

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Department Biotechnologie

Bachelorthesis

Herstellung eines Adenovirusvektors für die Modulation von cGMP in glatten
Muskelzellen

B. Sc. Biotechnologie

vorgelegt von

Melina Pankewytsch



Hamburg

Am 15. Februar 2021

Durchgeführt am Institut für Experimentelle Herz-Kreislauf-Forschung

Institutsdirektor Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev

- | | | |
|----------------------|--------------------|---------------|
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. Wacker | (HAW Hamburg) |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. Nikolaev | (UKE Hamburg) |

Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die mich während der Erstellung meiner Bachelorarbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herr Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev, der es mir ermöglicht hat meine Bachelorarbeit im Institut für Experimentelle Herz-Kreislauf-Forschung am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchzuführen. Vielen Dank für die gute Betreuung und die hilfreichen Ratschläge.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für die wunderbare Arbeitsatmosphäre und Unterstützung bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Wacker für die Betreuung und Begutachtung meiner Bachelorarbeit bedanken.

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CFP	Cyan-fluoreszierendes Protein
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CNP	C-Typ-natriuretisches Peptid
CsCl	Caesiumchlorid
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escheria coli</i>
FCS	Fetal Bovine Serum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IRAG	IP3-Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase Substratprotein
KCl	Kaliumchlorid
KCM-Puffer	Kaliumchlorid, Calciumchlorid, Magnesiumchlorid Puffer
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MLC	Myosin-leichte-Kette

MLCP	Myosin-leichte-Kette-Phosphatase
MOI	Multiplizität der Infektion
mRFP	Monomeres rot-fluoreszierendes Protein
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
ORF	Offenes Leseraster
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
PKG1 α	Proteinkinase G1 α
sGC	Guanylatzyklasen
SNP	Natrium-Nitroprussid
TAE Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
VSMC	Glatte Gefäßmuskelzellen
WHO	<i>World Health Organisation</i>
YFP	Gelb-fluoreszierendes Protein

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	1
Abkürzungsverzeichnis	2
Inhaltsverzeichnis	4
1. Einleitung	6
1.1 cGMP-gesteuerte Regulation der PKG1 α Aktivität	7
1.2 Adenovirus Expressionssystem	9
1.3 Funktionsprinzip des cGi-Biosensors	11
1.4 cGMP Manipulation durch SponGee	12
2. Ziel der Arbeit	13
3. Materialien	14
3.1 Zelllinien	14
3.2 Zellkulturmedien, Lösungen und Puffer für die Zellkultur	14
3.3 Bakterienstamm	15
3.4 Reagenzsysteme	15
3.5 Medien und Lösungen für Mikrobiologische Arbeiten	16
3.6 Enzyme, Lösungen und Substanzen für molekularbiologische Methoden	17
3.7 Puffer und Lösungen für die FRET-Messungen	18
3.8 Plasmide	19
3.8.1 pDONR-AKAR-NLS	20
3.8.2 pCEP-SponGee	21
3.8.3 pDONR-SponGee	22
3.8.4 pAd	23
3.8.5 pAd-SponGee	24
4. Methoden	25
4.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen (Top Ten)	25
4.2 Herstellung von LB-Medium und Platten	26
4.3 Zellkultur	26
4.3.1 Herstellung von Zellkulturmedium	26
4.3.2 Medium-Wechsel	26
4.3.3 Zellen auftauen	26

4.3.4 Zellen splitten/umsetzen (10er Platte)	27
4.4 Umklonierung pDONR-AKAR-NLS/pCEP-SponGee	27
4.4.1 Restriktion.....	28
4.4.2 Gelelektrophorese.....	28
4.4.3 Extraktion der Nukleinsäuren aus dem Gel	28
4.4.4 Ligation	29
4.4.5 Transformation in <i>E. coli</i>	29
4.4.6 Plasmidpräparation und Kontrollverdau	30
4.5 Virus Klonierung.....	31
4.5.1 LR-Rekombination	31
4.5.2 Transformation.....	31
4.5.3 Plasmidpräparation und Kontrollverdau	32
4.5.4 Transfektion von HEK-293A-Zellen mit dem Viruskonstrukt	33
4.5.5 Ernte des Virusüberstandes.....	33
4.5.6 Zellen ausplattieren.....	34
4.5.7 Transfektion.....	35
4.6 Viruspräparation.....	36
4.6.1 Virus-Dialyse	37
4.7 Isolation von primären glatten Muskelzellen	38
4.8 Transduktion der glatten Muskelzellen	39
4.9 Förster-Resonanzenergietransfer-Messung	39
5. Ergebnisse	40
5.1 Herstellung des pDONR-SponGee-Konstrukts.....	40
5.2 Virus Klonierung.....	42
5.2.1 Virus-Amplifikation.....	43
5.2.2 Aufreinigung des Virus.....	44
5.3 Isolierung von glatten Muskelzellen.....	44
5.4 Transduktion der glatten Muskelzellen	46
5.5 FRET-Messung.....	47
6. Diskussion	51
6.1 Herstellung des Adenovirus pAd-SponGee	51
6.2 Isolation und Transduktion der glatten Muskelzellen	52
6.3 cGMP-Messung am FRET-Mikroskop	53
7. Schlussfolgerung und Ausblick	54
8. Literaturverzeichnis.....	55
Anhang.....	58

1. Einleitung

Bluthochdruck ist ein weit verbreiteter Gesundheitszustand, welcher das Risiko einer Herz-Kreislauf-Erkrankung signifikant erhöht. Weltweit leiden etwa 1,13 Milliarden Menschen an Bluthochdruck (WHO, 2019). Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind Herz-Kreislauf Erkrankungen global die Haupttodesursache (WHO, 2017).

Mit Nitrovasodilatoren wie z.B Nitroprussid (SNP) kann, durch Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), eine Vasodilation herbeigeführt werden. Die Nitrovasodilatoren sind als therapeutisches Mittel gegen Bluthochdruck nur begrenzt einsetzbar, da nach kurzer Zeit ein Toleranzphänomen auftritt und die Wirkung verloren geht. Die Wirkung dieser Medikamente beruht auf der Erhöhung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) in den glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC). Das cGMP aktiviert die Proteinkinase G α (PKG α) und startet die Signalkaskade zur Vasodilation in VSMC (Noack and Feelisch, 2012; Robert, 2012).

In dieser Arbeit wurde ein Adenovirusvektor hergestellt, mit dem Ziel cGMP in glatten Muskelzellen zu binden und somit die natürliche Vasodilation über cGMP-gesteuerte Aktivierung der PKGI zu unterbinden. Das ermöglicht die Untersuchung medikamentöser Therapien, die auf der oxidativen Aktivierung der PKGI beruhen.

1.1 cGMP-gesteuerte Regulation der PKGI α Aktivität

Die Typ I cGMP-abhängige Protein Kinasen (PKGI) spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus. Durch alternatives Spleißen kommt die PKGI in zwei Isoformen vor, der PKGI α und PKGI β . In VSMC kommen beide Isoformen vor. In Abbildung 1 ist der schematische Aufbau einer PKGI zu sehen. Die PKGI besitzt drei Domänen. Die erste Domäne bildet ein Amino-Terminus mit einem Leucin-Zipper und einer inhibitorischen Domäne. Der Leucin-Zipper ermöglicht die Homodimerisierung. Die zweite Domäne ist die regulatorische Domäne mit zwei cGMP Bindestellen. Diese Domäne ist für die Aktivierung des Enzyms zuständig. Die dritte Domäne ist die katalytische Domäne mit einer ATP-Bindestelle. (Hofmann, 2005; Ruth, 1999; Wolfertstetter et al., 2013)

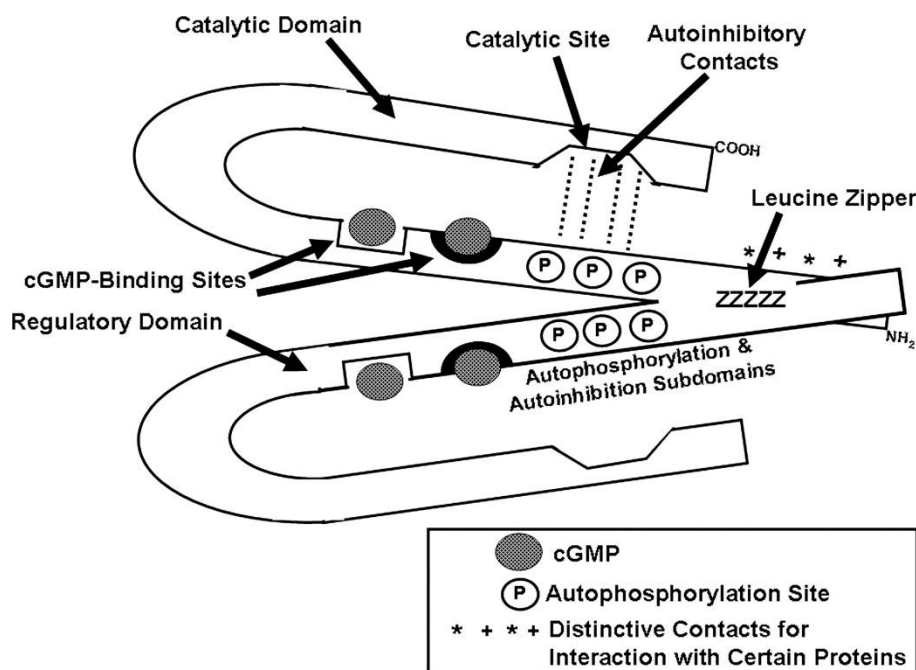


Abbildung 1: Schematische Darstellung der PKGI. Die homodimere Form wird durch die Leucin-Zipper-Region (ZZZZZ) ermöglicht. Die Zipper-Region unterscheidet sich je nach Isoform in der selektiven Interaktion mit zellulären Proteinen (+ * + *). Die Stellen der Autophosphorylierung sind mit eingekreisten P markiert. Die gestrichelte Linie zeigt die Autoinhibitorischen Kontakte (----). Die cGMP-Bindestellen sind N-terminal loziert und haben eine hohe Bindeaffinität. (Francis et al., 2010)

Die PKGI werden von dem *Second Messenger* cGMP aktiviert. Wenn cGMP an die regulatorische Domäne bindet, findet eine Konformationsänderung der PKGI statt und die katalytische Domäne kann anschließend Substrat phosphorylieren. In Abbildung 2 ist die Regulation der PKGI α schematisch dargestellt. Der zelluläre cGMP Spiegel wird durch lösliche Guanylatzyklasen (sGC) erhöht, welche durch Stickoxide aktiviert werden und cGMP aus GTP generieren. Die aktivierte PKGI α führt zur Relaxation der VSMC. Phosphodiesterasen bauen zelluläres cGMP ab. Der cGMP-Spiegel kann pharmakologisch durch NO-Donatoren (z.B. SNP), sGC-Aktivatoren und Phosphodiesterasen-Inhibitoren (z.B. 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), Sildenafil) erhöht werden. C-typ natriuretisches Peptid (CNP) aktiviert die membranständigen Guanylatzyklasen. (Francis et al., 2010; Hoffmann and Chen, 2014; Hofmann, 2005; Lincoln et al., 2001; Scotland et al., 2005)

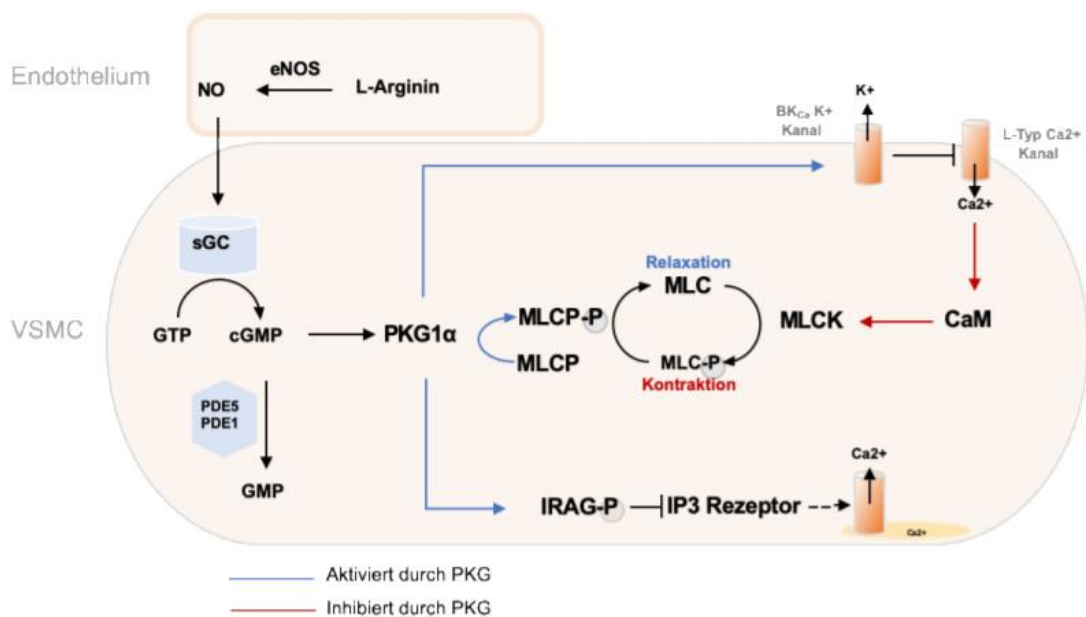


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Regulation der PKGI α -Aktivität. NO wird im Endothelium durch NO-Synthasen hergestellt und diffundiert zu den VSMC. Dort bindet es an die Häm-Gruppe der sGC und aktiviert diese. Die sGC wandelt GTP zu cGMP um. Das cGMP bindet an die PKGI α und aktiviert diese durch eine Konformationsänderung, wodurch die nachfolgende Substratphosphorylierung ermöglicht wird. PKGI α phosphoryliert unter anderem die Myosin-leichte-Kette-Phosphatase (MLCP), welche wiederum die Myosin-leichte-Kette (MLC) dephosphoryliert. Dieser Prozess führt zur Relaxation der VSMC. Zudem steuert die PKGI α Ionen-Kanäle z.B. durch Phosphorylierung des IP₃-Rezeptor assoziierten cGMP-Kinase Substratproteins (IRAG) (Francis et al., 2010).

1.2 Adenovirus Expressionssystem

Adenoviren sind unbehüllte Viren mit einer doppelsträngigen, linearen DNA als Genom. In Abbildung 3 ist der Aufbau von Adenoviren dargestellt. Das Virusgenom ist in ein ikosaedrisches Kapsid eingebettet. Die Infektion von Zellen findet in zwei Phasen statt. Die erste Phase beinhaltet den Eintritt des Virus in die Zelle, die Überführung des Virusgenoms in den Nukleus und die selektive Transkription und Translation von Genen (z.B. das E1-Gen). In dieser frühen Phase werden die Funktionen der Zelle dahingehend moduliert, dass die Replikation der viralen DNA und die Transkription und Translation der späteren Gene erleichtert werden. Die späte Phase umfasst die Ansammlung der Strukturproteine und die Reifung infektiöser Viren. Die frühe Phase dauert ca. sechs bis acht Stunden, die späte Phase vier bis sechs Stunden. Die Adsorption des Virus an Zielzellrezeptoren beinhaltet eine hochaffine Bindung an Zellrezeptoren über die verknotete Faser. (Russell, 2000; Stewart et al., 1993)

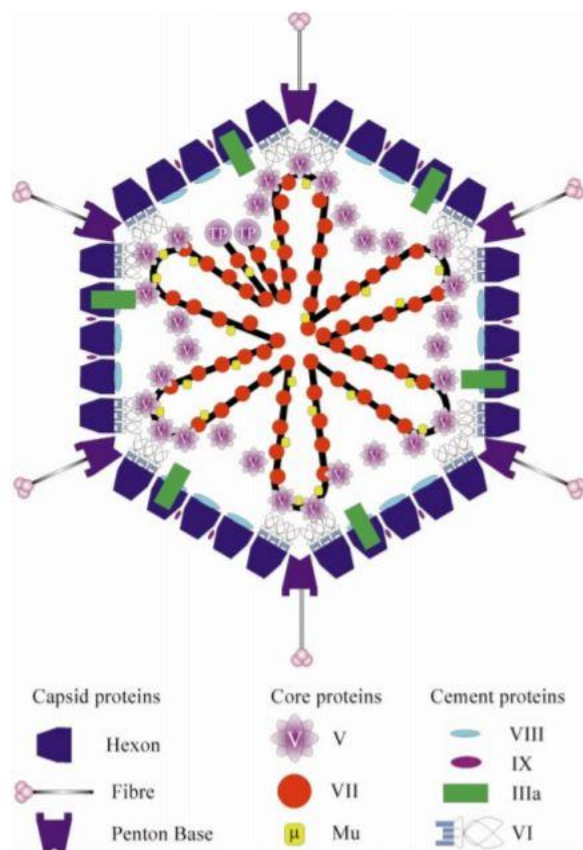


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Adenovirus. Das Kapsid wird durch drei Proteine gebildet: dem Hexon, verknoteten Fasern und einer Penton-Basis. Zudem gibt es Proteine, die das Kapsid festigen und weitere Proteine im Kern des Virus. (Russell, 2000)

Bei dem Adenovektor pAd ist das E1-Gen deletiert, damit sich das Virus nicht selbstständig replizieren kann. 293A-Zellen wurden dahingehend moduliert, dass sie das fehlende E1-Gen herstellen. Mit pAd transfizierte 293A-Zellen erzeugen Adenoviren, welche in den Vektor eingebrachte Gene exprimieren. Sie sind ein gutes Mittel, um schwer transfizierbare Zellen zu transduzieren (Massie, 1999).

1.3 Funktionsprinzip des cGi-Biosensors

Fluoreszierende Biosensoren sind ein wichtiges Werkzeug, um biochemische Prozesse in lebenden Zellen zu visualisieren. Die Grundlage für die Biosensoren bildet das grün-fluoreszierende Protein (GFP). Mutationen des GFP haben veränderte Erregungs- und Emissionswellenlängen. Ein angeregter Fluoreszenzfarbstoff (Donor) überträgt seine Energie an einen Fluoreszenzfarbstoff mit geeigneten spektralen Eigenschaften in ihrer Nähe (Akzeptor) und regt diesen zur Fluoreszenz an. Diese Interaktion wird von Theodor Förster als Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) beschrieben (Förster, 1948). Das Donor/Akzeptor-Paar sollte zwischen 2 und 6 nm voneinander entfernt sein und das Emissionsspektrum des Donors sollte sich um mindestens 30 % mit den Erregungsspektrums des Akzeptors überlappen. (Zaccollo, 2004; Zhang et al., 2002)

Der cGi Biosensor besteht aus einer trunkierten bovinen cGKI mit Bindestellen für cGMP, welcher von dem Donor cyan-fluoreszierendes Protein (CFP) und dem Akzeptor gelb-fluoreszierendes Protein (YFP) flankiert ist. In Abbildung 4 ist das Wirkprinzip des cGi Sensors schematisch dargestellt. In Abwesenheit von cGMP tritt FRET vom angeregten CFP zum YFP auf. Sobald cGMP bindet, tritt eine Konformationsänderung auf und FRET nimmt ab. (Thunemann et al., 2013)

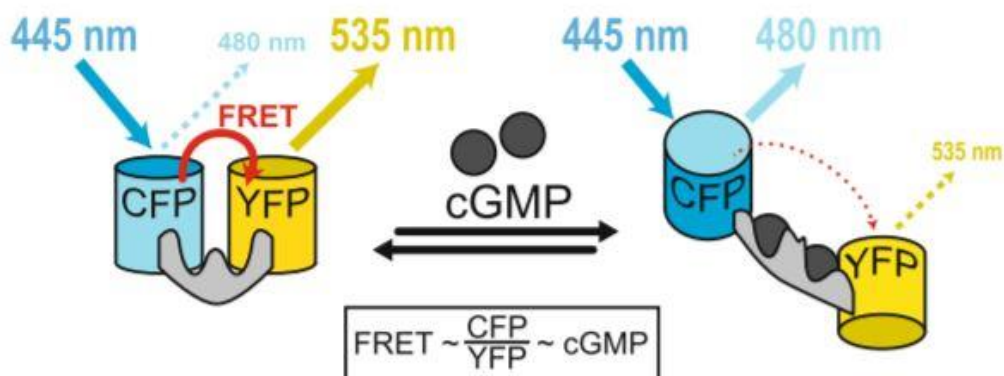


Abbildung 4: Schematische Darstellung des cGi-Biosensors. Das CFP wird mit einer Lichtquelle mit 440 nm Wellenlänge angeregt und emittiert bei einer Wellenlänge von 480 nm. In Abwesenheit von cGMP wird durch die Emission des CFP, das YFP angeregt und es emittiert bei einer Wellenlänge von 535 nm. Sobald cGMP an den Sensor bindet, findet eine Konformationsänderung statt und YFP wird nicht mehr angeregt. Das Verhältnis von der Emission von CFP zu YFP ist proportional der intrazellulären cGMP-Konzentration. (Thunemann et al., 2013)

1.4 cGMP Manipulation durch SponGee

SponGee ist ein von Ros et al. entwickelter cGMP-Chelator. Es beinhaltet die cGMP-Bindestellen und Leucin-Zipper einer chimären PKG α/β und ein monomeres rot-fluoreszierendes Protein (mRFP). Die Kinase-Domäne der PKG ist nicht in SponGee enthalten, damit die cGMP-Signalkette nicht aktiviert wird. Das mRFP ermöglicht es, anhand der Fluoreszenz, Zellen zu erkennen die SponGee exprimieren. Der Leucin-Zipper ermöglicht die, für die cGMP-Bindung nötige, Dimerisation. Wird SponGee in Zellen exprimiert, so wird das in den Zellen befindliche cGMP gebunden und cGMP-gesteuerte Signalwege werden inhibiert. Mit dem cGi-Biosensor und der FRET Messung kann die cGMP-Manipulation in lebenden Zellen gemessen werden (Campbell et al., 2002; Kim et al., 2016; Ros et al., 2019; Ruth et al., 1997).



Abbildung 5: Schematische Darstellung von SponGee. Es enthält die cGMP-Bindedomänen und den Leucin-Zipper einer PKG α /PKG β -Chimäre, sowie mRFP zur Identifikation von Zellen, die SponGee enthalten. (Ros et al., 2019)

2. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es einen Adenovirusvektor herzustellen, mit dem es möglich ist cGMP in glatten Gefäßmuskeln zu manipulieren. Um das zu erreichen, wurde mittels der Gateway® Technologie das Gen für SponGee in den Adenovirusvektor pAd kloniert. Dazu wurde zunächst das Gen für SponGee aus dem Vektor pCEP SponGee in den Vektor pDONR-AKAR-NLS umklontiert. Anschließend wurde mittels der LR-Reaktion der Gateway® Technologie das SponGee-Gen in den Destinationsvektor pAd kloniert. Mit dem hergestellten Adenovektor wurden HEK-293A-Zellen transfiziert, welche den Adenovirus exprimiert und vervielfältigt haben. Das Virus wurde amplifiziert und aufgereinigt. Aus Maus-Aorten isolierte glatte Gefäßmuskelzellen wurden mit dem Virus transduziert und waren nun in der Lage SponGee zu exprimieren. Mittels FRET-Messungen wurde die cGMP-Konzentration in den transduzierten Zellen und in Wildtyp-Zellen untersucht.

