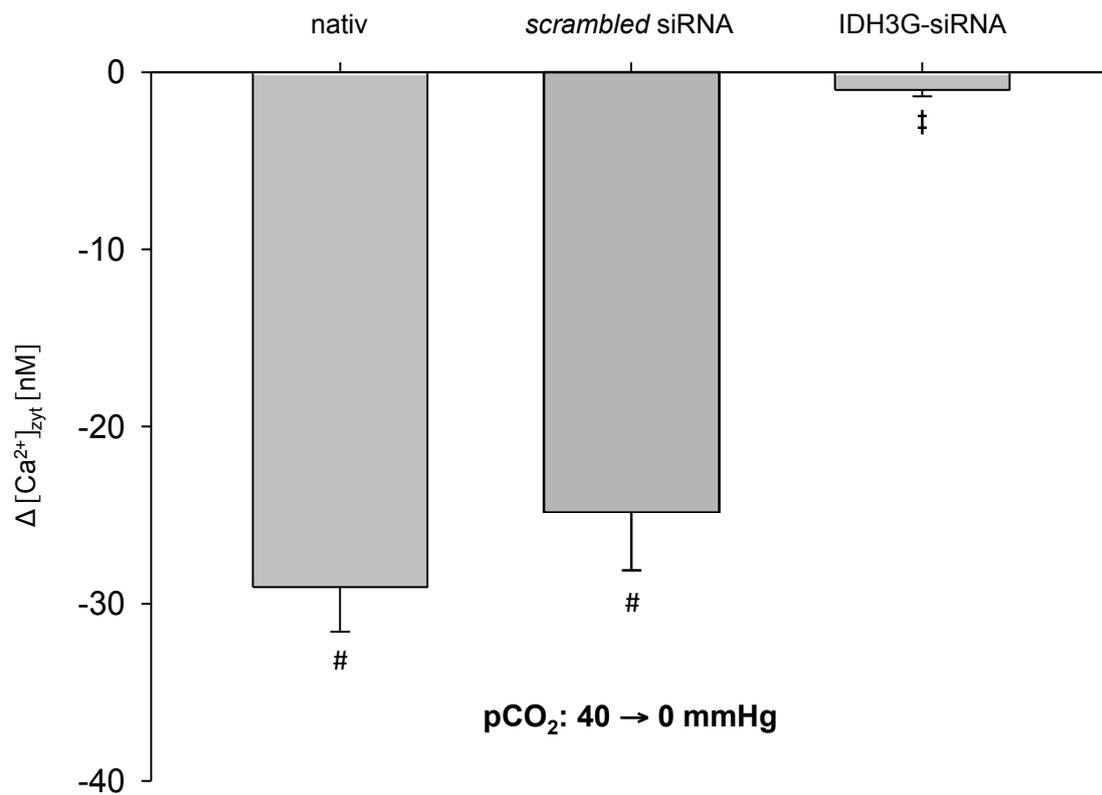


Abbildung 24: Gruppenanalyse der maximalen $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Antworten nach 10-minütiger Hypokapnie in nativen A549-Zellen im Vergleich mit transfizierten A549-Zellen (IDH3G-siRNA) und deren Kontrollen (A549-Zellen mit *scrambled* siRNA) *in vitro*. Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4. Dargestellt als MW \pm SD. # = $p < 0,05$ vs. Normokapnie in nativen A549-Zellen. ‡ = $p < 0,05$ vs. Normokapnie in nativen A549-Zellen/Kontroll-A549-Zellen (*scrambled* siRNA). n=10.

3.2 Der Einfluss von Hypokapnie auf die $[Ca^{2+}]_{mito}$ in A549-Zellen *in vitro*

Zur Messung der $[Ca^{2+}]_{mito}$ wurden sowohl die nativen als auch die transfizierten A549-Zellen und deren Kontrollen wie unter 2.2, 2.3 und 2.5 beschrieben vorbereitet. Nach 40-minütiger Inkubation mit Rhod-2-AM und anschließender Waschung erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Messung. Durch die Anreicherung der freien Ca^{2+} -Ionen in den Mitochondrien mit Rhod-2 konnten die einzelnen Zellen voneinander abgegrenzt werden, was eine Messung der $[Ca^{2+}]_{mito}$ über den gesamten Versuchsablauf hinweg ermöglichte und zusätzlich eine Beurteilung der räumlichen Veränderungen der $[Ca^{2+}]_{mito}$ im zweidimensionalen Raum in Echtzeit erlaubte. Die $[Ca^{2+}]_{mito}$ wurde dabei nicht direkt gemessen, sondern mithilfe der Fluoreszenzintensität von Rhod-2 nach Lichtexzitation der A549-Zellen mit einer Wellenlänge von 545 nm ermittelt. Die darauf folgende Lichtemission von 560 nm wurde von der Kamera aufgefangen und mit der *MetaFluor® Imaging Software* in Grauwerten im Sinne von Helligkeitswerten dargestellt. Eine Zunahme der Fluoreszenzintensität von Rhod-2 spiegelte somit eine Zunahme der $[Ca^{2+}]_{mito}$ wider, während eine Abnahme der Fluoreszenzintensität von Rhod-2 auch eine Abnahme der $[Ca^{2+}]_{mito}$ repräsentierte.

3.2.1 Native A549-Zellen

Eine Hypokapnie führte in nativen A549-Zellen *in vitro* zu einer signifikanten Zunahme der $[Ca^{2+}]_{mito}$. Unter Ausgangsbedingungen lag die Fluoreszenzintensität von Rhod-2 durchschnittlich bei $246,73 \pm 39,81$ (Grauwertintensität, entspricht 100 %). Ein Austausch des normokapnischen HBS-Puffers durch hypokapnischen HBS-Puffer führte zu einer durchschnittlichen Zunahme der Fluoreszenzintensität von Rhod-2 auf $545,27 \pm 38,66$ (Grauwertintensität, entspricht einem Anstieg um 121% der Ausgangsbedingungen). Wie die Abbildung 26 veranschaulicht, war dieser Vorgang reversibel: Ein Austausch des hypokapnischen HBS-Puffers durch normokapnischen HBS-Puffer führte zu einem erneuten Abfall der Fluoreszenzintensität von Rhod-2 und somit auch der $[Ca^{2+}]_{mito}$ auf vorherige Ausgangswerte.

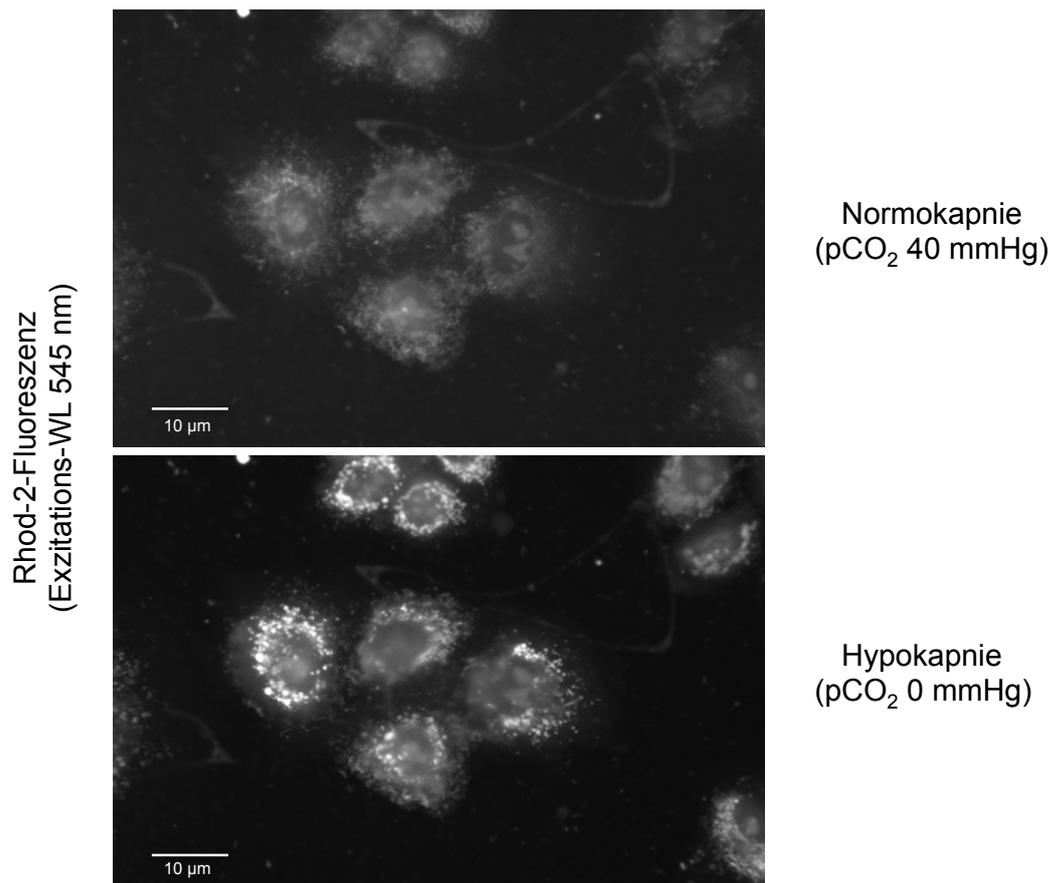


Abbildung 25: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von nativen A549-Zellen *in vitro* unter Normokapnie (oben) und Hypokapnie (unten) nach Exzitation mit einer Wellenlänge von 545 nm zur Messung der Fluoreszenzintensität von Rhod-2 und somit zur Ermittlung der $[Ca^{2+}]_{mito}$. Der pH-Wert ist konstant bei 7,4. Der spezifische Fluoreszenzindikator ermöglicht eine Abgrenzung der einzelnen Zellen voneinander und somit die Messung der $[Ca^{2+}]_{mito}$ in jeder einzelnen Zelle.

Durch eine Blockade des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette mittels Rotenon erfolgte die Inhibierung des NADH-vermittelten mitochondrialen Elektronentransports. Die Rolle der Mitochondrien in der alveolären CO₂-Registrierung sollte so in einem ersten Schritt näher beleuchtet werden. Nach Zugabe von Rotenon führte eine anschließende Hypokapnie zu einer signifikant geringeren Veränderung der $[Ca^{2+}]_{mito}$ im Vergleich zu den Versuchen ohne vorherige Blockade des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Die Fluoreszenzintensität von Rhod-2 stieg lediglich um 12 % des Ausgangswertes auf $276,12 \pm 2,42$ (Grauwertintensität).

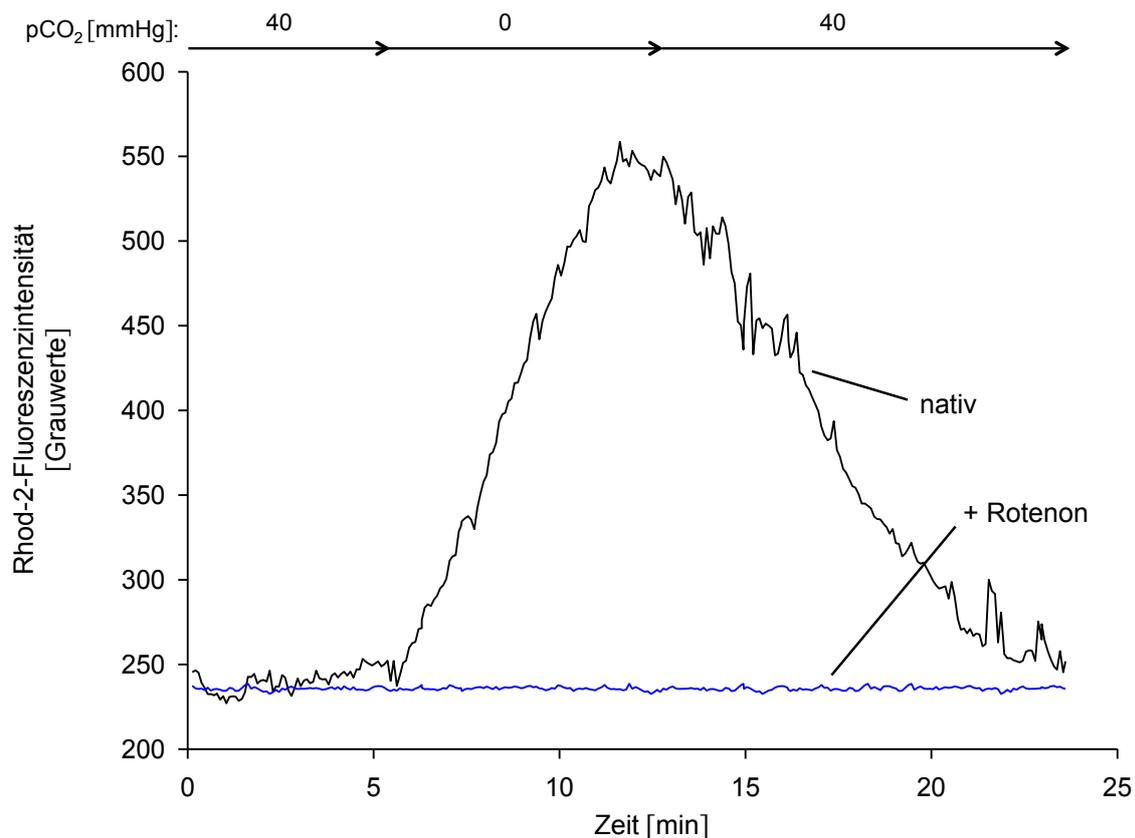


Abbildung 26: Repräsentative grafische Darstellung der Rhod-2-Fluoreszenzintensität über die Zeit eines Versuches in einer nativen A549-Zelle (schwarzer Graph) und einer nativen A549-Zelle nach Zugabe von 50 μM Rotenon (blauer Graph) *in vitro* unter Ausgangsbedingungen (pCO_2 40 mmHg), nach Wechsel des normokapnischen HBS-Puffers durch hypokapnischen HBS-Puffer (pCO_2 0 mmHg) sowie nach erneuter Etablierung einer Normokapnie (pCO_2 40 mmHg). Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4.

Um sicher zu stellen, dass die gemessenen Veränderungen der Fluoreszenzintensität von Rhod-2 tatsächlich auf die Hypokapnie und nicht auf den alleinigen Austausch des HBS-Puffers an sich zurückzuführen waren, wurden Kontrollversuche durchgeführt. Wie die Abbildungen 27 und 28 zeigen, führte der Austausch des normokapnischen HBS-Puffers durch erneut normokapnischen HBS-Puffer zu keiner signifikanten Veränderung der Fluoreszenzintensität von Rhod-2. Im Vergleich zum Ausgangswert von $246,73 \pm 39,81$ (Grauwertintensität) betrug die Fluoreszenzintensität von Rhod-2 nach erneuter Normokapnie durchschnittlich $249,13 \pm 40,24$ (Grauwertintensität, entspricht 101 %). Die Zugabe von 100 μM ATP als Positivkontrolle zur Vitalitätsüberprüfung der Zellen führte zu einem Anstieg der

Fluoreszenzintensität von Rhod-2 um 36 % des Ausgangswertes auf $336,72 \pm 45,34$ (Grauwertintensität).

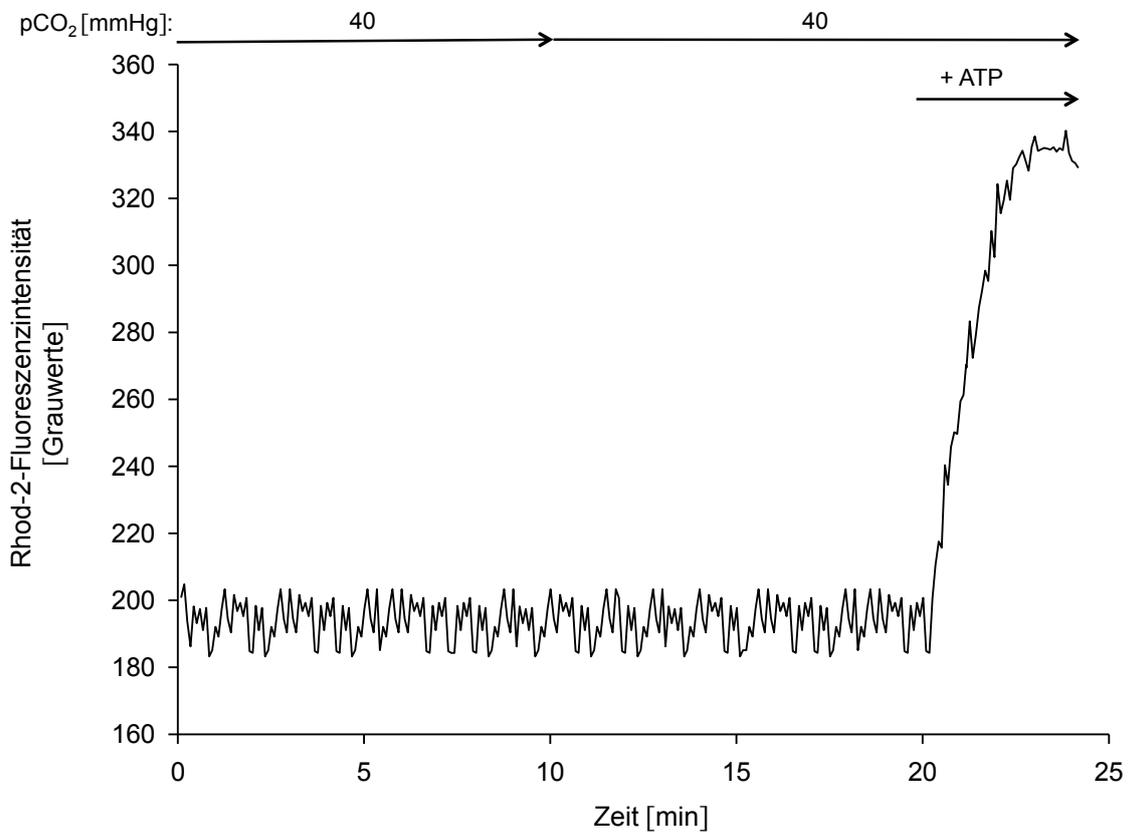


Abbildung 27: Repräsentative grafische Darstellung der Fluoreszenzintensität von Rhod-2 über die Zeit eines Versuches in einer nativen A549-Zelle *in vitro* unter Ausgangsbedingungen (pCO₂ von 40 mmHg), nach Wechsel des HBS-Puffers ebenfalls bei einem pCO₂ von 40 mmHg sowie nach Zugabe von 100 μ M ATP (Kontrollversuch). Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4.

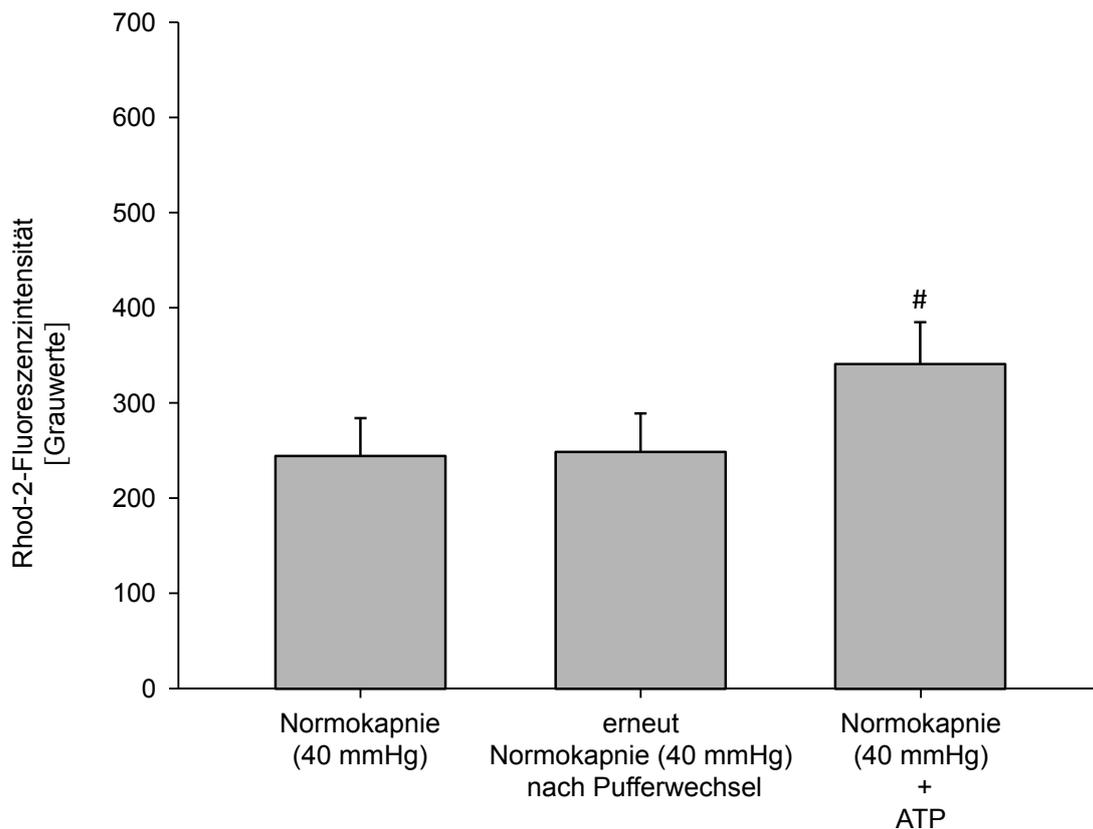


Abbildung 28: Gruppenanalyse der maximalen Anstiege der Fluoreszenzintensität von Rhod-2 in nativen A549-Zellen *in vitro* unter Ausgangsbedingungen (Normokapnie), nach Pufferwechsel durch erneut normokapnischen HBS-Puffer und nach Zugabe von 100 μ M ATP (Kontrollversuche). Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4. Dargestellt als MW \pm SD. # = $p < 0,05$ vs. Ausgangsbedingungen. $n=10$.

3.2.2 Transfizierte A549-Zellen

Zur Untersuchung der Rolle der mitochondrialen IDH3 im Prozess der alveolären CO_2 -Registrierung wurde diese mittels *Gen-Knock-Down* herunterreguliert. Eine Hypokapnie führte in transfizierten A549-Zellen *in vitro* zu einer signifikant geringeren Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen (Normokapnie). Ein Austausch des normokapnischen HBS-Puffers durch hypokapnischen HBS-Puffer resultierte lediglich in einer durchschnittlichen Zunahme der Fluoreszenzintensität von Rhod-2 um 29 % des Ausgangswertes auf $321,75 \pm 9,92$ (Grauwertintensität). Um sicherzustellen, dass die Herunterregulierung der IDH3 keinen Einfluss auf andere Zellfunktionen hatte, wurden auch hier Versuche mit einer entsprechenden *scrambled* siRNA durchgeführt. Eine Hypokapnie führte in A549-

Zellen mit der *scrambled* siRNA *in vitro* zu einer signifikanten Zunahme der Fluoreszenzintensität von Rhod-2 um durchschnittlich 101 % des Ausgangswertes auf $497,19 \pm 40,01$ (Grauwertintensität).

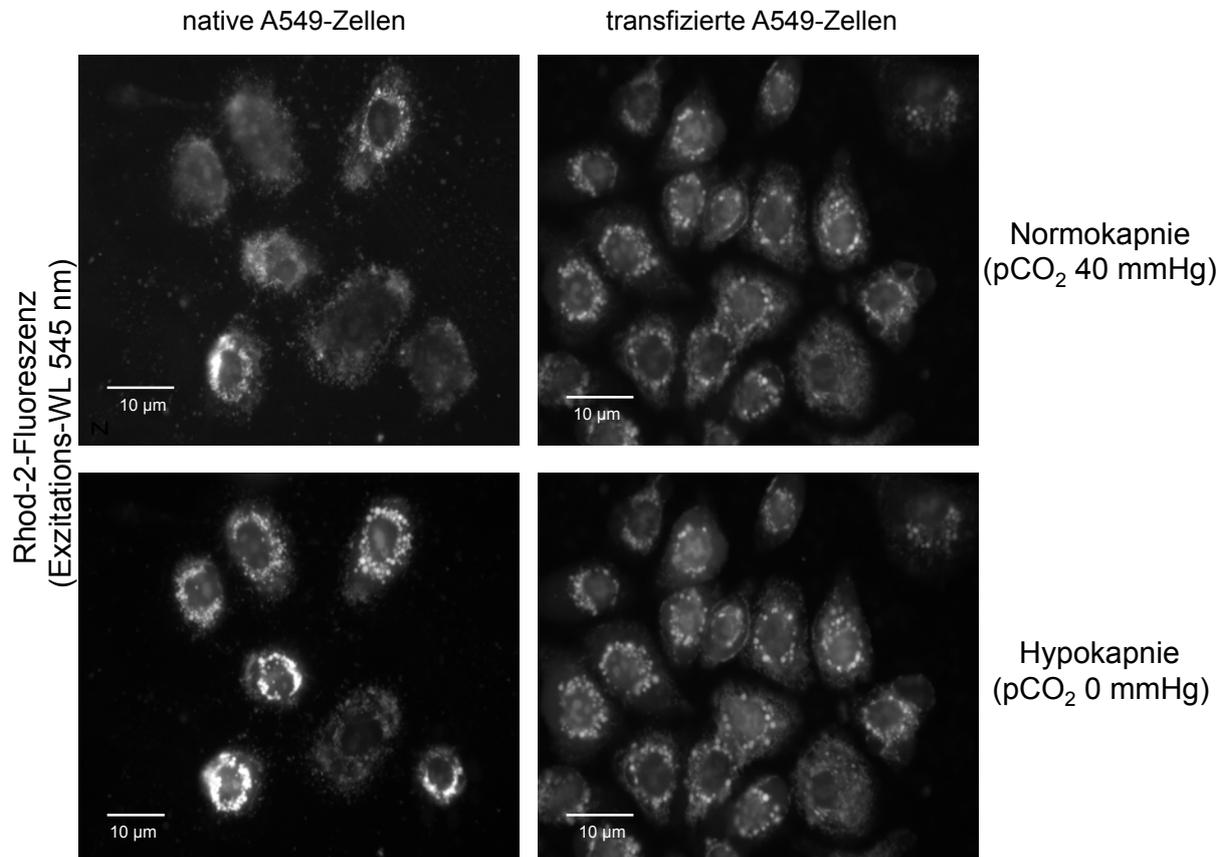


Abbildung 29: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mehrerer nativer A549-Zellen (links) im Vergleich mit transfizierten A549-Zellen (rechts) *in vitro* unter Normokapnie (oben) und Hypokapnie (unten) nach Exzitation mit einer Wellenlänge von 545 nm zur Messung der Fluoreszenzintensität von Rhod-2 und somit zur Ermittlung der $[Ca^{2+}]_{mito}$. Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4. Auch hier ermöglicht die Applikation eines spezifischen Indikators die Abgrenzung der einzelnen Zellen voneinander und somit die Messung der $[Ca^{2+}]_{mito}$ in jeder einzelnen Zelle.