3. Materialien

3.1 Zelllinien

Primäre Glatte Muskelzellen (Maus)	Aus der Aorta von Wildtyp-Mäusen isoliert.
293A	Von ThermoFisher Scientific. Zur Herstellung eines rekombinanten Adenovirus.

3.2 Zellkulturmedien, Lösungen und Puffer für die Zellkultur

DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (Sigma Aldrich, D6546-500ML)
DPBS	Dulbeccos Phosphat-gepufferte Salzlösung (Sigma Aldrich, RNBJ4977)
Trypsin/EDTA-Lösung	Trypsin/EDTA-Lösung (0.05%/0.02%) in PBS, ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} (Biochrom GmbH, 720)
L-Glutamine-Lösung	(Sigma Aldrich, RNBJ3517)
Geneticin®	Geneticin 50 mg/mL (Gibco, 10131-035)
Hygromycin B	in PBS 50 mg/mL (Invitrogen, HO44-16 US)
FBS	Fetal Bovine Serum (Sigma Aldrich, BCBW6329)
Penicillin-Streptomycin	(Sigma Aldrich, 049M4849V)

Iscove basal Medium (Biochrom, FG 0465)

Antibiotic-Antimycotic, 100x (Gibco, 15240062)

3.3 Bakterienstamm

One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* invitrogen

3.4 Reagenzsysteme

QIAquick Gel Extraktion Kit (250) (QIAGEN, 28706)

Plasmid Midi Kit (25) (QIAGEN, 12243)

3.5 Medien und Lösungen für Mikrobiologische Arbeiten

LB-Medium	LB-Medium-Pulver nach Miller (Carl Roth, 049279577) 25 g ^l ⁻¹ , autoklaviert
LB-Agarplatten	LB-Agar-Pulver nach Miller (Carl Roth, 318273932) 40 g ^l ⁻¹ , autoklaviert
Ampicillin	Ampicillin-Natriumsalz (AppliChem, 0A002393) 100 mgml ⁻¹ Stocklösung, angesetzt in Aqua dest., aliquotiert, Lagerung bei -20°C
Kanamycin	50 mg/mL in Wasser (ROTH, T832.1)
5x KCM-Puffer	Kaliumchlorid (AppliChem A049374), Calciumchlorid (AppliChem A489923), MgCl ₂ 6H ₂ O (AppliChem, A1036,0500)

3.6 Enzyme, Lösungen und Substanzen für molekularbiologische Methoden

Transformationspuffer	LB-Medium, PEG (Fluka, 81269), DMSO (AppliChem, A3672), MgCl ₂ 6H ₂ O (AppliChem, A1036,0500)
10xLigase-Puffer	(New England biolabs)
10xCutSmartPuffer	(New England biolabs)
Midori Green DNA Stain	(Noppen Genetics)
Gel Loading Dye Purple (6x)	(New England biolabs)
1kb DNA Marker	(New England biolabs)
TAE-Puffer	1:50 verdünnt mit H ₂ O (AppliChem)
Restriktionsenzyme	(New England biolabs)
Lipofectamine 2000	Invitrogen
(D+)-Saccharose	(Roth, 4621.1)
Glycerol	(Sigma, G55516)
Tris	(Roth, 2781.1)

Gateway®LR-ClonaseII Enzymmix	(Invitrogen, 11791-020)
Papain	(Sigma-Aldrich, P4762)
Hyaluronidase	(Applichem, A1937,0001)
Collagenase	(Sigma-Aldrich, C8051)

3.7 Puffer und Lösungen für die FRET-Messungen

FRET-Puffer	NaCl 8,42 g/L (Roth, 3957.2), KCl 0,40 g/L (Merck, A1073933 637), MgCl ₂ ·6H ₂ O 0,95 g/L (AppliChem, A1036,0500, CaCl ₂ 0,11 g/L (Sigma, 21115), HEPES 2,38 g/L (AppliChem, A1069,0500)
Sildenafil	10 mM Stammlösung in DMSO (Molekula)
SNP	(Sigma)
IBMX	100 mM Stammlösung in DMSO (AppliChem)
CNP	(Sigma)

3.8 Plasmide

pDONR-AKAR-NLS

Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev

pCEP-SponGee

Julia Pflaumenbaum

pAd

Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev

3.8.1 pDONR-AKAR-NLS

Das 4608 bp große Plasmid pDONR-AKAR-NLS enthält eine attL1 und attL2 Sequenz, welche für die LR-Rekombination notwendig ist. Es wird mit den Restriktionsenzymen HindIII und XhoI geschnitten und die Sequenz für YFP und CFP wird durch SponGee aus dem Plasmid pCEP SponGee ersetzt. Das Plasmid enthält eine Sequenz für eine Kanamycin-Resistenz. In Abbildung 6 ist die Plasmidkarte des pDONR-AKAR-NLS zu sehen.

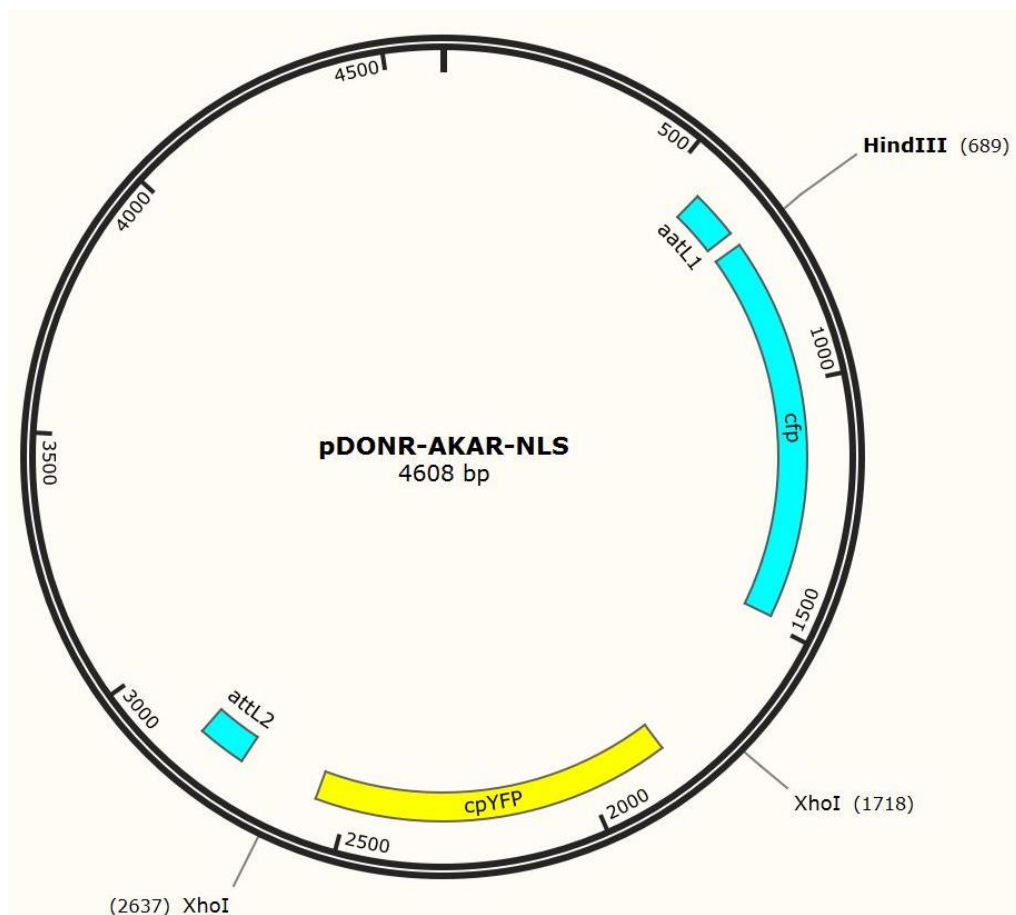


Abbildung 6: Plasmidkarte des pDONR-AKAR-NLS mit eingezeichneten Schnittstellen der Enzyme HindIII und XhoI.

3.8.2 pCEP-SponGee

Das Plasmid pCEP-SponGee ist 12 kbp groß. Es enthält eine Sequenz für das Protein SponGee und eine Sequenz für eine Ampicillin-Resistenz. Es wird mit den Restriktionsenzymen HindIII und XhoI geschnitten und das offene Leseraster (ORF) wird in das Plasmid pDONR-AKAR-NLS eingefügt. In Abbildung 7 ist die Plasmidkarte des pCEP-SponGee zu sehen.

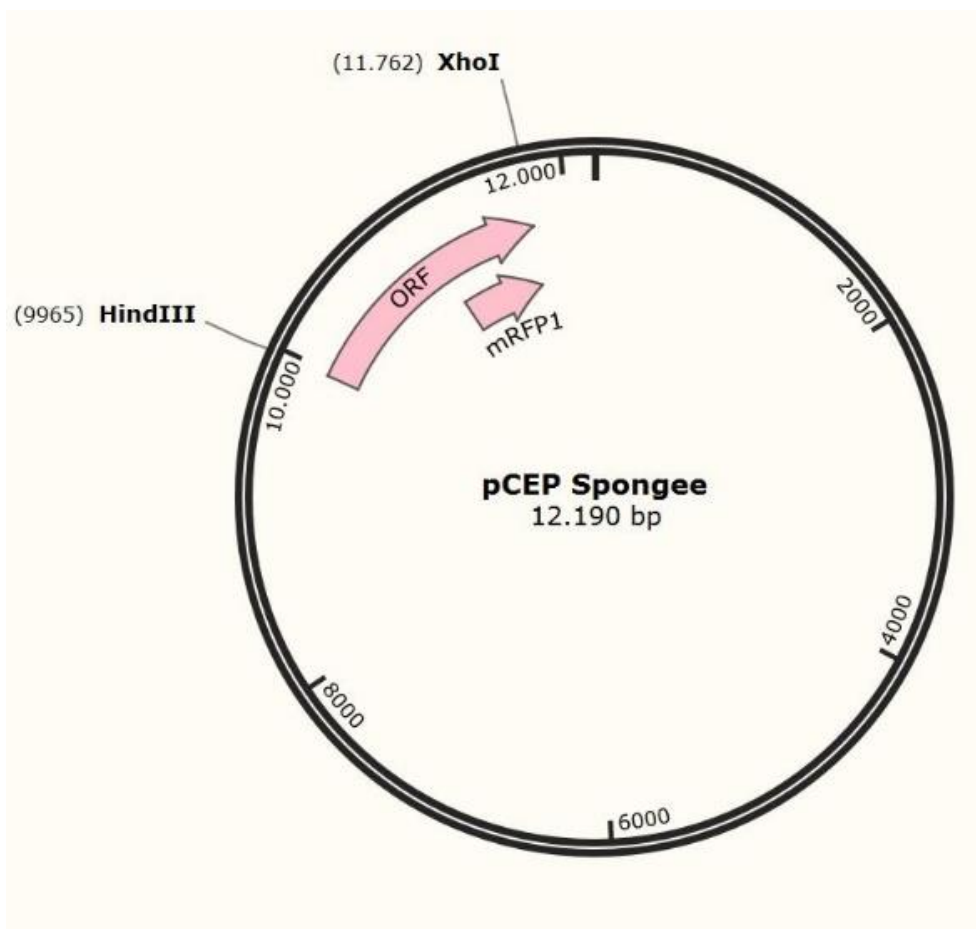


Abbildung 7: Plasmidkarte des pCEP-SponGee mit eingezeichneten Schnittstellen der Enzyme HindIII und XhoI.

3.8.3 pDONR-SponGee

Das Plasmid pDONR-SponGee ist das Produkt aus der Umklonierung von des Vektors pDONR-AKAR-NLS und pCEP-SponGee. Es ist 4460 bp groß und enthält eine Kanamycin-Resistenz. Der ORF enthält die Sequenz für SponGee. In Abbildung 8 ist die Plasmidkarte des pDONR-SponGee zu sehen.

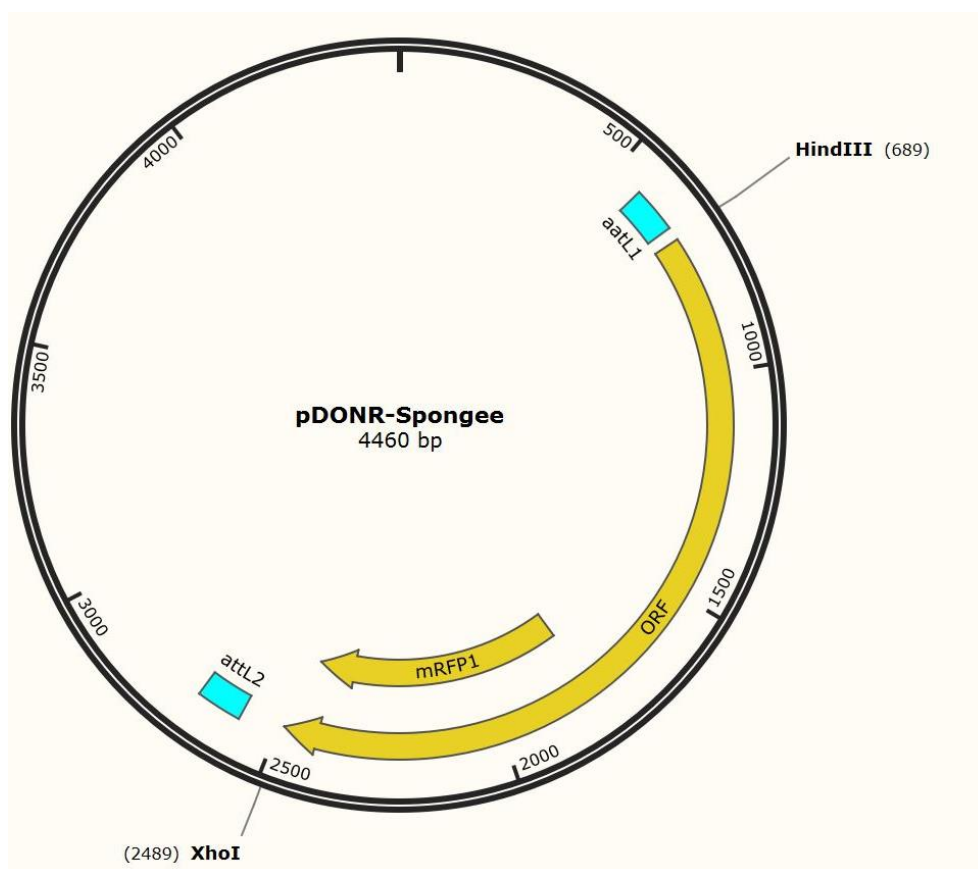


Abbildung 8: Plasmidkarte des pDONR-SponGee. Die attL1 und attL2 Stellen flankieren den ORF mit der Sequenz von SponGee.

3.8.4 pAd

Der Adenovektor pAd ist 36,7 kbp groß. Für den Kontrollverdau wurden die Restriktionsenzyme HindIII, XhoI und XbaI genutzt. Die attB1 und attB2 sind für die LR-Rekombination wichtig. In Abbildung 9 ist die Plasmidkarte des pAd zu sehen.

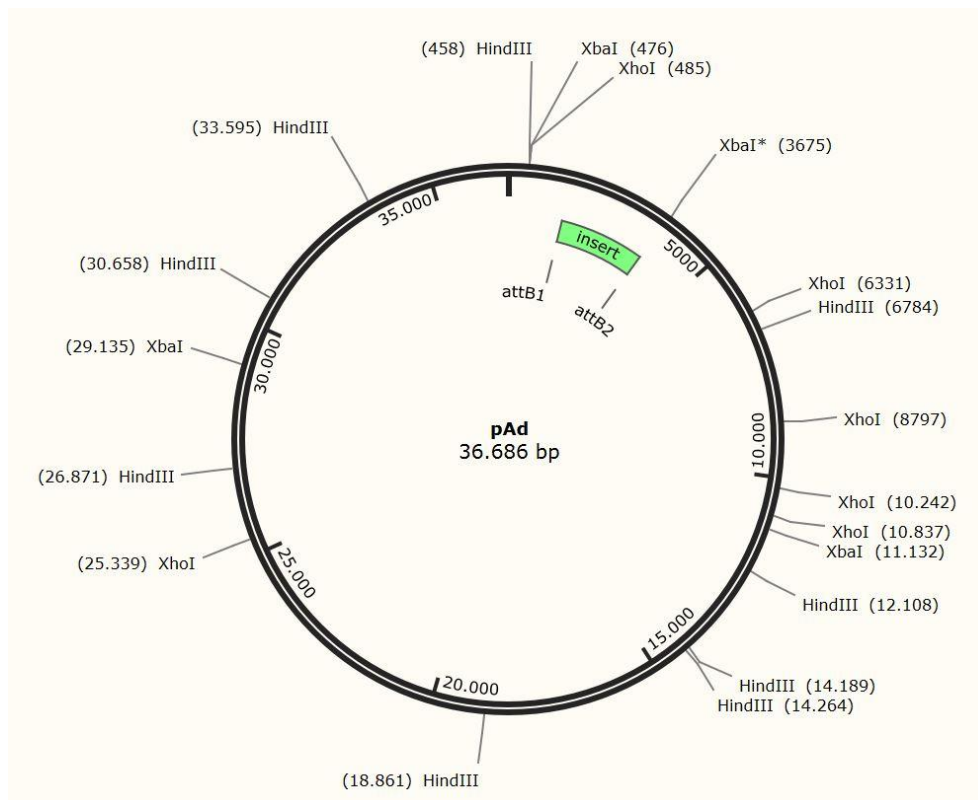


Abbildung 9: Plasmidkarte des pAd. Die attB1 und attB2 Stellen flankieren den Insert Bereich.

3.8.5 pAd-SponGee

Der Adenovektor pAd-SponGee ist das Produkt aus der LR-Rekombination. Der Kontrollverdau wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII, XbaI und XhoI durchgeführt. Linearisiert wurde mit PacI. Die LR-Rekombination ermöglicht eine hohe Effizienz der Rekombination. pAd-SponGee ist 36,4 kbp groß. In Abbildung 10 ist die Plasmidkarte des pAd-SponGee zu sehen.

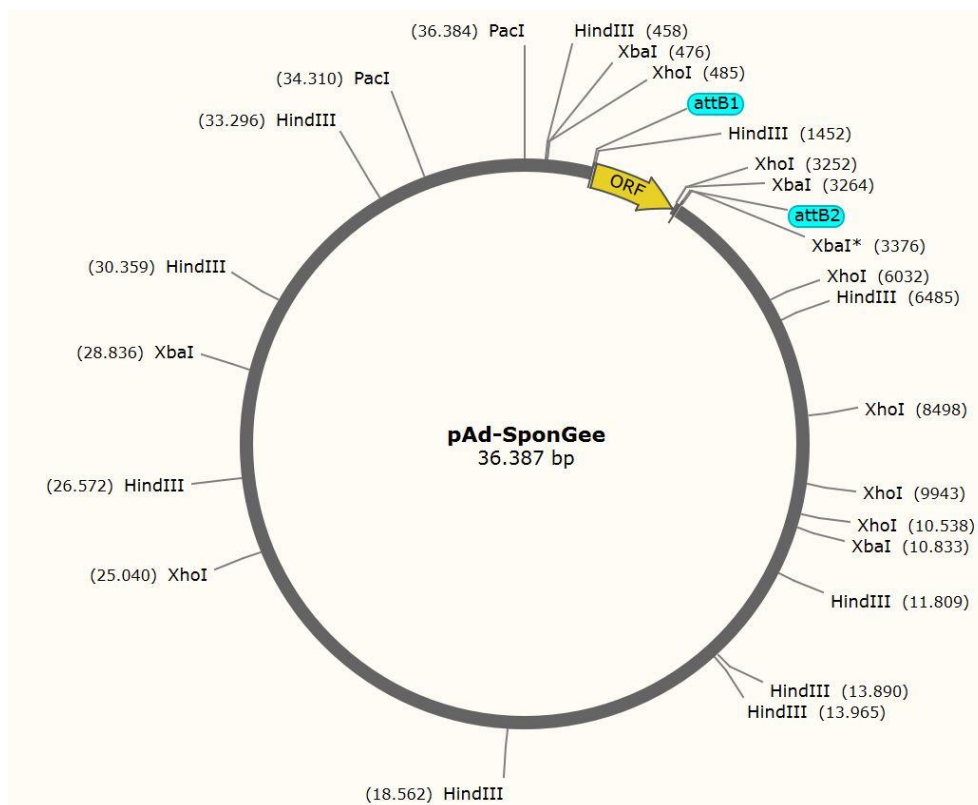


Abbildung 10: Plasmidkarte des pAd-SponGee. Der ORF enthält die Sequenz für SponGee.

4. Methoden

4.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen (Top Ten)

Für die Herstellung der kompetenten Zellen wurden noch vorhandene kompetente Zellen mit einem drei-Ösen-Ausstrich auf eine LB-Platte ohne Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von der Platte wurde eine Einzelkolonie gepickt und mit dieser wurde, in 4 mL LB-Medium ohne Antibiotikum, über Nacht eine Vorkultur angezogen.

Mit 0,5 mL der Vorkultur wurde 250 mL LB-Medium ohne Antibiotikum im Schüttelkolben angeimpft. Die Bakterienkultur wurde für 4-5 Stunden bei 37 °C bis zu einer $OD_{600} = 0,3-0,6$ angezogen. Die OD_{600} wurde mit einem Photometer bestimmt. Der Blank erfolgt über eine Küvette gefüllt mit LB-Medium.

Sobald die Bakterienkultur den benötigten OD_{600} Wert erreichte, wurde sie für 10 Minuten bei 500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 25 mL eisgekühlten Transformationspuffer vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde für 4-5 Stunden auf Eis inkubiert.

Im Anschluss wurde je 500 µL der Zellen in eisgekühlte 1,5 mL Mikroreaktionsgefäße aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zusammensetzung Transformationspuffer (100mL): 75 mL LB-Medium ohne Antibiotikum, 20 mL PEG, 5 mL DMSO und 2 mL 1M $MgCl_2$.

4.2 Herstellung von LB-Medium und Platten

Für 500 mL LB-Medium wurde zu 500 mL Wasser 12,5 g LB-Medium-Pulver nach Miller gemischt und autoklaviert. Je nach Verwendungszweck wurde zu 500 mL Medium 500 µL Antibiotika gegeben

Für 500 mL LB-Medium zum Gießen von Platten wurde zu 500 mL Wasser 20 g LB-Agar-Pulver gegeben und anschließend autoklaviert. Nach kurzem abkühlen wurde je nach Verwendungszweck zu 500 mL Medium 500 µL Antibiotika gegeben. Das Medium wurde in 10 cm Schalen gegossen. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

4.3 Zellkultur

4.3.1 Herstellung von Zellkulturmedium

Als Basis für das Zellkulturmedium wurde 500 mL DMEM Medium von Sigma-Aldrich genutzt. Dieses wurde mit 50 mL FCS, 5 mL Penicillin/Streptomycin (10000 Einheiten/10 mg je mL) und 5 mL L-Glutamin (200 mM) versetzt. Das Zellkulturmedium wurde bei 4 °C gelagert.

4.3.2 Medium-Wechsel

Das frische Zellkulturmedium wurde im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Das alte Medium wurde unter der Sterilwerkbank mit einer sterilen Pasteurpipetten vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurde das frische Medium vorsichtig auf die Platte gegeben, ohne dabei die Zellen abzulösen. Je nach Bedarf wurde Antibiotikum hinzugegeben.

4.3.3 Zellen auftauen

Die gefrorenen Zellen werden in Tanks mit flüssigem Stickstoff gelagert. Die gewünschten Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C für 40-50 s erwärmt und anschließend in ein 15 mL Falcon-Röhrchen mit 10 mL Medium überführt. Die Zellsuspension wurde für 3 Minuten bei 900 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellen wurden ausplattiert.

4.3.4 Zellen splitten/umsetzen (10er Platte)

Das Medium wurde von der Platte mit den zu splittenden Zellen abgesaugt. Die Zellen wurden mit 5-10 mL PBS gewaschen, um Rückstände des Mediums zu entfernen. Das PBS wurde abgesaugt und 1 mL Trypsin/EDTA auf die Schale gegeben. Die Schale wurde für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert, um die Zellen abzulösen. Währenddessen wurden neue Schalen mit 9 mL Medium befüllt und nach Bedarf Antibiotikum hinzugegeben. Die Schalen wurden aus dem Inkubator geholt. Die Zellen wurden mit 4 mL Medium von der Platte gelöst und je nach gewünschter Verdünnung wurde die Zellsuspension auf die neue Platte gegeben. Bei einer gewünschten Verdünnung von 1:4 wurde beispielsweise 1 mL der Zellsuspension zu der neuen Platte pipettiert.

4.4 Umklonierung pDONR-AKAR-NLS/pCEP-SponGee

Der ORF des Expressionsvektors pCEP-SponGee wurde in den Vektor pDONR-AKAR-NLS überführt. Das aus der Umklonierung entstandene Produkt wurde für die folgende LR-Rekombination benötigt. Die Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII und XhoI geschnitten. Der benötigte Nukleinsäureabschnitt vom pCEP-SponGee hat eine Größe von 1797 bp und vom pDONR-AKAR-NLS eine Größe von 2660 bp.

Die Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen geschnitten, auf einem Gel wurden die Abschnitte voneinander getrennt und die gewünschten Abschnitte wurden aus dem Gel extrahiert. Anschließend wurden die Abschnitte ligiert und in *E. coli* transformiert. Nachdem sich das Plasmid in den *E. coli*s vervielfältigt hat, wurde das Plasmid isoliert und ein Kontrollverdau durchgeführt.

4.4.1 Restriktion

Der erste Restriktionsansatz beinhaltete 7 µg des Plasmids pDONR-AKAR-NLS, 5 µl 10xRestriktionspuffer, 2,5 µl HindIII, 2,5 µl XhoI und wurde mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Der zweite Restriktionsansatz beinhaltete 10 µg des Plasmid pCEP-SponGee, 5 µl 10xRestriktionspuffer, 2,5 µl HindIII, 2,5 µl XhoI und wurde mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt.

Die Restriktionsansätze wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.4.2 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1%iges Agarose Gel gegossen. 0,5 g Agarose wurde mit 50 mL 1xTAE Puffer in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose komplett gelöst war. Nach kurzem Abkühlen wurde 4 µl DNA-Färbemittel hinzugefügt und das Gel in eine Form mit Kämmen für die Taschen gegossen. Das Gel benötigte 30 Minuten zum Aushärten und wurde anschließend in eine horizontale Elektrophorese-Kammer gelegt und die Kammer mit TAE-Puffer gefüllt bis das Gel bedeckt war.

Die Restriktionsansätze aus Abschnitt 4.4.1 wurden mit 10 µl 6xLadepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zudem wurde 5 µl 1kb DNA Marker aufgetragen. Das Auftragen erfolgte durch Pipettieren der Proben und des Markers in je eine Tasche des Gels. Das Gel lief für 30 Minuten bei 100 V.

4.4.3 Extraktion der Nukleinsäuren aus dem Gel

Bei dem geschnittenen Plasmid pCEP-SponGee wurde die Bande bei 1797 bp aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten (Insert). Bei dem Plasmid pDONR-AKAR-NLS wurde die Bande bei 2660 bp ausgeschnitten (Vektor). Die Gelausschnitte wurden in vorher austarierten Mikroreaktionsgefäßen gewogen und anschließend mit dem QIAquick Gel Extraktions Kit von QIAGEN nach Anleitung extrahiert. Das Insert wurde mit 25 µL EB-Puffer und der Vektor mit 50 µL EB-Puffer eluiert.

4.4.4 Ligation

Die extrahierten Nukleinsäureabschnitte der Plasmide pCEP-SponGee (Insert) und pDONR-AKAR-NLS (Vektor) wurden miteinander legiert.

Der Ligationsansatz beinhaltete 10,5 µL vom geschnittenen Insert, 2 µL vom geschnittenen Vektor, 1,5 µL 10xLigase-Puffer und 1 µL T4 DNA-Ligase. Die Ligation erfolgte bei 14 °C über Nacht.

4.4.5 Transformation in *E. coli*

Für die Transformation wurden vorher aliquotierte kompetente *E. coli* (siehe Abschnitt 4.1) auf Eis aufgetaut. 15 µL des Ligationsansatzes aus Abschnitt 4.4.4 wurden mit 65 µL Wasser und 20 µL 5xKCM-Puffer versetzt und anschließend für 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 100 µL der kompetenten Zellen zupipettiert. Der Ansatz wurde für 20 Minuten auf Eis und danach für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde 1 mL LB-Medium ohne Antibiotikazusatz hinzu gegeben. Der Ansatz wurde für 60 Minuten bei 37 °C und 700 rpm im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 2 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurden 100 µL abpipettiert. Der übrige Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet mit den 100 µL Überstand resuspendiert. Das Resuspendat wurde auf LB-Platten + Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zusammensetzung des 5xKCM-Puffer: 500 mM KCl, 150 mM CaCl₂, 250 mM MgCl₂

4.4.6 Plasmidpräparation und Kontrollverdau

Von der Platte mit den transformierten *E. coli* (Abschnitt 4.4.5) wurden zehn Klone gepickt und mit diesen je eine Kultur, in einem 15 mL Falcon-Röhrchen mit 3 mL LB-Medium mit 50 µg/µL Kanamycin, angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Je 1,5 mL der Kulturen wurden für die Plasmidisolierung genutzt. Die Isolierung wurde mit den Plasmid Midi Kit (25) – Lösungen und QUIAfiltern von QUIAGEN nach Anleitung durchgeführt. Die Plasmide wurden in 100 µL Wasser resuspendiert.

Für den Kontrollverdau wurde ein Mastermix mit einem Gesamtvolumen von 84 µL angesetzt: 18 µL 10xRestriktionspuffer Puffer, 2,5 µL HindIII, 2,5 µL XhoI und 61 µL Wasser. Von dem Mastermix wurde je 7 µL zu 8 µL der Plasmide pipettiert und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Die Proben werden mit 2 µL 6xLadepuffer versehen und wie in Abschnitt auf ein 1%iges Agarose Gel aufgetragen. Es wurde zudem ein 1kb DNA Marker aufgetragen. Ein positiver Klon sollte Banden bei 1797 bp und bei 2660 bp haben.

Von einer Bakterienkultur mit positivem Klon wurden 100 µL genutzt, um 50 mL LB-Medium (50 µg/µL Kanamycin) anzupflanzen. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur bei 5000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert und die Plasmid DNA mit dem Plasmid Midi Kit (25) Lösungen und QUIAfiltern von QUIAGEN aufgereinigt. Die Konzentration wurde mittels Nanodrop bestimmt.

Mit dem aufgereinigten Plasmid wurde ein erneuter Kontrollverdau durchgeführt, mit dem Plasmid pCEP-SponGee als Vergleich. Die Restriktionsansätze enthielten je 1 µg Plasmid, 0,5 µL HindIII und 0,5 µL XhoI. Die Ansätze wurden mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µL aufgefüllt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie mit 2 µL 6xLadepuffer versetzt und zusammen mit einem 1kb DNA Marker auf ein 1%iges Agarose Gel aufgetragen. Das Gel lief für 30 Minuten bei 100 V.

4.5 Virus Klonierung

Das Plasmid pDONR-SponGee wurde mittels der LR-Rekombination mit dem Adenovektor pAd rekombiniert. Für die Rekombination wurde der LR-ClonaseII Enzymmix von invitrogen genutzt.

Die Plasmide wurden mit dem LR-ClonaseII Enzymmix rekombiniert und in *E. coli*s transformiert und vervielfältigt. Anschließend wurde das Plasmid isoliert und in HEK-293A-Zellen transfiziert. In den transfizierten HEK-293A-Zellen wurde der Adenovirus exprimiert und der Virusüberstand konnte geerntet werden. Um den Virus zu vervielfältigen wurden Wannenstapel mit HEK-293A-Zellen mit dem Virusüberstand transfiziert.

4.5.1 LR-Rekombination

Es wurde das umklonierte Plasmid aus Abschnitt 4.4 (pDONR-SponGee) mit einem Adenovektor (pAd) rekombiniert. Für die Reaktion wurden je 150 ng beider Plasmide mit 2 μ L des LR-ClonaseII Enzymmix gemischt und mit TE-Puffer auf 8 μ L aufgefüllt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 25 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 μ L Proteinkinase K hinzugefügt und die Probe für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert.

4.5.2 Transformation

Es wurden kompetente Bakterien (Abschnitt 4.1) auf Eis aufgetaut und 50 μ L der Bakteriensuspension zu dem LR-Rekombinationsansatz (Abschnitt 4.5.1) pipettiert. Dieser wurde für 30 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Probe im Wasserbad bei 42 °C ein Hitzeschock versetzt. Den Bakterien wurde 250 μ L LB-Medium zugefügt und sie wurden für 1 Stunde bei 37 °C und 700 rpm inkubiert. Danach wurden die Bakterien auf eine LB-Platte + Ampicillin (Abschnitt 4.2) ausgestrichen und über Nacht bei 36 °C inkubiert. Von der Platte wurde ein Klon gepickt und mit diesem eine Kultur in einem 15 mL Falcon-Röhrchen mit 4 ml LB-Medium + Ampicillin angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

4.5.3 Plasmidpräparation und Kontrollverdau

2 mL der Kultur wurde für die Plasmidisolation genutzt. Die Isolation wurde mit den Plasmid Midi Kit (25) – Lösungen und QUIAfiltern von QUIAGEN nach Anleitung durchgeführt. Die übrigen 2 mL wurden bei 4 °C gelagert.

Es wurden sechs Restriktionsansätze hergestellt. Je drei Ansätze wurden mit dem pAd und den Restriktionsenzymen XhoI, XbaI und HindIII und je drei Ansätze mit dem aus der LR-Rekombination entstandenen Plasmid pAd-SponGee und den Restriktionsenzymen XhoI, XbaI und HindIII angesetzt.

Ansätze: 1 µg Plasmid, 1 µL 10xRestriktionspuffer und 1 µL Enzym. Die Ansätze wurden mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µL aufgefüllt.

Den Ansätzen wurde jeweils 2 µL 6xLadepuffer zugemischt und sie wurden auf ein 1%iges Agarose Gel aufgetragen. Das Gel lief für 30 Minuten bei 100 V.

4.5.4 Transfektion von HEK-293A-Zellen mit dem Viruskonstrukt

Das Viruskonstrukt wurde mit dem Restriktionsenzym PacI linearisiert. Der Ansatz enthielt 5 µg pAd-SponGee, 2,5 µL 10xRestriktionspuffer Puffer, 2 µL PacI und wurde mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 µL aufgefüllt. Das Viruskonstrukt wurde für 3 Stunden bei 37 °C verdaut.

Die DNA wurde anschließend mit Ethanol gefällt. Dazu wurde die DNA mit 70 µL -20 °C kalten 100%igen Ethanol und 10 µL 3M Natriumacetat versetzt und für 30 Minuten bei -20 °C inkubiert. Die Probe wurde anschließend für 10 Minuten bei 13300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Probe wurde mit 500 µL -20 °C kalten 75%igen Ethanol gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 13300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Probe für 10 Minuten getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 10 µL Wasser resuspendiert.

Für die Transfektion wurde die gefällte DNA mit 300 µL DMEM-Medium ohne Zusätze und 7 µL Lipofectamine 2000 gemischt und für 20 Minuten inkubiert. Bei einer 10 cm Schale mit 80% konfluenten HEK-293A-Zellen wurde das Medium durch DMEM-Medium ohne Zusätze gewechselt und der Transfektionsansatz auf die Zellen getropft. Die Zellen wurden für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend wurde das Medium mit DMEM (10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin) ersetzt. Die Platte wurde für 14 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, bis sich die Zellen abgelöst haben.

4.5.5 Ernte des Virusüberstandes

Sobald die Viruslast so groß war, dass sich fast alle HEK-293A-Zellen gelöst haben, wurden die Zellen mit dem Überstand von der Platte abgespült und in ein 15 mL Falcon-Röhrchen überführt. Es wurde für 5 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert und der Überstand in eine neues 15 mL Falcon-Röhrchen überführt. Das Pellet aus dem ersten Falcon-Röhrchen wurde mit flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Das Zellpellet wurde mit dem Virus-Überstand aus dem zweiten Falcon-Röhrchen resuspendiert und anschließend für 6 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 15 mL Falcon-Röhrchen überführt und bei 4 °C gelagert.

4.5.6 Zellen ausplattieren

Es wurden vier T175-Zellkulturflaschen mit DMEM (10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin) befüllt und aufgetaute HEK-293A-Zellen ausplattiert. Die Zellen wurden bei 37 °C/5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Nach drei Tagen Inkubation wurden die Zellen aus drei T175-Zellkulturflaschen in Wannenstapel überführt (siehe Abschnitt 4.3.4). Statt 1 mL Trypsin/EDTA wurden 3 mL verwendet. Die abgelösten Zellen aus den drei Flaschen wurden in ein 50 mL Falcon-Röhrchen überführt und mit DMEM (10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin) auf 30 mL aufgefüllt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 30 mL Medium resuspendiert. Das Resuspendat wurde in eine T175-Zellkulturflasche überführt und mit Medium auf 450 mL aufgefüllt. Von der Zellsuspension wurden 150 mL auf einen zweier-Wannenstapel und 300 mL auf einen vierer-Wannenstapel verteilt. Die Wannenstapel werden im Inkubator bei 37 °C für 4 Tage inkubiert.

4.5.7 Transfektion

Die übrige T175-Zellkulturflasche aus Abschnitt 4.5.6 wurde nach 4 Tagen Inkubation mit dem Virus transfiziert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und 25 mL DMEM (5% FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin) hinzugegeben. Anschließend wurden 2 mL des Virusüberstandes aus Abschnitt 4.5.5 hinzugegeben und der Ansatz für 2,5 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium mit 35 mL DMEM (5% FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin) gewechselt. Die Zellen wurden für 3 Tage bei 37 °C inkubiert, bis die Zellen lysiert waren.

Die lysierten Zellen wurden in ein 50 mL Falcon-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 800 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neue T175-Zellkulturflasche überführt und mit DMEM (5% FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin) auf 300 mL aufgefüllt.

Mit dem Virusüberstand wurden die Wannenstapel aus Abschnitt 4.5.6 transfiziert. Das Medium wurde von den Wannenstapeln abgesaugt und 100 mL des Virusüberstandes zu dem zweier-Wannenstapel und 200 mL des Virusüberstandes zu dem vierer-Wannenstapel hinzugefügt. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde das Virusgemisch abgesaugt und 150 mL DMEM (5% FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin) zu dem zweier-Wannenstapel und 300 mL DMEM (5% FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin) zu dem vierer-Wannenstapel hinzugegeben. Die Wannenstapel wurden für 3 Tage inkubiert.

4.6 Viruspräparation

Der Überstand der Wannenstapel wurde auf zwei 250 mL Zentrifugenbecher aufgeteilt und austariert. Zu dem Virusüberstand wurde 20% Triton-X-100/PBS (4 °C) bis zu einer Endkonzentration von 0,1% zugegeben. Die Probe wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur und 900 rpm inkubiert und anschließend für 60 Minuten bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf drei neue 250 mL Zentrifugenbecher aufgeteilt und 50% des Gesamtvolumens 20% PEG 8000/2,5 M NaCl (4 °C) hinzugegeben. Die Probe wurde gemischt und über Nacht bei 4 °C in Eiswasser inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Probe für 60 Minuten bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets mit insgesamt 11,5 mL PBS pH 8,0 (4 °C) resuspendiert und in ein 50 mL Falcon-Röhrchen überführt. Die Suspension wurde mit einer 30 mL Spritze mit 18G Kanüle aufgesaugt. Die Kanüle wurde durch eine 23G Kanüle ersetzt und die Suspension durch diese Kanüle in ein neues 15 mL Falcon-Röhrchen überführt. Die Probe wurde für 1,5 Stunden bei 4 °C rotierend inkubiert. Anschließend wurde die Viruslösung bei 2000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 15 mL Falcon-Röhrchen überführt und CsCl bis zu einer Gesamtkonzentration von 1,33 µg/µL zugefügt. Durch Erwärmen und Schütteln wurde das CsCl gelöst und die Virus-CsCl-Lösung in ein Ultrazentrifugenrohr überführt. Das Ultrazentrifugenrohr wurde verschweißt und für circa 24 Stunden bei 16°C, Accel.: 9, Decel.: 4 zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde das Ultrazentrifugenrohr entlüftet, indem eine 21G Kanüle oben beim Verschluss eingeführt wurde und die Virusbande mit einer 2 mL Spritze und einer 21G Kanüle abgenommen. Der Virus wurde in ein 2 mL Mikroreaktionsgefäß überführt.

4.6.1 Virus-Dialyse

Für die Virus-Dialyse wurde 1 L 10x Saccharose-Puffer mit autoklaviertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 5 L verdünnt. Ein Stück Dialyseschlauch wurde in einem Becherglas mit autoklaviertem Wasser zweimal in der Mikrowelle aufgekocht. Eine Seite des Dialyseschlauches wurde verknotet und kurz oberhalb des Knotens eine Plastikklemme angebracht. Der Virus wurde in den Schlauch überführt und eine zweite Klemme am anderen Ende angebracht, sodass der Schlauch prall und ohne Luftblasen gefüllt ist. Oberhalb der zweiten Klemme wurde ein weiterer Knoten gesetzt. Der Dialyse-Schlauch wurde in Dialyse-Puffer gegeben und bei 4 °C über Nacht langsam rührend dialysiert.

Am nächsten Tag wurde der Dialyse-Puffer gewechselt und eine weitere Nacht dialysiert.

Nach der Dialyse wurde steriles Glycerol bis zu einer Endkonzentration von 10% hinzugegeben und jeweils 10 µL des Virus in 0,5 mL Mikroreaktionsgefäße aliquotiert. Die Virus-Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

4.7 Isolation von primären glatten Muskelzellen

Die primären glatten Muskelzellen wurden aus der Aorta von Mäusen gewonnen.

Die Mäuse wurden mit gasförmigen Kohlenstoffdioxid betäubt und durch Genickbruch getötet. Der Thorax wurde geöffnet und die Aorta durch Entfernung der Speiseröhre und der Lungen freigelegt. Die Aorta liegt innenseitig an der Wirbelsäule und wurde herausgeschnitten. In PBS-Puffer wurde die Aorta von Fettgewebe befreit.

Die Aorta wurde mittels zwei Enzymlösungen verdaut. Enzymlösung 1 beinhaltet 0,7 mg/ml Papain, 1 mg/ml DTT, 1 mg/ml BSA. Enzymlösung 2 beinhaltet 1 mg/ml Hyaluronidase, 1 mg/ml Collagenase und 1 mg/ml BSA. Die Basis für die Enzymlösung ist ein Calcium-freies Medium mit 85 mM Natriumglutamat, 60 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5,6 mM KCl und 1 mM Magnesiumchlorid-Hexahydrat. Der pH-Wert des Calcium-freien Mediums soll 7,4 betragen.

Die Aorten wurden in Enzymlösung 1 überführt und in einem Wasserbad bei 37 °C für 45 Minuten inkubiert. Anschließend wurden sie in Enzymlösung 2 überführt, wo sie im Wasserbad bei 37 °C für insgesamt 20 Minuten inkubiert wurden. Während der Inkubation in der Enzymlösung 2 wurde, nach jeweils 5 Minuten, die Suspension durch Pipettieren durchmischt.

Nach dem Verdau wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 10 ml DMEM (10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin) überführt und 3 Minuten stehen gelassen, damit die Zelldebris sedimentiert. 9 ml des Überstandes wurden in ein neues 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 850 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet in frischen DMEM (10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend auf zwei 6-Well-Platten ausplattiert. In jeden Well befand sich ein Deckglas.

4.8 Transduktion der glatten Muskelzellen

Sobald die Platten mit den glatten Muskelzellen (Abschnitt 4.7) konfluent waren, wurden sie mit Viren transduziert. Beide Platten wurden mit dem cGi500-Adenovirus transduziert, und eine der beiden Platten wurde zusätzlich mit dem SponGee-Adenovirus transduziert. Es wurde von einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 30 ausgegangen. Auf jedem Deckglas befanden sich schätzungsweise 10000 Zellen. Pro Well wurden ungefähr 300000 Partikel des jeweiligen Virus hinzugegeben.

4.9 Förster-Resonanzenergietransfer-Messung

Für die FRET-Messung wurde ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI 3000 B) mit einem Immersionsobjektiv (Plan Apo λ 60x/1.40 Öl) verwendet. Zudem wurde ein Strahlteiler (Photometrics Dual-View DV2) eingebaut, der einen Filter-Würfel (DV2-cube 05-EM) enthält, welcher aus einem dichroitischen Spiegel (505dcxr), einem Emissions-Filter für CFP (D480/30m) und einem Emissions-Filter für YFP (D535/40m) besteht. Die Bilder wurden mit einer CMOS-Kamera (QIMAGING optiMOS) übertragen und mit einer Kombination aus zwei Mikroskopie-Softwares (Micro-Manager 1.4.5 und ImageJ) ausgewertet.