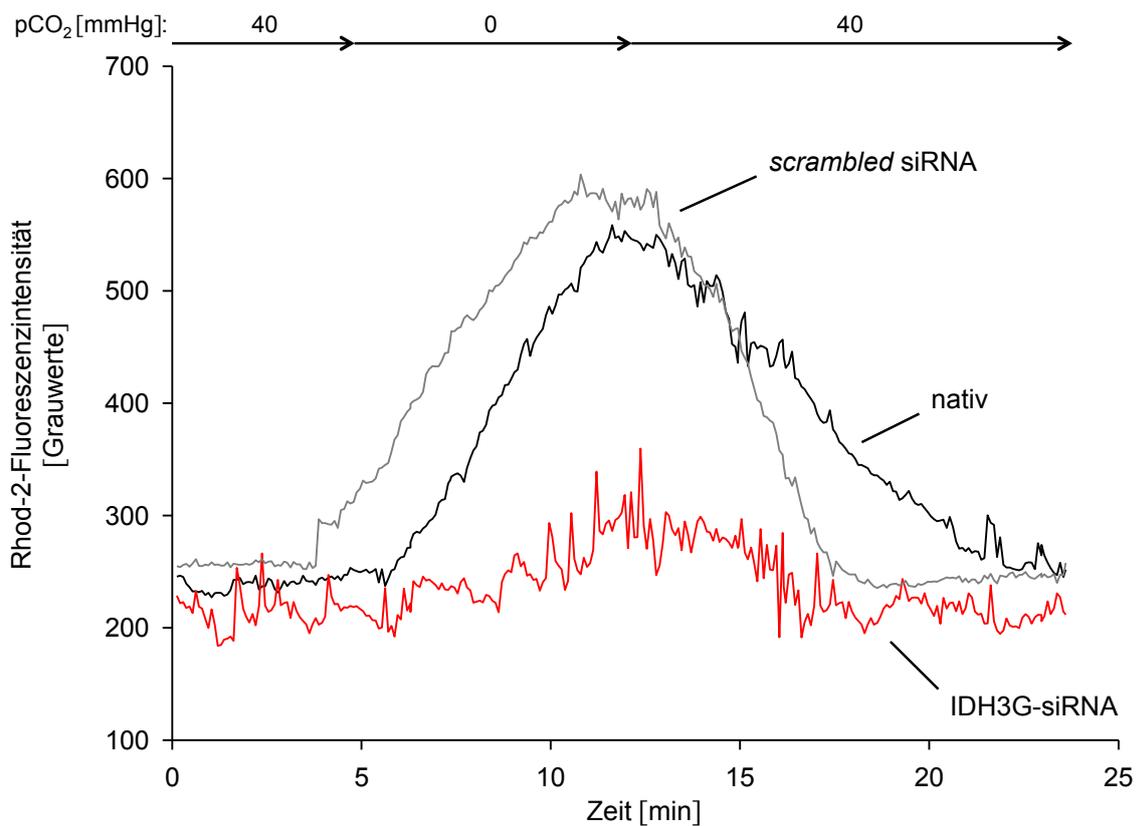


Abbildung 30: Repräsentative grafische Darstellung der Fluoreszenzintensität von Rhod-2 über die Zeit eines Versuches in einer nativen A549-Zelle (schwarzer Graph), in einer transfizierten A549-Zelle (IDH3G-siRNA, roter Graph) und in einer Kontroll-A549-Zelle (*scrambled* siRNA, grauer Graph) *in vitro* unter Ausgangsbedingungen (pCO₂ 40 mmHg), nach Wechsel des normokapnischen HBS-Puffers durch hypokapnischen HBS-Puffer (pCO₂ 0 mmHg) sowie nach erneuter Etablierung einer Normokapnie (pCO₂ 40 mmHg). Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4.

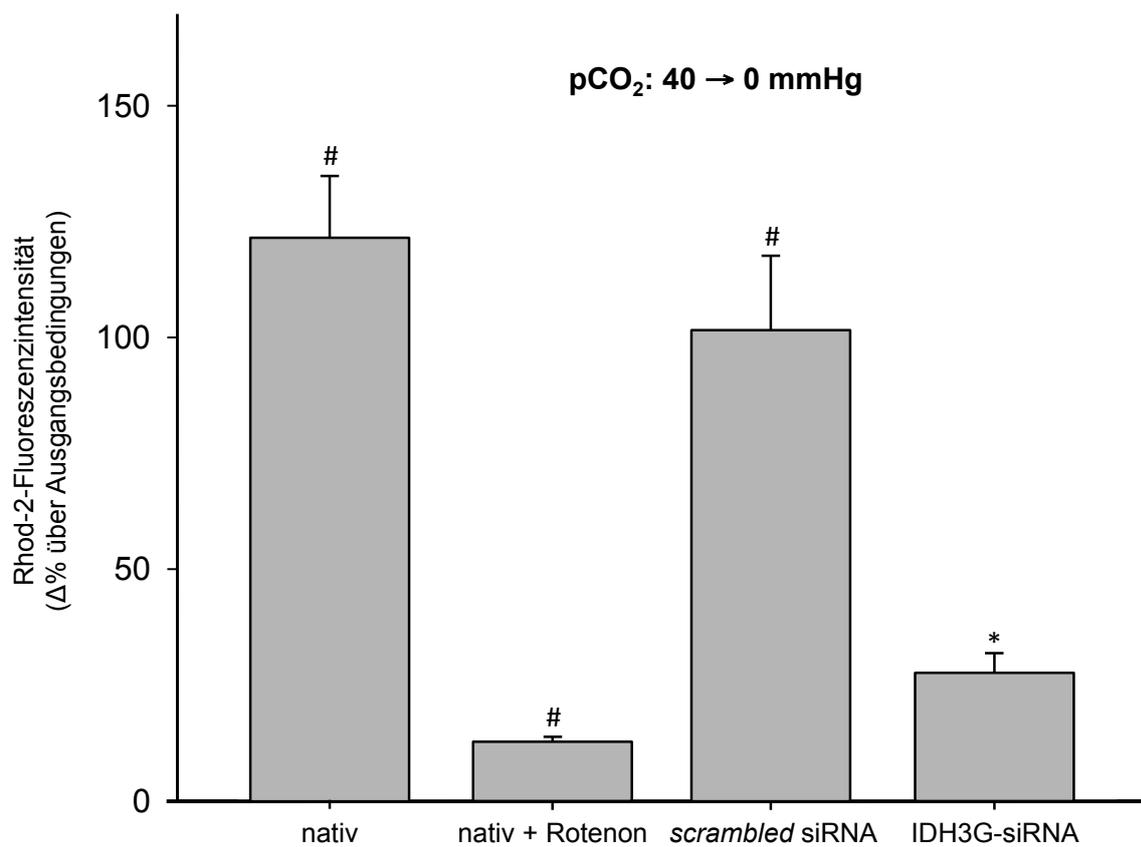


Abbildung 31: Gruppenanalyse der maximalen Anstiege der Fluoreszenzintensität von Rhod-2 nach 10-minütiger Hypokapnie in nativen A549-Zellen im Vergleich mit nativen A549-Zellen nach Zugabe von 50 μ M Rotenon sowie mit transfizierten A549-Zellen (IDH3G-siRNA) und deren Kontrollen (A549-Zellen mit *scrambled* siRNA) *in vitro*. Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4. Dargestellt als MW \pm SD. # = $p < 0,05$ vs. Normokapnie in nativen A549-Zellen. * = $p < 0,05$ vs. Normokapnie in nativen A549-Zellen/Kontroll-A549-Zellen (*scrambled* siRNA). $n=10$.

3.3 Der Einfluss von Hypokapnie auf das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ in A549-Zellen *in vitro*

Zur Messung des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ wurden sowohl die nativen als auch die transfizierten A549-Zellen und deren Kontrollen wie unter 2.2, 2.3 und 2.5 beschrieben vorbereitet. Nach 20-minütiger Inkubation mit TMRM⁺ und anschließender Waschung erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Messung. Die Färbung der A549-Zellen mit dem spezifischen Fluoreszenzindikator TMRM⁺ ermöglicht eine Abgrenzung der einzelnen Zellen voneinander und somit die Messung des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ in jeder einzelnen Zelle. Das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ wurde dabei nicht direkt gemessen, sondern mithilfe der Fluoreszenzintensität von TMRM⁺ nach Lichtexzitation der A549-Zellen mit einer Wellenlänge von 560 nm ermittelt. Die darauf folgende Lichtemission von 590 nm wurde von der Kamera aufgefangen und mit der *MetaFluor® Imaging Software* in Grauwerten im Sinne von Helligkeitswerten dargestellt. Da TMRM⁺ innerhalb der Zellen keine spezifischen Bindungen eingeht, sondern konzentrationsabhängig innerhalb anionischer Zellareale akkumuliert, wurden zunächst die verwendeten HBS-Puffer ebenfalls mit TMRM⁺ in entsprechender Konzentration angereichert, um ein Auswaschen und folglich falsche Ergebnisse zu verhindern. Anschließend wurden während der Versuche sowohl die Fluoreszenzintensität von TMRM⁺ in den Mitochondrien als auch die Fluoreszenzintensität von TMRM⁺ im Zytosol gemessen, der Quotient beider errechnet und als *Ratio* angegeben. Eine Zunahme des TMRM⁺-*Ratios* spiegelte eine Zunahme des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ im Sinne einer Negativitätssteigerung wider, während eine Abnahme des TMRM⁺-*Ratios* auch eine Abnahme des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ im Sinne einer Verringerung der Negativität repräsentierte.

3.3.1 Native A549-Zellen

Eine Hypokapnie führte in nativen A549-Zellen *in vitro* zu einer signifikanten Zunahme der Negativität des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$. Ein Austausch des normokapnischen HBS-Puffers durch hypokapnischen HBS-Puffer führte im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen (Normokapnie) zu einer durchschnittlichen Zunahme der TMRM⁺-*Ratio* um 20,58 % ± 4,41 %. Wie die Abbildung 33 veranschaulicht, war dieser Vorgang reversibel: Ein Austausch des hypokapnischen HBS-Puffers durch normokapnischen HBS-Puffer führte zu einem erneuten Abfall der TMRM⁺-*Ratio* und somit auch des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ auf die ursprünglichen Ausgangswerte.

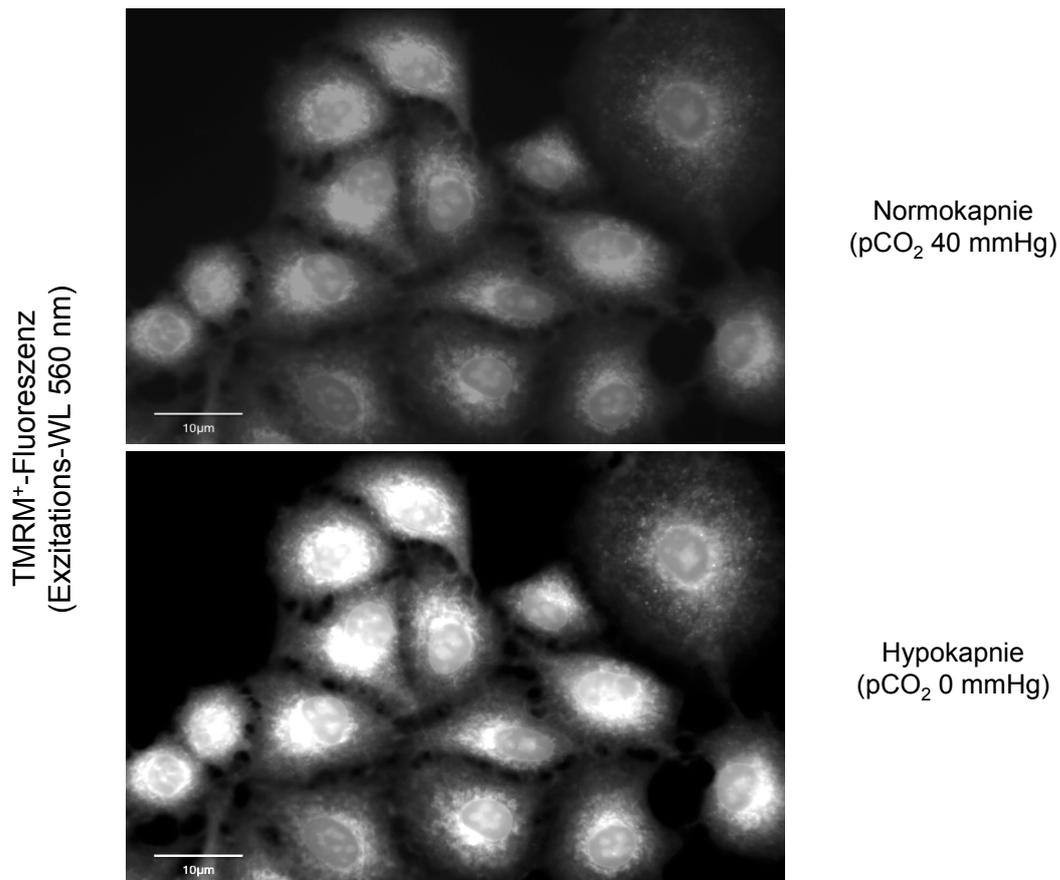


Abbildung 32: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mehrerer nativer A549-Zellen nach Färbung mit TMRM⁺ *in vitro* unter Normokapnie (oben) und Hypokapnie (unten) nach Exzitation mit einer Wellenlänge von 560 nm zur Ermittlung des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$. Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4. Die Färbung mit dem spezifischen Fluoreszenzindikator TMRM⁺ ermöglicht die Abgrenzung der einzelnen Zellen voneinander und somit die Messung des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ in jeder einzelnen Zelle.

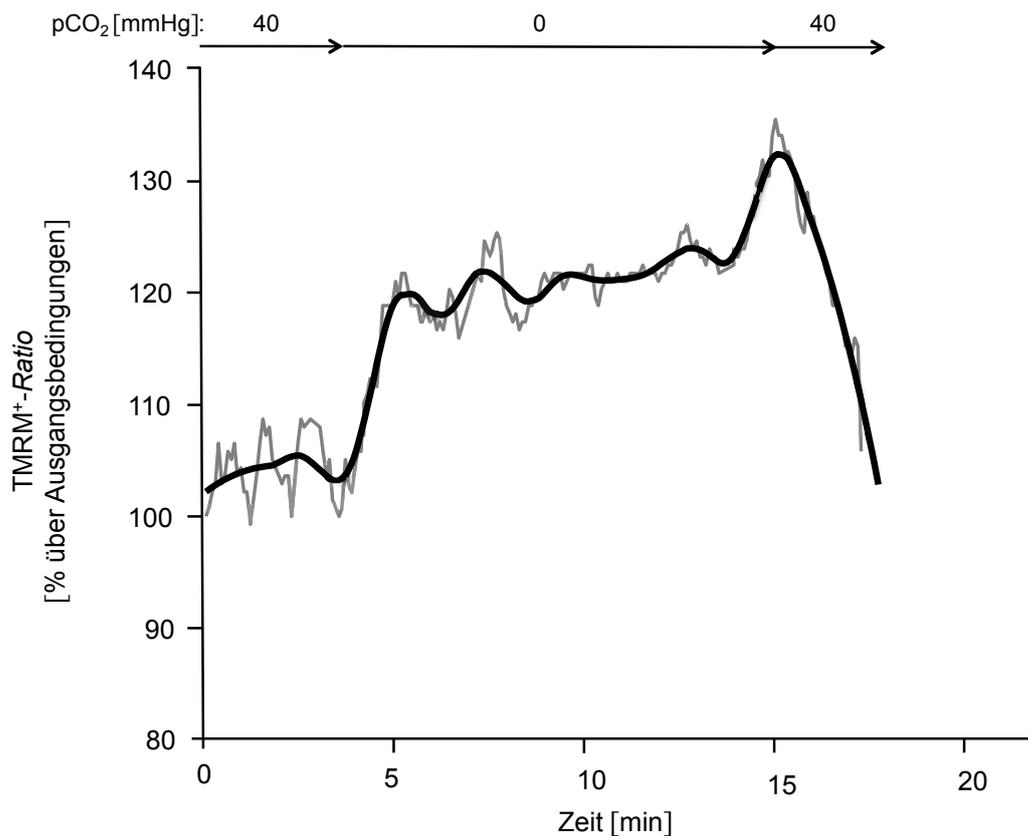


Abbildung 33: Repräsentative grafische Darstellung der TMRM⁺-Ratio dargestellt als Prozent über Ausgangsbedingungen über die Zeit eines Versuches in einer nativen A549-Zelle *in vitro* unter Normokapnie (pCO₂ 40 mmHg), nach Wechsel des normokapnischen HBS-Puffers durch hypokapnischen HBS-Puffer (pCO₂ 0 mmHg) sowie nach erneuter Etablierung einer Normokapnie (pCO₂ 40 mmHg) (graue Linie). Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4. Schwarze Linie: Mittelwerte der TMRM⁺-Ratio-Veränderungen.

Durch die Blockade des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette mittels Rotenon erfolgte auch hier die Inhibierung des NADH-vermittelten mitochondrialen Elektronentransports zur Untersuchung der Rolle der Mitochondrien im Prozess der alveolären CO₂-Registrierung. Nach der Zugabe von Rotenon mündete eine Hypokapnie in einer signifikant geringeren Veränderung des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen (Normokapnie). Die Zugabe von 50 μM Rotenon führte zunächst zu einer Abnahme der TMRM⁺-Ratio auf 84,61 % \pm 2,44 % des Ausgangswertes (Normokapnie allein). Ein Austausch des normokapnischen HBS-Puffers durch hypokapnischen HBS-Puffer führte daraufhin lediglich zu einer Abnahme der TMRM⁺-Ratio auf 82,47% \pm 2,43 % des Ausgangswertes (Normokapnie allein).

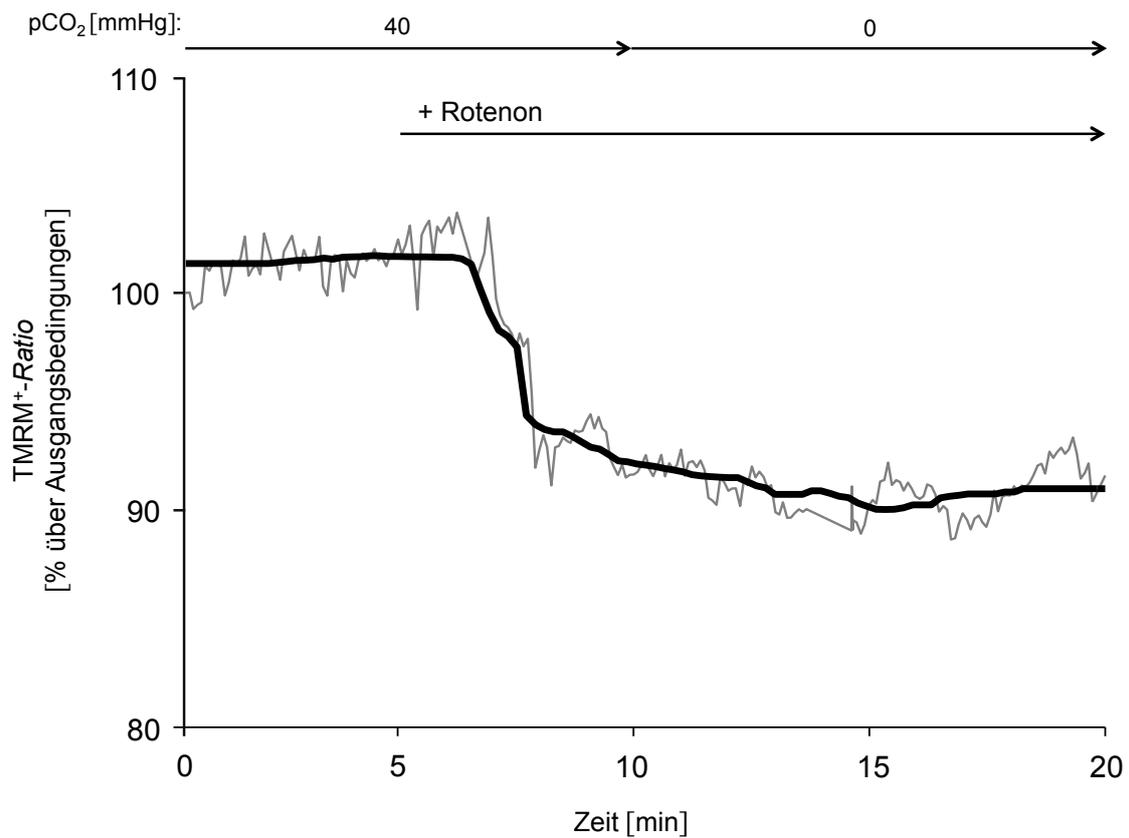


Abbildung 34: Repräsentative grafische Darstellung der TMRM⁺-Ratio dargestellt als Prozent über Ausgangsbedingungen über die Zeit eines Versuches in einer nativen A549-Zelle *in vitro* unter Ausgangsbedingungen (pCO₂ 40 mmHg), nach Zugabe von 50 µM Rotenon (Komplex-I-Inhibierung) sowie nach Wechsel des normokapnischen HBS-Puffers durch erneut hypokapnischen HBS-Puffer (pCO₂ 0 mmHg) (graue Linie). Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4. Schwarze Linie: Mittelwerte der TMRM⁺-Ratio-Veränderungen.

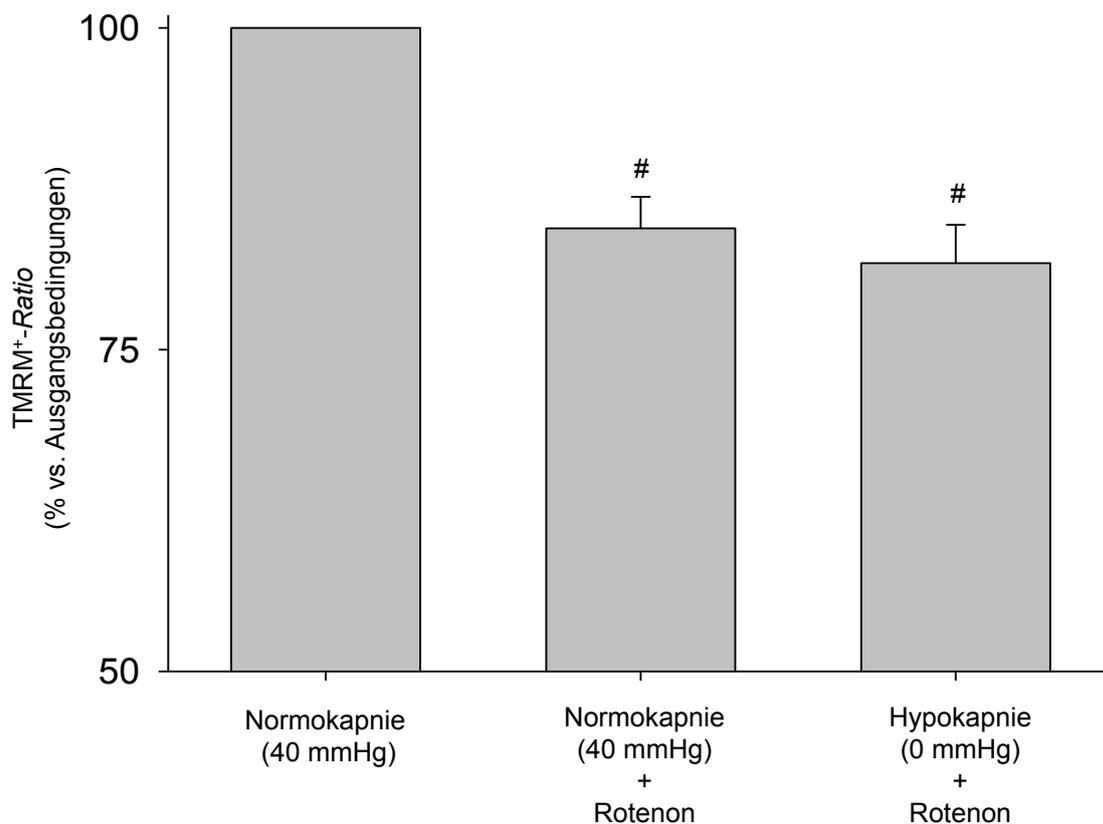


Abbildung 35: Gruppenanalyse der TMRM⁺-Ratio in nativen A549-Zellen *in vitro* unter Normokapnie (Ausgangsbedingungen), nach Zugabe von 50 μ M Rotenon sowie nach 10-minütiger Hypokapnie und vorangegangener Rotenon-Zugabe. Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4. Dargestellt als MW \pm SD. # = $p < 0,05$ vs. Normokapnie. $n=5$.

3.3.2 Transfizierte A549-Zellen

Zur Untersuchung der Rolle der mitochondrialen IDH3 im Prozess der alveolären CO₂-Registrierung wurde diese auch hier mittels *Gen-Knock-Down* herunterreguliert. Eine Hypokapnie führte in transfizierten A549-Zellen *in vitro* im Gegensatz zu nativen A549-Zellen zu keiner signifikanten Zunahme der Negativität des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$. Im Vergleich zur Normokapnie sank die TMRM⁺-Ratio nach Austausch des normokapnischen HBS-Puffers durch hypokapnischen HBS-Puffer auf durchschnittlich 98,52 % \pm 2,95 % des Ausgangswertes. Um sicherzustellen, dass die Herunterregulierung der IDH3 keinen Einfluss auf andere Zellfunktionen hatte, wurden hier ebenfalls Versuche mit einer entsprechenden *scrambled* siRNA durchgeführt. Eine Hypokapnie führte in A549-Zellen mit der *scrambled* siRNA *in vitro* zu einer

signifikanten Zunahme der TMRM⁺-Ratio um durchschnittlich 20,43 % ± 4,56 % des Ausgangswertes im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen (Normokapnie).