Die Deckgläser mit den adhärenenten glatten Muskelzellen aus Abschnitt 4.8 wurden in der Zellkammer für die Mikroskopie platziert und mit 400 μ L FRET-Puffer gewaschen, um nicht adhärenente und tote Zellen abzuspülen. Anschließend wurde 400 μ L FRET-Puffer auf die Zellen gegeben und die Zellkammer auf dem Mikroskop platziert. Mit dem Mikroskop wurden ein bis drei gut leuchtende einzelne Zellen anvisiert und die Software für die Messung gestartet. Das Intervall der Messung betrug 1 Sekunde.

5. Ergebnisse

5.1 Herstellung des pDONR-SponGee-Konstrukts

Das pDONR-SponGee-Konstrukt wurde mittels Umklonierung aus den Plasmiden pCEP-SponGee und pDONR-AKAR-NLS, wie im Abschnitt 4.4 beschrieben, hergestellt. Auf Abbildung 11 ist das Gel zu sehen, aus dem die Nukleinsäure-Fragmente der Plasmide herausgeschnitten wurden (Abschnitt 4.4.3).

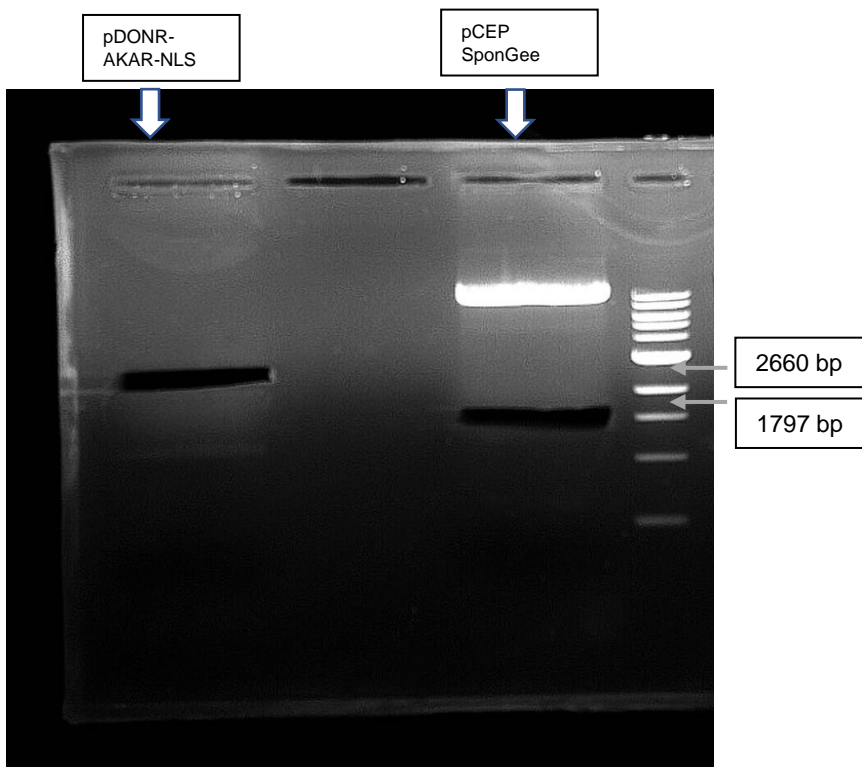


Abbildung 11: 1%iges Agarosegel beladen mit den, mit HindIII und XhoI geschnittenen, Plasmiden pDONR-AKAR-NLS und pCEP-SponGee.

Die Nukleinsäureabschnitte wurden aus dem Gel extrahiert, ligiert und in *E. coli* transformiert. Die transformierten *E. coli*s wurden auf LB-Platten mit Kanamycin ausgestrichen. Auf den Platten können nur Klone mit einer Kanamycin-Resistenz wachsen, welche entweder durch das ligierte Plasmid pDONR-SponGee oder das Ausgangs Plasmid pDONR-AKAR-NLS verliehen wird. Auf der Platte sind mehrere Einzelkolonien gewachsen, von denen zehn Klone für die Plasmidpräparation und den Kontrollverdau gepickt wurden.

Die Plasmide wurden für den Kontrollverdau mit HindIII und XhoI geschnitten. Positive Klone sollten Banden bei 2660 bp und 1797 bp aufweisen. In Abbildung 12 ist das Gel mit den geschnittenen nummerierten Klonen zu sehen. Die Klone 1-4, 6, 7, 9 und 10 zeigen das Konstrukt pDONR-SponGee.

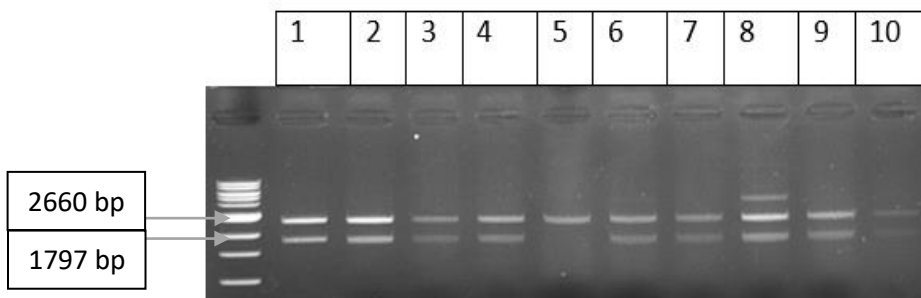


Abbildung 12: 1%iges Agarosegel beladen mit den isolierten Plasmiden aus zehn gepickten Klonen. Die Plasmide wurden mit den Enzymen HindIII und XhoI geschnitten.

Mit Klon Nummer 1 wurde eine Kultur angeimpft, aus welcher eine größere Menge des pDONR-SponGee isoliert wurde. Die aufgereinigte DNA wurde mittels Nanodrop gemessen und wies eine Konzentration von 2,289 µg/µL auf.

5.2 Virus Klonierung

Das Viruskonstrukt pAd-SponGee wurde aus dem Plasmid pDONR-SponGee und dem Adenovektor pAd mit der LR-Rekombination hergestellt (Abschnitt 4.5). Das hergestellte pAd-SponGee wurde mittels Hitzeschock in kompetente *E. coli* transformiert und eine Kultur mit LB-Medium und Ampicillin angeimpft. In dieser Kultur konnten nur Bakterien mit einer Ampicillin-Resistenz wachsen, welche durch das pAd-SponGee verliehen wurde. Mit der Kultur wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Das pAd-SponGee wurde mittels Nanodrop gemessen und hatte eine Konzentration von 1,11 µg/µL. Es wurde ein Kontrollverdau mit dem pAd-SponGee und dem pAd durchgeführt. Für die Restriktionen wurden jeweils die Enzyme XhoI, XbaI und HindIII verwendet. In Abbildung 13 ist das Gel von dem Kontrollverdau zu sehen. Zum Vergleich ist in Abbildung 14 das mit dem Programm „ApE-A Plasmid Editor“ simulierte Gel zu sehen. Das Gel aus dem Kontrollverdau deckt sich mit dem simulierten Gel und es ist davon auszugehen, dass die LR-Rekombination den gewünschten Klon hervorgebracht hat

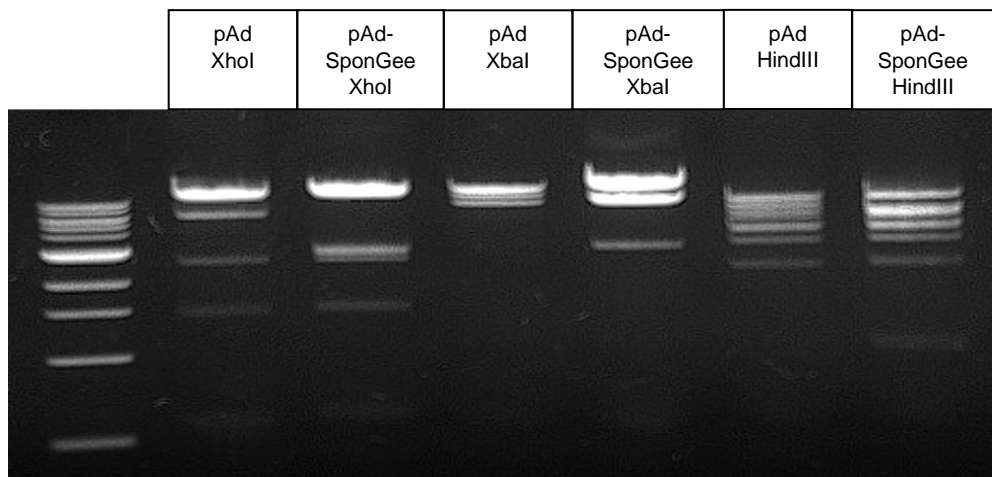


Abbildung 13: 1%iges Agarosegel beladen mit den Adenovektoren pAd und pAd-SponGee. Jedes Plasmid wurde jeweils einmal mit XbaI, XhoI und HindIII geschnitten.

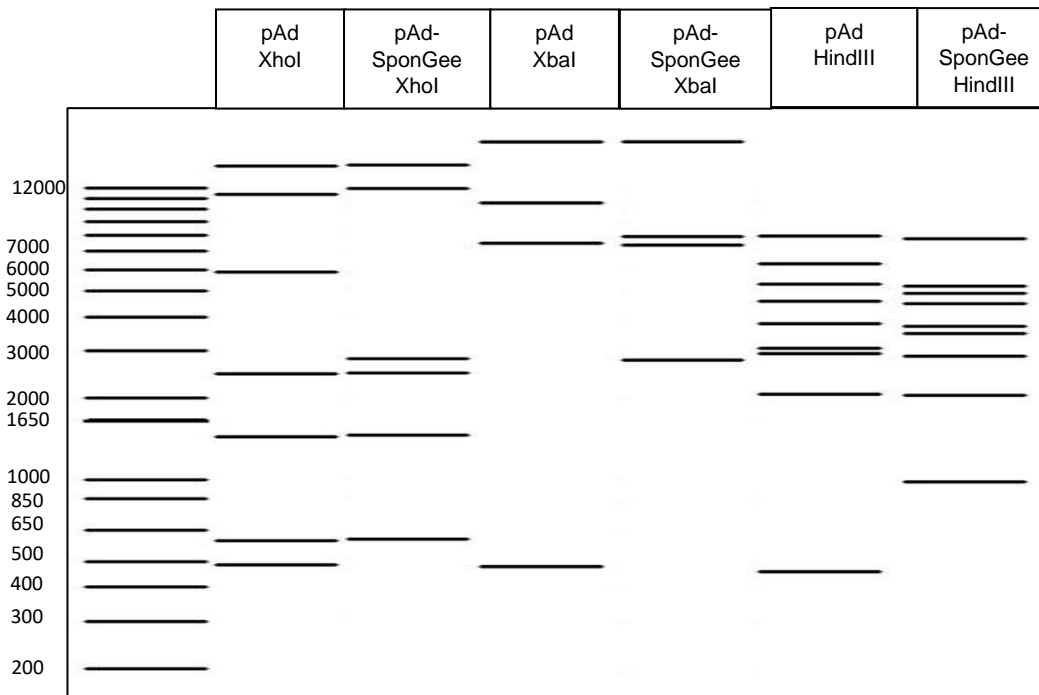


Abbildung 14: Mit ApE simuliertes Gel der Adenovektoren pAd und pAd-SponGee. Jedes Plasmid wurde jeweils einmal mit XbaI, XhoI und HindIII geschnitten.

Das Viruskonstrukt wurde anschließend in 293A-Zellen transfiziert, um den Adenovirus herzustellen. Nach zwei Wochen waren die Zellen abgelöst und der Virusüberstand konnte geerntet werden.

5.2.1 Virus-Amplifikation

Um große Mengen des Virus ernten zu können, wurden HEK-293A-Zellen in Wannenstapel ausplattiert und mit dem Virusüberstand infiziert. Nach der zweiwöchigen Inkubation waren die meisten Zellen lysiert und abgelöst.

5.2.2 Aufreinigung des Virus

Das Virus wurde nach dem Ernten zunächst wie in Abschnitt 4.6 beschrieben präpariert. An dem Ultrazentrifugenrohr war keine Bande zu sehen und es wurde der Bereich abgenommen, an dem das Virus vermutet wurde. Anschließend wurde eine Dialyse durchgeführt und das Virus aliquotiert. Die Messung mit dem Nanodrop ergab einen A260 Wert von 0,0696, was ungefähr $6,96 \cdot 10^{10}$ pfu/ml entspricht.

5.3 Isolierung von glatten Muskelzellen

Die Isolierung der glatten Muskelzellen wurde mehrfach wie im Abschnitt 4.7 beschrieben durchgeführt. Es wurden jeweils Aorten von zwei bis vier Mäusen für eine 6-Well-Platte verwendet. Auf allen Platten sind nach ca. zwei Wochen die Zellen konfluent gewachsen. Das Medium wurde dreimal in der Woche gewechselt. In Abbildung 15 sind zwei Maus-Aorten in PBS zu sehen. In Abbildung 16 sind die gewachsenen glatten Muskelzellen sechs Tage nach Isolation zu sehen.



Abbildung 15: Zwei Aorten aus Wildtyp Mäusen. An den Aorten sind noch Reste von Fettgewebe zu sehen. Die Aorten werden in PBS gereinigt.

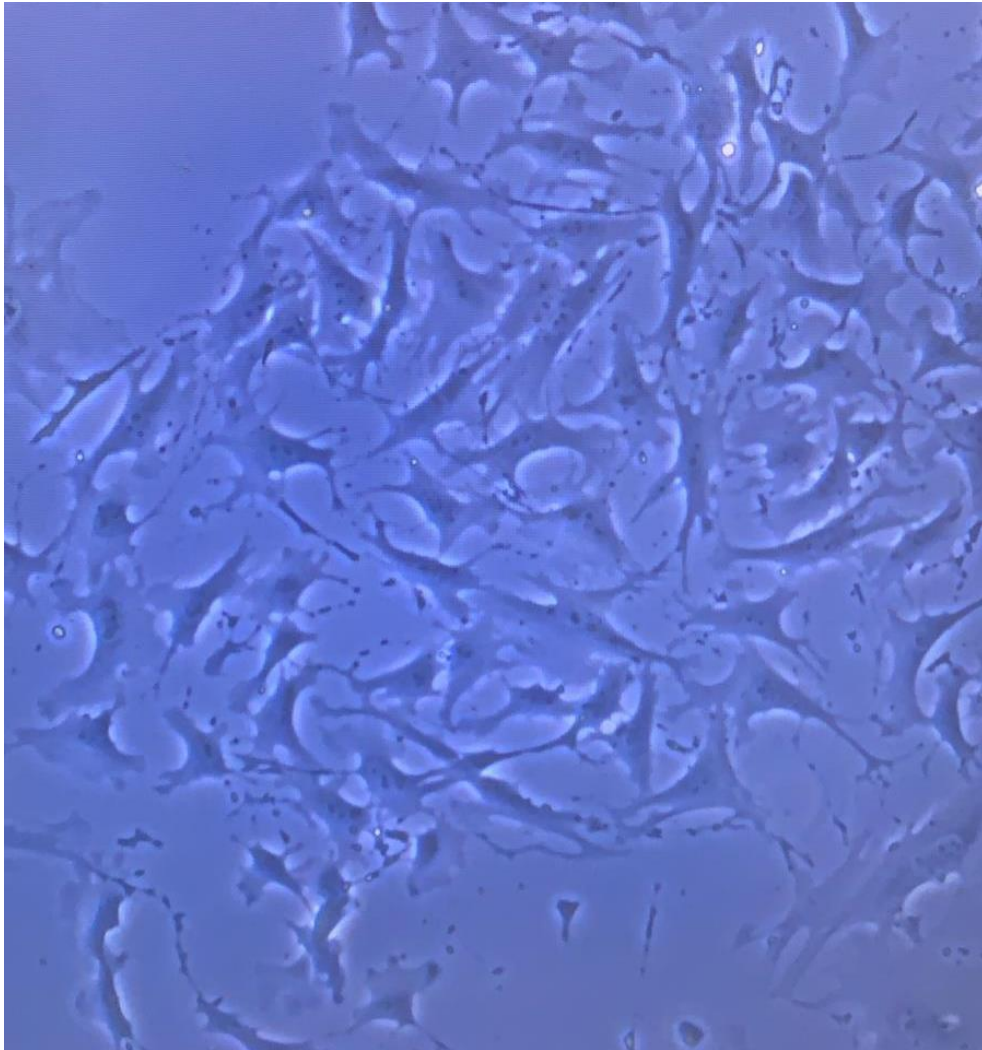


Abbildung 16: Die ausplattierten glatten Muskelzellen unter dem Mikroskop.

5.4 Transduktion der glatten Muskelzellen

Die konfluenten glatten Muskelzellen wurden wie in Abschnitt 4.8 beschrieben SponGee-Adenovirus transduziert. Es wurden zunächst auf einer 6-Well-Platte verschiedene Virus-Konzentrationen getestet. In Tabelle 1 sind die getesteten Virus-Mengen zu sehen. Es wurden verschiedene Volumina des aufgereinigten Virus (Abschnitt 5.2.2) sowie des geernteten Virus-Überstandes (Abschnitt 4.4.5) getestet. Anhand der Fluoreszenz des mRFP, welches sich an dem SponGee befindet, lässt sich feststellen ob die Zellen SponGee exprimieren.

Tabelle 1: Zugegebene Mengen des aufgereinigten Virus und des Virus-Überstandes auf die einzelnen Wells.

Well 1:	0,01 µL Virus (aufgereinigt)
Well 2:	0,1 µL Virus (aufgereinigt)
Well 3:	1 µL Virus (aufgereinigt)
Well 4:	10 µL Virus (Überstand)
Well 5:	30 µL Virus (Überstand)
Well 6:	Kontrolle

Die Zellen, die mit den aufgereinigten Virus transduziert wurden, haben nicht geleuchtet, deshalb wurde der Virus-Überstand für die Transduktion der glatten Muskelzellen verwendet. Für die FRET-Messung wurden zwei 6-Well-Platten transfiziert. Für die erste Platte wurde 10 mL Zellkulturmedium mit 2 µL cGi500-Adenovirus und 1 mL des Virus-Überstandes aus Abschnitt 4.4.5 vermischt. Von der konfluenten Platte wurde das Medium abgesaugt und das Medium-Virus-Gemisch wurde auf die Wells verteilt. Für die zweite Platte wurde 10 mL Zellkulturmedium mit 2 µL cGi500-Adenovirus gemischt und es wurde wie bei der ersten Platte verfahren. Die Zellen wurden für 48 Stunden inkubiert.

5.5 FRET-Messung

Die FRET-Messung wurde wie in Abschnitt 4.9 beschrieben durchgeführt. Nachdem die Basislinie stabil war, wurde 50 μM SNP hinzugegeben. Nachdem die cGMP-Konzentration nicht weiter gestiegen ist, wurde 1 μM Sildenafil hinzugegeben. Es wurde erneut gewartet bis die cGMP-Konzentration nicht mehr gestiegen ist und als letztes wurde 100 nM IBMX und 100 nM CNP hinzugegeben. Die Messung wurde beendet, nachdem die cGMP-Konzentration nicht mehr gestiegen ist. Die Lösungen wurden jeweils in FRET-Puffer angesetzt. Die Auswertung der Messung erfolgt als prozentuale Steigerung des CFP/YFP-Verhältnis und somit der cGMP-Konzentration. Als Basiswert (0%) wird der Mittelwert aus den letzten drei Messpunkten vor der Zugabe von SNP verwendet. Als Maximalwert (100%) wird der Mittelwert von drei Messpunkten der maximalen cGMP-Konzentration verwendet, also nachdem alle Reagenzien hinzugegeben wurden. In Abbildung 16 ist die Messung einer Zelle zu sehen, die mit dem cGi500-Adenovirus transduziert wurde. Insgesamt wurden acht Zellen gemessen. In Abbildung 17 ist die Messung einer Zelle zu sehen, die mit dem cGi500 Adenovirus transduziert wurde. In Abbildung 18 ist die Messung einer Zelle zu sehen, die mit dem cGi500-Adenovirus und dem SponGee Adenovirus transduziert wurde. Die einzelnen Messwerte sind dem Anhang zu entnehmen.

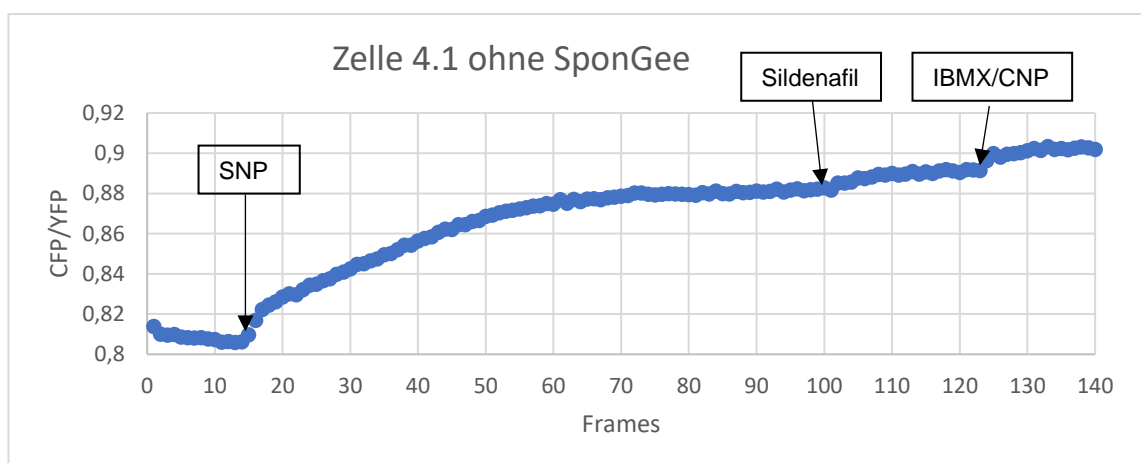


Abbildung 17: Messergebnis einer Zelle, die mit dem cGi500-Adenovirus transduziert wurde. Die X-Achse gibt die Frames an. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Die Y-Achse gibt das CFP/YFP-Verhältnis an, was der cGMP-Konzentration entspricht. Bei dieser Zelle wurde bei Frame 15 SNP, bei Frame 100 Sildenafil und bei Frame 122 IBMX und CNP hinzugegeben.

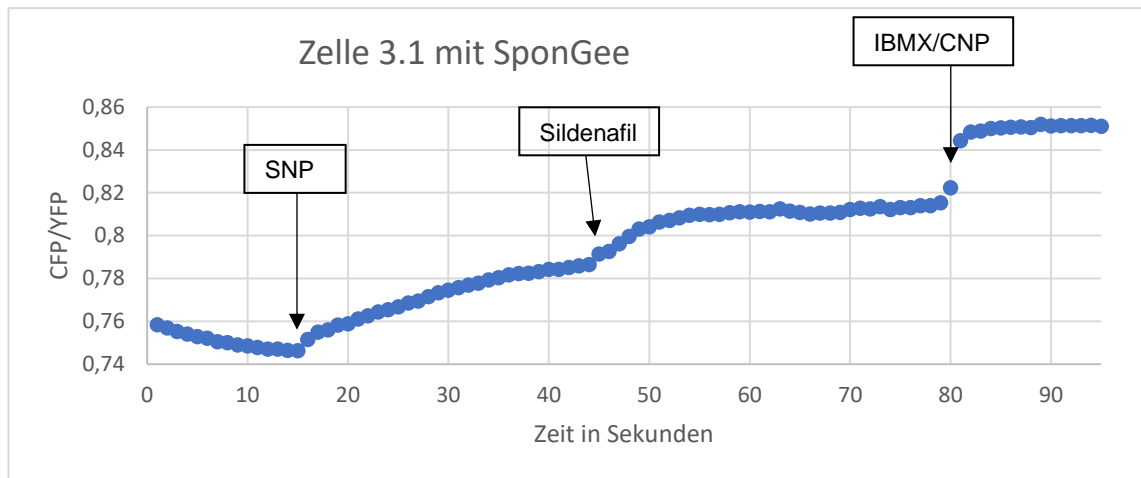


Abbildung 18: Messergebnis einer Zelle, die mit dem cGi500-Adenovirus und dem SponGee-Adenovirus transduziert wurde. Die X-Achse gibt die Frames an. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Die Y-Achse gibt das CFP/YFP-Verhältnis an, was der cGMP-Konzentration entspricht. Bei dieser Zelle wurde bei Frame 15 SNP, bei Frame 45 Sildenafil und bei Frame 80 IBMX und CNP hinzugegeben.

Die glatten Muskelzellen mit SponGee wurden mit denen ohne SponGee verglichen. Dazu wurde der Minimalwert von cGMP von dem Maximalwert bei Zugabe der jeweiligen Reagenzien abgezogen und durch den cGMP-Maximalwert, geteilt durch 100%, geteilt. Dazu wurden folgende Formeln verwendet:

$$Effekt\ SNP = \frac{(Mittelwert\ SNP_{Max} - Mittelwert\ Minimalwert)}{\frac{Mittelwert\ Maximalwert - Mittelwert\ Minimalwert}{100\%}} \quad (1)$$

$$Effekt\ SNP + Sildenafil = \frac{(Mittelwert\ Sildenafil_{Max} - Mittelwert\ Minimalwert)}{\frac{Mittelwert\ Maximalwert - Mittelwert\ Minimalwert}{100\%}} \quad (2)$$

Bei den Messungen wurden jeweils ein bis vier Zellen gleichzeitig gemessen. Die Nummerierung der Zellen setzt sich aus der Nummer der Messung und der Zahl der Zelle zusammen. Beispiel: Messung 1 mit zwei Zellen, werden die Zellen mit 1.1 und 1.2 nummeriert. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der acht gemessenen glatten Muskelzellen ohne SponGee zu sehen. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der elf gemessenen glatten Muskelzellen mit SponGee zu sehen.

Tabelle 2: Berechneter Effekt von SNP und berechneter Effekt von SNP + Sildenafil. Die glatten Muskelzellen sind mit dem cGi500-Adenovirus transduziert und exprimieren kein SponGee. Die einzelnen CFP/YFP-Ratio-Änderungen (% max) sind dem Anhang zu entnehmen.

Zelle	SNP	Sildenafil
1.1	92,50	95,88
2.1	77,18	85,38
2.2	72,19	81,78
2.3	75,08	82,43
3.1	94,36	97,06
3.2	96,56	97,16
4.1	78,65	88,15
4.2	71,10	86,08
Mittelwert	82,20	89,24
Standardabweichung	9,83	6,08

Tabelle 3: Berechneter Effekt von SNP und berechneter Effekt von SNP + Sildenafil. Die glatten Muskelzellen sind mit dem cGi500-Adenovirus und dem SponGee-Adenovirus transduziert. Die einzelnen CFP/YFP-Ratio-Änderungen (% max) sind dem Anhang zu entnehmen.

Zelle	SNP	Sildenafil
1.1	83,37	110,43
1.2	73,51	94,31
2.1	29,38	78,42
2.2	17,54	73,29
2.3	40,72	79,14
3.1	39,48	67,47
3.2	11,89	44,16
3.3	21,75	55,84
3.4	21,23	86,98
4.1	7,87	35,04
4.2	16,92	72,41
Mittelwert	33,06	72,50
Standardabweichung	23,61	20,70

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich die cGMP-Konzentration in glatten Muskelzellen mit und ohne SponGee bei Zugabe von cGMP-erhöhenden Reagenzien verhält. Dazu sollte in mehreren Schritten ein Adenovirus hergestellt werden, mit dem glatte Muskelzellen transduziert werden können, die im Anschluss SponGee exprimieren. Das ermöglicht es therapeutische Interventionen von einer akuten Hypertonie, die nicht auf cGMP-Erhöhung basieren, zu untersuchen.

6.1 Herstellung des Adenovirus pAd-SponGee

Zur Herstellung eines Adenovirusvektor mit einem SponGee-Insert wurde die Gateway® Technologie von Thermo Fisher in abgewandelter Form verwendet. Das GOI wurde durch traditionelles Klonieren auf Basis von Restriktionsenzymen in den Donor-Vektor kloniert. Im Vergleich zu dem Gateway® Verfahren hat das Klonieren auf Basis von Restriktionsenzymen eine geringere Effizienz und benötigt mehr Schritte (Liang et al., 2013). Für dieses Projekt war es ausreichend mit Restriktionsenzymen zu klonieren. Die LR-Rekombination von pDONR-SponGee und pAd hat eine hohe Effizienz und es ist davon auszugehen, dass der daraus resultierende Adenovirusvektor pAd-SponGee das richtige Insert enthält. Das wurde durch den Kontrollverdau (Abbildung 13) bestätigt. Mit dem Adenovirusvektor pAd-SponGee wurden HEK-293A-Zellen transfiziert. Die HEK-293A-Zellen sind in der Lage aus Adenovirusvektoren die Bildung von Adenoviren einzuleiten. Nach einer Inkubationszeit von zwei Wochen sind die Zellen lysiert und das Virus befindet sich im Medium. Mit diesem Überstand kann eine größere Anzahl von HEK-293A-Zellen transduziert werden und somit wird der Adenovirus amplifiziert.

Die Aufreinigung des Virus hat leider nicht funktioniert. Es ist davon auszugehen, dass die Auftrennung während der Ultrazentrifugation nicht optimal gelaufen ist. Dafür sprach auch das Fehlen einer typische Virusbande im CsCl-Gradienten. Vermutlich wurde nicht die richtige CsCl-Menge hinzugegeben. Das erklärt auch, warum die mit aufgereinigtem Virus transduzierten VSMC nicht geleuchtet haben. Glücklicherweise waren die nicht aufgereinigten 293A-Zelllysate noch vorhanden, die eine große Menge der Viruspartikel enthielten und für die Transduktion daher ausreichend waren. So konnten die geplanten FRET-Messungen dennoch erfolgreich durchgeführt werden.

6.2 Isolation und Transduktion der glatten Muskelzellen

Die Isolation von primären glatten Muskelzellen aus Maus-Aorten wurde mehrmals durchgeführt und lieferte jedes Mal positive Ergebnisse. Die Aorten wurden unmittelbar nach dem Ableben der Maus entnommen und mit den Enzymmischen aufbereitet und verdaut. Nach ca. einer Woche waren erste Zellen mit dem charakteristischen Phänotyp von glatten Muskelzellen zu sehen (siehe Abbildung 16). Nach ein bis zwei Wochen waren die Platten konfluent bewachsen. Die Isolation von primären glatten Muskelzellen hat den Vorteil, dass glatte Muskelzellen von knock-out Mäusen isoliert werden können. In dieser Arbeit wurden nur Zellen von Wildtyp-Mäusen isoliert.

Glatte Muskelzellen lassen sich nur mit geringer Effizienz mit klassischen Methoden (z.B. mit Lipofectamine 2000) transfizieren. Die Transduktion mit einem Adenovirus ist deutlich effizienter. Die meisten der mit den SponGee-Adenovirus transduzierten Zellen leuchteten, aufgrund des mRFP, unter dem Fluoreszenz Mikroskop rot. Daraus lässt sich schließen, dass die Zellen SponGee exprimiert haben.

6.3 cGMP-Messung am FRET-Mikroskop

Um zu beurteilen, ob die Transduktion der Zellen mit dem hergestellten Adenovirus erfolgreich war, wurde eine cGMP-Messung am FRET-Mikroskop durchgeführt. Es ist zu erwarten, dass die Zellen, die mit dem SponGee-Adenovirus transduziert wurden und SponGee exprimieren, weniger cGMP zur Verfügung haben als die Zellen ohne SponGee. Zum Vergleich wurden primäre glatte Muskelzellen ohne SponGee gemessen. Damit die cGMP-Konzentration unter dem FRET-Mikroskop darstellbar ist, wurden alle Zellen zudem mit dem cGi500-Adenovirus transduziert. Es wurden verschiedene cGMP-erhöhende Zusätze während der Messung hinzugegeben, sodass mehr cGMP in den Zellen verfügbar ist, als SponGee binden kann.

Bei den glatten Muskelzellen mit SponGee war nach Zugabe von SNP durchschnittlich 33,06 % der maximalen cGMP-Konzentration erreicht mit einer Standardabweichung von 23,61. Bei den glatten Muskelzellen ohne SponGee waren nach Zugabe von SNP durchschnittlich bereits 82,20 % der maximalen cGMP-Konzentration erreicht mit einer Standardabweichung von 9,83. Nach Zugabe von Sildenafil waren bei den Zellen mit SponGee 72,50% (Standardabweichung 20,70) und bei den Zellen ohne SponGee 89,24 % (Standardabweichung 6,08) der maximalen cGMP-Konzentration erreicht. Die Zellen mit SponGee haben den cGMP-Anstieg deutlich gesenkt. Die mit dem SponGee-Adenovirus transduzierten Zellen scheinen unterschiedliche SponGee-Mengen exprimiert zu haben. Das zeigte sich in der hohen Standardabweichung der Messung. Hinzu kommt, dass alle Zellen individuell auf die cGMP-erhöhenden Reagenzien reagieren. Die Zeit bis die cGMP-Konzentration nicht mehr gestiegen ist, war von Zelle zu Zelle unterschiedlich.

7. Schlussfolgerung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war es einen Adenovirusvektor, zur Modulation von cGMP in glatten Muskelzellen, herzustellen. Der Erfolg der Modulation von cGMP wurde mit dem FRET-Mikroskop untersucht.

Der Adenovirusvektor pAd-SponGee wurde durch eine Kombination von klassischer Klonierung mit Restriktionsenzymen und der Gateway® Technologie erfolgreich hergestellt. Die Gele der Kontrollverdaue wiesen die erwarteten Banden auf. Mit diesem Vektor wurden HEK-293A-Zellen transfiziert und der SponGee-Adenovirus wurde hergestellt und vervielfältigt. Für die Transduktion wurden primäre glatte Muskelzellen aus Maus-Aorten verwendet. Das Protokoll der Isolation war einfach durchzuführen und effizient.

Die cGMP-Messung am FRET-Mikroskop hat einen deutlichen Unterschied des cGMP-Anstiegs bei Zellen mit und Zellen ohne SponGee gezeigt. Es ist anzunehmen, dass das SponGee das zelluläre cGMP erfolgreich moduliert hat. Nach Zugabe der cGMP-erhöhenden Reagenzien war bei Zellen mit SponGee ein geringerer prozentualer Anteil des maximalen cGMP-Levels erreicht als bei den Zellen ohne SponGee.

Mit dem SponGee-Adenovirus ist es möglich in weiteren Versuchen den cGMP-Signalweg in glatten Muskelzellen zu umgehen und die Vasodilation in Unabhängigkeit von cGMP zu untersuchen, z.B. die direkte Oxidation der PKGI α .

8. Literaturverzeichnis

- Campbell, R., Tour, O., Palmer, A., Steinbach, P., Baird, G., Zacharias, D., Tien, R., 2002. A monomeric red fluorescent protein. *PNAS* 2002, 7877–7882. <https://www.pnas.org/content/pnas/99/12/7877.full.pdf>.
- Förster, T., 1948. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften* 33 1948, 166–175.
- Francis, S., Busch, J.L., Corbin, J.D., 2010. cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action. *Pharmacological Reviews*, 525–563.
- Hoffmann, L.S., Chen, H.H., 2014. cGMP: transition from bench to bedside: a report of the 6th International Conference on cGMP Generators, Effectors and Therapeutic Implications. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 387 (8), 707–718. doi:10.1007/s00210-014-0999-8.
- Hofmann, F., 2005. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *The Journal of biological chemistry* 280 (1), 1–4. doi:10.1074/jbc.R400035200.
- Kim, J.J., Lorenz, R., Arold, S.T., Reger, A.S., Sankaran, B., Casteel, D.E., Herberg, F.W., Kim, C., 2016. Crystal Structure of PKG I:cGMP Complex Reveals a cGMP-Mediated Dimeric Interface that Facilitates cGMP-Induced Activation. *Structure (London, England : 1993)* 24 (5), 710–720. doi:10.1016/j.str.2016.03.009.
- Liang, X., Peng, L., Baek, C.-H., Katzen, F., 2013. Single step BP/LR combined Gateway reactions. *BioTechniques* 55 (5), 265–268. doi:10.2144/000114101. https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/cloning/pdfs.par.1129.file.dat/BTN_A_000114101_O_230638a.pdf.
- Lincoln, T.M., Dey, N., Sellak, H., 2001. Invited Review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* 91, 1421–1430. <https://journals.physiology.org/doi/pdf/10.1152/jappl.2001.91.3.1421>.
- Massie, B., 1999. Adenovirus E1-complementing cell lines. <https://patentimages.storage.googleapis.com/20/e0/17/3e61ed9ebce173/US5891690.pdf>. Accessed 26 January 2021, 11 pp.
- Noack, E., Feelisch, M., 2012. Molecular mechanisms of nitrovasodilator bioactivation, in: *Endothelial mechanisms of vasomotor control. With special reference to the, Heidelberg. 1991. Steinkopff Darmstadt, [Place of publication not identified]*, pp. 37–50.
- Robert, K. (Ed.), 2012. *Endothelial mechanisms of vasomotor control: With special reference to the. Steinkopff Darmstadt, [Place of publication not identified]*, 1 online resource.
- Ros, O., Zagar, Y., Ribes, S., Baudet, S., Loulier, K., Couvet, S., Ladarre, D., Aghaie, A., Louail, A., Petit, C., Mechulam, Y., Lenkei, Z., Nicol, X., 2019. SponGee: A Genetic Tool for Subcellular and Cell-Specific cGMP Manipulation. *Cell reports* (13), 4003-4012. doi:10.1016/j.celrep.2019.05.102. [https://www.cell.com/cell-reports/pdf/S2211-1247\(19\)30741-7.pdf](https://www.cell.com/cell-reports/pdf/S2211-1247(19)30741-7.pdf).
- Russell, W.C., 2000. Update on adenovirus and its vectors. *JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY* 2000 (81).

- Ruth, P., 1999. Cyclic GMP-Dependent Protein Kinases: Understanding in Vivo Functions by Gene Targeting. *Pharmacology & Therapeutics* 82 (2-3), 355–372. doi:10.1016/S0163-7258(98)00067-9.
- Ruth, P., Pfeifer, A., Kamm, S., Klatt, P., Dostmann, W.R., Hofmann, F., 1997. Identification of the amino acid sequences responsible for high affinity activation of cGMP kinase I α . *The Journal of biological chemistry* (16), 10522–10528. doi:10.1074/jbc.272.16.10522. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S002192581840720X?token=0D7199B5D F8E5D6A1AA547AA0F33C02F397228204BC70AA6949173FED111A5354BA900E D3DDDEACBB44E63AB77ADC00AA>.
- Scotland, R.S., Ahluwalia, A., Hobbs, A.J., 2005. C-type natriuretic peptide in vascular physiology and disease.
- Stewart, P.L., Fuller, S.D., Burnett, R.M., 1993. Difference imaging of adenovirus : bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *EMBO Journal* (12), 2589–2599.
- Thunemann, M., Fomin, N., Krawutschke, C., Russwurm, M., Feil, R., 2013. Visualization of cGMP with cGi biosensors. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 89–120. doi:10.1007/978-1-62703-459-3_6. https://www.researchgate.net/profile/Martin_Thunemann/publication/236940136_Visualization_of_cGMP_with_cGi_Biosensors/links/577498be08ae4645d60a13b5/Visualization-of-cGMP-with-cGi-Biosensors.pdf?origin=publication_detail.
- WHO, 2017. Cardiovascular diseases (CVDs). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Accessed 15 January 2021.
- WHO, 2019. Hypertension. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>. Accessed 15 January 2021.
- Wolfertstetter, S., Huettner, J.P., Schlossmann, J., 2013. cGMP-Dependent Protein Kinase Inhibitors in Health and Disease. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland) 6 (2), 269–286. doi:10.3390/ph6020269.
- Zaccollo, M., 2004. Use of Chimeric Fluorescent Proteins and Fluorescence Resonance Energy Transfer to Monitor Cellular Responses. *Circulation Research* 94 2004, 866–873. <https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/01.RES.0000123825.83803.CD>.
- Zhang, J., Campbell, R.E., Ting, A.Y., Tsien, R.Y., 2002. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 2002, 906–918.

9. Eidesstattliche Erklärung.

Hiermit versichere ich, Melina Pankewytsch, an Eides statt, dass die vorliegende Bachelorarbeit mit dem Titel „Herstellung eines Adenovirusvektors für die Modulation von cGMP in glatten Muskelzellen“, selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt worden ist. Alle Inhalte, die direkt oder indirekt aus Veröffentlichungen entnommen wurden, sind als solche im Literaturverzeichnis gekennzeichnet. Dies gilt sowohl für den Textinhalt als auch für alle in dieser Arbeit dargestellten Abbildungen und Skizzen.



Ort, Datum



Unterschrift: Melina Pankewytsch

Anhang

Messergebnisse der glatten Muskelzellen ohne SponGee

Zelle 1.1:

Zugabe SNP bei Frame 10, Sildenafil bei Frame 41 und IBMX/CNP bei Frame 55

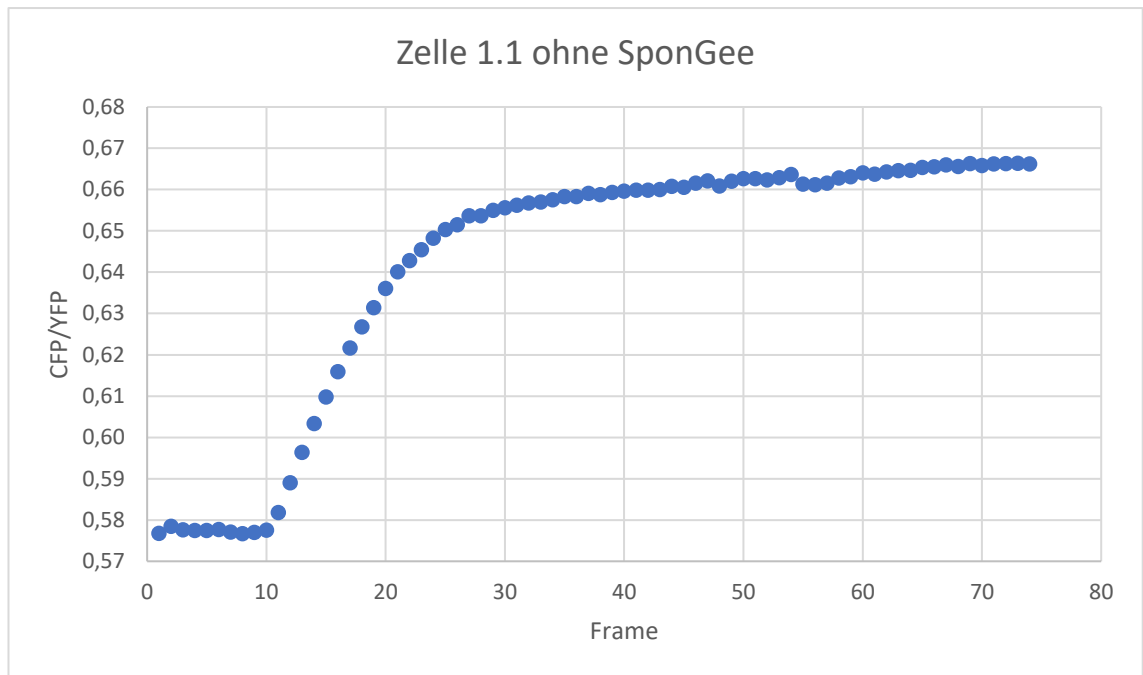


Abbildung 19: Diagramm der FRET-Messung von der Zelle 1.1 ohne SponGee. Das CFP/YFP-Verhältnis ist gegen die Frames aufgetragen. Ein Frame entspricht 5 Sekunden.

Tabelle 4: Messwerte der FRET-Messung der Zelle 1.1 ohne SponGee. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Das CFP/YFP-Verhältnis ist proportional zu der zellulären cGMP-Konzentration.

Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP
0	0.576780677	38	0.658760965
2	0.578495204	39	0.659304380
3	0.577672660	40	0.659635067
4	0.577524424	41	0.659898758
5	0.577464640	42	0.659863651
6	0.577748001	43	0.660054207
7	0.577125847	44	0.660804510
8	0.576729894	45	0.660609424
9	0.577041805	46	0.661548078
10	0.577528238	47	0.662108541
11	0.581807852	48	0.660879970
12	0.589055955	49	0.662017465
13	0.596401393	50	0.662666440
14	0.603403687	51	0.662646055
15	0.609843612	52	0.662389278
16	0.615946293	53	0.662879467
17	0.621640384	54	0.663679838
18	0.626796901	55	0.661342263
19	0.631399632	56	0.661161065
20	0.636084199	57	0.661563754
21	0.640084743	58	0.662807405
22	0.642802656	59	0.663102090
23	0.645452201	60	0.664086819
24	0.648235261	61	0.663769782
25	0.650326014	62	0.664270997
26	0.651525259	63	0.664624095
27	0.653710186	64	0.664710343
28	0.653643370	65	0.665411413
29	0.654987216	66	0.665552378
30	0.655589402	67	0.665966988
31	0.656261504	68	0.665576518
32	0.656771243	69	0.666332304
33	0.656990290	70	0.665874898
34	0.657537758	71	0.666216254
35	0.658295214	72	0.666297436
36	0.658355713	73	0.666379094
37	0.659139276	74	0.666238308

Zelle 2.1:

Zugabe SNP bei Frame 10, Sildenafil bei Frame 60 und IBMX/CNP bei Frame 70

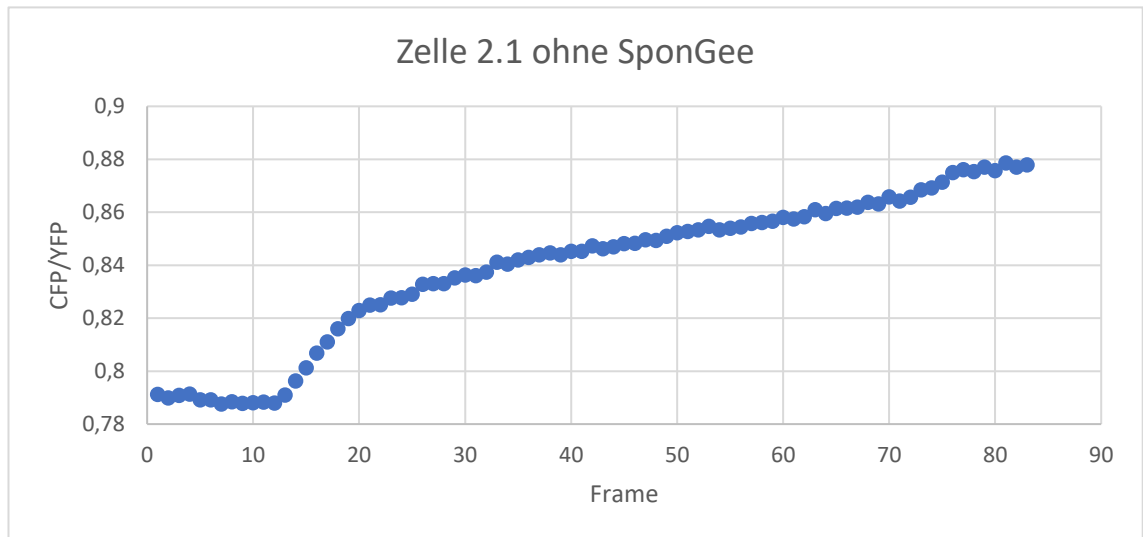


Abbildung 20: Diagramm der FRET-Messung von der Zelle 2.1 ohne SponGee. Das CFP/YFP-Verhältnis ist gegen die Frames aufgetragen. Ein Frame entspricht 5 Sekunden.

Tabelle 5: Messwerte der FRET-Messung der Zelle 2.1 ohne SponGee. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Das CFP/YFP-Verhältnis ist proportional zu der zellulären cGMP-Konzentration.

Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP
1	0.791264117	42	0.847293198	83	0.877913713
2	0.789911687	43	0.846216381		
3	0.790844083	44	0.846920133		
4	0.791337729	45	0.848156989		
5	0.789195120	46	0.848348379		
6	0.789180756	47	0.849627912		
7	0.787588060	48	0.849441350		
8	0.788483143	49	0.850998282		
9	0.787801206	50	0.852245033		
10	0.788091183	51	0.852733433		
11	0.788338184	52	0.853333533		
12	0.787944913	53	0.854663134		
13	0.791032434	54	0.853347719		
14	0.796349287	55	0.854034960		
15	0.801273286	56	0.854421914		
16	0.806835592	57	0.855846822		
17	0.811118901	58	0.856119752		
18	0.816009998	59	0.856688857		
19	0.819942176	60	0.858095884		
20	0.822967350	61	0.857523739		
21	0.825016856	62	0.858298659		
22	0.825102091	63	0.860962927		
23	0.827678263	64	0.859530032		
24	0.827707171	65	0.861461878		
25	0.829106808	66	0.861593544		
26	0.832859755	67	0.862019897		
27	0.833117604	68	0.863758922		
28	0.833036661	69	0.863233268		
29	0.835288763	70	0.865848362		
30	0.836277783	71	0.864309788		
31	0.836136222	72	0.865673244		
32	0.837437212	73	0.868470192		
33	0.841222823	74	0.869254470		
34	0.840501070	75	0.871357560		
35	0.842069805	76	0.875035584		
36	0.842988670	77	0.876106918		
37	0.843931317	78	0.875348806		
38	0.844709814	79	0.877100468		
39	0.843990028	80	0.875739276		
40	0.845311284	81	0.878613174		
41	0.845309019	82	0.877036214		

Zelle 2.2:

Zugabe SNP bei Frame 10, Sildenafil bei Frame 60 und IBMX/CNP bei Frame 70

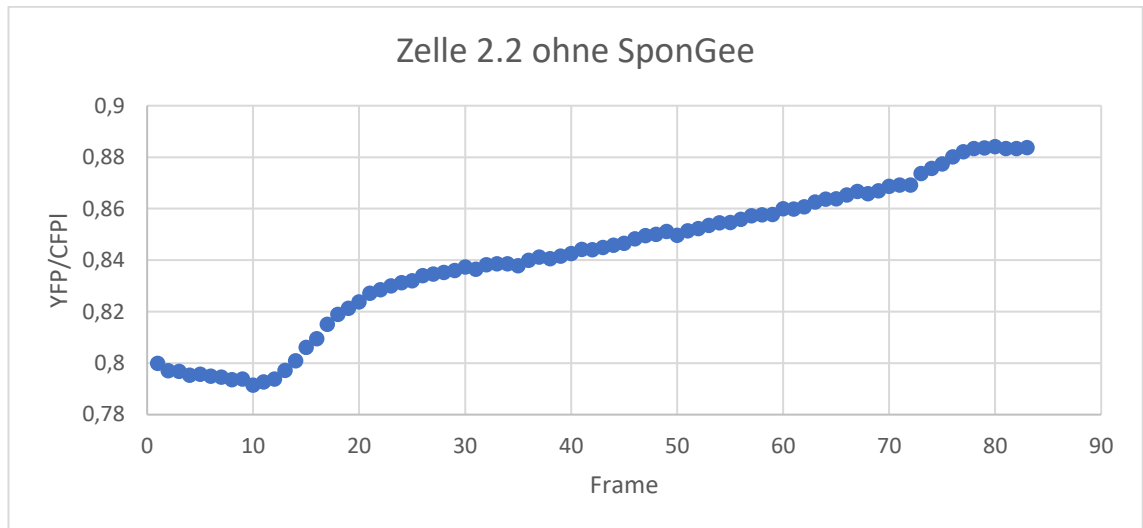


Abbildung 21: Diagramm der FRET-Messung von der Zelle 2.2 ohne SponGee. Das CFP/YFP-Verhältnis ist gegen die Frames aufgetragen. Ein Frame entspricht 5 Sekunden.

Tabelle 6: Messwerte der FRET-Messung der Zelle 2.2 ohne SponGee. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Das CFP/YFP-Verhältnis ist proportional zu der zellulären cGMP-Konzentration.

Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP
1	0,79992873	42	0,84395373	83	0,88372451
2	0,79702091	43	0,84492207		
3	0,79675746	44	0,84572780		
4	0,79528177	45	0,84654266		
5	0,79568076	46	0,84820378		
6	0,79491025	47	0,84952354		
7	0,79450911	48	0,84993464		
8	0,79346889	49	0,85113698		
9	0,79371840	50	0,84966683		
10	0,79138035	51	0,85136718		
11	0,79260683	52	0,85219753		
12	0,79372674	53	0,85347354		
13	0,79716164	54	0,85448158		
14	0,80086291	55	0,85463971		
15	0,80612773	56	0,85580337		
16	0,80946600	57	0,85719806		
17	0,81502289	58	0,85753191		
18	0,81888002	59	0,85768282		
19	0,82124263	60	0,85986811		
20	0,82376277	61	0,85977870		
21	0,82715797	62	0,86070359		
22	0,82850599	63	0,86248994		
23	0,83001125	64	0,86371058		
24	0,83125711	65	0,86376572		
25	0,83197808	66	0,86524463		
26	0,83392781	67	0,86667746		
27	0,83453596	68	0,86573976		
28	0,83518070	69	0,86688924		
29	0,83590388	70	0,86857396		
30	0,83730203	71	0,86912847		
31	0,83641779	72	0,86910266		
32	0,83821982	73	0,87361527		
33	0,83853298	74	0,87559229		
34	0,83850771	75	0,87739092		
35	0,83778024	76	0,88009530		
36	0,83991462	77	0,88209724		
37	0,84118938	78	0,88328469		
38	0,84050775	79	0,88350642		
39	0,84154904	80	0,88401467		
40	0,84255332	81	0,88335341		
41	0,84415472	82	0,88329357		

Zelle 2.3:

Zugabe SNP bei Frame 10, Sildenafil bei Frame 60 und IBMX/CNP bei Frame 70

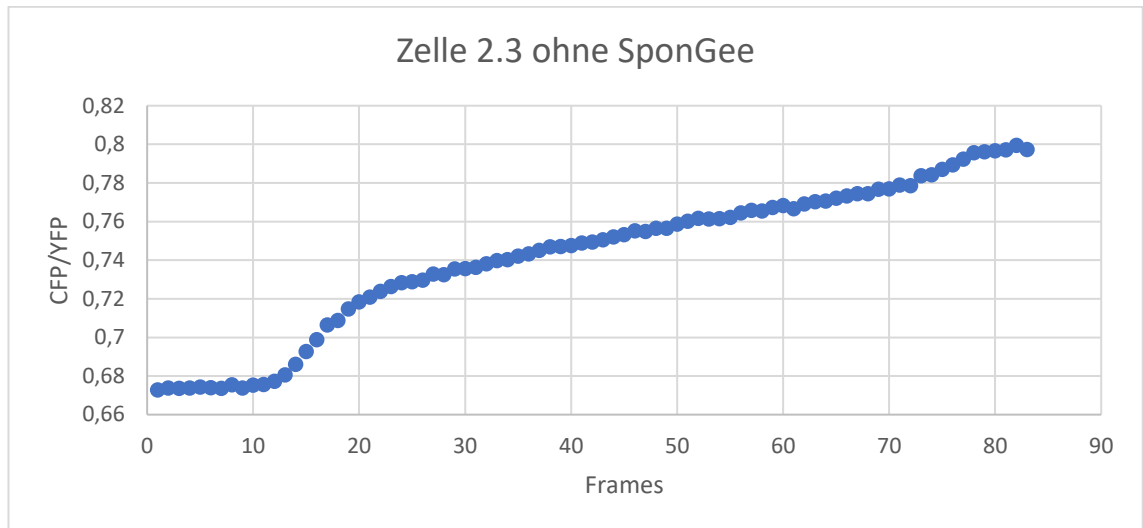


Abbildung 22: Diagramm der FRET-Messung von der Zelle 2.3 ohne SponGee. Das CFP/YFP-Verhältnis ist gegen die Frames aufgetragen. Ein Frame entspricht 5 Sekunden.

Tabelle 7: Messwerte der FRET-Messung der Zelle 2.3 ohne SponGee. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Das CFP/YFP-Verhältnis ist proportional zu der zellulären cGMP-Konzentration.

Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP
1	0,67268091	42	0,74928075	83	0,79719204
2	0,67371494	43	0,75053173		
3	0,67358947	44	0,75198674		
4	0,67365861	45	0,75308645		
5	0,67428923	46	0,75510919		
6	0,67394221	47	0,75481343		
7	0,67362326	48	0,75653577		
8	0,67544556	49	0,75647408		
9	0,67375964	50	0,75858492		
10	0,67520648	51	0,76004791		
11	0,67552215	52	0,76154202		
12	0,67725176	53	0,76132667		
13	0,68052906	54	0,76145554		
14	0,68598670	55	0,76212901		
15	0,69261324	56	0,76437694		
16	0,69875926	57	0,76571333		
17	0,70637792	58	0,76536506		
18	0,70874262	59	0,76721996		
19	0,71475101	60	0,76828295		
20	0,71833849	61	0,76660442		
21	0,72077036	62	0,76904637		
22	0,72372693	63	0,77028817		
23	0,72626150	64	0,77049524		
24	0,72821343	65	0,77206785		
25	0,72879767	66	0,77324271		
26	0,72954142	67	0,77442020		
27	0,73275173	68	0,77438903		
28	0,73238492	69	0,77676475		
29	0,73537898	70	0,77676958		
30	0,73563194	71	0,77876097		
31	0,73625356	72	0,77851558		
32	0,73799431	73	0,78358787		
33	0,73976332	74	0,78415030		
34	0,74027753	75	0,78688824		
35	0,74206680	76	0,78927738		
36	0,74323243	77	0,79220545		
37	0,74500775	78	0,79551613		
38	0,74688739	79	0,79601204		
39	0,74693829	80	0,79649597		
40	0,74757892	81	0,79701364		
41	0,74875277	82	0,79946989		

Zelle 3.1:

Zugabe SNP bei Frame 10, Sildenafil bei Frame 30 und IBMX/CNP bei Frame 48

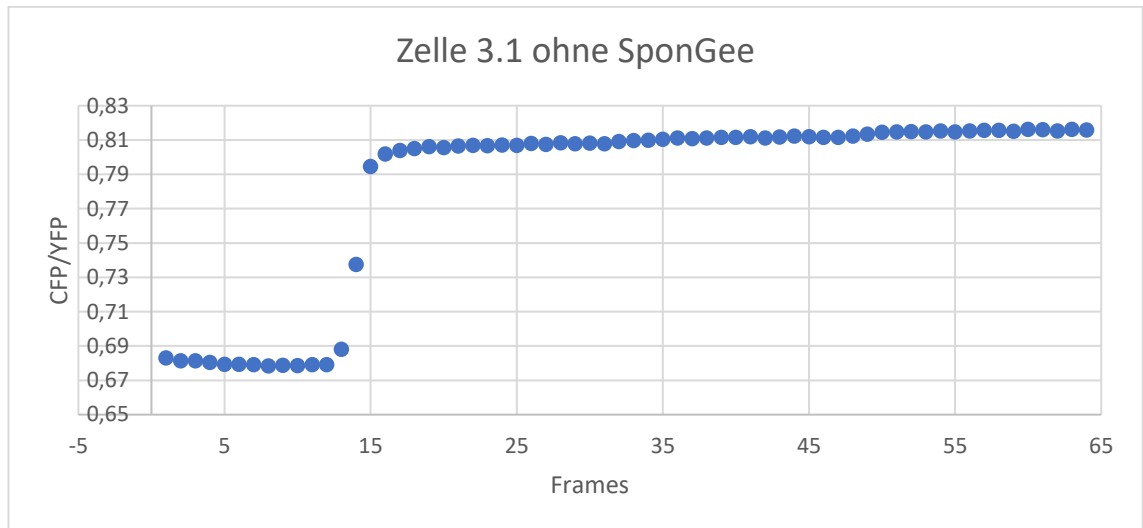


Abbildung 23: Diagramm der FRET-Messung von der Zelle 3.1 ohne SponGee. Das CFP/YFP-Verhältnis ist gegen die Frames aufgetragen. Ein Frame entspricht 5 Sekunden.

Tabelle 8: Messwerte der FRET-Messung der Zelle 3.1 ohne SponGee. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Das CFP/YFP-Verhältnis ist proportional zu der zellulären cGMP-Konzentration.

Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP
1	0,68299216	33	0,80956537
2	0,68130153	34	0,80972976
3	0,68126392	35	0,81034923
4	0,68032152	36	0,81102359
5	0,67919534	37	0,81080586
6	0,67927557	38	0,81111628
7	0,67902207	39	0,81148827
8	0,67837465	40	0,81143725
9	0,67865282	41	0,81179833
10	0,67858392	42	0,81108743
11	0,67910898	43	0,81175739
12	0,67912495	44	0,81232190
13	0,68804932	45	0,81194168
14	0,73743033	46	0,81156409
15	0,79447168	47	0,81141275
16	0,80178899	48	0,81218743
17	0,80380362	49	0,81325877
18	0,80487502	50	0,81444842
19	0,80607170	51	0,81460291
20	0,80555713	52	0,81481516
21	0,80647826	53	0,81458157
22	0,80689001	54	0,81516939
23	0,80661500	55	0,81456786
24	0,80701333	56	0,81516355
25	0,80687463	57	0,81555790
26	0,80785006	58	0,81565970
27	0,80737948	59	0,81511271
28	0,80832881	60	0,81613112
29	0,80766356	61	0,81595963
30	0,80807710	62	0,81528300
31	0,80779529	63	0,81614739
32	0,80910230	64	0,81583893

Zelle 3.2:

Zugabe SNP bei Frame 10, Sildenafil bei Frame 30 und IBMX/CNP bei Frame 48

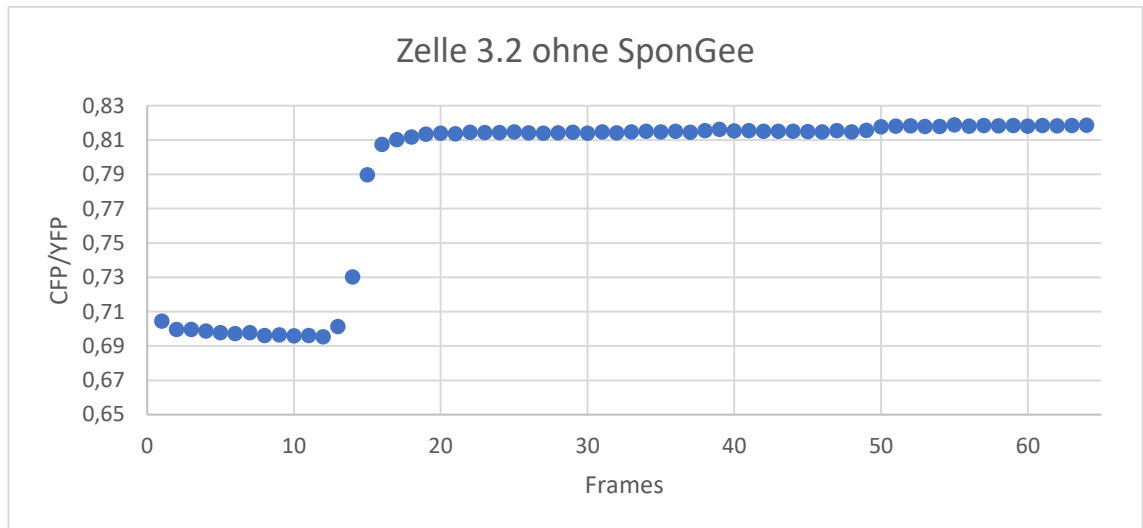


Abbildung 24: Diagramm der FRET-Messung von der Zelle 3.2 ohne SponGee. Das CFP/YFP-Verhältnis ist gegen die Frames aufgetragen. Ein Frame entspricht 5 Sekunden.

Tabelle 9: Messwerte der FRET-Messung der Zelle 3.2 ohne SponGee. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Das CFP/YFP-Verhältnis ist proportional zu der zellulären cGMP-Konzentration.

Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP
1	0,70434332	33	0,81467372
2	0,69957185	34	0,81508124
3	0,69949645	35	0,81457132
4	0,69870526	36	0,81506354
5	0,69768077	37	0,81447148
6	0,69720841	38	0,81532037
7	0,69768995	39	0,81605554
8	0,69600457	40	0,81512892
9	0,69635284	41	0,81548321
10	0,69588018	42	0,81504387
11	0,69611383	43	0,81510389
12	0,69521928	44	0,81507283
13	0,70127398	45	0,81491160
14	0,73018605	46	0,81458855
15	0,78967792	47	0,81546557
16	0,80741227	48	0,81471163
17	0,81013274	49	0,81563479
18	0,81175208	50	0,81762743
19	0,81335276	51	0,81804198
20	0,81393719	52	0,81814194
21	0,81362492	53	0,81776363
22	0,81441188	54	0,81788355
23	0,81432843	55	0,81883144
24	0,81423467	56	0,81796819
25	0,81470394	57	0,81830847
26	0,81409156	58	0,81823099
27	0,81393164	59	0,81831676
28	0,81410456	60	0,81801766
29	0,81452757	61	0,81833983
30	0,81393361	62	0,81825167
31	0,81461370	63	0,81845665
32	0,81402749	64	0,81848693

Zelle 4.1:

Zugabe SNP bei Frame 15, Sildenafil bei Frame 100 und IBMX/CNP bei Frame 122

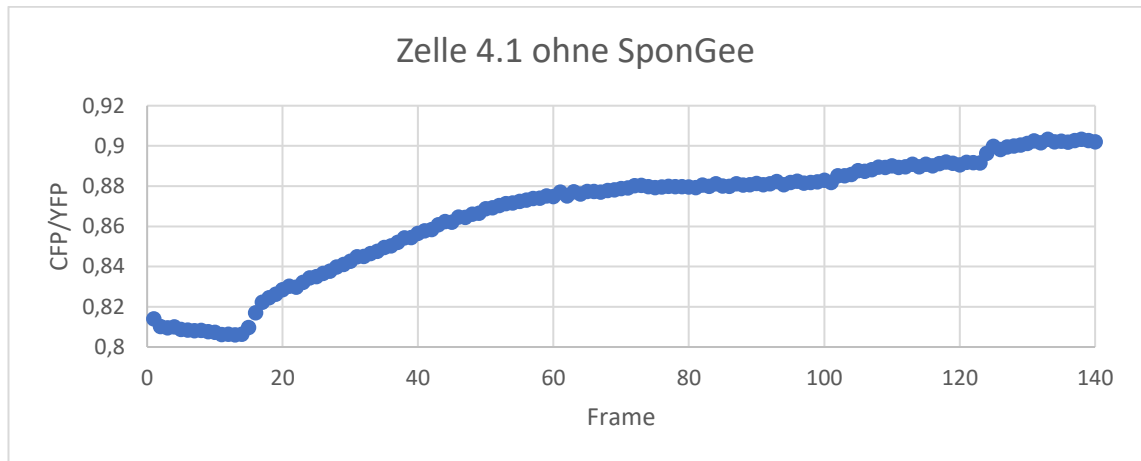


Abbildung 25: Diagramm der FRET-Messung von der Zelle 4.1 ohne SponGee. Das CFP/YFP-Verhältnis ist gegen die Frames aufgetragen. Ein Frame entspricht 5 Sekunden.

Tabelle 10: Messwerte der FRET-Messung der Zelle 4.1 ohne SponGee. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Das CFP/YFP-Verhältnis ist proportional zu der zellulären cGMP Konzentration.

Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP
1	0,8138938	42	0,85838586	83	0,87978822	124	0,89625919
2	0,81009507	43	0,86066854	84	0,88117385	125	0,89978039
3	0,80954117	44	0,86233592	85	0,87992626	126	0,89807743
4	0,80996352	45	0,86206895	86	0,87982291	127	0,89947081
5	0,80868417	46	0,86452621	87	0,88103914	128	0,89984930
6	0,80834049	47	0,86443776	88	0,88040823	129	0,90032166
7	0,80808377	48	0,86605728	89	0,88062531	130	0,90121049
8	0,80823588	49	0,86649215	90	0,88122147	131	0,90237361
9	0,80763364	50	0,86862600	91	0,88071150	132	0,90146601
10	0,80732501	51	0,86920387	92	0,88106835	133	0,90326625
11	0,80611527	52	0,87036729	93	0,88220775	134	0,90195537
12	0,80633926	53	0,87125230	94	0,88069910	135	0,90233201
13	0,80591697	54	0,87163806	95	0,88167369	136	0,90175557
14	0,80626696	55	0,87229312	96	0,88236076	137	0,90255904
15	0,80970657	56	0,87293762	97	0,88139081	138	0,90322065
16	0,81688398	57	0,87373060	98	0,88180298	139	0,90263981
17	0,82226640	58	0,87393200	99	0,88210779	140	0,90197653
18	0,82450670	59	0,87506086	100	0,88286394		
19	0,82620138	60	0,87471199	101	0,88167822		
20	0,82844645	61	0,87693811	102	0,88512754		
21	0,83010680	62	0,87512404	103	0,88514572		
22	0,82968295	63	0,87709832	104	0,88569987		
23	0,83213133	64	0,87599480	105	0,88768935		
24	0,83434075	65	0,87730444	106	0,88738936		
25	0,83489102	66	0,87731075	107	0,88816547		
26	0,83660692	67	0,87698007	108	0,88940740		
27	0,83760142	68	0,87778932	109	0,88920552		
28	0,83978730	69	0,87815732	110	0,89003533		
29	0,84096783	70	0,87865150	111	0,88917673		
30	0,84255242	71	0,87901354	112	0,88957405		
31	0,84478092	72	0,88020551	113	0,89087838		
32	0,84499472	73	0,88027620	114	0,88957602		
33	0,84648126	74	0,87969220	115	0,89078808		
34	0,84748161	75	0,87926513	116	0,88997215		
35	0,84948480	76	0,87956029	117	0,89117914		
36	0,85015160	77	0,87989682	118	0,89191580		
37	0,85204703	78	0,87974101	119	0,89131439		
38	0,85424018	79	0,87965125	120	0,89048928		
39	0,85431993	80	0,87950969	121	0,89182484		
40	0,85642266	81	0,87918532	122	0,89163768		
41	0,85768986	82	0,88043881	123	0,89146489		

Zelle 4.2:

Zugabe SNP bei Frame 15, Sildenafil bei Frame 100 und IBMX/CNP bei Frame 122

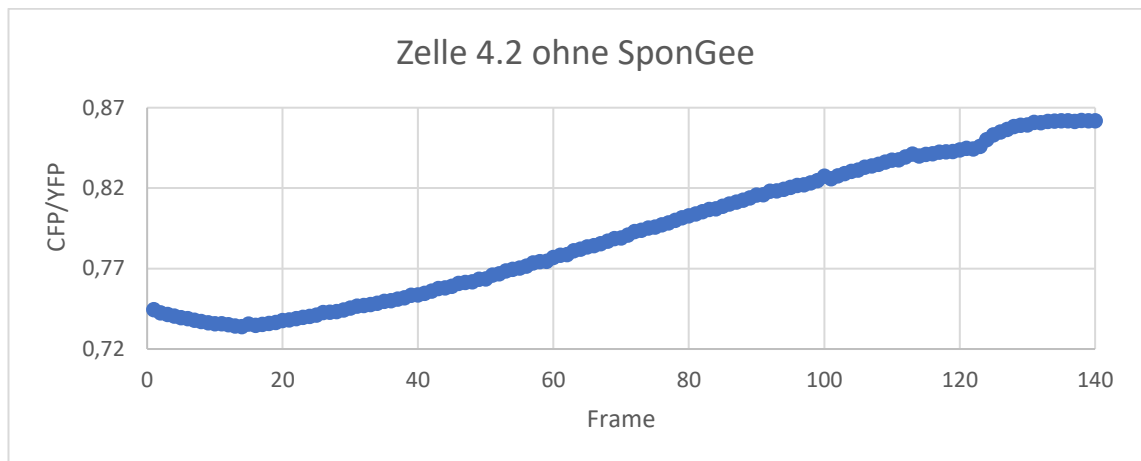


Abbildung 26: Diagramm der FRET-Messung von der Zelle 4.2 ohne SponGee. Das CFP/YFP-Verhältnis ist gegen die Frames aufgetragen. Ein Frame entspricht 5 Sekunden.

Tabelle 11: Messwerte der FRET-Messung der Zelle 4.2 ohne SponGee. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Das CFP/YFP-Verhältnis ist proportional zu der zellulären cGMP-Konzentration.

Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP
1	0,74440360	42	0,75606591	83	0,80669862	124	0,85012698
2	0,74250680	43	0,75769472	84	0,80719376	125	0,85314804
3	0,74148226	44	0,75793940	85	0,80870497	126	0,85486013
4	0,74056751	45	0,75906205	86	0,81010133	127	0,85645610
5	0,73944694	46	0,76069146	87	0,81141919	128	0,85821968
6	0,73879612	47	0,76130468	88	0,81260359	129	0,85902840
7	0,73793846	48	0,76172632	89	0,81389308	130	0,85920852
8	0,73703134	49	0,76332891	90	0,81564057	131	0,86089122
9	0,73626447	50	0,76362264	91	0,81584960	132	0,86067253
10	0,73576760	51	0,76590061	92	0,81807309	133	0,86157268
11	0,73562074	52	0,76681548	93	0,81836903	134	0,86160511
12	0,73501915	53	0,76846117	94	0,81929588	135	0,86177558
13	0,73422170	54	0,76950508	95	0,82046115	136	0,86189920
14	0,73391259	55	0,77031398	96	0,82174015	137	0,86143607
15	0,73553270	56	0,77145410	97	0,82212710	138	0,86216039
16	0,73481399	57	0,77353889	98	0,82327318	139	0,86196494
17	0,73524225	58	0,77440542	99	0,82468778	140	0,86186165
18	0,73585892	59	0,77456516	100	0,82751715		
19	0,73655266	60	0,77682829	101	0,82577497		
20	0,73772216	61	0,77829629	102	0,82758147		
21	0,73817581	62	0,77861810	103	0,82909554		
22	0,73897678	63	0,78103346	104	0,83039033		
23	0,73963594	64	0,78214657	105	0,83122712		
24	0,74037612	65	0,78355849	106	0,83307231		
25	0,74099869	66	0,78421271	107	0,83388090		
26	0,74266851	67	0,78537965	108	0,83488917		
27	0,74288172	68	0,78708041	109	0,83611131		
28	0,74334443	69	0,78863239	110	0,83735788		
29	0,74430728	70	0,78904265	111	0,83763057		
30	0,74551809	71	0,79075354	112	0,83932418		
31	0,74668831	72	0,79294896	113	0,84113425		
32	0,74704713	73	0,79375798	114	0,83993703		
33	0,74762535	74	0,79514539	115	0,84097755		
34	0,74852026	75	0,79575527	116	0,84129584		
35	0,74961489	76	0,79722947	117	0,84240586		
36	0,74998170	77	0,79839158	118	0,84258091		
37	0,75105530	78	0,79995745	119	0,84284389		
38	0,75191838	79	0,80147964	120	0,84375191		
39	0,75347513	80	0,80285287	121	0,84467435		
40	0,75363660	81	0,80399257	122	0,84435290		
41	0,75465453	82	0,80526120	123	0,84591508		

Messergebnisse der glatten Muskelzellen mit SponGee

Zelle 1.1:

Zugabe SNP bei Frame 10, Sildenafil bei Frame 41 und IBMX/CNP bei Frame 55

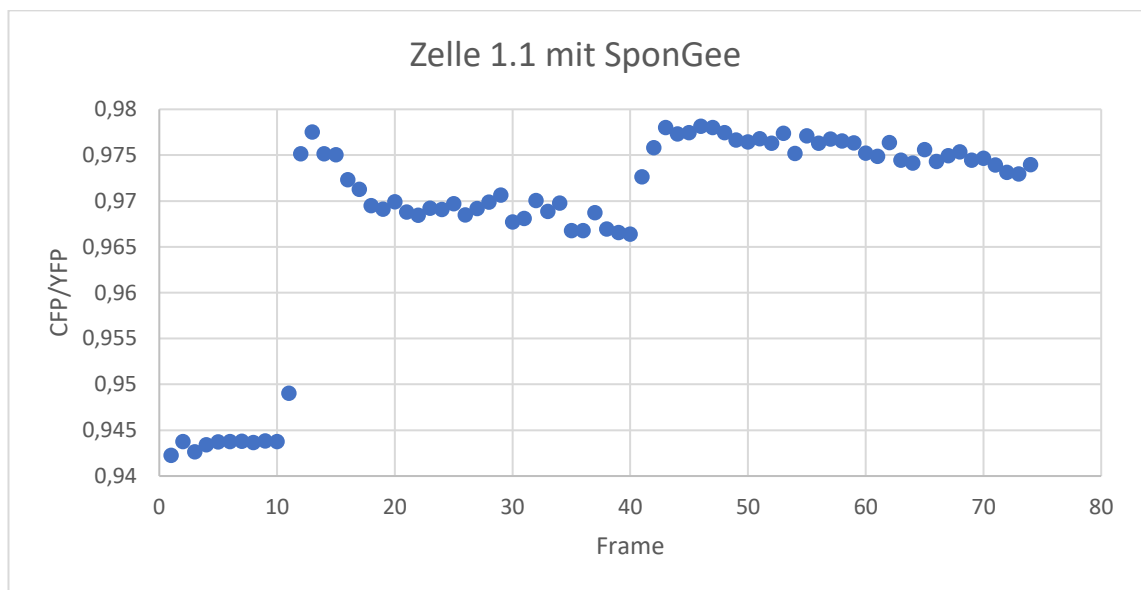


Abbildung 27: Diagramm der FRET-Messung von der Zelle 1.1 mit SponGee. Das CFP/YFP-Verhältnis ist gegen die Frames aufgetragen. Ein Frame entspricht 5 Sekunden.

Tabelle 22: Messwerte der FRET-Messung der Zelle 1.1 mit SponGee. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Das CFP/YFP-Verhältnis ist proportional zu der zellulären cGMP-Konzentration.

Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP
1	0,94226861	38	0,96694589
2	0,94374567	39	0,96655554
3	0,94263822	40	0,96637815
4	0,94342750	41	0,97265309
5	0,94371706	42	0,97582698
6	0,94377720	43	0,97800487
7	0,94380504	44	0,97730774
8	0,94364876	45	0,97746211
9	0,94383395	46	0,97815841
10	0,94376934	47	0,97802514
11	0,94902593	48	0,97746944
12	0,97514874	49	0,97664446
13	0,97752959	50	0,97645646
14	0,97515035	51	0,97678751
15	0,97504127	52	0,97632337
16	0,97234052	53	0,97739208
17	0,97126490	54	0,97519910
18	0,96950942	55	0,97712016
19	0,96909666	56	0,97631365
20	0,96990418	57	0,97677004
21	0,96878755	58	0,97656065
22	0,96845460	59	0,97633255
23	0,96920377	60	0,97523785
24	0,96908784	61	0,97486138
25	0,96970493	62	0,97636074
26	0,96848983	63	0,97445446
27	0,96917081	64	0,97415805
28	0,96987563	65	0,97560161
29	0,97066438	66	0,97431636
30	0,96771771	67	0,97494221
31	0,96811014	68	0,97535986
32	0,97006792	69	0,97446656
33	0,96886182	70	0,97465456
34	0,96978957	71	0,97392803
35	0,96678537	72	0,97313029
36	0,96675926	73	0,97296315
37	0,96872652	74	0,97397661

Zelle 1.2:

Zugabe SNP bei Frame 10, Sildenafil bei Frame 41 und IBMX/CNP bei Frame 55

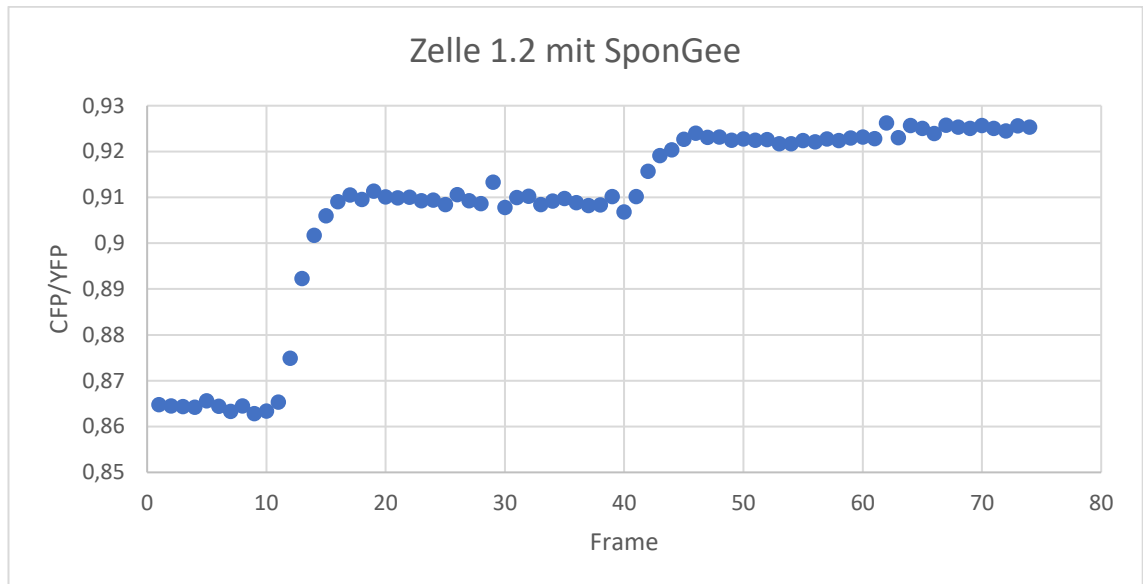


Abbildung 28: Diagramm der FRET-Messung von der Zelle 1.2 mit SponGee. Das CFP/YFP-Verhältnis ist gegen die Frames aufgetragen. Ein Frame entspricht 5 Sekunden.

Tabelle 33: Messwerte der FRET-Messung der Zelle 1.2 mit SponGee. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Das CFP/YFP-Verhältnis ist proportional zu der zellulären cGMP-Konzentration

Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP
1	0,86474550	38	0,90832710
2	0,86447227	39	0,91013378
3	0,86434376	40	0,90680867
4	0,86415798	41	0,91016626
5	0,86559171	42	0,91566306
6	0,86443389	43	0,91907680
7	0,86329210	44	0,92030990
8	0,86443901	45	0,92265797
9	0,86276484	46	0,92397267
10	0,86333841	47	0,92304802
11	0,86533231	48	0,92312783
12	0,87484503	49	0,92246223
13	0,89224666	50	0,92272097
14	0,90166640	51	0,92243677
15	0,90592676	52	0,92257434
16	0,90905881	53	0,92168492
17	0,91047996	54	0,92165512
18	0,90950537	55	0,92239618
19	0,91130453	56	0,92210919
20	0,91006953	57	0,92270494
21	0,90988135	58	0,92234063
22	0,91002601	59	0,92295224
23	0,90925986	60	0,92317075
24	0,90934730	61	0,92278552
25	0,90841782	62	0,92619145
26	0,91058350	63	0,92299163
27	0,90924603	64	0,92561817
28	0,90857643	65	0,92504275
29	0,91326469	66	0,92392021
30	0,90775043	67	0,92570078
31	0,90990239	68	0,92527598
32	0,91021258	69	0,92501921
33	0,90839523	70	0,92564726
34	0,90914029	71	0,92501015
35	0,90971732	72	0,92447513
36	0,90882891	73	0,92557532
37	0,90821463	74	0,92529810

Zelle 2.1:

Zugabe SNP bei Frame 10, Sildenafil bei Frame 60 und IBMX/CNP bei Frame 100

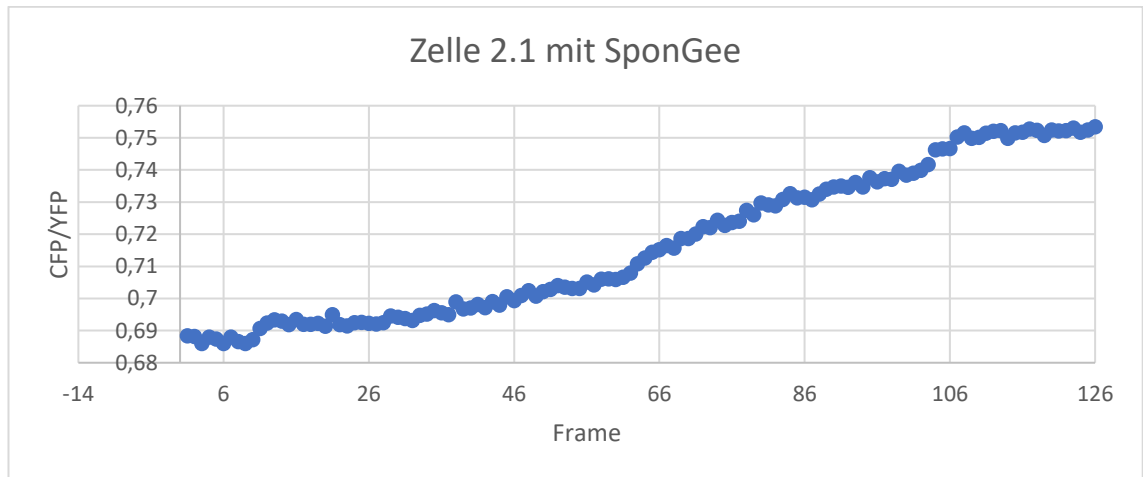


Abbildung 29: Diagramm der FRET-Messung von der Zelle 2.1 mit SponGee. Das CFP/YFP-Verhältnis ist gegen die Frames aufgetragen. Ein Frame entspricht 5 Sekunden.

Tabelle 14: Messwerte der FRET-Messung der Zelle 2.1 mit SponGee. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Das CFP/YFP-Verhältnis ist proportional zu der zellulären cGMP-Konzentration

Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP
1	0,68832982	42	0,69714230	83	0,73077911	124	0,75168222
2	0,68812096	43	0,69900703	84	0,73254103	125	0,75240475
3	0,68590343	44	0,69792342	85	0,73130745	126	0,75335091
4	0,68796092	45	0,70046771	86	0,73148894		
5	0,68730921	46	0,69928831	87	0,73066336		
6	0,68598580	47	0,70088005	88	0,73252052		
7	0,68791068	48	0,70238215	89	0,73393828		
8	0,68651152	49	0,70065278	90	0,73467088		
9	0,68594980	50	0,70208442	91	0,73494941		
10	0,68711501	51	0,70273590	92	0,73455137		
11	0,69058663	52	0,70399857	93	0,73605490		
12	0,69236445	53	0,70346344	94	0,73468930		
13	0,69330239	54	0,70313084	95	0,73755741		
14	0,69289100	55	0,70306003	96	0,73630470		
15	0,69186592	56	0,70504135	97	0,73724634		
16	0,69337165	57	0,70416915	98	0,73710161		
17	0,69195151	58	0,70593399	99	0,73956937		
18	0,69193059	59	0,70605618	100	0,73837817		
19	0,69225168	60	0,70584023	101	0,73894954		
20	0,69129932	61	0,70653456	102	0,73987210		
21	0,69490373	62	0,70789677	103	0,74163836		
22	0,69178838	63	0,71075743	104	0,74622095		
23	0,69140619	64	0,71250713	105	0,74651152		
24	0,69241780	65	0,71438569	106	0,74660325		
25	0,69249499	66	0,71510029	107	0,75023013		
26	0,69224173	67	0,71642143	108	0,75150639		
27	0,69201428	68	0,71561182	109	0,74978471		
28	0,69242674	69	0,71860653	110	0,75008315		
29	0,69454956	70	0,71865696	111	0,75138784		
30	0,69411469	71	0,71998560	112	0,75197667		
31	0,69374955	72	0,72230184	113	0,75217730		
32	0,69313937	73	0,72203881	114	0,74982226		
33	0,69473326	74	0,72431696	115	0,75152290		
34	0,69506562	75	0,72267747	116	0,75166214		
35	0,69617790	76	0,72360414	117	0,75265938		
36	0,69554150	77	0,72400320	118	0,75233603		
37	0,69490343	78	0,72736061	119	0,75070876		
38	0,69887477	79	0,72603816	120	0,75242871		
39	0,69674975	80	0,72964996	121	0,75213665		
40	0,69704789	81	0,72911781	122	0,75216132		
41	0,69805610	82	0,72881621	123	0,75299323		

Zelle 2.2:

Zugabe SNP bei Frame 10, Sildenafil bei Frame 60 und IBMX/CNP bei Frame 100

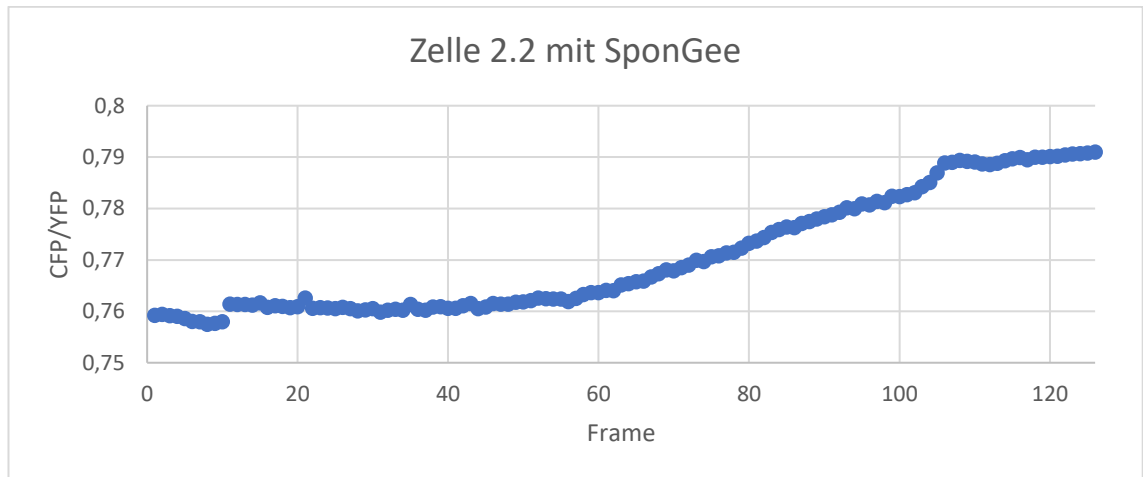


Abbildung 30: Diagramm der FRET-Messung von der Zelle 2.2 mit SponGee. Das CFP/YFP-Verhältnis ist gegen die Frames aufgetragen. Ein Frame entspricht 5 Sekunden.