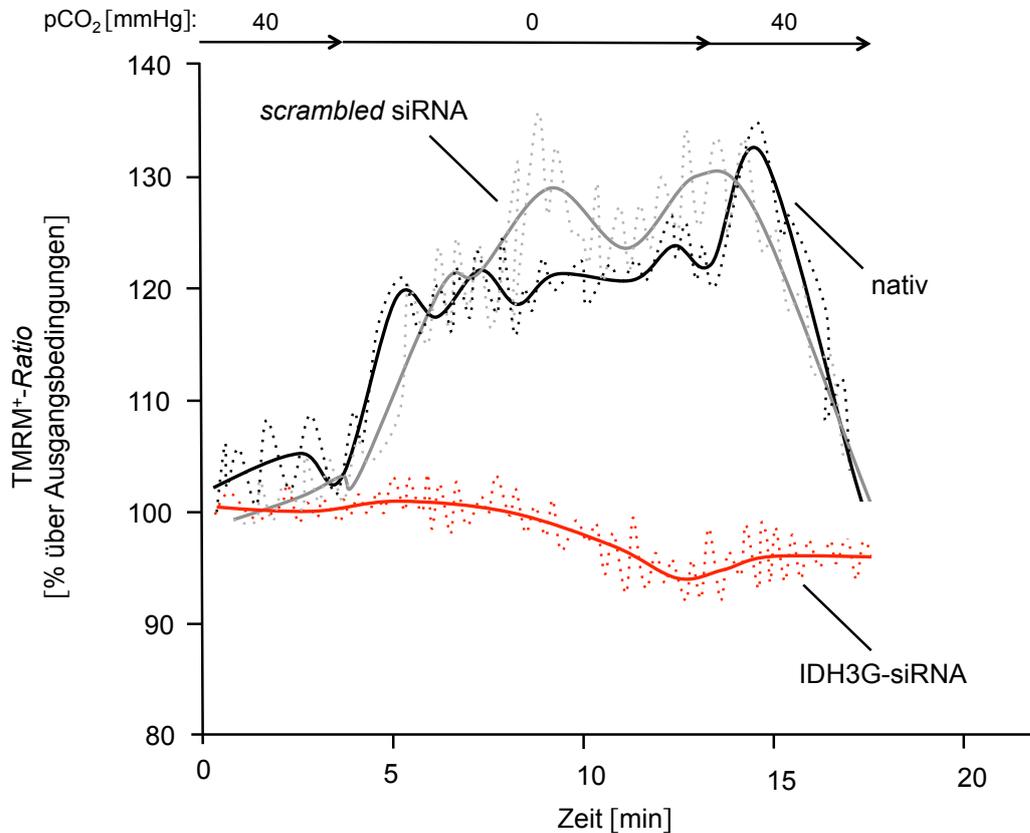


Abbildung 36: Repräsentative grafische Darstellung der TMRM⁺-Ratio über die Zeit eines Versuches in einer transfizierten A549-Zelle (IDH3G-siRNA, roter Graph), einer nativen A549-Zelle (schwarzer Graph) und einer Kontroll-A549-Zelle (scrambled siRNA, grauer Graph) *in vitro* unter Ausgangsbedingungen (pCO₂ 40 mmHg), nach Wechsel des normokapnischen HBS-Puffers durch hypokapnischen HBS-Puffer (pCO₂ 0 mmHg) sowie nach erneuter Etablierung einer Normokapnie (pCO₂ 40 mmHg). Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4.

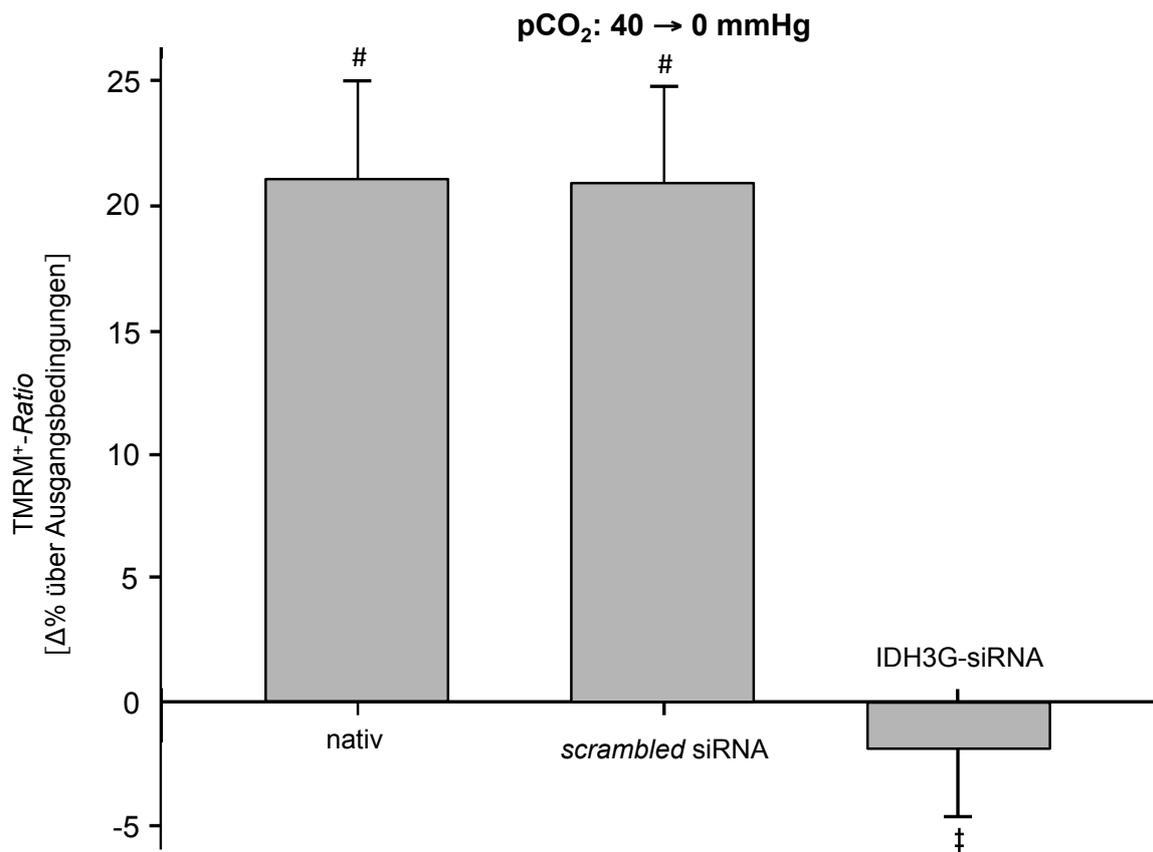


Abbildung 37: Gruppenanalyse der maximalen Veränderungen der TMRM⁺-Ratio nach einer 10-minütigen Hypokapnie in nativen A549-Zellen im Vergleich mit transfizierten Zellen (IDH3G-siRNA) und deren Kontrollen (A549-Zellen mit *scrambled* siRNA) *in vitro*. Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4. Dargestellt als MW ± SD. # = p<0,05 vs. Normokapnie in nativen A549-Zellen. ‡ = p<0,05 vs. Normokapnie in nativen/Kontroll-A549-Zellen (*scrambled* siRNA). n=10.

3.4 Der Einfluss von Hypokapnie auf die [NADH] in A549-Zellen *in vitro*

Die Quantifizierung des Einflusses einer Hypokapnie auf die [NADH] in nativen A549-Zellen erfolgte mit Hilfe eines Assays (siehe 2.6). Sowohl die Kontrollmessungen in nativen A549-Zellen als auch alle Versuche mit transfizierten A549-Zellen und deren Kontrollen wurden, wie unter 2.5.6 beschrieben, fluoreszenzmikroskopisch durchgeführt. Aufgrund der Autofluoreszenz von NADH entfiel eine Anfärbung der A549-Zellen mit einem speziellen Indikator. Nach Lichtexzitation mit einer Wellenlänge von 360 nm wurde die darauf folgende Lichtemission von 510 nm von der Kamera aufgefangen und mit der *MetaFluor® Imaging Software* ebenfalls in Grauwerten im Sinne von Helligkeitswerten dargestellt.

3.4.1 Native A549-Zellen

Mit Hilfe des NADH-Assays konnte gezeigt werden, dass eine Hypokapnie in nativen A549-Zellen *in vitro* zu einer signifikanten Zunahme der [NADH] führte. Unter Ausgangsbedingungen (Normokapnie = pCO₂ 40 mmHg) lag die [NADH] durchschnittlich bei 3,43 µM ± 1,71 µM. Unter Hypokapnie (pCO₂ 0 mmHg) betrug die [NADH] 5,24 µM ± 1,72 µM. Durch die Blockade des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette mittels Rotenon erfolgte auch hier die Inhibierung des NADH-vermittelten mitochondrialen Elektronentransports. Die Rolle der Mitochondrien in der alveolären CO₂-Registrierung sollte so weiterführend untersucht werden. So konnte gezeigt werden, dass eine Hypokapnie in A549-Zellen *in vitro* nach Zugabe von Rotenon - anders als bei den vorangegangenen Versuchen zur [Ca²⁺]_{zyt}, [Ca²⁺]_{mito} und dem ΔΨ_{mito} - nach wie vor in einer vermehrten Produktion von NADH mündete. Bei einem Ausgangswert von 2,95 µM ± 0,38 µM (Normokapnie + Rotenon) betrug die [NADH] unter Hypokapnie 7,33 µM ± 2,76 µM (Hypokapnie + Rotenon).

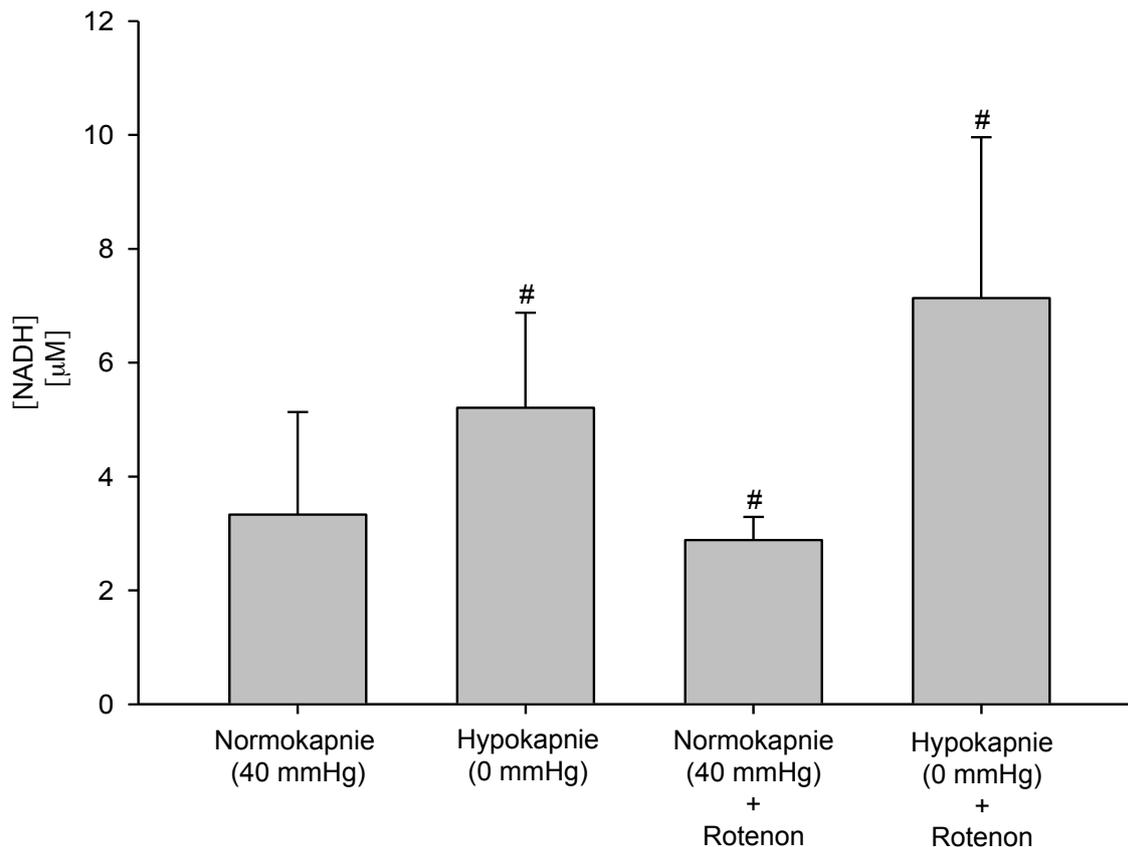


Abbildung 38: NADH-Assay: Gruppenanalyse der [NADH] in nativen A549-Zellen *in vitro* unter Normokapnie, Hypokapnie, Normokapnie und Zugabe von 50 μM Rotenon sowie Hypokapnie und Zugabe von 50 μM Rotenon. Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4. Dargestellt als MW \pm SD. # = $p < 0,05$ vs. Normokapnie. $n=8$.

Zusätzlich zum Assay erfolgten fluoreszenzmikroskopische Versuche zur ergänzenden Untersuchung des Einflusses einer Hypokapnie auf die [NADH] in nativen A549-Zellen *in vitro*. Um einen möglichen Abbau von NADH zu verhindern, wurde die Atmungskette mittels Rotenon bereits unter Ausgangsbedingungen, also unter Normokapnie, blockiert. Die Zugabe von 50 μM Rotenon unter normokapnischen Ausgangsbedingungen führte zunächst zu einer durchschnittlichen Zunahme der NADH-Fluoreszenzintensität um $78,27\% \pm 10,39\%$ des Ausgangswertes in nativen A549-Zellen *in vitro*. Ein anschließender Austausch des normokapnischen HBS-Puffers durch hypokapnischen HBS-Puffer mündete in einer signifikanten Zunahme der [NADH] und verifizierte so die Ergebnisse des Assays. Eine Hypokapnie führte zu einer durchschnittlichen Zunahme der NADH-Fluoreszenzintensität um $215,76\% \pm 40,11\%$ des Ausgangswertes (Normokapnie allein).

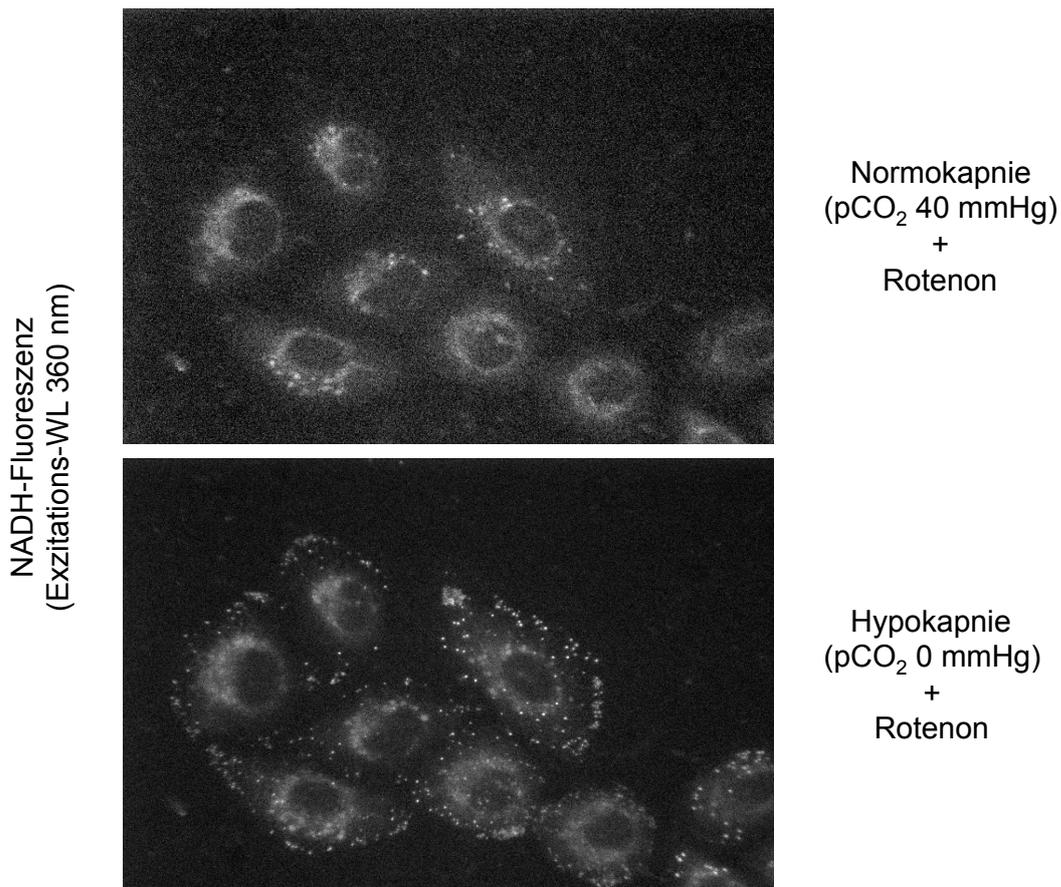


Abbildung 39: Repräsentative Aufnahmen mehrerer nativer A549-Zellen *in vitro* zur fluoreszenzmikroskopischen Messung der [NADH] nach Zugabe von 50 µM Rotenon unter Normokapnie (oben) und Hypokapnie (unten) nach Exzitation mit einer Wellenlänge von 360 nm. Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4. Aufgrund der Autofluoreszenz von NADH entfällt eine Anfärbung der A549-Zellen mit einem speziellen Indikatorfarbstoff. Die einzelnen Zellen können dennoch voneinander abgegrenzt werden, womit eine Messung der [NADH] in jeder einzelnen Zelle möglich ist.

Um auszuschließen, dass ein alleiniger Pufferwechsel möglicherweise bereits signifikante Veränderungen der [NADH] zur Folge hatte, wurden sowohl Kontrollversuche mit als auch ohne die vorherige Zugabe von Rotenon durchgeführt. Wie die Abbildungen 40 - 42 veranschaulichen, führte der Austausch des normokapnischen HBS-Puffers durch erneut normokapnischen HBS-Puffer in beiden Versuchsmodellen zu keiner signifikanten Veränderung der [NADH] in nativen A549-Zellen *in vitro*. Im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen mündete ein Pufferwechsel bei gleichbleibendem pCO₂ lediglich zu einer Zunahme der NADH-Fluoreszenzintensität um 2,62 % ± 7,27 % des Ausgangswertes (Normokapnie allein) bzw. 2,25 % ± 8,83 % des Ausgangswertes (Normokapnie + Rotenon).

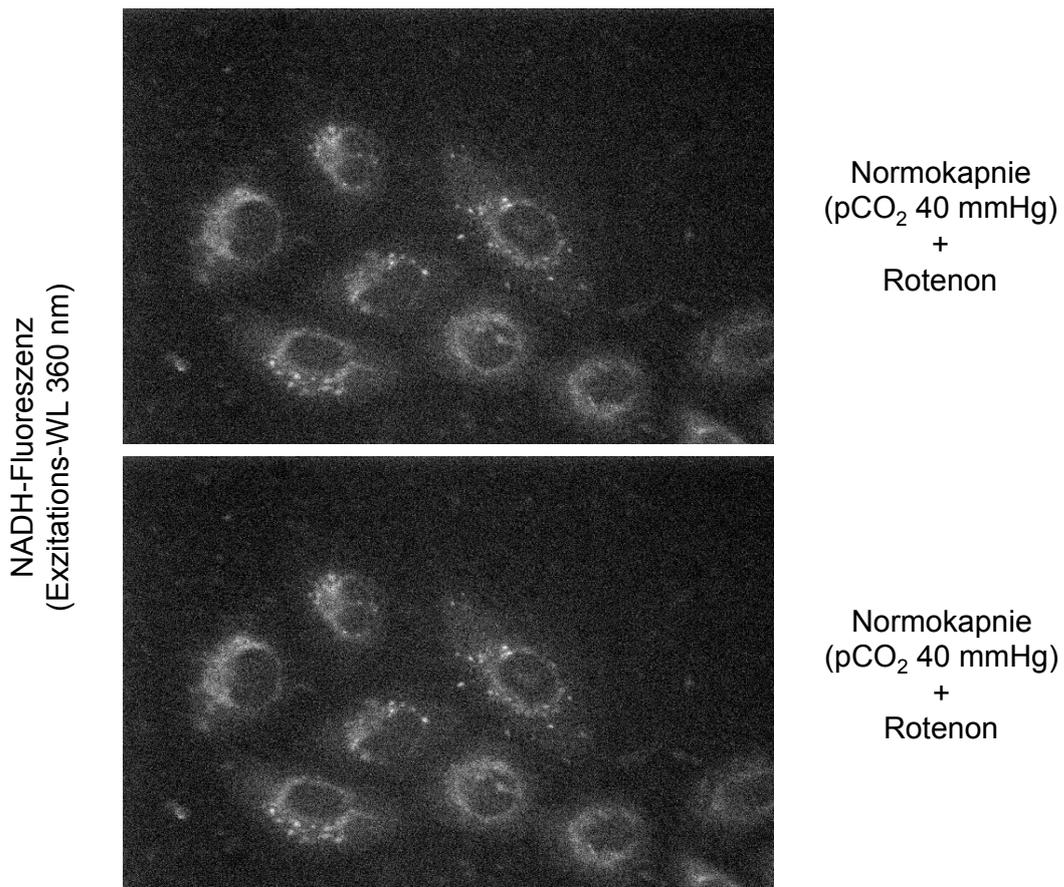


Abbildung 40: Repräsentative Aufnahmen mehrerer nativer A549-Zellen *in vitro* zur fluoreszenzmikroskopischen Messung der [NADH] nach Zugabe von 50 μ M Rotenon unter Normokapnie (oben) und nach erneuter Normokapnie (Pufferwechsel) (unten) nach Exzitation mit einer Wellenlänge von 360 nm (Kontrollversuch). Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4.

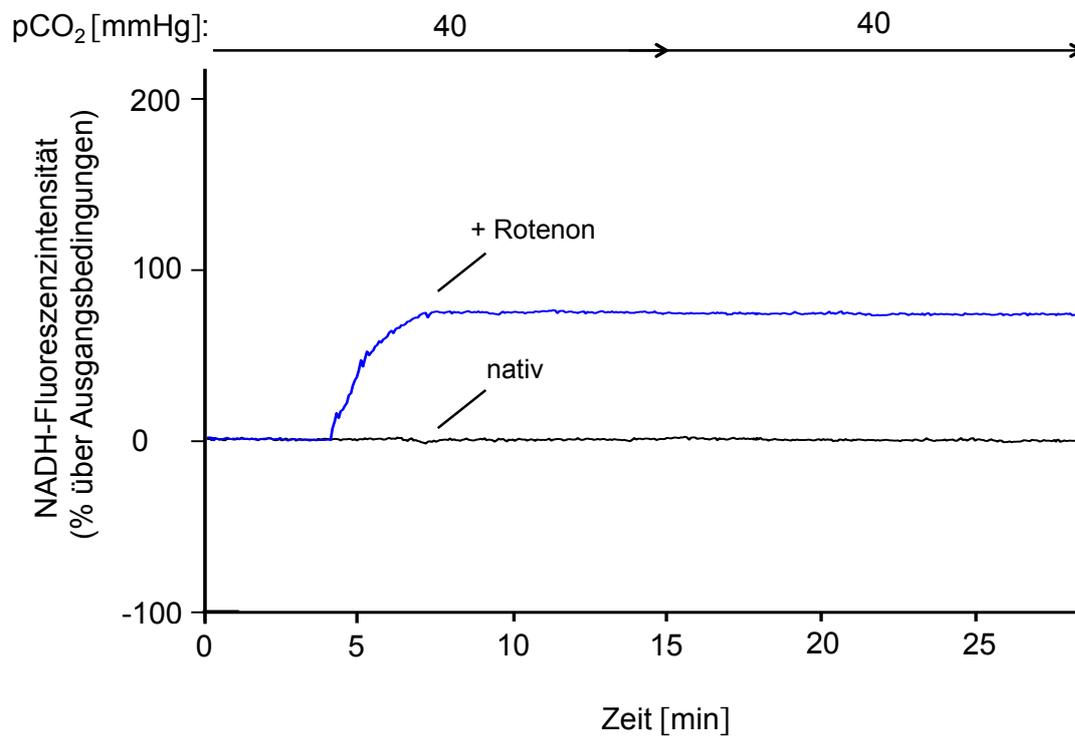


Abbildung 41: Fluoreszenzmikroskopie: Repräsentative grafische Darstellung der NADH-Autofluoreszenzintensität dargestellt als Prozent über Ausgangsbedingungen über die Zeit eines Versuches in einer nativen A549-Zelle (schwarzer Graph) und einer nativen A549-Zelle nach Zugabe von 50 μ M Rotenon (blauer Graph) *in vitro* unter Ausgangsbedingungen ($p\text{CO}_2$ 40 mmHg) sowie nach Wechsel des normokapnischen HBS-Puffers durch erneut normokapnischen HBS-Puffer ($p\text{CO}_2$ 40 mmHg). Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4.

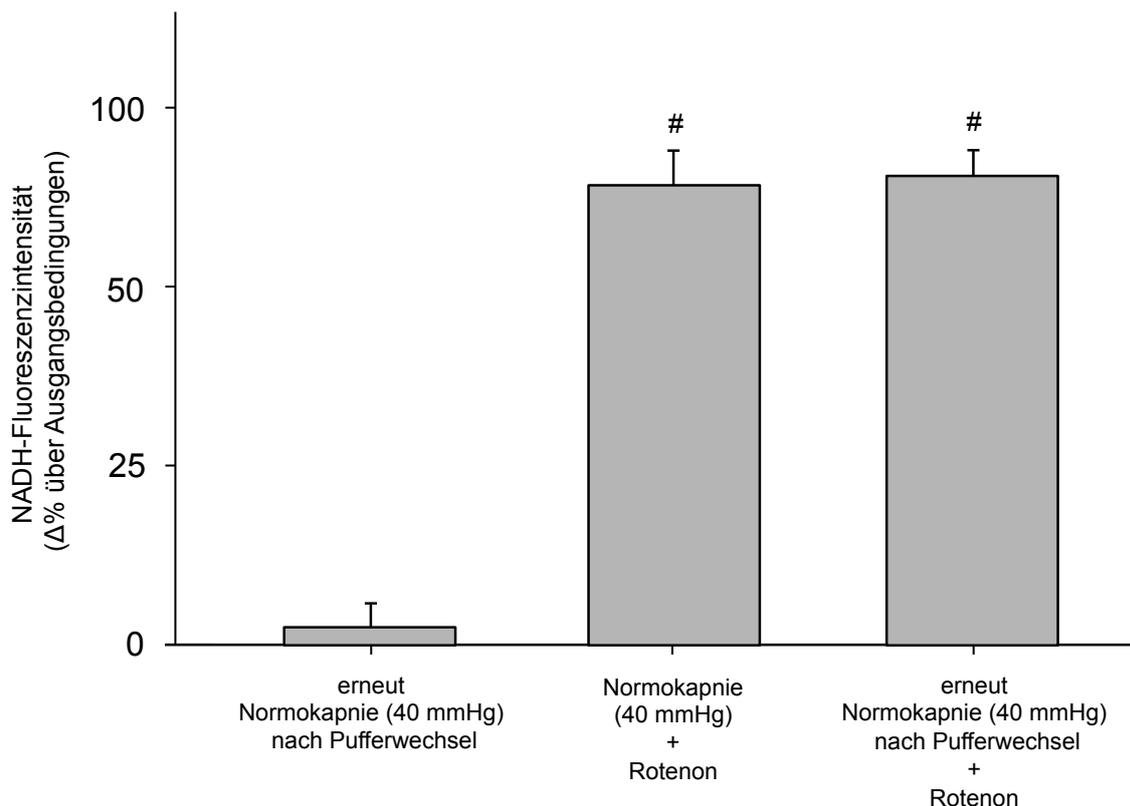


Abbildung 42: Fluoreszenzmikroskopie: Gruppenanalyse der maximalen Anstiege der [NADH] in nativen A549-Zellen *in vitro* dargestellt als $\Delta\%$ über Ausgangsbedingungen nach einem Pufferwechsel durch erneut normokapnischen HBS-Puffer, unter Normokapnie und der Zugabe von 50 μM Rotenon sowie ebenfalls nach Wechsel des normokapnischen HBS-Puffers durch erneut normokapnischen HBS-Puffer bei vorangegangener Rotenon-Zugabe. Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4. Dargestellt als MW \pm SD. # = $p < 0,05$ vs. Ausgangsbedingungen. $n=8$.

3.4.2 Transfizierte A549-Zellen

Während der Versuche zur Untersuchung des Einflusses einer Hypokapnie auf die [NADH] in nativen A549-Zellen *in vitro* konnte beobachtet werden, dass eine Hypokapnie trotz einer Blockade des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette mittels Rotenon nach wie vor zu einer vermehrten NADH-Produktion führte. Um die Rolle der IDH als mitochondrialen NADH-Lieferanten und mögliches Schlüsselenzym im Prozess der alveolären CO_2 -Registrierung zu untersuchen, erfolgte auch hier der Gen-*Knock-Down* mittels IDH3G-siRNA. Zusätzlich wurde die Atmungskette mittels Rotenon bereits unter Ausgangsbedingungen blockiert, um einen möglichen Abbau von NADH während des Versuchsverlaufs zu verhindern. Eine Hypokapnie führte in

transfizierten A549-Zellen *in vitro* zu einer signifikant geringeren Veränderung der [NADH] im Vergleich zu einer Hypokapnie in nativen A549-Zellen *in vitro*. Eine Zugabe von 50 μM Rotenon führte auch in den transfizierten A549-Zellen zunächst zu einer Steigerung der NADH-Fluoreszenzintensität um durchschnittlich $12,62\% \pm 0,43\%$ des Ausgangswertes (Normokapnie nativ). Ein anschließender Austausch des normokapnischen HBS-Puffers durch hypokapnischen HBS-Puffer resultierte in einer durchschnittlichen Zunahme der NADH-Fluoreszenzintensität um $20,14\% \pm 1,35\%$ des Ausgangswertes (Normokapnie nativ).

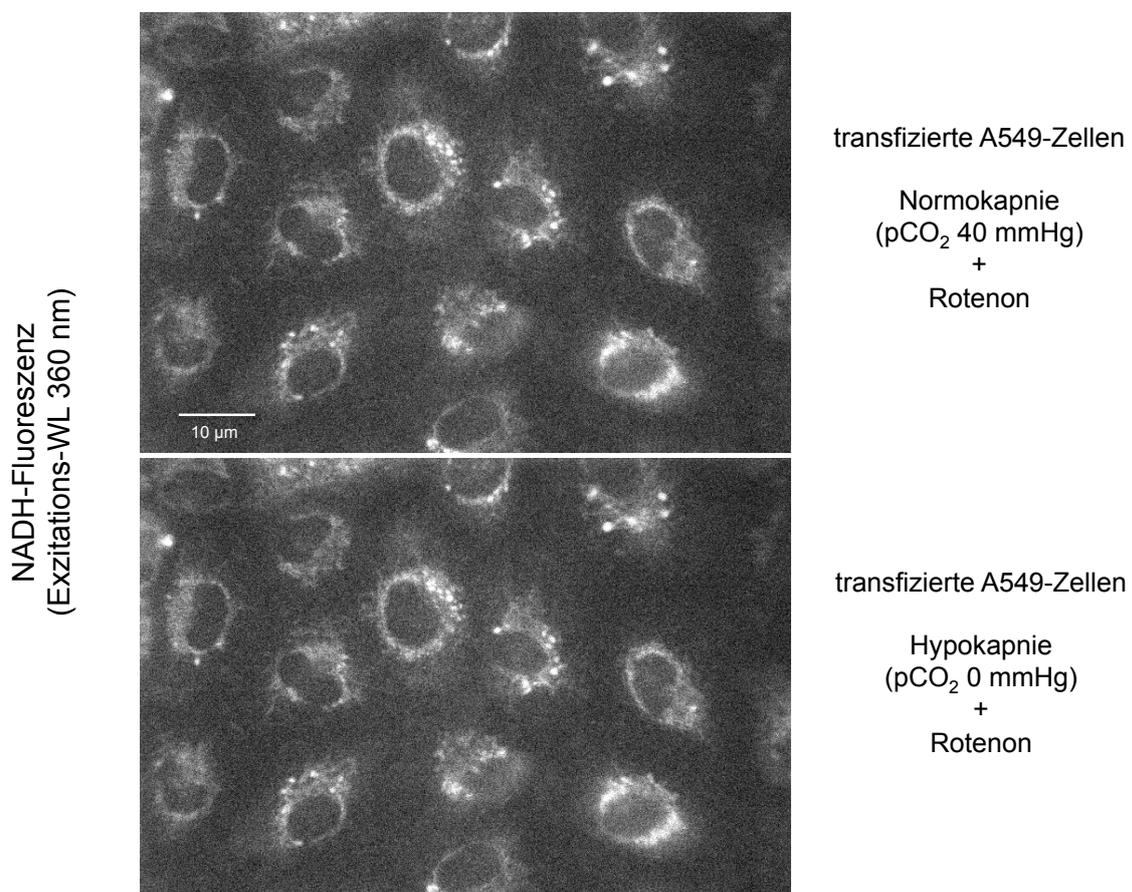


Abbildung 43: Repräsentative Aufnahmen mehrerer transfizierter A549-Zellen *in vitro* zur fluoreszenzmikroskopischen Messung der [NADH] nach Zugabe von 50 μM Rotenon unter Normokapnie (oben) und Hypokapnie (unten). Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4.

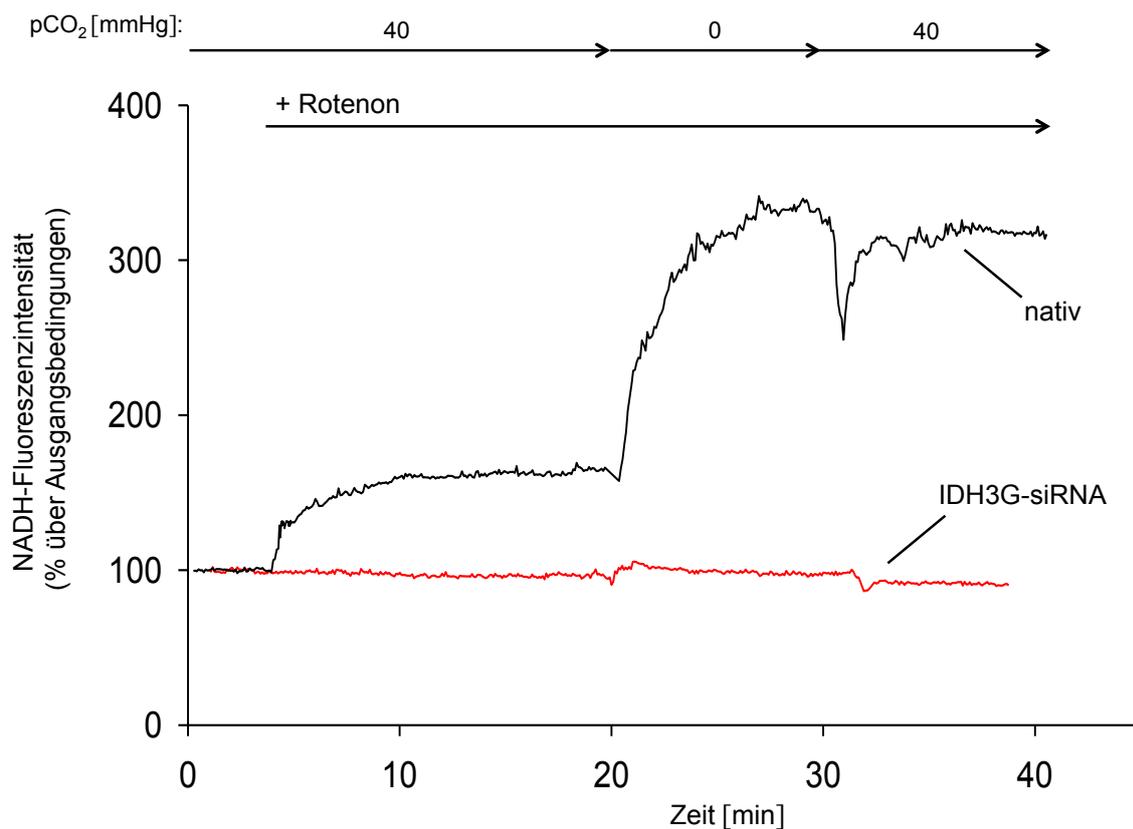


Abbildung 44: Fluoreszenzmikroskopie: Repräsentative grafische Darstellung der NADH-Autofluoreszenzintensität dargestellt als Prozent über Ausgangsbedingungen über die Zeit eines Versuches in einer nativen A549-Zelle (schwarzer Graph) und in einer transfizierten A549-Zelle (IDH3G-siRNA, roter Graph) *in vitro* unter Ausgangsbedingungen (pCO₂ 40 mmHg), nach Zugabe von 50 μM Rotenon, nach Wechsel des normokapnischen HBS-Puffers durch hypokapnischen HBS-Puffer (pCO₂ 0 mmHg) sowie nach erneuter Etablierung einer Normokapnie (pCO₂ 40 mmHg). Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4.

Um sicherzustellen, dass die Herunterregulierung der IDH3 keinen Einfluss auf andere Zellfunktionen hatte, wurden hier ebenfalls Versuche mit einer entsprechenden *scrambled* siRNA durchgeführt. Eine Zugabe von 50 μM Rotenon führte auch in A549-Zellen mit der *scrambled* siRNA *in vitro* zunächst zu einer Steigerung der NADH-Fluoreszenzintensität um durchschnittlichen 70,52 % ± 9,87 % des Ausgangswertes (Normokapnie nativ). Ein anschließender Austausch des normokapnischen HBS-Puffers durch hypokapnischen HBS-Puffer resultierte in einer durchschnittlichen Zunahme der NADH-Fluoreszenzintensität um 220,14 % ± 31,35 % des Ausgangswertes (Normokapnie nativ).

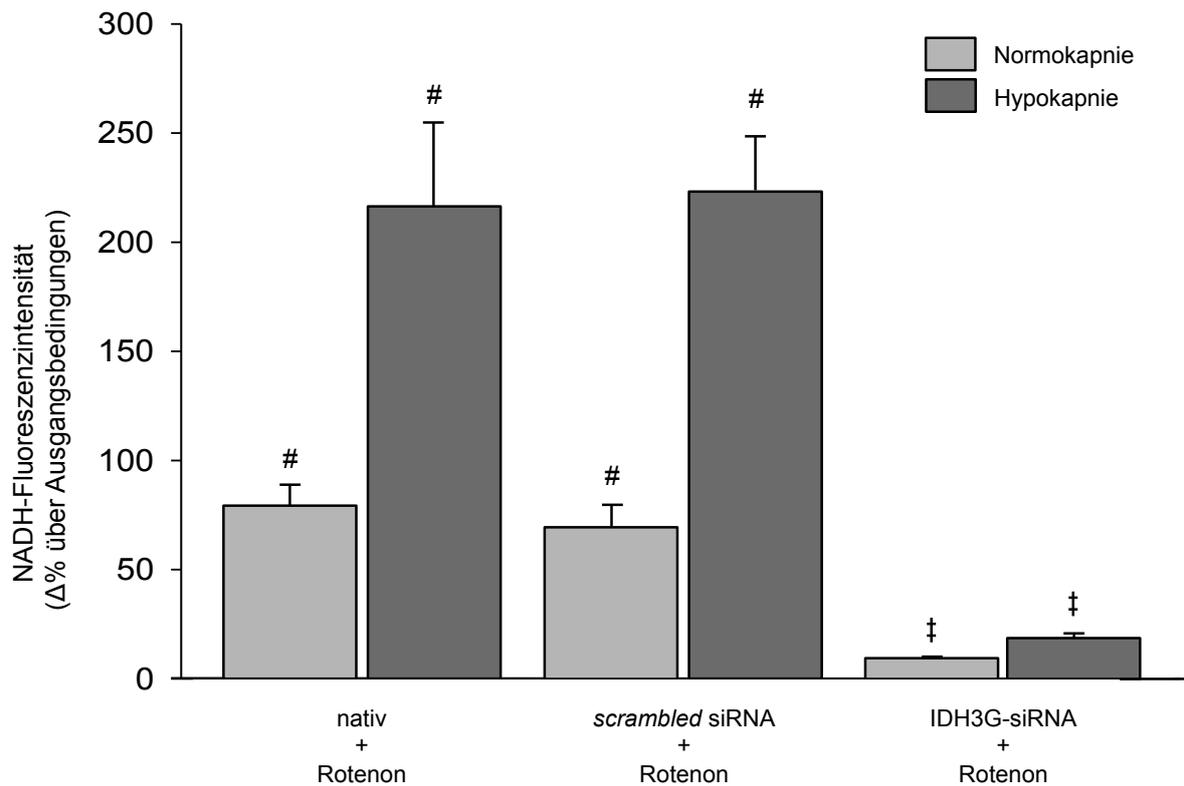


Abbildung 45: Fluoreszenzmikroskopie: Gruppenanalyse der maximalen Anstiege der NADH-Autofluoreszenzintensität dargestellt als $\Delta\%$ über Ausgangsbedingungen in nativen A549-Zellen nach Zugabe von 50 μM Rotenon unter Normokapnie und Hypokapnie im Vergleich mit transfizierten A549-Zellen (IDH3G-siRNA) nach Zugabe von 50 μM Rotenon unter Normokapnie und Hypokapnie und deren Kontrollen (A549-Zellen mit *scrambled* siRNA) nach Zugabe von 50 μM Rotenon unter Normokapnie und Hypokapnie *in vitro*. Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4. Dargestellt als MW \pm SD. # = $p < 0,05$ vs. Ausgangsbedingungen (Normokapnie in nativen A549-Zellen). ‡ = $p < 0,05$ vs. Normokapnie in nativen A549-Zellen/Kontroll-A549-Zellen (*scrambled* siRNA). n=8.

3.5 Transfektionsnachweise

Die Überprüfung der Wirksamkeit der Transfektion in A549-Zellen erfolgte qualitativ sowohl auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR sowie auf Proteinebene mittels Western Blot. Zusätzlich erfolgte ein mikroskopischer Nachweis mithilfe fluoreszenzmarkierter siRNA. Auf allen drei Ebenen konnte eine erfolgreiche Transfektion belegt werden.

Abbildung 46 zeigt die Ergebnisse der RT-PCR. So konnte die entsprechende mRNA der IDH3 zwar in nativen A549-Zellen (Spalten 2 und 3) und in mit der *scrambled* siRNA inkubierten A549-Zellen (= Negativkontrolle) (Spalten 6 und 7) nachgewiesen werden, nicht jedoch in den transfizierten A549-Zellen (Spalten 4 und 5), welche mit der entsprechenden siRNA inkubiert wurden. Analog verhielt es sich mit den Ergebnissen des Western Blot (Abbildung 47). Die IDH3 war in den nativen A549-Zellen (Spalten 2 und 3) und in den mit der *scrambled* siRNA inkubierten A549-Zellen (= Negativkontrolle) (Spalten 4 und 5) vorhanden, in den mit der entsprechenden siRNA inkubierten A549-Zellen (Spalten 6 und 7) ließ sich die IDH3 nicht nachweisen.

Mithilfe der fluoreszenzmarkierter siRNA ließ ich nicht nur eine erfolgreiche Aufnahme der siRNA in die A549-Zellen bestätigen; es konnte zudem gezeigt werden, dass die Transfektion die Dauer der Versuche ohne qualitative Veränderungen übersteht (Abbildung 48).

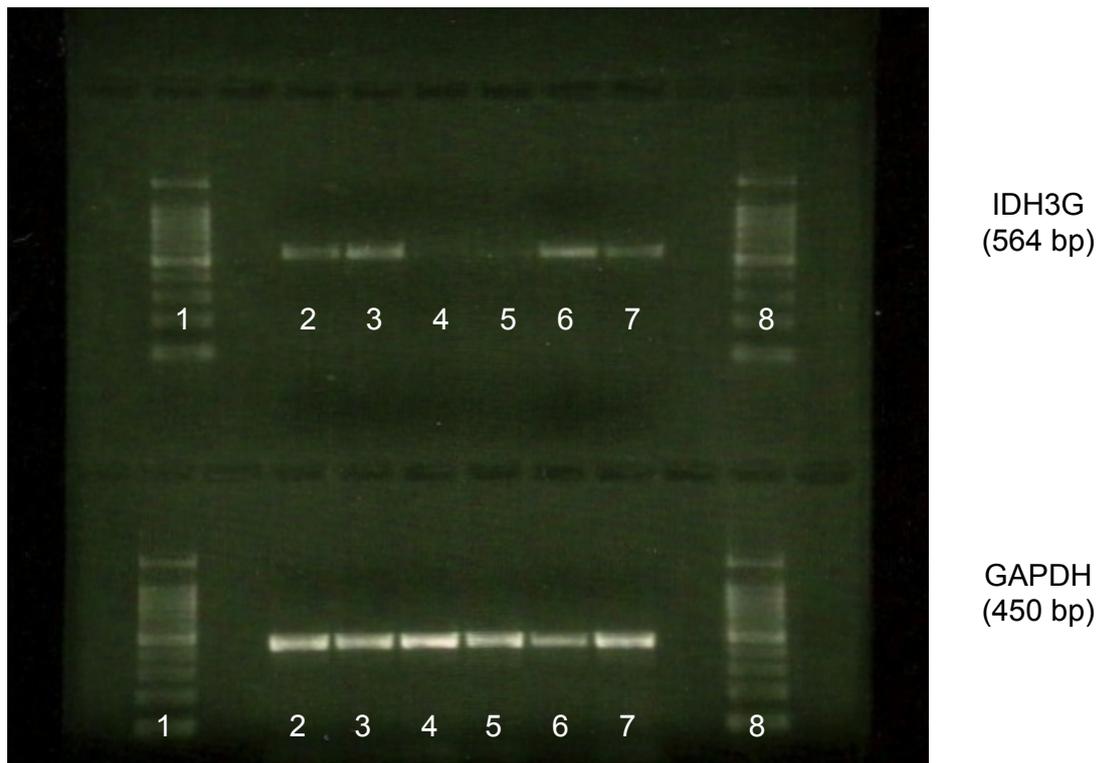


Abbildung 46: *Scan* des RT-PCR-Gels für den Nachweis des Transfektionserfolgs auf mRNA-Ebene. Oben: mRNA der IDH3G in nativen A549-Zellen (Spalten 2 und 3), in A549-Zellen nach Inkubation mit IDH3G-siRNA (Spalten 4 und 5) und in A549-Zellen nach Inkubation mit *scrambled* siRNA (Spalten 6 und 7). Spalten 1 und 8: Skala für molekulares Gewicht. Unten: Kontrolle mit GAPDH.

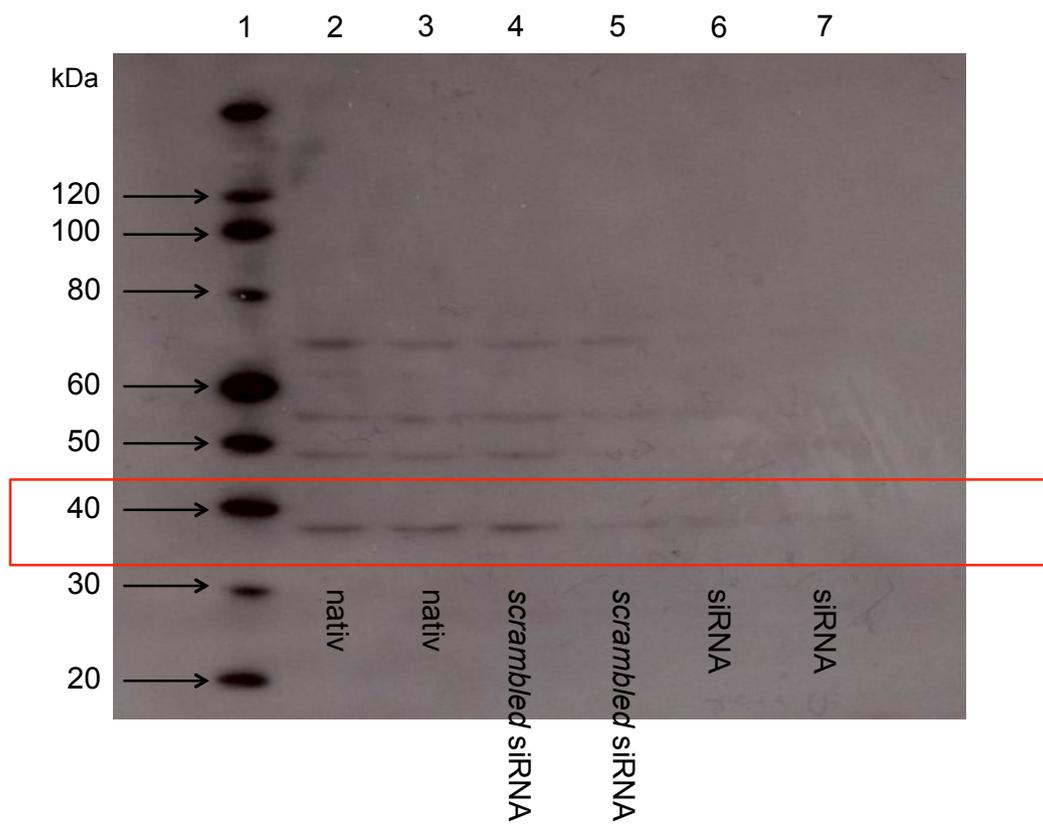


Abbildung 47: *Scan* des Western Blot des IDH3-Proteins für den Nachweis des Transfektionserfolgs auf Proteinebene in nativen A549-Zellen (Spalten 2 und 3), in A549-Zellen nach Inkubation mit *scrambled* siRNA (Spalten 4 und 5) und in A549-Zellen nach Inkubation mit IDH3G-siRNA (Spalten 6 und 7). Spalte 1: Skala für molekulares Gewicht.

Fluoreszenzmarkierte IDH3G-siRNA

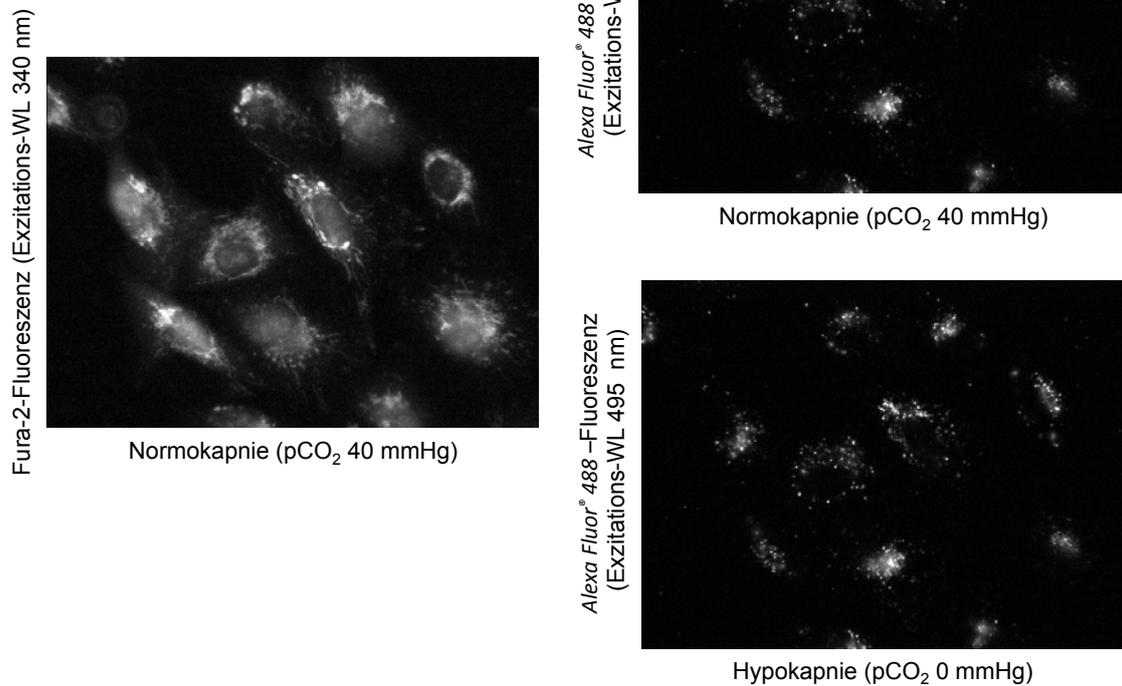


Abbildung 48: Repräsentative Aufnahmen von transfizierten A549-Zellen *in vitro* zur fluoreszenzmikroskopischen Beurteilung des Transfektionserfolgs mithilfe von Fura-2 und autofluoreszierender IDH3G-siRNA. Der pH-Wert ist allzeit konstant bei 7,4. Links: Transfizierte A549-Zellen unter Ausgangsbedingungen (pCO₂ = 40 mmHg) nach Exzitation mit einer Wellenlänge von 340 nm. Rechts oben: Transfizierte A549-Zellen unter normokapnischen Ausgangsbedingungen (pCO₂ = 40 mmHg) nach Exzitation mit einer Wellenlänge von 495 nm. Rechts unten: Transfizierte A549-Zellen unter Hypokapnie (pCO₂ = 0 mmHg) nach Exzitation mit einer Wellenlänge von 495 nm.

3.6 [Ca²⁺]-Oszillationen

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in allen untersuchten A549-Zellen spontane [Ca²⁺]_{zyt}- und [Ca²⁺]_{mito}-Oszillationen vorherrschen, die sowohl in Ruhe in nativen als auch in transfizierten A549-Zellen sowie unter hypocapnischen Bedingungen und nach Zugabe von Rotenon und ATP zu beobachten waren. Diese Oszillationen lassen auf eine Mitbeteiligung des ER schließen. Für konkrete Aussagen über deren Ausmaß und Bedeutung bedarf es jedoch weiterer Analysen.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der mitochondrialen IDH3 im Prozess der alveolären CO₂-Registrierung in A549-Zellen *in vitro* zu untersuchen. Grundlage dafür war die Mechanismus-Entschlüsselung der Ventilationsanpassung zur Reduzierung des Ventilations-Perfusions-Missverhältnisses bei pulmonalen Perfusionsstörungen. Die IDH3 katalysiert als mitochondrienspezifisches Enzym die oxydative Decarboxylierung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat und reduziert dabei NAD⁺ zu NADH+H⁺ [70]. Als Nebenprodukt entsteht CO₂. Die Hypothese dieser Arbeit war dabei, dass der während einer pulmonalen Perfusionsstörung sinkende alveoläre pCO₂ direkt Einfluss auf die IDH3 nimmt und über eine positive Rückkopplung zu einer Aktivitätssteigerung dieser führt. Dies hat neben der gesteigerten Produktion von CO₂ zum Zwecke der Wiederherstellung des gestörten Reaktionsgleichgewichts eine vermehrte Produktion von Reduktionsäquivalenten in Form von NADH+H⁺ zur Folge, mit deren Hilfe über die Atmungskette Protonen (H⁺) aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum gepumpt werden, was wiederum zu einer Zunahme der Negativität des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ führt. Da das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ die treibende Kraft für die Aufnahme von Ca²⁺ aus dem Zytosol in die Mitochondrien ist, hat ein negativeres $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ eine vermehrte Aufnahme von Ca²⁺ über den Ca²⁺-Uniporter in die Mitochondrien zur Folge. Entsprechend sinkt die [Ca²⁺] im Zytosol. Konkret wurde dabei im Rahmen dieser Arbeit untersucht, welchen Einfluss eine Hypokapnie auf die [Ca²⁺]_{zyt}, die [Ca²⁺]_{mito}, das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ und die [NADH] in A549-Zellen *in vitro* hat und inwiefern sich dieser Einfluss durch eine Herunterregulierung der mitochondrialen IDH3 ändert.

4.1 Versuchslimitationen

In allen *in-vitro*-Versuchen wurden A549-Zellen als Surrogat für Typ II Alveolarepithelzellen verwendet. A549-Zellen sind Karzinomzellen alveolarepithelialen Ursprungs mit humanem Karyotyp, welche einer einzelnen Elternzelle entstammen. A549-Zellen werden in der Lungenforschung aufgrund gleicher Eigenschaften häufig als stellvertretene Zellmodelle für die Untersuchung von Typ II Alveolarepithelzellen verwendet. Vor allem ihre Fähigkeit zur Synthese von Lecithin und Surfactant-Proteinen sowie der mikroskopische Nachweis von multilamellären Einschlusskörperchen haben dazu beigetragen, dass A549-Zellen in den vergangenen 50

Jahren in vielen Studien zur Untersuchung der Zellphysiologie von Typ II Alveolarepithelzellen eingesetzt wurden [76, 77]. Auch die Arbeitsgruppen um Jacob Sznajder, die mit Beginn der 2000er Jahre den Einfluss von Hyperkapnie auf Typ II Alveolarepithelzellen in der isoliert-perfundierten Rattenlunge untersuchten, griffen für ihre *in-vitro*-Versuche auf A549-Zellen zurück [29, 32, 78, 79]. Da in den vergangenen Jahren jedoch vermehrt gezeigt wurde, dass sie trotz Surfactant-Synthese und -Sekretion sowie ähnlicher Verhaltensweisen auf eine Hypoxie in ihrer Physiologie eher Tumor- als Alveolarepithelzellen entsprechen, ist ihr Einsatz in der Grundlagenforschung der Lunge in den letzten 5 Jahren deutlich zurückgegangen [80-82]. Zusätzlich dazu hat die Weiterentwicklung der technischen Möglichkeiten bezüglich der Isolierung von Primärzellen dazu beigetragen, dass A549-Zellen in der Erforschung der Lungenphysiologie durch primär isolierte Alveolarepithelzellen ersetzt wurden. Aufgrund ihres hochfrequenten Einsatzes in der Vergangenheit, ihrer Robustheit, ihrer besonders guten Aufnahme von Indikatoren und ihrer Transfektionsstabilität wurden sie dennoch für diese Arbeit genutzt. Um die hier präsentierten Ergebnisse auf die intakte Lunge übertragen zu können, bedarf es jedoch zukünftiger Versuche mit primär isolierten Alveolarepithelzellen.

Des Weiteren muss angemerkt werden, dass die Verwendung von Puffer anstelle von Blut eine weitere Limitation dieser Arbeit in Bezug auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die intakte Lunge darstellt. Eine Verwendung von Blut war in diesen Versuchen unter anderem technisch nicht umsetzbar. Dennoch entspricht die Zusammensetzung des verwendeten HBS-Puffers der Physiologie des Blutplasmas. Durch die Zugabe von FBS wurde zusätzlich ein physiologischer, onkotischer Druck erzeugt. Lediglich die korpuskulären Bestandteile des Blutes konnten nicht imitiert werden.

4.2 Die Rolle der mitochondrialen Isocitrat-Dehydrogenase im Prozess der Kohlenstoffdioxid-Registrierung in Alveolarepithelzellen *in vitro*

4.2.1 Eine Hypokapnie verursacht eine Abnahme der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ bei gleichzeitiger Zunahme der $[Ca^{2+}]_{mito}$ in A549-Zellen *in vitro*

Es konnte gezeigt werden, dass eine Hypokapnie in A549-Zellen *in vitro* zu einer signifikanten Abnahme der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ führt. Gleichzeitig kommt es zu einer signifi-

kanten Zunahme der $[Ca^{2+}]_{mito}$. Eine Hypokapnie verursacht demnach eine Aufnahme von zytosolischem Ca^{2+} in die Mitochondrien. Dieser Prozess ist reversibel. Dass Mitochondrien in der Lage sind, zytosolisches Ca^{2+} aufzunehmen, wurde in der Vergangenheit vielfach bestätigt. Während man zunächst lange Zeit davon ausging, dass die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme ausschließlich im Rahmen pathologischer $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Erhöhungen zur Initiierung von Apoptose stattfindet [83], wurde dies mit Beginn der 1990er Jahre widerlegt [84, 85]. So konnte im Laufe der letzten Jahrzehnte gezeigt werden, dass die Mitochondrien eine zentrale Rolle im zellulären Ca^{2+} -Signalsystem einnehmen. Einige Autoren sind dabei der Meinung, dass die umkehrbare Ca^{2+} -Aufnahme in die Mitochondrien primär der Synchronisierung der mitochondrialen ATP-Produktion mit den zellulären Energieanforderungen dient und sich die Beziehung zwischen Mitochondrien und Ca^{2+} in der Zelle demnach auf energieabhängige Prozesse beschränkt [57, 69, 86]. Dem gegenüber stehen andere Publikationen, in denen aufgezeigt werden konnte, dass Mitochondrien nicht nur der alleinigen ATP-Produktion dienen, sondern vor allem über die Aufnahme und Abgabe von Ca^{2+} sowie über die Freisetzung mitochondrialer Metabolite die Fortleitung von Ca^{2+} -Signalen innerhalb der Zelle beeinflussen [40, 61, 62]. Die Aufnahme von zytosolischem Ca^{2+} in die Mitochondrien dient so der Ausbreitungsbegrenzung von mikromolaren Anhebungen der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ und trägt zur Aufrechterhaltung des starken lokalen Charakters von Ca^{2+} -Signalen bei. Dass Mitochondrien eine essentielle Schnittstelle zwischen dem zellulären Energiemetabolismus und dem intrazellulären Ca^{2+} -Signalsystem darstellen, lässt sich am Beispiel von Mitochondrien sekretorischer Zellen aufzeigen. Soll die Sekretion stattfinden, wird dies über Botenstoffe an die Zielzelle vermittelt. Innerhalb der Zielzelle wird die Aufforderung zur Sekretion mithilfe von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Änderungen fortgeleitet. Über die Zunahme der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ kommt es so einerseits direkt zur Fusion von Sekretgranula mit der Zellmembran und somit zur Freisetzung der Granulainhalte. Ferner wird für den Transport der Sekretgranula zur Zellmembran Energie in Form von ATP benötigt, welches über die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der mitochondrialen, oxydativen Phosphorylierung bereitgestellt wird. Zusätzlich zur ATP-Produktion nehmen die Mitochondrien Einfluss auf die Ausbreitung des intrazellulären Ca^{2+} -Signals. Durch die direkte Aufnahme von Ca^{2+} sowie Interaktionen mit anderen Ca^{2+} -speichernden und -freisetzenden Zellorganellen verhindern Mitochondrien die unkontrollierte Ausbreitung des Sekretions-

stimulus innerhalb der gesamten Zelle und limitieren so gleichzeitig die Sekretionsmenge [87, 88].

Welche konkrete Rolle die Mitochondrien im zellulären Ca^{2+} -Signalsystem einnehmen, also was die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme bedingt und welche Konsequenzen sich daraus sowohl für die Mitochondrien als auch für die gesamte Zelle ergeben, ist höchst gewebespezifisch und kann selbst in ein und derselben Zelle variieren [51-54, 89]. Diesbezüglich ist festzuhalten, dass Mitochondrien in der Regel nicht wahllos verteilt, sondern in Abhängigkeit von ihrer Funktion innerhalb der Zelle organisiert sind. Dabei ist die Entwicklung verschiedener Populationen von Mitochondrien möglich, die je nach Lage innerhalb der Zelle und in Abhängigkeit ihrer Nähe zu anderen Organellen eigene Funktionen bezüglich der Regulation zellulärer Ca^{2+} -Signale, der Generierung von ATP oder der Induktion von Apoptose [51, 62, 90] aufweisen. Die Abbildung 49 fasst den mitochondrialen Einfluss auf das intrazelluläre Ca^{2+} -Signalsystem schematisch zusammen.

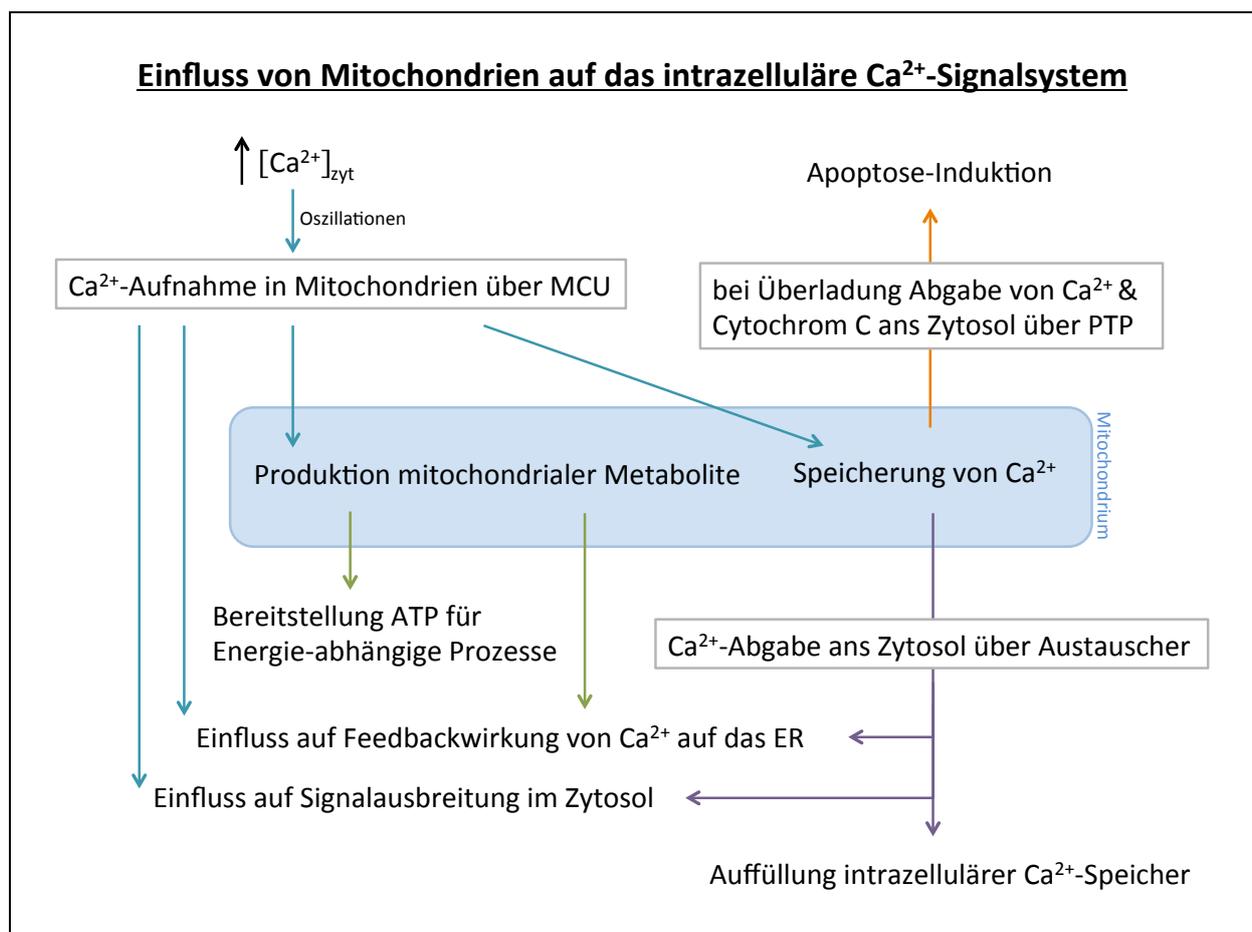


Abbildung 49: Schematische Darstellung des Einflusses von Mitochondrien auf das intrazelluläre Ca^{2+} -Signalsystem (stark vereinfacht). MCU = *mitochondrial calcium uniporter* (Ca^{2+} -Uniporter), PTP = *permeability transition pore* (Permeabilitäts-Transitions-pore).

Inwiefern Mitochondrien von sich aus in der Lage sind, eigenständige Ca^{2+} -Signale zu generieren bzw. als Initiatoren aktiv in das zelluläre Ca^{2+} -Signalsystem einzugreifen, war lange Zeit unklar und Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen. Sowohl Shears und Kirk als auch Denton und McCormack konnten in den 1980er Jahren zunächst aufzeigen, dass Mitochondrien nicht die Quelle sondern lediglich ein Ziel innerhalb des zellulären Ca^{2+} -Signalsystems darstellen und als Ca^{2+} -Puffer eine eher passive Rolle einnehmen [91], respektive primär der Verwaltung und nicht der Anbahnung intrazellulärer Ca^{2+} -Signale zu Gunsten der Energieproduktion dienen [92]. Ende der 1990er Jahre gelang es unter anderem Jouaville und Kollegen dies zu widerlegen, indem sie veranschaulichten, dass Mitochondrien sehr wohl Ausgangspunkt von Ca^{2+} -Signalen sein können und diese dafür nutzen, den Rest der Zelle über ihre eigenen Bedürfnisse zu informieren [65]. Die mitochondriale Kommunikation erfolgt dabei sowohl über Ca^{2+} -Signale [93] als auch mithilfe von Metaboliten wie ROS und ATP [52, 94, 95]. Dass Mitochondrien das Ca^{2+} -Signalsystem dafür nutzen, um die Zelle über Bedürfnisse unabhängig von der ATP-Synthese zu informieren und speziell pulmonale Mitochondrien sogar Ausgangspunkt der Registrierung von Gasveränderungen sein können, konnte spätestens mit der Entschlüsselung des Mechanismus der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion dargelegt werden. So führt die Abnahme des pO_2 über eine Reduktion des Elektronentransports an der Atmungskette zu Konzentrationsänderungen von ROS in den Mitochondrien der glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien. ROS evozieren als Sekundärbotenstoffe u.a. die Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$, was in einer Kontraktion der glatten Muskelzellen und somit in einer Vasokonstriktion der Pulmonalarterien mündet [8, 96].

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Mitochondrien aus verschiedenen Gründen zum Zwecke ihrer Funktionserfüllung Gewebe- und lokalisationsabhängig zytosolisches Ca^{2+} aufnehmen können und aktiv Einfluss auf das zelluläre Ca^{2+} -Signalsystem nehmen. Im Rahmen dieser Dissertation konnte verifiziert werden, dass eine Hypokapnie in A549-Zellen *in vitro* in einer reversiblen mitochondrialen Aufnahme von zytosolischem Ca^{2+} mündet und dass die Mitochondrien demnach eine zentrale Rolle im Prozess der alveolarepithelialen CO_2 -Registrierung einnehmen.

4.2.2 Die Aufnahme von zytosolischem Ca^{2+} in die Mitochondrien unter Hypokapnie beruht auf einer IDH3-vermittelten Steigerung der [NADH] mit konsekutiver Zunahme der Negativität des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ in A549-Zellen *in vitro*

Es konnte gezeigt werden, dass eine Hypokapnie *in vitro* in nativen A549-Zellen sowohl zu einer signifikanten Zunahme der Negativität des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ als auch zu einer Steigerung der [NADH] führt. Mithilfe von *in-vitro*-Versuchen an transfizierten A549-Zellen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Steigerung der [NADH] als auch die $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ -Veränderungen auf einer Hypokapnie-induzierten Aktivitätssteigerung der mitochondrialen IDH3 beruhen. Dieser Prozess ist reversibel.

Das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ resultiert im allgemeinen aus dem Ausstoß von Protonen (H^+) aus der Mitochondrienmatrix in den mitochondrialen Intermembranraum. Seit Beginn der 1970er Jahre ist bekannt, dass das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ die treibende Kraft für die Aufnahme von Ca^{2+} in die Mitochondrien und somit essentiell für die mitochondriale Funktion in jeder Zelle ist [97, 98]. So ist das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ nicht nur Grundlage für die ATP-Synthese, sondern auch für die Aufnahme von Ca^{2+} zum Zwecke der Apoptose-Induktion sowie für die Verwaltung von intrazellulären Ca^{2+} -Signalen unabdingbar [50, 99]. Dabei kann das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ ganz individuell entsprechend den zellulären Anforderungen lokal reguliert werden [90], wodurch eine große Heterogenität bezüglich des energetischen Status und der Funktion von Mitochondrien innerhalb einer Zelle möglich ist [38]. Die Aufrechterhaltung und Regulierung des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ erfolgt in Abhängigkeit von Reduktionsäquivalenten in Form von $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FAD_2 . Im Rahmen dieser Dissertation wurde gezeigt, dass eine Hypokapnie in A549-Zellen *in vitro* über eine Steigerung der [NADH] zu einer Zunahme der Negativität des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ führt, was in einer reversiblen Aufnahme von Ca^{2+} aus dem Zytosol in die Mitochondrien mündet. Mithilfe der Zugabe von Rotenon war zunächst eine erneute Verifizierung der zuvor vermuteten, zentralen Rolle von Mitochondrien in der alveolären CO_2 -Registrierung in nativen A549-Zellen möglich, da gezeigt werden konnte, dass die Hypokapnie-bedingte Aufnahme von zytosolischem Ca^{2+} in die Mitochondrien mit der Blockade der mitochondrialen Atmungskette und konsekutiv der Ausschaltung des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ als sonst treibende Kraft für die Aufnahme von Ca^{2+} ausblieb. Zusätzlich wurde damit gezeigt, dass der Mechanismus der CO_2 -Registrierung innerhalb der Mitochondrien vor der Atmungskette greifen muss, da trotz der Zugabe von Rotenon eine

Hypokapnie weiterhin in einer Zunahme der [NADH] mündete. $\text{NADH} + \text{H}^+$ gilt vor FAD_2 als wichtigstes Schlüsselzwischenprodukt für die Versorgung der Atmungskette mit Protonen (H^+) und somit u.a. für die Aufrechterhaltung essentieller mitochondrialer Funktionen [44], dessen Produktion im Mitochondrium auf der Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Dehydrogenasen beruht [69]. Durch eine quantitative Herunterregulierung der IDH3 konnte im Rahmen dieser Dissertation die Bedeutung dieser mitochondrialen Dehydrogenase für die Produktion von Reduktionsäquivalenten erneut bestätigt werden, da nach *Gen-Knock-Down* der IDH3 die [NADH] signifikant abnahm. Ferner gelang es, die IDH3 als ein Schlüsselenzym innerhalb der alveolären CO_2 -Registrierung zu identifizieren und damit den Mechanismus hinter der perfusionsabhängigen Ventilationsanpassung in der Lunge zu konkretisieren. So wurde gezeigt, dass nach *Gen-Knock-Down* der IDH3 eine Hypokapnie keine Steigerung der [NADH], keine Veränderungen des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ und auch keine Aufnahme von zytosolischem Ca^{2+} in die Mitochondrien zur Folge hatte.

Auch wenn diese offenbar direkte Abhängigkeit von CO_2 bislang noch nicht beschrieben wurde, so gibt es mehrere Theorien, welche die Rolle der IDH3 als *Sensing*-Molekül für CO_2 in der Lunge wahrscheinlich machen und die Ergebnisse dieser Dissertation bekräftigen. Bereits der Mechanismus des Euler-Liljestrand-Reflexes zeigt, dass die Registrierung von Gasveränderungen dort ihren Ursprung hat, wo das registrierte Gas unter physiologischen Bedingungen in biochemischen Reaktionen als Edukt genutzt wird oder als Produkt anfällt. So wird die Abnahme des pO_2 dort registriert, wo O_2 physiologisch genutzt wird, nämlich an der mitochondrialen Atmungskette der glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien [71]. Dass die Registrierung von CO_2 im Fall einer pulmonalen Hypokapnie folglich den mitochondrialen Citratzyklus involviert, scheint aus teleologischen Gesichtspunkten demnach möglich zu sein [100]. Zudem untermauern die mutmaßlichen Theorien der CO_2 -Registrierung in den Typ I Zellen des Glomus caroticum und den Mukosazellen des Ösophagus die hier diskutierte Rolle der IDH3. So sag man dort der löslichen Adenylatzyklase und der Carboanhydrase eine Involvierung als molekulare CO_2 -Sensoren nach – Enzyme, welche, genau wie die IDH3, unter physiologischen Umständen CO_2 -abhängig sind, respektive die Produktion von CO_2 katalysieren [23, 24, 101]. Auch wenn die oxydative Decarboxylierung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat durch die Isocitrat-Dehydrogenase keine reversible chemische Reaktion im engeren Sinne ist und bislang nur in einigen mikroaeroben Organismen als reduktiv

verlaufend beschrieben wurde [102, 103], ist sie Teil eines hochkomplexen Kreislaufs, der einer Vielzahl von Regulationsmechanismen unterliegt. Dass im speziellen die Aktivität der drei bislang identifizierten Isocitrat-Dehydrogenasen sowohl von ihren Edukten als auch ihren Produkten abhängig ist, konnte im Verlauf der letzten Jahrzehnte mehrfach aufgezeigt werden [104]. Es scheint demnach möglich zu sein, dass der unter Hypokapnie sinkende $p\text{CO}_2$ direkt Einfluss auf die IDH3 nimmt und über eine positive Rückkopplung zu einer Aktivitätssteigerung dieser und somit zu einer Wiederherstellung des gestörten physiologischen Gleichgewichts zwischen den Reaktionspartnern führt.

Dass CO_2 indirekt Einfluss auf seine eigene Produktion über die Aktivität der Ca^{2+} -abhängigen Dehydrogenasen nimmt, konnte 2011 erstmals durch Vohwinkel und Kollegen gezeigt werden. So führt eine Hyperkapnie in Fibroblasten und A549-Zellen über die Induktion einer microRNA-183 zu einer Translationsrepression der mRNA der Isocitrat-Dehydrogenase 2 (IDH2) und somit zu einer Beeinträchtigung der Zellproliferation und der Mitochondrienfunktion [78].

Im Rahmen dieser Dissertation wurde gezeigt, dass eine Reduktion des $p\text{CO}_2$ im Rahmen einer Hypokapnie in A549-Zellen *in vitro* zu einer IDH3-vermittelten Konzentrationssteigerung von Reduktionsäquivalenten in Form von $\text{NADH}+\text{H}^+$ führt, was in einer Zunahme der Negativität des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ mündet und eine reversible Aufnahme von Ca^{2+} aus dem Zytosol in die Mitochondrien nach sich zieht. Die mitochondriale IDH3 stellt somit ein Schlüsselenzym im Prozess der alveolären CO_2 -Registrierung dar. Die Abbildung 50 fasst den Mechanismus zusammen.

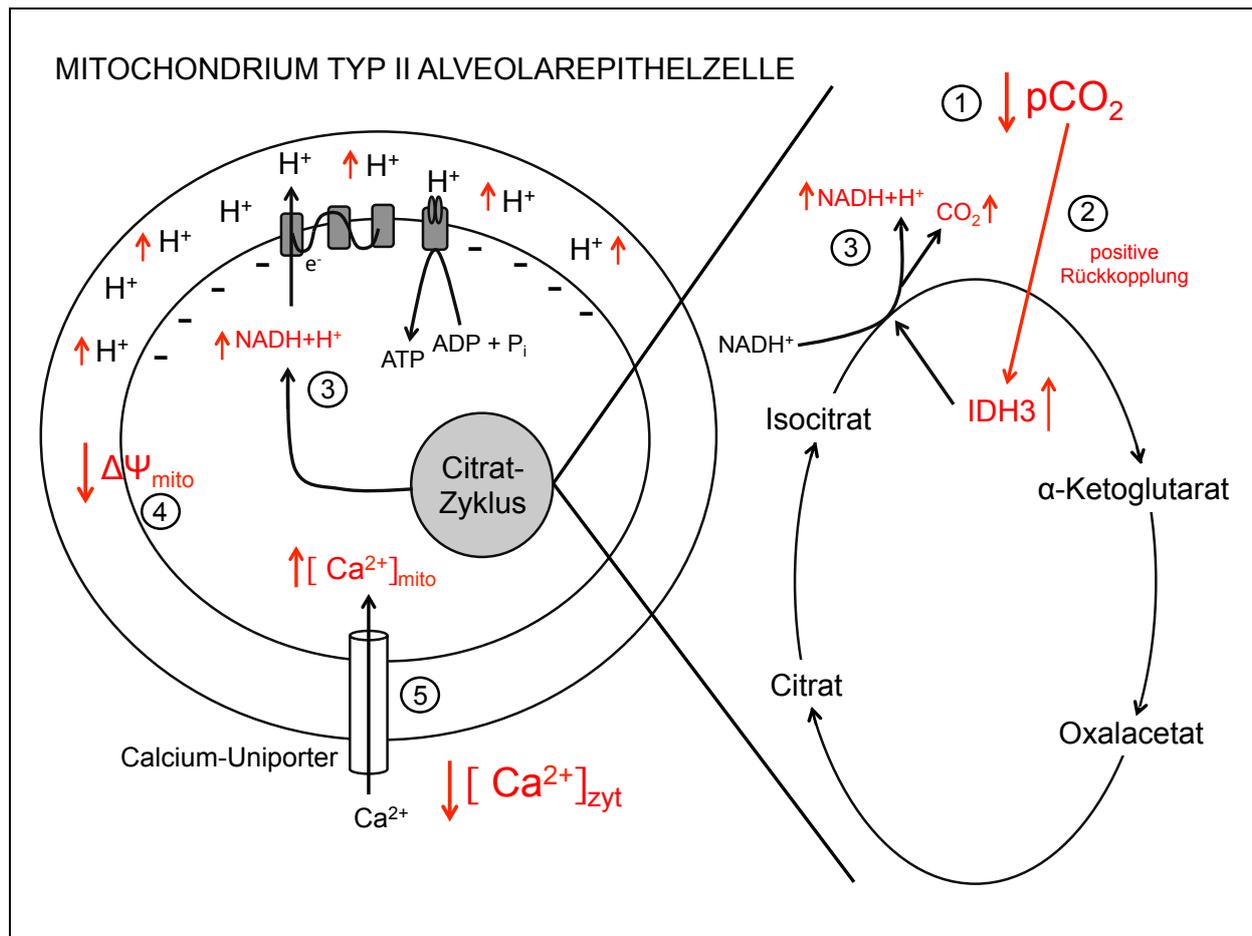


Abbildung 50: Rolle der IDH3 im Prozess der alveolären CO_2 -Registrierung in A549-Zellen *in vitro*. Über eine positive Rückkopplung des erniedrigten CO_2 kommt es bei einer alveolären Hypokapnie (1) zu einer gesteigerten Aktivierung der IDH3 des mitochondrialen Citratzyklus (2). Dies hat neben der gesteigerten Produktion von CO_2 zum Zwecke der Wiederherstellung des gestörten Reaktionsgleichgewichts eine vermehrte Produktion von Reduktionsäquivalenten in Form von $\text{NADH}+\text{H}^+$ zur Folge (3), mit deren Hilfe über die Atmungskette Protonen (H^+) aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum gepumpt werden. Dies mündet in einer Zunahme der Negativität des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ (4). Da das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ die treibende Kraft für die Aufnahme von Ca^{2+} aus dem Zytosol in die Mitochondrien ist, hat ein negativeres $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ eine vermehrte Aufnahme von Ca^{2+} über den Ca^{2+} -Uniporter in die Mitochondrien zur Folge (5). Entsprechend sinkt die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$.

4.2.3 Die Bedeutung der Ergebnisse für die Hypothese der mitochondrialen CO_2 -Registrierung in Alveolarepithelzellen

Durch *in-vitro*-Versuche an A549-Zellen konnte stellvertretend für humane Typ II Alveolarepithelzellen aufgezeigt werden, dass eine alveoläre Hypokapnie in den Mitochondrien registriert wird bzw. dass die Signalkaskade der alveolären CO_2 -Registrierung die Mitochondrien involviert und speziell die mitochondriale IDH3 eine entscheidende Schlüsselfunktion einnimmt. So bewirkt die Abnahme des pCO_2 im

Rahmen einer pulmonalen Perfusionsstörung über eine positive Rückkopplung eine Aktivitätssteigerung der IDH3 des mitochondrialen Citratzyklus. Im Sinne einer Wiederherstellung des gestörten physiologischen Gleichgewichts von CO_2 mündet dies über eine vermehrte Produktion von Reduktionsäquivalenten in Form von $\text{NADH}+\text{H}^+$ und eine Zunahme der Negativität des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ in einer reversiblen Aufnahme von zytosolischem Ca^{2+} über den Ca^{2+} -Uniporter in die Mitochondrien. Entsprechend sinkt die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$. In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der so hervorgerufene Mangel an freiem Ca^{2+} im Zytosol eine Fusion der Lamellarkörperchen mit der Zellmembran der Typ II Alveolarepithelzellen verhindert; eine quantitative Reduktion der alveolarepithelialen Surfactantsekretion mit konsekutiver Atelektasenbildung ist die Folge [33] (siehe Abbildung 51).

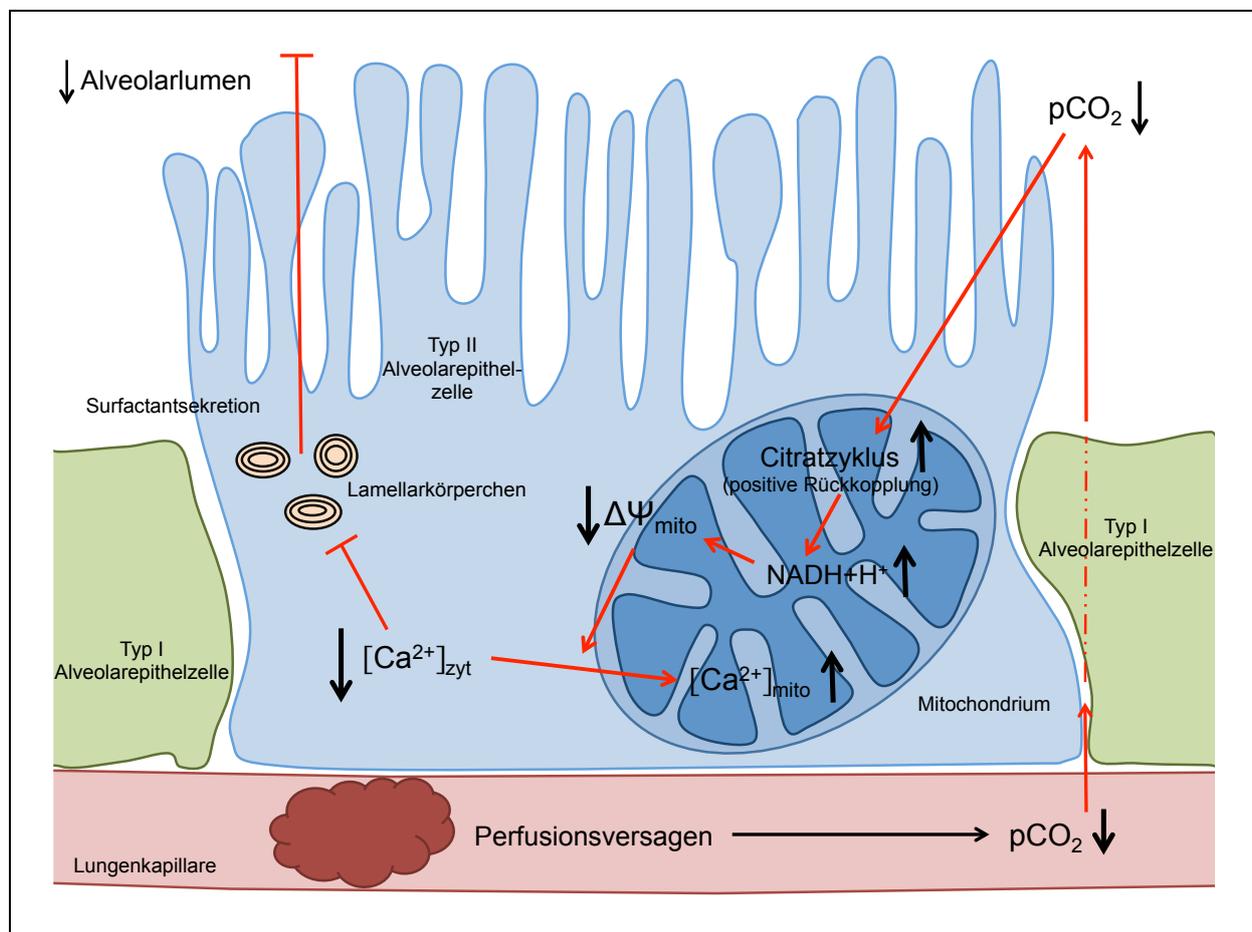


Abbildung 51: Schematische Darstellung der Hypothese der mitochondrialen CO_2 -Registrierung in Typ II Alveolarepithelzellen. Über eine positive Rückkopplung des erniedrigten pCO_2 kommt es bei einer alveolären Hypokapnie im Rahmen eines pulmonalen Perfusionsversagens zu einer gesteigerten Aktivierung der IDH3 des mitochondrialen Citratzyklus, was über eine vermehrte Produktion von Reduktionsäquivalenten in Form von $\text{NADH}+\text{H}^+$ und einer Zunahme der Negativität des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ zu einer Aufnahme von Ca^{2+} aus dem Zytosol in die Mitochondrien führt. Der Mangel an freiem Ca^{2+} im

Zytosol verhindert eine Fusion der Lamellarkörperchen mit der Zellmembran der Typ II Alveolarepithelzellen und hat demnach eine quantitative Surfactant-Dysfunktion zur Folge, welche in einer Reduktion der Surfactantsekretion mündet und zu einer Ventilationsminderung durch Atelektasenbildung führt. Eine Umverteilung der Ventilation hin zu besser perfundierten Lungenarealen ist die Folge.

Ob dies der einzige Mechanismus ist bzw. ob die dargestellte Signaltransduktionskaskade so vollständig ist, kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht abschließend beantwortet werden. Abgesehen von der indizierten Übertragung der Versuche sowohl auf primär isolierte Alveolarepithelzellen als auch auf die intakte Lunge sind somit ergänzende Untersuchungen zur vollständigen Entschlüsselung der alveolarepithelialen CO_2 -Registrierung nötig. In Anbetracht der Tatsache, dass die CO_2 -Registrierung in anderen Geweben wie beispielsweise den peripheren und zentralen Chemorezeptoren vor allem aufgrund ihrer enormen Komplexität u.a. durch die Involvierung vieler verschiedener CO_2 -, HCO_3^- - und pH-sensitiver Moleküle [105] bis heute nicht lückenlos entschlüsselt werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass sich die alveolarepitheliale CO_2 -Registrierung nicht auf den hier beschriebenen Mechanismus beschränkt. Konkret sollten die Auswirkungen von CO_2 dahingehend näher beleuchtet werden, als dass zu klären wäre, ob CO_2 alleinig über eine positive Rückkopplung direkt Einfluss auf die Aktivität der IDH3 nimmt oder ob sich sein Einfluss umfangreicher gestaltet und eventuell ebenfalls auf mRNA-Ebene greift, wie Vohwinkel et al. dies für den Einfluss von Hyperkapnie auf die IDH2 beobachten konnten [78]. Auch wenn die IDH1 und die IDH2 andere Funktionen innerhalb der Zelle einnehmen [70, 106, 107], sollte in diesem Zusammenhang ebenfalls untersucht werden, ob und wenn ja, welche Auswirkungen eine alveoläre Hypokapnie auf diese Isoformen der Isocitrat-Dehydrogenase in Typ II Alveolarepithelzellen hat. Auch eine CO_2 -vermittelte Aktivitätsveränderung der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase, welche ebenfalls eine oxydative Decarboxylierung innerhalb des Citratzykluses der Mitochondrien katalysiert, scheint möglich und könnte Inhalt weiterer Untersuchungen sein. Ein Einfluss auf andere Ziele innerhalb der Zelle scheint ebenfalls wahrscheinlich. Da Enzyme wie die lösliche Adenylatzyklase oder die Carboanhydrase in der CO_2 -Registrierung in peripheren Chemorezeptoren und im Ösophagus als mögliche molekulare CO_2 -Sensoren identifiziert wurden [24, 101], sind ergänzende Untersuchungen bezüglich weiterer CO_2 -sensitiver Moleküle neben

der IDH3 nötig, um den Prozess der alveolarepithelialen CO₂-Registrierung auf zellulärer Ebene weiterführend zu entschlüsseln.

Nicht nur die CO₂-Registrierung scheint komplex, auch die pulmonale Surfactantsekretion zeichnet sich durch eine Vielzahl auslösender Faktoren, involvierter Mediatoren und vollzogener Signalwege aus [45, 108, 109], sodass die Angriffspunkte für eine Inhibierung der Surfactantsekretion im Rahmen einer kompensatorischen Ventilationsanpassung bei pulmonalen Perfusionsstörungen mannigfaltig scheinen. Konkret sollte in diesem Zusammenhang beispielweise untersucht werden, ob sich der Einfluss der Mitochondrien bezüglich der Surfactantsekretion unter Hypokapnie alleinig auf die Aufnahme von Ca²⁺ aus dem Zytosol beschränkt oder ob die Mitochondrien über Metabolite wie ATP oder ROS ebenfalls Einfluss auf das zelluläre Ca²⁺-Signalsystem nehmen [52, 94, 95]. Da eine Hypokapnie zu einer Steigerung von Reduktionsäquivalenten und einer Negativitätszunahme des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ führt, wäre es durchaus denkbar, dass sowohl ROS als auch ATP Einfluss auf umliegende Organellen wie das ER und somit auf die Zellfunktion nehmen könnten, sollte sich deren Konzentration unter Hypokapnie ebenfalls ändern. Auch die Tatsache, dass die Sekretion von Surfactant nachweislich die Interaktion von Typ II mit Typ I Alveolarepithelzellen voraussetzt [47, 110], öffnet weitere Möglichkeiten für Ergänzungen oder eventuelle Alternativen zu der hier vorgestellten Signalkaskade.

Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Signaltransduktionskaskade, welche eine Hypokapnie in A549-Zellen auslöst, sowohl zytosolische als auch mitochondriale [Ca²⁺]-Oszillationen involviert, scheinen neben den Mitochondrien zusätzliche Zellorganellen in den Prozess der alveolarepithelialen CO₂-Registrierung involviert zu sein. [Ca²⁺]_{zyt}-Oszillationen stellen die häufigste Form der Signalvermittlung in nicht-erregbaren Zellen dar, deren Generierung primär auf aufeinander abgestimmten Handlungen von IP₃ und Ca²⁺ am IP₃R des ER beruht [39]. Das ER gilt als intrazellulärer Hauptspeicher für Ca²⁺ in nicht-muskulären Zellen [111, 112] und kontrolliert sowohl über die Speicherung von Ca²⁺ als auch über die Erzeugung von Ca²⁺-Signalen zahlreiche Zellfunktionen [113, 114]. Es breitet sich innerhalb der Zelle netzartig im gesamten Zytoplasma aus und steht damit in unmittelbarem Kontakt zu jeglichen intrazellulären Ca²⁺-Signalen oder Ca²⁺-freisetzenden Faktoren [115]. Von besonderer Bedeutung ist dabei seine Beziehung zu Mitochondrien. Beide Organellen gehen sowohl funktionelle als auch physische Verbindungen miteinander ein [116, 117] und formen dabei nicht nur das Bild der

intrazellulären Signalvermittlung, sondern nehmen Einfluss auf Funktionen des jeweilig anderen Organells. Die Tatsache, dass die Funktion von Mitochondrien unter anderem von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Oszillationen abhängt, welche primär durch das ER erzeugt werden, schafft eine besondere Beziehung zwischen beiden Zellorganellen. Auch für die physiologische Surfactantsekretion spielt, wie bereits zuvor erwähnt, die Verbindung zwischen ER und Mitochondrien eine bedeutende Rolle [46, 88]. Ferner basieren die Mechanismen der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion und der Hyperkapnie-Registrierung in Alveolarepithelzellen [30] auf Interaktionen beider Organellen miteinander. In Bezug auf zukünftige Arbeiten zur Untersuchung der alveolarepithelialen CO_2 -Registrierung sollte demnach speziell die Rolle des ER sowie die Beziehung zwischen den Mitochondrien und dem ER unter Hypokapnie untersucht werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Signaltransduktionskaskade der alveolären CO_2 -Registrierung mündet in einer quantitativen Reduktion der Surfactantsekretion in Typ II Alveolarepithelzellen. Seit der Veröffentlichung von Nakos et al. im Jahr 1998 ist bekannt, dass die Atelektasenbildung nach pulmonaler Perfusionsminderung jedoch nicht nur auf einer quantitativen, sondern auch auf einer qualitativen Dysfunktion des Surfactantsystems beruht [19]. Auch dies bildet eine mögliche Grundlage für weitere Untersuchungen. Zu klären wäre demnach, ob der hier vorgestellte Mechanismus zusätzlich eine Minderung der Qualität von Surfactant nach sich zieht, oder ob die Qualitätsreduktion von Surfactant im Rahmen einer pulmonalen Hypokapnie andere Signalwege und Mediatoren involviert.

Auch wenn nicht alle Fragen bezüglich der CO_2 -Registrierung in Alveolarepithelzellen abschließend geklärt werden konnten, lässt sich nichtsdestotrotz abschließend zusammenfassen, dass die IDH3 eine Schlüsselrolle in der mitochondrialen CO_2 -Registrierung in Alveolarepithelzellen einnimmt, da ihre Aktivitätssteigerung unter Hypokapnie über eine Reduktion der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in einer quantitativen Minderung der Surfactantsekretion mündet. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen demnach zu einem besseren Verständnis der pathophysiologischen Abläufe bei pulmonalen Perfusionsstörungen bei und stellen möglicherweise einen Angriffspunkt für zukünftige Therapien dar. Die Abbildung 52 fasst die physiologische Signaltransduktionskaskade der Surfactantsekretion in Typ II Alveolarepithelzellen zusammen, während die Abbildung 53 die Erkenntnisse dieser Arbeit schematisch darstellt.

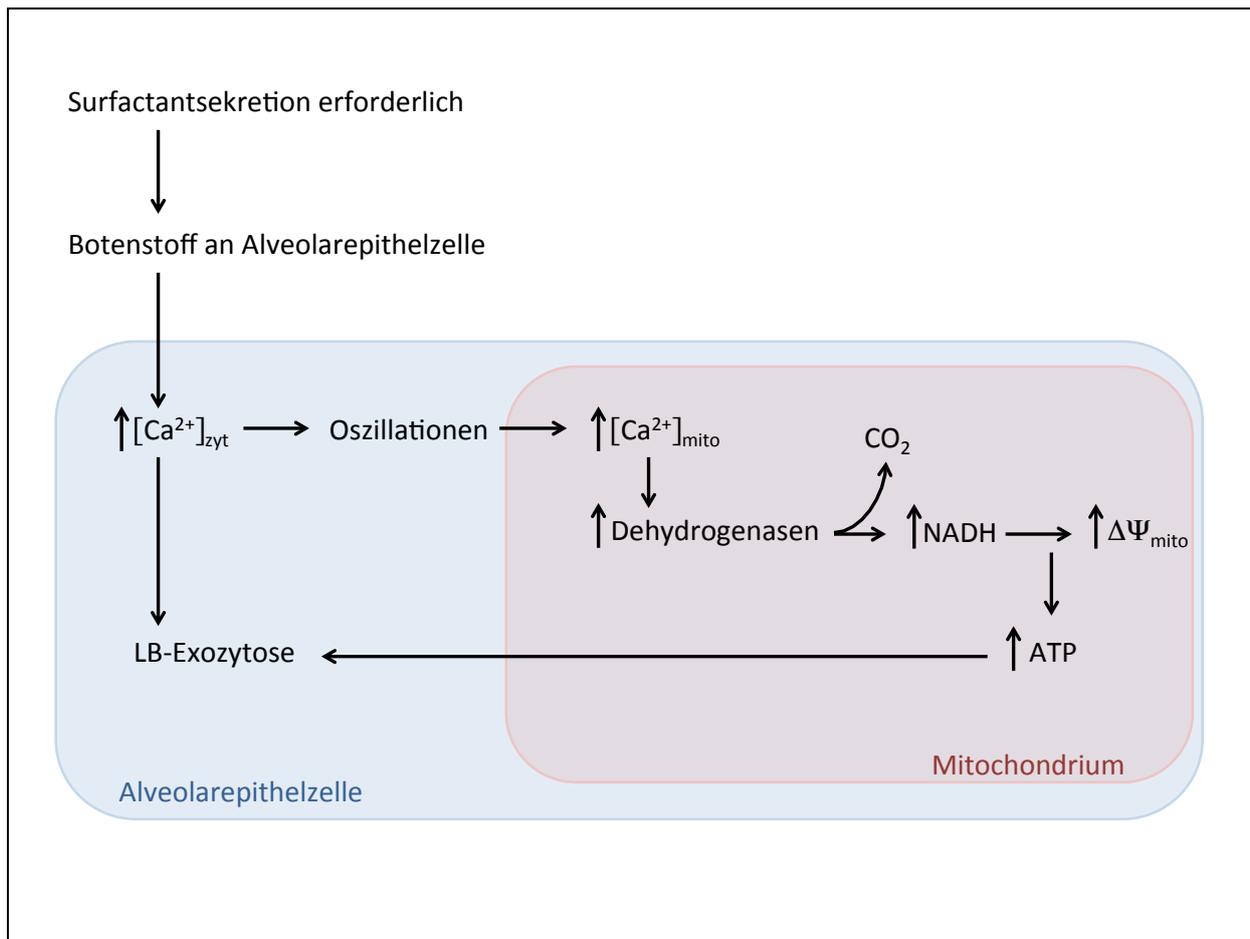


Abbildung 52: Physiologische Signaltransduktionskaskade der Surfactantsekretion in Typ II Alveolarepithelzellen (stark vereinfacht): Soll die Sekretion von Surfactant stattfinden, wird dies über Botenstoffe an die Alveolarepithelzelle vermittelt. Eine Zunahme der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in der Typ II Alveolarepithelzelle führt einerseits direkt zur Fusion der Lamellarkörperchen (LB) mit der Zellmembran und somit zu einer Freisetzung von Surfactant in die Alveole. Ferner wird für den intrazellulären Transport der Lamellarkörperchen zur Zellmembran Energie in Form von ATP benötigt. Die Zunahme der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ führt in Form von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Oszillationen zur Aufnahme von Ca^{2+} in die Mitochondrien, wo es die Ca^{2+} -abhängigen Dehydrogenasen aktiviert. Dies mündet über die Zunahme von Reduktionsäquivalenten entsprechend der erhöhten Bedürfnisse in einer vermehrten Produktion von ATP.

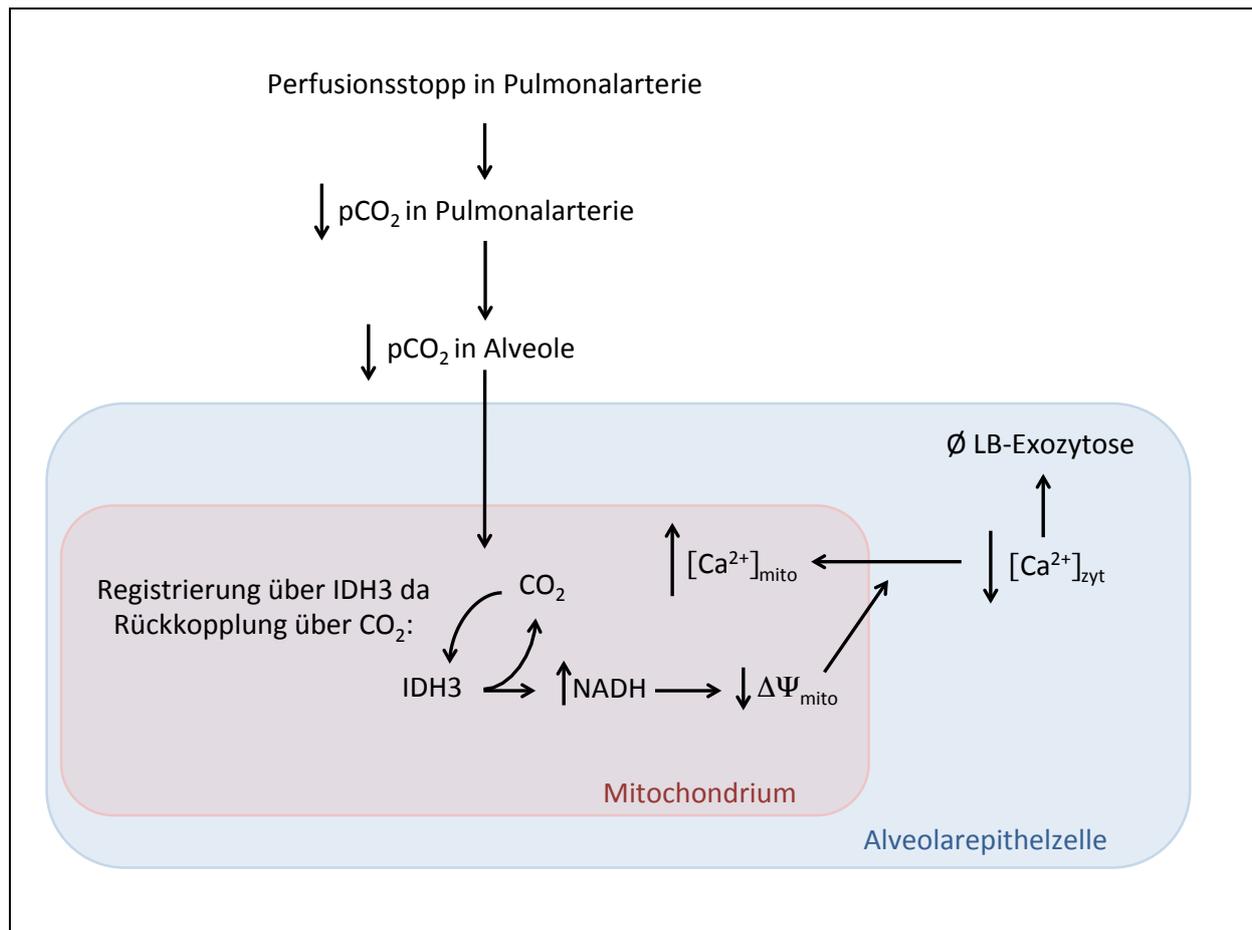


Abbildung 53: Hypothese der mitochondrialen CO₂-Registrierung in Typ II Alveolarepithelzellen: Ein pulmonaler Perfusionsstopp führt zu einem Abfall des pCO₂ in der betroffenen Pulmonalarterie und den angrenzenden Alveolen. Dies wird in den Mitochondrien der Alveolarepithelzellen registriert. Über eine positive Rückkopplung des erniedrigten CO₂ kommt es zu einer gesteigerten Aktivierung der IDH3 des mitochondrialen Citratzyklus. Dies hat eine vermehrte Produktion von Reduktionsäquivalenten in Form von NADH+H⁺ zur Folge, mit deren Hilfe über die Atmungskette Protonen (H⁺) aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum gepumpt werden. Dies mündet in einer Zunahme der Negativität des ΔΨ_{mito}. Da das ΔΨ_{mito} die treibende Kraft für die Aufnahme von Ca²⁺ aus dem Zytosol in die Mitochondrien ist, hat ein negativeres ΔΨ_{mito} eine vermehrte Aufnahme von Ca²⁺ über den Ca²⁺-Uniporter in die Mitochondrien zur Folge. Entsprechend sinkt die [Ca²⁺]_{zyt}. Der Mangel an freiem Ca²⁺ im Zytosol verhindert eine Fusion der Lamellarkörperchen mit der Zellmembran der Typ II Alveolarepithelzellen. Die mitochondriale CO₂-Registrierung über die IDH3 hat demnach eine quantitative Reduktion der Surfactantsekretion zur Folge.

5 Zusammenfassung

Eine der Ursachen für Gasaustauschstörungen in der Lunge und damit eine häufige Komplikation bei kritisch kranken Patienten ist ein Missverhältnis zwischen alveolärer Ventilation und Perfusion. Um dieses Missverhältnis gering zu halten, existieren in der Lunge spezifische Kompensationsmechanismen. Ventilationsstörungen, wie sie beispielsweise bei Pneumonien und Atelektasen auftreten, führen zu einer lokalen alveolären Hypoxie, welche über eine Zunahme der pulmonalen Shuntperfusion in einer systemischen Hypoxämie münden kann. Um dieser entgegenzuwirken, reagieren die Pulmonalarterien betroffener Lungenareale mit einer Vasokonstriktion. Diese hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion beruht auf einer O₂-vermittelten Abnahme des mitochondrialen Elektronentransportes und einer konsekutiven Veränderung mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in den glatten Muskelzellen betroffener Pulmonalarterien, welche über die zweizeitige Freisetzung von Ca²⁺ zu einer Aktivierung von Aktin und Myosin und entsprechender Kontraktion dieser glatten Muskelzellen führt. Dies hat eine Verschiebung des pulmonalen Blutflusses weg von minderventilierten Lungenarealen hin zu Arealen mit physiologischen Ventilationsverhältnissen und somit eine Wiederherstellung des zuvor gestörten Gasaustauschs in der Lunge zur Folge. Perfusionsstörungen, wie sie etwa im Rahmen von pulmonalen Thrombembolien auftreten, führen ebenfalls zu einer Störung des pulmonalen Gasaustauschs. Um dieser entgegenzuwirken, kommt es in den betroffenen Lungenarealen zu einer Reduktion der Ventilation und einer Verlagerung dieser zu Arealen mit physiologischen Perfusionsverhältnissen. Diese Ventilationsverlagerung beruht auf einer Bildung von Atelektasen im betroffenen Lungenareal, welche auf eine CO₂-vermittelte Dysfunktion des Surfactant-Sekretionssystems zurückzuführen ist. Welche zellulären Prozesse diesem Mechanismus zugrunde liegen, ist bislang jedoch unklar.

Durch Vorversuche unserer Arbeitsgruppe an isoliert-perfundierten Rattenlungen konnte gezeigt werden, dass diese Hypokapnie-bedingte Dysfunktion auf einer mitochondrialen Aufnahme von zytosolischem Ca²⁺ in Typ II Alveolarepithelzellen beruht und dass die Mitochondrien von Typ II Alveolarepithelzellen demnach eine zentrale Rolle im Prozess der alveolären CO₂-Registrierung einnehmen. Ziel dieser Arbeit war es, diese bislang unbeschriebene Funktion der Mitochondrien genauer zu untersuchen. Dabei wurde im speziellen die Rolle der IDH3 analysiert. Diese

katalysiert als mitochondrienspezifisches Enzym die oxydative Decarboxylierung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat innerhalb des Citratzykluses, wobei NAD^+ zu $\text{NADH}+\text{H}^+$ reduziert sowie CO_2 produziert wird. In der Annahme, dass die Registrierung von CO_2 -Veränderung in der Lunge dort stattfindet, wo CO_2 unter physiologischen Umständen produziert wird und der während einer pulmonalen Perfusionsstörung sinkende alveoläre pCO_2 zu einer Aktivitätssteigerung der IDH3 führt, um dem durch die Hypokapnie gestörten Reaktionsgleichgewicht entgegenzuwirken, wurde im Rahmen dieser Arbeit mithilfe fluoreszenzmikroskopischer Versuche eruiert, welchen Einfluss eine Hypokapnie auf die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$, die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$, das $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ und die $[\text{NADH}]$ in A549-Zellen *in vitro* hat und inwiefern sich dieser Einfluss durch eine Herunterregulierung der mitochondrialen IDH3 mittels Gen-*Knock-Down* ändert. Dabei wurde die Wirksamkeit des Gen-*Knock-Down* mittels PCR, Western Blot und ebenfalls fluoreszenzmikroskopischer Versuche verifiziert. Es konnte so gezeigt werden, dass eine Hypokapnie in A549-Zellen *in vitro* zu einer Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$, einer Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$, einer Zunahme der Negativität des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ und einer Zunahme der $[\text{NADH}]$ führt. Diese Veränderungen verringerten sich nach der Herunterregulierung der mitochondrialen IDH3 signifikant. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass eine alveoläre Hypokapnie in den Mitochondrien registriert wird bzw. dass die Signalkaskade der alveolären CO_2 -Registrierung die Mitochondrien involviert. Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine Hypokapnie in A549-Zellen *in vitro* über einen positiven Rückkopplungsmechanismus zu einer IDH3-vermittelten Konzentrationssteigerung von Reduktionsäquivalenten in Form von $\text{NADH}+\text{H}^+$ führt, was in einer Zunahme der Negativität des $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ mündet und eine Aufnahme von Ca^{2+} aus dem Zytosol in die Mitochondrien nach sich zieht. Die mitochondriale IDH3 konnte somit als ein Schlüsselenzym im Prozess der alveolären CO_2 -Registrierung identifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen demnach zu einem besseren Verständnis der (patho-)physiologischen Abläufe in der Lunge bei, wobei eine zukünftige Verifizierung durch Versuche an primär isolierten Alveolarepithelzellen und der intakten Lunge angestrebt werden sollte.

5 Abstract

Background: One of the main reasons for gas exchange disorders within the human lung and therefore a common complication amongst critically ill patients is a mismatch between alveolar ventilation and perfusion. In order to minimise this mismatch, there are specific compensatory mechanisms within the lung.

Disruption of pulmonary ventilation, as seen during pneumonia and atelectasis, leads to a decrease in oxygen within the affected area of the lung. Due to a consecutive increase in shunt perfusion, this pulmonary hypoxia may lead to a systemic hypoxemia. In order to minimise the shunt perfusion and the consequential harm for the entire body, low oxygen levels within the lung evoke a vasoconstriction of the adjacent pulmonary arteries. This reflex, also known as hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV), leads to a redirection of pulmonary blood flow from areas of poor ventilation to areas of unimpaired ventilation within the lung. The molecular mechanism behind HPV is well known and involves a change in reactive oxygen species and a release of calcium ions (Ca^{2+}) within the smooth muscle cells of the affected pulmonary arteries.

Disruption of pulmonary perfusion, as caused by pulmonary embolisms, is another main reason for the failure of gas exchange within the human lung. In order to minimise the effects of it on the systemic circulation and to retain an efficient ratio between pulmonary ventilation and perfusion, ventilation is shifted from areas of poor perfusion to areas of undisrupted perfusion within the lung. In contrast to HPV, the redirection of pulmonary ventilation following a disruption of pulmonary perfusion is a CO_2 -dependent process, which is based upon the formation of atelectasis in the affected areas of the lung due to a dysfunction of surfactant secretion in pulmonary alveoli during hypocapnia. However, apart from that, little is known about the underlying molecular mechanism leading to this change in ventilation.

Preliminary research using isolated, perfused rat lungs has shown that this hypocapnia-mediated dysfunction of surfactant secretion causing the shift in ventilation is based on an uptake of cytosolic Ca^{2+} into the mitochondria of type II alveolar cells. The aim of this study was to further investigate this so far unknown role of the mitochondria in type II alveolar cells by analysing the influence of the isocitrate dehydrogenase 3 (IDH3) during hypocapnia. The IDH3 is an enzyme specific to mitochondria, which catalyses the decarboxylation of isocitrate to α -

ketoglutarate within the Krebs cycle and thus produces $\text{NADH}+\text{H}^+$ as well as CO_2 . Assuming that the sensing of CO_2 within the lung takes place where CO_2 is physiologically produced, we claimed that the decrease in alveolar CO_2 , caused by a disruption of pulmonary perfusion, leads to an increase in the activity of the IDH3 in order to re-establish the equilibrium between the reactants involving the production of CO_2 .

Methods: Real-time fluorescence imaging of A549 cells was used to analyse the effects of hypocapnia on the concentration of cytosolic calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$), the concentration of mitochondrial calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$), the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_{\text{mito}}$) as well as the concentration of NADH ($[\text{NADH}]$) *in vitro*. In order to do so, A549 cells were incubated with specific fluorescent dyes such as Fura-2-AM, Rhod-2-AM and TMRM⁺ prior to the actual process of microscopy. In addition to the real-time fluorescence imaging, a NADH assay was run to determine the effects of hypocapnia on the $[\text{NADH}]$ in A549 cells *in vitro*. As a surrogate for blood, a specially prepared HBS buffer was used. For normocapnic conditions, the buffer was saturated with 5 % of CO_2 before applying it onto the cells. In order to change from normocapnia to hypocapnia, the buffer solution surrounding the A549 cells was carefully exchanged. In order to further investigate the role of mitochondria within the sensing process of CO_2 , rotenone was applied onto the cells. In a second step, and in order to analyse the influence of the IDH3 on the changes happening during hypocapnia, the IDH3 was down-regulated using a specific siRNA in advance to the microscopy. In order to obtain any information to whether the process of the gene knock down caused any other changes to the A549 cells than those intended, control tests were run using a matching scrambled siRNA. The efficiency of the gene knock down was verified using PCR, western blot as well as real-time fluorescence imaging using a siRNA marked with a special fluorescent dye. In order to determine whether the cells had taken any harm during the experiments, at the end of every trial, ATP was applied onto the cells in order to check on their vitality.

Results: Changing from normocapnia to hypocapnia led to a decrease in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$, an increase in the negativity of the $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ and an increase in $[\text{NADH}]$. All of these effects were reversible, meaning that a further switch from hypocapnia to normocapnia led to a change to initial concentrations.

After the knock down of the IDH3, all the above stated effects significantly declined. Changing from normocapnia to hypocapnia led to a significantly smaller decrease in $[Ca^{2+}]_{cyt}$, a significantly smaller increase in $[Ca^{2+}]_{mito}$, a significantly smaller increase in the negativity of the $\Delta\Psi_{mito}$ and a significantly smaller increase in [NADH].

Conclusion: The results confirm the findings of the preliminary investigation in a way that the sensing process of CO_2 within the human lung clearly involves the mitochondria of type II alveolar cells. In addition, it was shown that hypocapnia in A549 *in vitro* leads to an IDH3-mediated increase in reducing equivalents in the form of $NADH+H^+$, which evokes an increase in the negativity of the $\Delta\Psi_{mito}$ and results in an uptake of cytosolic Ca^{2+} into mitochondria. This Ca^{2+} uptake is one reason for the dysfunction of the surfactant secretion leading to a redirection of ventilation following a disruption of pulmonary perfusion. The IDH3 was therefore identified as a key enzyme within the signalling cascade of pulmonary CO_2 sensing.

The results help to obtain a better insight into the pathophysiological processes within the human lung. However, further investigation on alveolar epithelial cells *in vitro* and *in vivo* needs to be done in order to prove the findings above as well as to check on any additional pathways involved in the sensing process of CO_2 within the lung.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

AB	<u>A</u> ntibiotikum/a
ADP	<u>A</u> denosindiphosphat
AK	<u>A</u> ntikörper
AM	<u>A</u> cetoxymethyl
ATP	<u>A</u> denosintriphosphat
BAL	<u>B</u> ronchoalveolären <u>L</u> avage
BisTris	<u>B</u> is(2-hydroxyethyl)amino- <u>t</u> ris(hydroxymethyl)methan
BGA	<u>B</u> lutgasanalyse
BL	<u>B</u> aseline (Ausgangsbedingungen)
BSA	<u>B</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin (Bovines Serumalbumin/Rinderalbumin)
°C	Temperatur in Celsius / Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium-Ion
[Ca ²⁺] _{mito}	Mitochondriale Calciumkonzentration
[Ca ²⁺] _{zyt}	Zytosolische Calciumkonzentration
cDNA	<u>C</u> omplimentary <u>D</u> N <u>A</u> (komplementäre DNA)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cu ²⁺	Kupfer-Ion
DH	<u>D</u> ehydrogenase
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	<u>D</u> esoxyribonucleic <u>A</u> cid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	<u>D</u> ithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacetat
ER	<u>E</u> ndoplasmatisches <u>R</u> etikulum
FBS	<u>F</u> etal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum (fetales Kälberserum)
GAP-DH	<u>G</u> lycerinaldehyd-3-phosphat- <u>D</u> ehydrogenase
GJ	<u>G</u> ap <u>J</u> unction (Zell-Zell-Kontakt)
H ⁺	Wasserstoff-Ion/Proton
H ₂	Wasserstoff
h	Stunde

HBS	<i>HEPES Buffered Saline</i> (Pufferlösung)
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat-Ion
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IDH2	Isocitrat-Dehydrogenase 2
IDH3A	Isocitrat-Dehydrogenase 3-(NAD ⁺)-Alpha
IDH3G	Isocitrat-Dehydrogenase 3-Gamma
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP ₃ R	Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor
kDA	Kilodalton
K ₃ PO ₄	Kaliumphosphat
LAE	Lungenarterienembolie
LB	<i>Lamellar body</i> (Lamellarkörperchen)
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LTG	<i>LysoTracker® Green</i>
M	Molar
MCU	<i>Mitochondrial Calcium Uniporter</i> (Calcium-Uniporter)
min	Minute
MLK	Myosin-Leichtketten-Kinase
mol	mol
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>Messenger-RNA</i> (Boten-RNA)
mRyR	mitochondrialer Ryanodin-Rezeptor
MTG	<i>MitoTracker® Green</i>
MW	Mittelwert
N ₂	Stickstoff
Na ⁺	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NADH + H ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxygeniert Form)
[NADH]	NADH-Konzentration
NCX	Na ⁺ -Ca ²⁺ -Austauscher
NCX _{mito}	mitochondrialer Na ⁺ -Ca ²⁺ -Austauscher
nM	Nanomolar

nm	<u>N</u> anometer
O ₂	Sauerstoff
p	Partialdruck
PASMC	<u>P</u> ulmonary <u>A</u> rtery <u>S</u> mooth <u>M</u> uscle <u>C</u> ells (glatte Muskelzellen der Pulmonalarterien)
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PKA	<u>P</u> roteinkinase <u>A</u>
PKC	<u>P</u> roteinkinase <u>C</u>
PTP	<u>P</u> ermeability <u>T</u> ransition <u>P</u> ore (Permeabilitäts-Transitions-Pore)
PO ₄ ³⁻	Phosphat-Ion
R123	<u>R</u> hodamin <u>123</u>
RaM	<u>R</u> apid <u>M</u> ode of <u>C</u> a ²⁺ <u>U</u> ptake (Methode der Calciumaufnahme)
RIPA	<u>R</u> adioimmunoprecipitation <u>a</u> ssay <u>b</u> uffer (RIPA-Puffer)
RL	<u>R</u> aumluft
RNA	<u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid (Ribonukleinsäure)
RNase	<u>R</u> ibunuklease
ROS	<u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies (reaktiven Sauerstoffspezies)
rpm	<u>R</u> ounds <u>p</u> er <u>M</u> inute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	<u>R</u> everse <u>T</u> ranscription <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
RYR	<u>R</u> yanodin-Rezeptor
Scrambled siRNA	<u>S</u> crambled <u>S</u> mall <u>I</u> nterfering <u>R</u> NA (Negativkontrolle)
SDS-PAGE	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate <u>P</u> olyacrylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
SERCA	<u>S</u> arcoplasmic/ <u>E</u> ndoplasmic <u>R</u> eticulum <u>C</u> alcium <u>A</u> TPase (Calciumpumpe des sarko-/endoplasmatischen Retikulums)
siRNA	<u>S</u> mall <u>I</u> nterfering <u>R</u> NA
SD	<u>S</u> tandard <u>D</u> iviation (Standardabweichung)
T25	<u>T</u> issue <u>C</u> ulture <u>F</u> lask <u>25</u> cm ² (Zellkulturflasche)
T75	<u>T</u> issue <u>C</u> ulture <u>F</u> lask <u>75</u> cm ² (Zellkulturflasche)
t	Zeit
Tab.	<u>T</u> abelle
TBS	<u>T</u> ris- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline (TBS-Puffer)

TMRE	<u>T</u> etramethylrhodaminethylester
TMRM ⁺	<u>T</u> etramethylrhodamin <u>m</u> ethylester
TRIS	<u>T</u> ris(hydroxymethyl-)aminomethan
V	Volt
VF	<u>V</u> erdünnungsfaktor
ZS	<u>Z</u> ellsuspension
$\Delta\Psi_{\text{mito}}$	Mitochondriales Membranpotential
μM	<u>M</u> ikromolar
1°	primär
2°	sekundär

6.2 Literaturverzeichnis

1. Muders, T. and H. Wrigge, *New insights into experimental evidence on atelectasis and causes of lung injury*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2010. **24**(2): p. 171-82.
2. Waypa, G.B. and P.T. Schumacker, *O₂ sensing in hypoxic pulmonary vasoconstriction: the mitochondrial door re-opens*. Respir Physiol Neurobiol, 2002. **132**(1): p. 81-91.
3. Moore, R.L., G.H. Humphreys, and H.W. Cochran, *The effect of sudden occlusion of either primary branch of the pulmonary artery on cardiac output and pulmonary expansion*. J Thorac Surg, 1934(3): p. 573-589.
4. Euler, U.S.v. and G. Liljestrand, *Observations on the Pulmonary Arterial Blood Pressure in the Cat*. Acta Physiologica Scandinavica, 1946. **12**(4): p. 301-320.
5. Nagasaka, Y., et al., *Micropuncture measurement of lung microvascular pressure profile during hypoxia in cats*. Circ Res, 1984. **54**(1): p. 90-5.
6. Aaronson, P.I., et al., *Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms and controversies*. J Physiol, 2006. **570**(Pt 1): p. 53-8.
7. Sylvester, J.T., et al., *Hypoxic pulmonary vasoconstriction*. Physiol Rev, 2012. **92**(1): p. 367-520.
8. Waypa, G.B., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes*. Circ Res, 2002. **91**(8): p. 719-26.
9. Carlens, E., H.E. Hanson, and B. Nordenstrom, *Temporary unilateral occlusion of the pulmonary artery; a new method of determining separate lung function and of radiologic examinations*. J Thorac Surg, 1951. **22**(5): p. 527-36.
10. Venrath, H., et al., *[Bronchspirometry in vascular diseases of the minor circulation]*. Beitr Klin Tuberk Spezif Tuberkuloseforsch, 1952. **107**(4): p. 291-4.
11. Swenson, E.W., T.N. Finley, and S.V. Guzman, *Unilateral hypoventilation in man during temporary occlusion of one pulmonary artery*. J Clin Invest, 1961. **40**: p. 828-35.
12. Severinghaus, J.W., et al., *Unilateral hypoventilation produced in dogs by occluding one pulmonary artery*. J Appl Physiol, 1961. **16**: p. 53-60.

13. Levy, S.E., et al., *Ventilation-perfusion abnormalities in experimental pulmonary embolism*. J Clin Invest, 1965. **44**(10): p. 1699-707.
14. Levy, S.E. and D.H. Simmons, *Redistribution of alveolar ventilation following pulmonary thromboembolism in the dog*. J Appl Physiol, 1974. **36**(1): p. 60-8.
15. Bruns, O. and F. Sauerbruch, *Die künstliche Erzeugung von Lungenschrumpfung durch Unterbindung von Aesten der Pulmonalarterie*. Mitt. a. d. Grenzgeb. d. Med. u. Chir., 1911. **23**: p. 343-350.
16. Chernick, V., W.A. Hodson, and L.J. Greenfield, *Effect of chronic pulmonary artery ligation on pulmonary mechanics and surfactant*. J Appl Physiol, 1966. **21**(4): p. 1315-20.
17. Calkovska, A., D. Mokra, and V. Calkovsky, *Lung surfactant alterations in pulmonary thromboembolism*. Eur J Med Res, 2009. **14 Suppl 4**: p. 38-41.
18. Shepard, J.W., Jr., G.F. Dolan, and S.Y. Yu, *Factors regulating lamellar body volume density of type II pneumocytes in excised dog lungs*. J Appl Physiol, 1982. **53**(3): p. 555-62.
19. Nakos, G., E.I. Kitsioui, and M.E. Lekka, *Bronchoalveolar lavage alterations in pulmonary embolism*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(5 Pt 1): p. 1504-10.
20. Tsang, J.Y., W.J. Lamm, and E.R. Swenson, *Regional CO₂ tension quantitatively mediates homeostatic redistribution of ventilation following acute pulmonary thromboembolism in pigs*. J Appl Physiol, 2009. **107**(3): p. 755-62.
21. Sharabi, K., et al., *Sensing, physiological effects and molecular response to elevated CO₂ levels in eukaryotes*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(11-12): p. 4304-18.
22. Young, J.J., et al., *CO₂ signaling in guard cells: calcium sensitivity response modulation, a Ca²⁺-independent phase, and CO₂ insensitivity of the gca2 mutant*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(19): p. 7506-11.
23. Summers, B.A., J.L. Overholt, and N.R. Prabhakar, *CO₂ and pH independently modulate L-type Ca²⁺ current in rabbit carotid body glomus cells*. J Neurophysiol, 2002. **88**(2): p. 604-12.
24. Akiba, Y., et al., *CO₂ chemosensing in rat oesophagus*. Gut, 2008. **57**(12): p. 1654-64.
25. Nisell, O.I., *Some aspects of the pulmonary circulation and ventilation*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1952. **3**(2): p. 142-8.

26. Brogan, T.V., et al., *Carbon dioxide added late in inspiration reduces ventilation-perfusion heterogeneity without causing respiratory acidosis*. J Appl Physiol, 2004. **96**(5): p. 1894-8.
27. Dorrington, K.L., et al., *Extent to which pulmonary vascular responses to PCO₂ and PO₂ play a functional role within the healthy human lung*. J Appl Physiol, 2010. **108**(5): p. 1084-96.
28. Myriantsefs, P.M., et al., *Hypocapnic but not metabolic alkalosis impairs alveolar fluid reabsorption*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **171**(11): p. 1267-71.
29. Briva, A., et al., *High CO₂ levels impair alveolar epithelial function independently of pH*. PLoS One, 2007. **2**(11): p. e1238.
30. Vadasz, I., et al., *AMP-activated protein kinase regulates CO₂-induced alveolar epithelial dysfunction in rats and human cells by promoting Na,K-ATPase endocytosis*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 752-62.
31. Briva, A., E. Lecuona, and J.I. Sznajder, *[Permissive and non-permissive hypercapnia: mechanisms of action and consequences of high carbon dioxide levels]*. Arch Bronconeumol, 2010. **46**(7): p. 378-82.
32. Vadasz, I., et al., *Evolutionary conserved role of c-Jun-N-terminal kinase in CO₂-induced epithelial dysfunction*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46696.
33. Tank, S., et al., *Die alveoläre Hypokapnie reduziert über Inhibition der Surfactantsekretion die alveoläre Ventilation*. Poster Präsentation, 13. Hauptstadtkongress der DGAI für Anästhesiologie und Intensivmedizin, 2011.
34. Carafoli, E. and M. Crompton, *The regulation of intracellular calcium by mitochondria*. Ann N Y Acad Sci, 1978. **307**: p. 269-84.
35. Hajnoczky, G. and A.P. Thomas, *Minimal requirements for calcium oscillations driven by the IP₃ receptor*. EMBO J, 1997. **16**(12): p. 3533-43.
36. Ying, X., et al., *Ca²⁺ waves in lung capillary endothelium*. Circ Res, 1996. **79**(4): p. 898-908.
37. Ryu, S.Y., et al., *Extracellular ATP and P₂Y₂ receptors mediate intercellular Ca²⁺ waves induced by mechanical stimulation in submandibular gland cells: Role of mitochondrial regulation of store operated Ca²⁺ entry*. Cell Calcium, 2010. **47**(1): p. 65-76.

38. Laude, A.J. and A.W. Simpson, *Compartmentalized signalling: Ca²⁺ compartments, microdomains and the many facets of Ca²⁺ signalling*. FEBS J, 2009. **276**(7): p. 1800-16.
39. Thomas, A.P., et al., *Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling*. FASEB J, 1996. **10**(13): p. 1505-17.
40. Hajnoczky, G., R. Hager, and A.P. Thomas, *Mitochondria suppress local feedback activation of inositol 1,4, 5-trisphosphate receptors by Ca²⁺*. J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 14157-62.
41. Pacher, P., et al., *Uncoupling of ER-mitochondrial calcium communication by transforming growth factor-beta*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **295**(5): p. F1303-12.
42. Rooney, T.A., E.J. Sass, and A.P. Thomas, *Agonist-induced cytosolic calcium oscillations originate from a specific locus in single hepatocytes*. J Biol Chem, 1990. **265**(18): p. 10792-6.
43. Robitaille, R., E.M. Adler, and M.P. Charlton, *Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses*. Neuron, 1990. **5**(6): p. 773-9.
44. Hajnoczky, G., et al., *Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria*. Cell, 1995. **82**(3): p. 415-24.
45. Andreeva, A.V., M.A. Kutuzov, and T.A. Voyno-Yasenetskaya, *Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(2): p. L259-71.
46. Dietl, P., et al., *Lamellar body exocytosis by cell stretch or purinergic stimulation: possible physiological roles, messengers and mechanisms*. Cell Physiol Biochem, 2010. **25**(1): p. 1-12.
47. Ashino, Y., et al., *[Ca²⁺]_i oscillations regulate type II cell exocytosis in the pulmonary alveolus*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(1): p. L5-13.
48. Sano, K., D.R. Voelker, and R.J. Mason, *Effect of secretagogues on cytoplasmic free calcium in alveolar type II epithelial cells*. Am J Physiol, 1987. **253**(5 Pt 1): p. C679-86.
49. Ichimura, H., et al., *Lung surfactant secretion by interalveolar Ca²⁺ signaling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **291**(4): p. L596-601.

50. Babcock, D.F., et al., *Mitochondrial participation in the intracellular Ca²⁺ network*. J Cell Biol, 1997. **136**(4): p. 833-44.
51. Johnson, P.R., et al., *Non-uniform distribution of mitochondria in pancreatic acinar cells*. Cell Tissue Res, 2003. **313**(1): p. 37-45.
52. Walsh, C., et al., *Modulation of calcium signalling by mitochondria*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(11): p. 1374-82.
53. Chinopoulos, C. and V. Adam-Vizi, *The 'ins and outs' of Ca²⁺ in mitochondria*. FEBS J, 2010. **277**(18): p. 3621.
54. Starkov, A.A., *The molecular identity of the mitochondrial Ca²⁺ sequestration system*. FEBS J, 2010. **277**(18): p. 3652-63.
55. McCormack, J.G., A.P. Halestrap, and R.M. Denton, *Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism*. Physiol Rev, 1990. **70**(2): p. 391-425.
56. Moreau, B., C. Nelson, and A.B. Parekh, *Biphasic regulation of mitochondrial Ca²⁺ uptake by cytosolic Ca²⁺ concentration*. Curr Biol, 2006. **16**(16): p. 1672-7.
57. Putney, J.W., Jr. and A.P. Thomas, *Calcium signaling: double duty for calcium at the mitochondrial uniporter*. Curr Biol, 2006. **16**(18): p. R812-5.
58. Rizzuto, R., et al., *Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria*. Science, 1993. **262**(5134): p. 744-7.
59. Rizzuto, R., et al., *Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses*. Science, 1998. **280**(5370): p. 1763-6.
60. Ichas, F., L.S. Jouaville, and J.P. Mazat, *Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals*. Cell, 1997. **89**(7): p. 1145-53.
61. Babcock, D.F. and B. Hille, *Mitochondrial oversight of cellular Ca²⁺ signaling*. Curr Opin Neurobiol, 1998. **8**(3): p. 398-404.
62. Rutter, G.A. and R. Rizzuto, *Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca²⁺ release: an intimate connection*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(5): p. 215-21.

63. Brough, D., M.J. Schell, and R.F. Irvine, *Agonist-induced regulation of mitochondrial and endoplasmic reticulum motility*. *Biochem J*, 2005. **392**(Pt 2): p. 291-7.
64. Yi, M., D. Weaver, and G. Hajnoczky, *Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit*. *J Cell Biol*, 2004. **167**(4): p. 661-72.
65. Jouaville, L.S., F. Ichas, and J.P. Mazat, *Modulation of cell calcium signals by mitochondria*. *Mol Cell Biochem*, 1998. **184**(1-2): p. 371-6.
66. Kim, B. and S. Matsuoka, *Cytoplasmic Na⁺-dependent modulation of mitochondrial Ca²⁺ via electrogenic mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchange*. *J Physiol*, 2008. **586**(6): p. 1683-97.
67. Jousset, H., M. Frieden, and N. Demaurex, *STIM1 knockdown reveals that store-operated Ca²⁺ channels located close to sarco/endoplasmic Ca²⁺ ATPases (SERCA) pumps silently refill the endoplasmic reticulum*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(15): p. 11456-64.
68. Denton, R.M., D.A. Richards, and J.G. Chin, *Calcium ions and the regulation of NAD⁺-linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues*. *Biochem J*, 1978. **176**(3): p. 899-906.
69. Denton, R.M., J.G. McCormack, and N.J. Edgell, *Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. Effects of Na⁺, Mg²⁺ and ruthenium red on the Ca²⁺-stimulated oxidation of oxoglutarate and on pyruvate dehydrogenase activity in intact rat heart mitochondria*. *Biochem J*, 1980. **190**(1): p. 107-17.
70. Krell, D., et al., *Screen for IDH1, IDH2, IDH3, D2HGDH and L2HGDH mutations in glioblastoma*. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e19868.
71. Weir, E.K. and S.L. Archer, *The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels*. *FASEB J*, 1995. **9**(2): p. 183-9.
72. Tsien, R.Y., T. Pozzan, and T.J. Rink, *Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator*. *J Cell Biol*, 1982. **94**(2): p. 325-34.
73. Ehrenberg, B., et al., *Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes*. *Biophys J*, 1988. **53**(5): p. 785-94.

74. Scaduto, R.C., Jr. and L.W. Grotyohann, *Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives*. Biophys J, 1999. **76**(1 Pt 1): p. 469-77.
75. Distelmaier, F., et al., *Life cell quantification of mitochondrial membrane potential at the single organelle level*. Cytometry A, 2008. **73**(2): p. 129-38.
76. Lieber, M., et al., *A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells*. Int J Cancer, 1976. **17**(1): p. 62-70.
77. Vaporidi, K., et al., *Effects of hypoxia and hypercapnia on surfactant protein expression proliferation and apoptosis in A549 alveolar epithelial cells*. Life Sci, 2005. **78**(3): p. 284-93.
78. Vohwinkel, C.U., et al., *Elevated CO(2) levels cause mitochondrial dysfunction and impair cell proliferation*. J Biol Chem, 2011. **286**(43): p. 37067-76.
79. Lecuona, E., et al., *Protein kinase A- α regulates Na,K-ATPase endocytosis in alveolar epithelial cells exposed to high CO(2) concentrations*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013. **48**(5): p. 626-34.
80. Burvall, K., L. Palmberg, and K. Larsson, *Metabolic activation of A549 human airway epithelial cells by organic dust: a study based on microphysiometry*. Life Sci, 2002. **71**(3): p. 299-309.
81. Swain, R.J., et al., *Assessment of cell line models of primary human cells by Raman spectral phenotyping*. Biophys J, 2010. **98**(8): p. 1703-11.
82. Yang, Y., et al., *Side population cells separated from A549 lung cancer cell line possess cancer stem cell-like properties and inhibition of autophagy potentiates the cytotoxic effect of cisplatin*. Oncol Rep, 2015. **34**(2): p. 929-35.
83. Gunter, T.E. and D.R. Pfeiffer, *Mechanisms by which mitochondria transport calcium*. Am J Physiol, 1990. **258**(5 Pt 1): p. C755-86.
84. Miyata, H., et al., *Measurement of mitochondrial free Ca²⁺ concentration in living single rat cardiac myocytes*. Am J Physiol, 1991. **261**(4 Pt 2): p. H1123-34.
85. Rizzuto, R., et al., *Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin*. Nature, 1992. **358**(6384): p. 325-7.
86. Andrienko, T.N., E. Picht, and D.M. Bers, *Mitochondrial free calcium regulation during sarcoplasmic reticulum calcium release in rat cardiac myocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 1027-36.

87. Kaftan, E.J., et al., *Mitochondria shape hormonally induced cytoplasmic calcium oscillations and modulate exocytosis*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25465-70.
88. Dietl, P., et al., *Mechanisms of surfactant exocytosis in alveolar type II cells in vitro and in vivo*. News Physiol Sci, 2001. **16**: p. 239-43.
89. Spat, A., et al., *When is high-Ca⁺ microdomain required for mitochondrial Ca⁺ uptake?* Acta Physiol (Oxf), 2009. **195**(1): p. 139-47.
90. Verburg, J. and P.J. Hollenbeck, *Mitochondrial membrane potential in axons increases with local nerve growth factor or semaphorin signaling*. J Neurosci, 2008. **28**(33): p. 8306-15.
91. Shears, S.B. and C.J. Kirk, *Determination of mitochondrial calcium content in hepatocytes by a rapid cellular fractionation technique. Vasopressin stimulates mitochondrial Ca²⁺ uptake*. Biochem J, 1984. **220**(2): p. 417-21.
92. Denton, R.M. and J.G. McCormack, *Ca²⁺ transport by mammalian mitochondria and its role in hormone action*. Am J Physiol, 1985. **249**(6 Pt 1): p. E543-54.
93. Haak, L.L., et al., *Mitochondria regulate Ca²⁺ wave initiation and inositol trisphosphate signal transduction in oligodendrocyte progenitors*. J Neurochem, 2002. **80**(3): p. 405-15.
94. Isaeva, E.V., V.M. Shkryl, and N. Shirokova, *Mitochondrial redox state and Ca²⁺ sparks in permeabilized mammalian skeletal muscle*. J Physiol, 2005. **565**(Pt 3): p. 855-72.
95. Hofer, A.M., et al., *ATP regulates calcium leak from agonist-sensitive internal calcium stores*. FASEB J, 1996. **10**(2): p. 302-8.
96. Waypa, G.B., et al., *Increases in mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced calcium responses in pulmonary artery smooth muscle cells*. Circ Res, 2006. **99**(9): p. 970-8.
97. Selwyn, M.J., A.P. Dawson, and S.J. Dunnett, *Calcium transport in mitochondria*. FEBS Lett, 1970. **10**(1): p. 1-5.
98. Rottenberg, H. and A. Scarpa, *Calcium uptake and membrane potential in mitochondria*. Biochemistry, 1974. **13**(23): p. 4811-7.
99. Jouaville, L.S., et al., *Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in Xenopus laevis oocytes*. Nature, 1995. **377**(6548): p. 438-41.

100. Erecinska, M. and D.F. Wilson, *Regulation of cellular energy metabolism*. J Membr Biol, 1982. **70**(1): p. 1-14.
101. Chen, Y., et al., *Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor*. Science, 2000. **289**(5479): p. 625-8.
102. Buchanan, B.B. and D.I. Arnon, *A reverse KREBS cycle in photosynthesis: consensus at last*. Photosynth Res, 1990. **24**(1): p. 47-53.
103. Evans, M.C., B.B. Buchanan, and D.I. Arnon, *New cyclic process for carbon assimilation by a photosynthetic bacterium*. Science, 1966. **152**(3722): p. 673.
104. Denton, R.M., *Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(11): p. 1309-16.
105. Jiang, C., et al., *CO₂ central chemosensitivity: why are there so many sensing molecules?* Respir Physiol Neurobiol, 2005. **145**(2-3): p. 115-26.
106. Moller, I.M. and A.G. Rasmusson, *The role of NADP in the mitochondrial matrix*. Trends in Plant Science, 1998. **3**(1): p. 21-27.
107. Galvez, S. and P. Gadal, *On the Function of the Nadp-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Isoenzymes in Living Organisms*. Plant Science, 1995. **105**(1): p. 1-14.
108. Mescher, E.J., L.G. Dobbs, and R.J. Mason, *Cholera toxin stimulates secretion of saturated phosphatidylcholine and increases cellular cyclic AMP in isolated rat alveolar type II cells*. Exp Lung Res, 1983. **5**(3): p. 173-82.
109. Mason, R.J. and D.R. Voelker, *Regulatory mechanisms of surfactant secretion*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1408**(2-3): p. 226-40.
110. Ichimura, H., et al., *Mechano-oxidative coupling by mitochondria induces proinflammatory responses in lung venular capillaries*. J Clin Invest, 2003. **111**(5): p. 691-9.
111. Streb, H., et al., *Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate*. Nature, 1983. **306**(5938): p. 67-9.
112. Berridge, M.J. and R.F. Irvine, *Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction*. Nature, 1984. **312**(5992): p. 315-21.
113. Carafoli, E., *Intracellular calcium homeostasis*. Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 395-433.
114. Exton, J.H., *Role of calcium and phosphoinositides in the actions of certain hormones and neurotransmitters*. J Clin Invest, 1985. **75**(6): p. 1753-7.

115. Tran, Q.K., K. Ohashi, and H. Watanabe, *Calcium signalling in endothelial cells*. Cardiovasc Res, 2000. **48**(1): p. 13-22.
116. Spat, A., et al., *High- and low-calcium-dependent mechanisms of mitochondrial calcium signalling*. Cell Calcium, 2008. **44**(1): p. 51-63.
117. Csordas, G., et al., *Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria*. J Cell Biol, 2006. **174**(7): p. 915-21.

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von Ventilations-Perfusions-Missverhältnissen	21
Abbildung 2: 2000 ml Glasgefäß mit präpariertem Aufsatz zur Herstellung des normokapnischen HBS-Puffers	33
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus (Fluoreszenzmikroskopie)	40
Abbildung 4: Aufbau des Lichtmikroskops	41
Abbildung 5: Darstellung der <i>MetaFlour</i> [®] <i>Imaging Software</i> während einer Messung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ mittels Fura-2	42
Abbildung 6: Messung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ mittels Fura-2 in nativen A549-Zellen	47
Abbildung 7: Messung der $[Ca^{2+}]_{mito}$ mittels Rhod-2 in nativen A549-Zelle	48
Abbildung 8: Messung der $[Ca^{2+}]_{mito}$ mittels Rhod-2 in nativen A549-Zellen (Kontrollversuche)	49
Abbildung 9: Messung des $\Delta\Psi_{mito}$ mittels TMRM ⁺ in nativen A549-Zellen	51
Abbildung 10: Versuchsabläufe der Kontrollreihen im Rahmen der Messung der [NADH] in nativen A549-Zellen	52
Abbildung 11: Messung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ mittels Fura-2 in transfizierten A549-Zellen und deren Kontrollen	54
Abbildung 12: Messung der $[Ca^{2+}]_{mito}$ mittels Rhod-2 in transfizierten A549-Zellen und deren Kontrollen	56
Abbildung 13: Messung des $\Delta\Psi_{mito}$ mittels TMRM ⁺ in transfizierten A549-Zellen und deren Kontrollen	57
Abbildung 14: Messung der [NADH] in transfizierten A549-Zellen und deren Kontrollen	58
Abbildung 15: Pipettierschema NADH-Assay (doppelte Versuchsreihe)	64
Abbildung 16: Grafische Zusammenfassung der Schritte der RT-PCR	74
Abbildung 17: Pipettierschema des Assay zur Proteinbestimmung im Rahmen des Western Blot	80
Abbildung 18: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mehrerer nativer A549-Zellen <i>in vitro</i> dargestellt als Fura-2- <i>Ratio</i> in Falschfarbendarstellung	85

Abbildung 19: Repräsentative grafische Darstellung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in einer nativen A549-Zelle <i>in vitro</i> über die Zeit eines Versuches	86
Abbildung 20: Repräsentative grafische Darstellung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in einer nativen A549-Zelle <i>in vitro</i> über die Zeit eines Versuches (Kontrollversuche)	87
Abbildung 21: Gruppenanalyse der maximalen $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Antworten in nativen A549-Zellen <i>in vitro</i> (Kontrollversuche)	88
Abbildung 22: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mehrerer nativer A549-Zellen im Vergleich mit transfizierten A549-Zellen <i>in vitro</i> dargestellt als Fura-2-Ratio in Falschfarbendarstellung	89
Abbildung 23: Repräsentative grafische Darstellung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ über die Zeit eines Versuches in einer nativen A549-Zelle, in einer transfizierten A549-Zelle und einer Kontroll-A549-Zelle <i>in vitro</i>	90
Abbildung 24: Gruppenanalyse der maximalen $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Antworten nach 10-minütiger Hypokapnie in nativen A549-Zellen im Vergleich mit transfizierten Zellen und deren Kontrollen <i>in vitro</i>	91
Abbildung 25: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von nativen A549-Zellen <i>in vitro</i> zur Messung der Fluoreszenzintensität von Rhod-2 (Ermittlung der $[Ca^{2+}]_{mito}$)	93
Abbildung 26: Repräsentative grafische Darstellung der Rhod-2-Fluoreszenzintensität über die Zeit eines Versuches in einer nativen A549-Zelle und einer nativen A549-Zelle nach Zugabe von 50 μ M Rotenon <i>in vitro</i>	94
Abbildung 27: Repräsentative grafische Darstellung der Fluoreszenzintensität von Rhod-2 über die Zeit eines Versuches in einer nativen A549-Zelle <i>in vitro</i> (Kontrollversuche)	95
Abbildung 28: Gruppenanalyse der maximalen Anstiege der Fluoreszenzintensität von Rhod-2 in nativen A549-Zellen <i>in vitro</i> (Kontrollversuche)	96
Abbildung 29: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mehrerer nativer A549-Zellen im Vergleich mit transfizierten A549-Zellen <i>in vitro</i> zur Messung der Fluoreszenzintensität von Rhod-2 (Ermittlung der $[Ca^{2+}]_{mito}$)	97
Abbildung 30: Repräsentative grafische Darstellung der Fluoreszenzintensität	

von Rhod-2 über die Zeit eines Versuches in einer nativen A549-Zelle, in einer transfizierten A549-Zelle und in einer Kontroll-A549-Zelle <i>in vitro</i>	98
Abbildung 31: Gruppenanalyse der maximalen Anstiege der Fluoreszenzintensität von Rhod-2 nach 10-minütiger Hypokapnie in nativen A549-Zellen im Vergleich mit nativen A549-Zellen nach Zugabe von 50 μ M Rotenon sowie mit transfizierten A549-Zellen und deren Kontrollen <i>in vitro</i>	99
Abbildung 32: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mehrerer nativer A549-Zellen nach Färbung mit TMRM ⁺ <i>in vitro</i>	101
Abbildung 33: Repräsentative grafische Darstellung der TMRM ⁺ - <i>Ratio</i> dargestellt als Prozent über Ausgangsbedingungen über die Zeit eines Versuches in einer nativen A549-Zelle <i>in vitro</i>	102
Abbildung 34: Repräsentative grafische Darstellung der TMRM ⁺ - <i>Ratio</i> dargestellt als Prozent über Ausgangsbedingungen über die Zeit eines Versuches in einer nativen A549-Zelle <i>in vitro</i> (Komplex-I-Inhibierung mittels Rotenon)	103
Abbildung 35: Gruppenanalyse der TMRM ⁺ - <i>Ratio</i> in nativen A549-Zellen <i>in vitro</i>	104
Abbildung 36: Repräsentative grafische Darstellung der TMRM ⁺ - <i>Ratio</i> über die Zeit eines Versuches in einer transfizierten A549-Zelle, einer nativen A549-Zelle und einer Kontroll-A549-Zelle <i>in vitro</i>	105
Abbildung 37: Gruppenanalyse der maximalen Veränderungen der TMRM ⁺ - <i>Ratio</i> nach einer 10-minütigen Hypokapnie in nativen A549-Zellen im Vergleich mit transfizierten Zellen und deren Kontrollen <i>in vitro</i>	106
Abbildung 38: NADH-Assay: Gruppenanalyse der [NADH] in nativen A549-Zellen <i>in vitro</i>	108
Abbildung 39: Repräsentative Aufnahmen mehrerer nativer A549-Zellen <i>in vitro</i> zur fluoreszenzmikroskopischen Messung der [NADH] nach Zugabe von 50 μ M Rotenon	109
Abbildung 40: Repräsentative Aufnahmen mehrerer nativer A549-Zellen <i>in vitro</i> zur fluoreszenzmikroskopischen Messung der [NADH] nach Zugabe von 50 μ M Rotenon (Kontrollversuch)	110
Abbildung 41: Fluoreszenzmikroskopie: Repräsentative grafische Darstellung der NADH-Autofluoreszenzintensität dargestellt als Prozent über Ausgangsbedingungen über die Zeit eines Versuches in einer nativen	

A549-Zelle und einer nativen A549-Zelle nach Zugabe von 50 μ M Rotenon <i>in vitro</i>	111
Abbildung 42: Fluoreszenzmikroskopie: Gruppenanalyse der maximalen Anstiege der [NADH] in nativen A549-Zellen <i>in vitro</i> dargestellt als $\Delta\%$ über Ausgangsbedingungen (Kontrollversuche)	112
Abbildung 43: Repräsentative Aufnahmen mehrerer transfizierter A549-Zellen <i>in vitro</i> zur fluoreszenzmikroskopischen Messung der [NADH] nach Zugabe von 50 μ M Rotenon	113
Abbildung 44: Fluoreszenzmikroskopie: Repräsentative grafische Darstellung der NADH-Autofluoreszenzintensität dargestellt als Prozent über Ausgangsbedingungen über die Zeit eines Versuches in einer transfizierten A549-Zelle und einer nativen A549-Zelle <i>in vitro</i>	114
Abbildung 45: Fluoreszenzmikroskopie: Gruppenanalyse der maximalen Anstiege der NADH-Autofluoreszenzintensität dargestellt als $\Delta\%$ über Ausgangsbedingungen in nativen A549-Zellen nach Zugabe von 50 μ M Rotenon unter Normokapnie und Hypokapnie im Vergleich mit transfizierten A549-Zellen und deren Kontrollen <i>in vitro</i>	115
Abbildung 46: <i>Scan</i> des RT-PCT-Gels für den Nachweis des Transfektionserfolgs auf mRNA-Ebene	117
Abbildung 47: <i>Scan</i> des Western Blot des IDH3-Proteins für den Nachweis des Transfektionserfolgs auf Proteinebene	118
Abbildung 48: Repräsentative Aufnahmen von transfizierten A549-Zellen <i>in vitro</i> zur fluoreszenzmikroskopischen Beurteilung des Transfektionserfolgs mithilfe von Fura-2 und autofluoreszierender IDH3G-siRNA	119
Abbildung 49: Schematische Darstellung des Einflusses von Mitochondrien auf das intrazelluläre Ca^{2+} -Signalsystem	123
Abbildung 50: Rolle der IDH3 im Prozess der alveolären CO_2 -Registrierung in A549-Zellen <i>in vitro</i>	128
Abbildung 51: Schematische Darstellung der Hypothese der mitochondrialen CO_2 -Registrierung in Alveolarepithelzellen	129
Abbildung 52: Physiologische Signaltransduktionskaskade der Surfactantsekretion in Typ II Alveolarepithelzellen	133
Abbildung 53: Hypothese der mitochondrialen CO_2 -Registrierung in Typ II Alveolarepithelzellen	134
	157

6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema zur Vorbereitung von A549-Zellen für die PCR	28
Tabelle 2: Pipettierschema zur Vorbereitung von A549-Zellen für den <i>Western Blot</i>	28
Tabelle 3: Pipettierschema zur Vorbereitung von A549-Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie	29
Tabelle 4: Ansatz des HBS-Puffers	31
Tabelle 5: Messung von pH-Wert und pCO ₂ im HBS-Puffer über Zeit	34
Tabelle 6: Zusammenfassung der Eigenschaften der Fluoreszenzindikatoren ...	38
Tabelle 7: Pipettierschema der Standardkurve (NADH-Assay)	63
Tabelle 8: Zusammensetzung der Reaktionslösung (NADH-Assay)	63
Tabelle 9: Ansatz des <i>Mastermix</i> für die cDNA-Synthese	71
Tabelle 10: Ansatz des <i>Mastermix</i> für die PCR	73
Tabelle 11: PCR-Programm	73
Tabelle 12: Pufferzusammensetzungen (Western Blot)	77
Tabelle 13: Pipettierschema der Albumin-Standardverdünnungskurve	79

6.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank den nachstehenden Menschen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Zunächst danke ich Univ.-Prof. Dr. med. Alwin E. Goetz und Prof. Dr. med. Christian Zöllner für die Möglichkeit am Zentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin zu promovieren.

Ferner gilt mein Dank Prof. Dr. Rainer Kiefmann, meinem Doktorvater, für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die lehrreiche Laborzeit. Außerdem bedanke ich mich für die Ideengebung, den kritischen Zugang zur Thematik sowie für die Unterstützung bei der Datenauswertung und das mehrfache Korrekturlesen meiner Arbeit.

Dr. Sascha Tank danke ich für die hilfsbereite, wissenschaftliche Betreuung während der gesamten Zeit meiner Promotion. Sein persönliches Engagement in Bezug auf diese Arbeit war unentbehrlich.

Ganz besonders möchte ich Dr. Anne Mecklenburg für ihre tatkräftige Unterstützung und ihre einzigartige Motivation sowie für die kritische Auseinandersetzung mit meinem Promotionsthema und die Durchsicht meiner Arbeit danken.

Ein herzlicher Dank gilt Monika Weber, Claudia Lüchau, Kirsten Pfeiffer-Drenkhahn, Andrea Pawelczyk, Dr. Martina Kiefmann, Dr. Cynthia Olotu, Dr. Anke Schuster und Dr. Mike Strunden sowie meinen Mitdoktoranden Anton Albrecht, Franziska Gniech und Felix Lehmsiek für die freundliche Aufnahme im Labor sowie für die beispiellose Unterstützung im Rahmen meines Promotionsvorhabens.

Dr. Harald Böttcher danke ich für seine Unterstützung während meines Studiums sowie für das Erwecken und die Aufrechterhaltung meines Interesses an der Anästhesie.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinen Eltern, Reiner und Petra Keller, ohne die ich nicht da wäre, wo ich heute bin, und denen ich diese Arbeit widme.

Weithin danke ich Jennifer Tramm für ihre Unterstützung und ihre Freundschaft während der Zeit des Studiums, der Promotion und darüber hinaus.

Zu tiefst dankbar bin ich Robert Wegener für seine bewundernswerte Geduld und seine einmalige Liebe.

6.6 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

6.7 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hamburg, den 26.10.2018

.....

(Paula Keller)