Tabelle 15: Messwerte der FRET-Messung der Zelle 2.1 mit SponGee. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Das CFP/YFP-Verhältnis ist proportional zu der zellulären cGMP-Konzentration.

Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP
1	0,75920481	42	0,76105076	83	0,77534699	124	0,79064643
2	0,75937671	43	0,76151830	84	0,77591217	125	0,79079664
3	0,75915438	44	0,76050603	85	0,77640146	126	0,79097116
4	0,75902665	45	0,76079220	86	0,77622813		
5	0,75857836	46	0,76148832	87	0,77705765		
6	0,75802755	47	0,76139551	88	0,77743274		
7	0,75798148	48	0,76140291	89	0,77795303		
8	0,75747883	49	0,76172650	90	0,77837575		
9	0,75761426	50	0,76182073	91	0,77876604		
10	0,75794202	51	0,76206058	92	0,77926445		
11	0,76137734	52	0,76255304	93	0,78012395		
12	0,76132596	53	0,76241118	94	0,77995974		
13	0,76133221	54	0,76235509	95	0,78089333		
14	0,76117998	55	0,76237977	96	0,78068739		
15	0,76159728	56	0,76189321	97	0,78133732		
16	0,76075178	57	0,76252711	98	0,78111380		
17	0,76107371	58	0,76322806	99	0,78236008		
18	0,76093829	59	0,76359177	100	0,78226906		
19	0,76070279	60	0,76361263	101	0,78264630		
20	0,76084948	61	0,76408082	102	0,78305012		
21	0,76255709	62	0,76400423	103	0,78420776		
22	0,76058841	63	0,76508892	104	0,78501606		
23	0,76067257	64	0,76534271	105	0,78693134		
24	0,76060021	65	0,76572645	106	0,78885359		
25	0,76049352	66	0,76583898	107	0,78898829		
26	0,76074982	67	0,76664209	108	0,78933376		
27	0,76051921	68	0,76729840	109	0,78917944		
28	0,76004803	69	0,76801723	110	0,78902358		
29	0,76026362	70	0,76787806	111	0,78863907		
30	0,76049101	71	0,76848340	112	0,78852922		
31	0,75980860	72	0,76896936	113	0,78877217		
32	0,76017821	73	0,76991481	114	0,78925067		
33	0,76037639	74	0,76968098	115	0,78965718		
34	0,76018071	75	0,77056664	116	0,78986865		
35	0,76132876	76	0,77079719	117	0,78945744		
36	0,76038635	77	0,77130991	118	0,78993350		
37	0,76021481	78	0,77149296	119	0,78994018		
38	0,76080871	79	0,77226251	120	0,79009515		
39	0,76088411	80	0,77323526	121	0,79015845		
40	0,76055151	81	0,77365273	122	0,79037225		
41	0,76059318	82	0,77432329	123	0,79057980		

Zelle 2.3:

Zugabe SNP bei Frame 10, Sildenafil bei Frame 60 und IBMX/CNP bei Frame 100

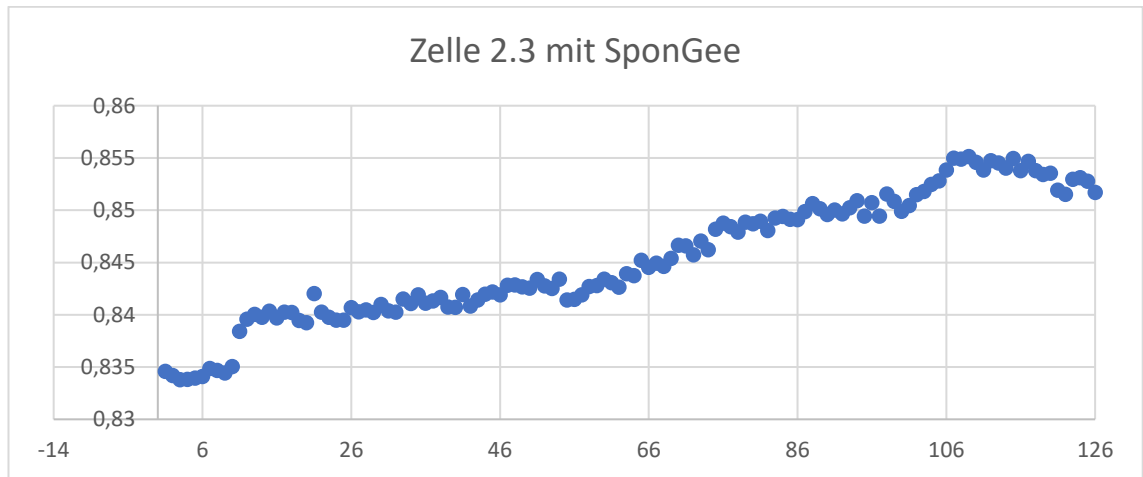


Abbildung 31: Diagramm der FRET-Messung von der Zelle 2.3 mit SponGee. Das CFP/YFP-Verhältnis ist gegen die Frames aufgetragen. Ein Frame entspricht 5 Sekunden.

Tabelle 16: Messwerte der FRET-Messung der Zelle 2.3 mit SponGee. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Das CFP/YFP-Verhältnis ist proportional zu der zellulären cGMP-Konzentration.

Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP
1	0,83456498	42	0,84081906	83	0,84925336	124	0,85310864
2	0,83418822	43	0,84141207	84	0,84940988	125	0,85275579
3	0,83377069	44	0,84194458	85	0,84912747	126	0,85168558
4	0,83379680	45	0,84218442	86	0,84909320		
5	0,83392578	46	0,84190798	87	0,84984738		
6	0,83409357	47	0,84281242	88	0,85061961		
7	0,83486217	48	0,84285414	89	0,85012847		
8	0,83465236	49	0,84266937	90	0,84958357		
9	0,83441556	50	0,84253925	91	0,85000962		
10	0,83502549	51	0,84336424	92	0,84962696		
11	0,83839947	52	0,84275329	93	0,85021502		
12	0,83957648	53	0,84250277	94	0,85089892		
13	0,84001684	54	0,84339875	95	0,84942263		
14	0,83974624	55	0,84141618	96	0,85072833		
15	0,84033454	56	0,84147883	97	0,84942061		
16	0,83969820	57	0,84190005	98	0,85154635		
17	0,84025472	58	0,84269607	99	0,85084069		
18	0,84020990	59	0,84278685	100	0,84988767		
19	0,83943325	60	0,84339893	101	0,85044384		
20	0,83923417	61	0,84305346	102	0,85148162		
21	0,84201753	62	0,84262073	103	0,85178083		
22	0,84025234	63	0,84391600	104	0,85245419		
23	0,83975720	64	0,84373546	105	0,85279119		
24	0,83946401	65	0,84519839	106	0,85384393		
25	0,83946031	66	0,84451938	107	0,85498416		
26	0,84065378	67	0,84493595	108	0,85487020		
27	0,84027934	68	0,84460479	109	0,85511887		
28	0,84044284	69	0,84539783	110	0,85455763		
29	0,84021604	70	0,84663773	111	0,85382295		
30	0,84097791	71	0,84656930	112	0,85472053		
31	0,84036976	72	0,84572482	113	0,85450703		
32	0,84023136	73	0,84704560	114	0,85402876		
33	0,84151000	74	0,84619719	115	0,85493136		
34	0,84108067	75	0,84816259	116	0,85378110		
35	0,84188604	76	0,84875006	117	0,85465014		
36	0,84111154	77	0,84840405	118	0,85378796		
37	0,84130311	78	0,84789252	119	0,85340053		
38	0,84166426	79	0,84885043	120	0,85353482		
39	0,84073830	80	0,84868008	121	0,85191125		
40	0,84070689	81	0,84894919	122	0,85151255		
41	0,84192818	82	0,84803885	123	0,85295647		

Zelle 3.1:

Zugabe SNP bei Frame 15, Sildenafil bei Frame 45 und IBMX/CNP bei Frame 80

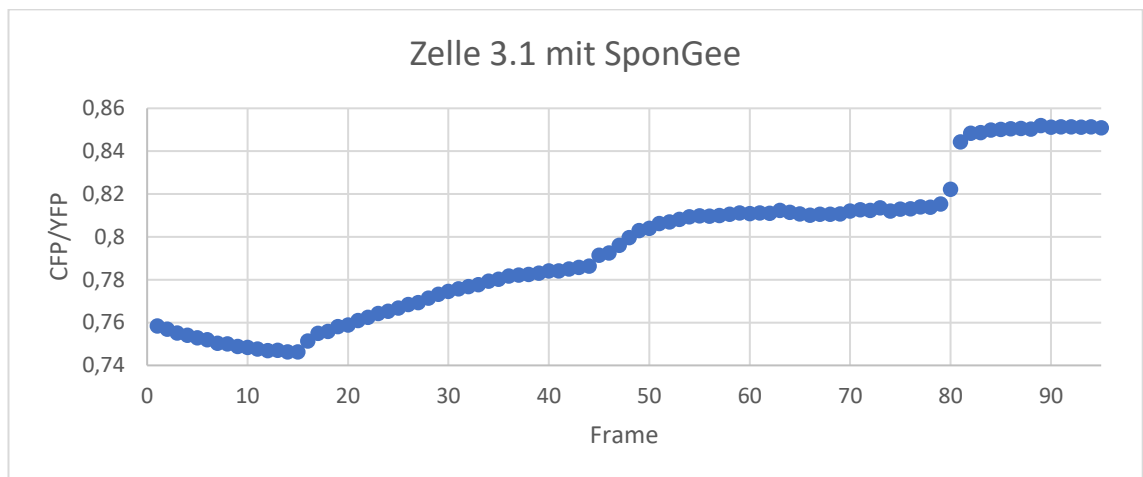


Abbildung 32: Diagramm der FRET-Messung von der Zelle 3.1 mit SponGee. Das CFP/YFP-Verhältnis ist gegen die Frames aufgetragen. Ein Frame entspricht 5 Sekunden.

Tabelle 17: Messwerte der FRET-Messung der Zelle 3.1 mit SponGee. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Das CFP/YFP-Verhältnis ist proportional zu der zellulären cGMP-Konzentration.

Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP
1	0,75838280	42	0,78506762	83	0,84870106
2	0,75693321	43	0,78582221	84	0,84994793
3	0,75521469	44	0,78638911	85	0,85026771
4	0,75406355	45	0,79144931	86	0,85051787
5	0,75287664	46	0,79257095	87	0,85064310
6	0,75204116	47	0,79611695	88	0,85040200
7	0,75042272	48	0,79961216	89	0,85197115
8	0,75003099	49	0,80304706	90	0,85123336
9	0,74887031	50	0,80408949	91	0,85137349
10	0,74841589	51	0,80633700	92	0,85133004
11	0,74766851	52	0,80702382	93	0,85130328
12	0,74699944	53	0,80821312	94	0,85140085
13	0,74705213	54	0,80941081	95	0,85096514
14	0,74636680	55	0,80989379		
15	0,74627197	56	0,80971766		
16	0,75144762	57	0,80996609		
17	0,75497085	58	0,81061280		
18	0,75596112	59	0,81116486		
19	0,75814259	60	0,81091929		
20	0,75882810	61	0,81124836		
21	0,76100457	62	0,81111252		
22	0,76250190	63	0,81243897		
23	0,76431018	64	0,81143540		
24	0,76533192	65	0,81075490		
25	0,76678538	66	0,81011128		
26	0,76849932	67	0,81055301		
27	0,76940674	68	0,81055486		
28	0,77149528	69	0,81077224		
29	0,77322686	70	0,81208521		
30	0,77452403	71	0,81275451		
31	0,77574217	72	0,81239367		
32	0,77685803	73	0,81353796		
33	0,77770919	74	0,81212574		
34	0,77932662	75	0,81302661		
35	0,78033060	76	0,81311595		
36	0,78169113	77	0,81398296		
37	0,78227019	78	0,81389976		
38	0,78244925	79	0,81536490		
39	0,78312534	80	0,82226133		
40	0,78418595	81	0,84434688		
41	0,78413600	82	0,84834099		

Zelle 3.2:

Zugabe SNP bei Frame 15, Sildenafil bei Frame 45 und IBMX/CNP bei Frame 80

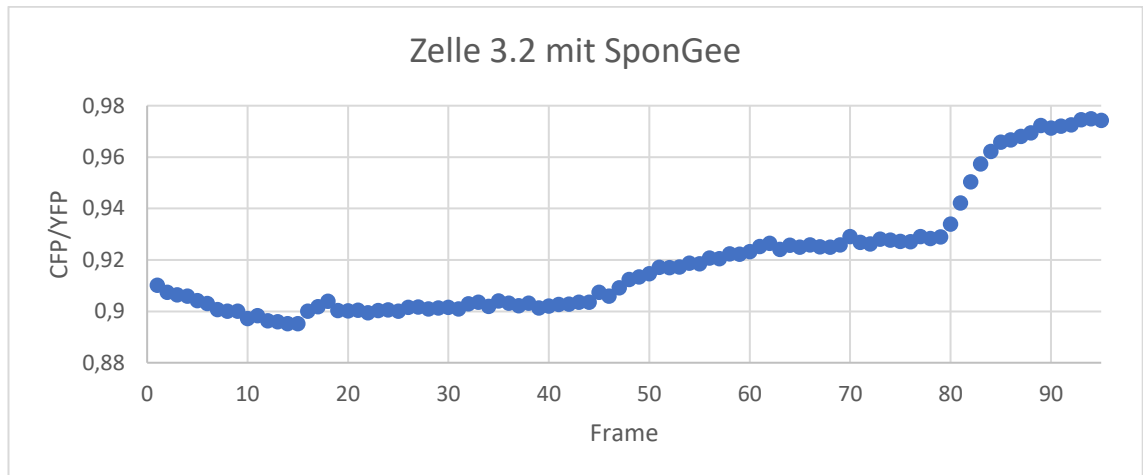


Abbildung 33: Diagramm der FRET-Messung von der Zelle 3.2 mit SponGee. Das CFP/YFP-Verhältnis ist gegen die Frames aufgetragen. Ein Frame entspricht 5 Sekunden.

Tabelle 18: Messwerte der FRET-Messung der Zelle 3.2 mit SponGee. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Das CFP/YFP-Verhältnis ist proportional zu der zellulären cGMP-Konzentration.

Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP
1	0,91009450	42	0,90285116	83	0,95739079
2	0,90745115	43	0,90356165	84	0,96221882
3	0,90636432	44	0,90360439	85	0,96583122
4	0,90596259	45	0,90741783	86	0,96672022
5	0,90413225	46	0,90587795	87	0,96801013
6	0,90310627	47	0,90913749	88	0,96939832
7	0,90069634	48	0,91238970	89	0,97223532
8	0,90010691	49	0,91342062	90	0,97130907
9	0,90007883	50	0,91463560	91	0,97202355
10	0,89724690	51	0,91718596	92	0,97258937
11	0,89826042	52	0,91699505	93	0,97447789
12	0,89637584	53	0,91725767	94	0,97496140
13	0,89590734	54	0,91872215	95	0,97428393
14	0,89525718	55	0,91850257		
15	0,89518750	56	0,92069328		
16	0,90001315	57	0,92044914		
17	0,90187049	58	0,92238420		
18	0,90389001	59	0,92217249		
19	0,90029430	60	0,92327374		
20	0,90022260	61	0,92526043		
21	0,90041083	62	0,92642033		
22	0,89938563	63	0,92411947		
23	0,90030509	64	0,92567194		
24	0,90058810	65	0,92500293		
25	0,90005952	66	0,92579168		
26	0,90156966	67	0,92504913		
27	0,90171337	68	0,92502523		
28	0,90094352	69	0,92589617		
29	0,90125895	70	0,92913348		
30	0,90158576	71	0,92686379		
31	0,90088654	72	0,92625576		
32	0,90299028	73	0,92812938		
33	0,90353435	74	0,92768794		
34	0,90189552	75	0,92715734		
35	0,90399456	76	0,92705727		
36	0,90320855	77	0,92913562		
37	0,90217191	78	0,92830735		
38	0,90313119	79	0,92891997		
39	0,90136069	80	0,93394309		
40	0,90200305	81	0,94220156		
41	0,90267783	82	0,95042592		

Zelle 3.3:

Zugabe SNP bei Frame 15, Sildenafil bei Frame 45 und IBMX/CNP bei Frame 80

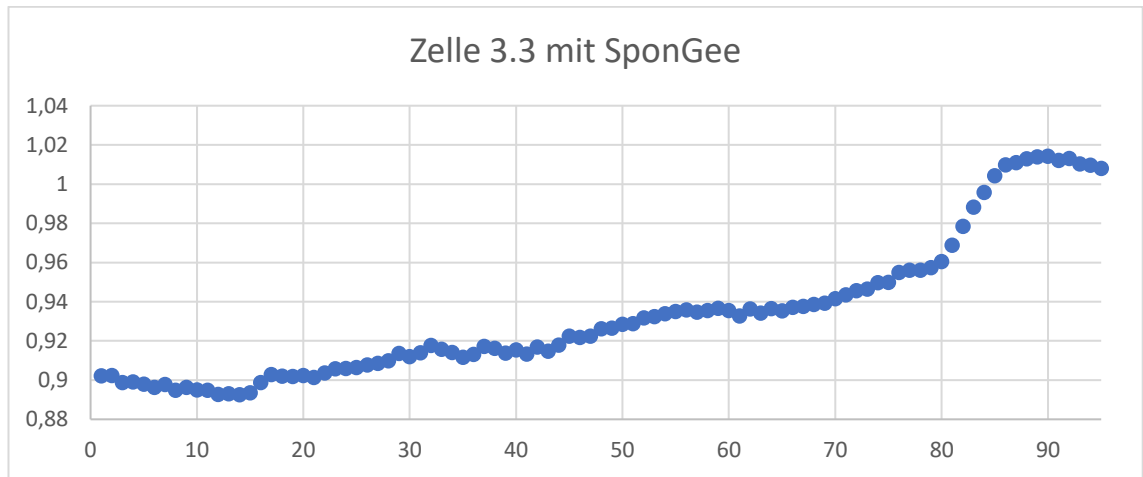


Abbildung 34: Diagramm der FRET-Messung von der Zelle 3.3 mit SponGee. Das CFP/YFP-Verhältnis ist gegen die Frames aufgetragen. Ein Frame entspricht 5 Sekunden.

Tabelle 19: Messwerte der FRET-Messung der Zelle 3.3 mit SponGee. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Das CFP/YFP-Verhältnis ist proportional zu der zellulären cGMP-Konzentration.

Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP
1	0,90218139	42	0,91673732	83	0,98824287
2	0,90221137	43	0,91470289	84	0,99566013
3	0,89871299	44	0,91775829	85	1,00422871
4	0,89896256	45	0,92238432	86	1,00968516
5	0,89789027	46	0,92165524	87	1,01082516
6	0,89615929	47	0,92229831	88	1,01289439
7	0,89776868	48	0,92606288	89	1,01385391
8	0,89477879	49	0,92637259	90	1,01412904
9	0,89617091	50	0,92845577	91	1,01201129
10	0,89487273	51	0,92868531	92	1,01308310
11	0,89475447	52	0,93175221	93	1,01019800
12	0,89270175	53	0,93230075	94	1,00962889
13	0,89297348	54	0,93376643	95	1,00794089
14	0,89255565	55	0,93500632		
15	0,89346081	56	0,93571496		
16	0,89864814	57	0,93469596		
17	0,90272611	58	0,93536657		
18	0,90197361	59	0,93651652		
19	0,90173215	60	0,93549699		
20	0,90227890	61	0,93269265		
21	0,90123081	62	0,93621832		
22	0,90356886	63	0,93419164		
23	0,90563494	64	0,93634546		
24	0,90580756	65	0,93526143		
25	0,90628207	66	0,93700320		
26	0,90770477	67	0,93758118		
27	0,90847743	68	0,93851841		
28	0,90982777	69	0,93923473		
29	0,91354168	70	0,94153780		
30	0,91198731	71	0,94350982		
31	0,91388571	72	0,94558978		
32	0,91763026	73	0,94635785		
33	0,91573328	74	0,94963241		
34	0,91411322	75	0,94985473		
35	0,91156894	76	0,95478594		
36	0,91305387	77	0,95601291		
37	0,91709310	78	0,95597160		
38	0,91609705	79	0,95733613		
39	0,91373181	80	0,96045375		
40	0,91533679	81	0,96869564		
41	0,91319174	82	0,97837013		

Zelle 3.4:

Zugabe SNP bei Frame 15, Sildenafil bei Frame 45 und IBMX/CNP bei Frame 80

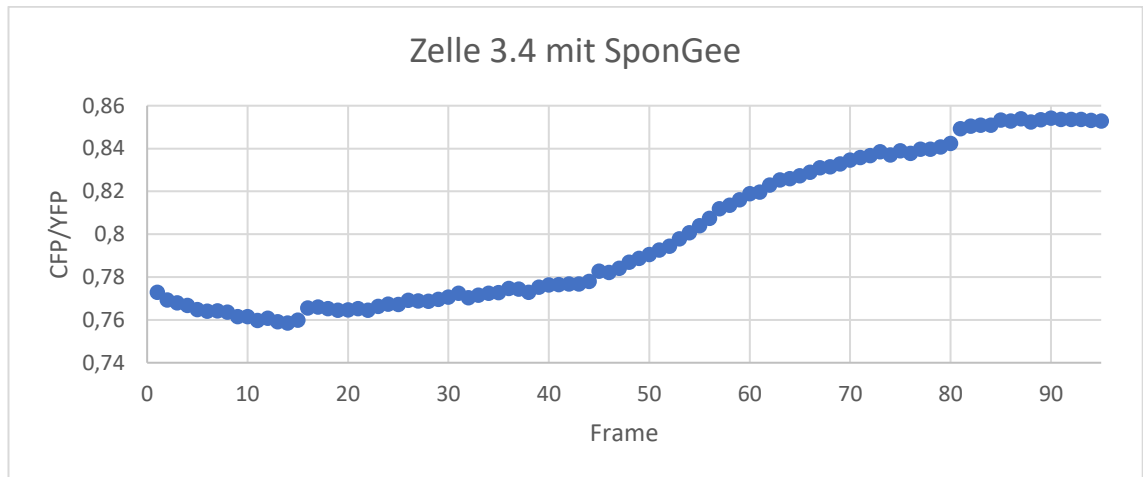


Abbildung 35: Diagramm der FRET-Messung von der Zelle 3.4 mit SponGee. Das CFP/YFP-Verhältnis ist gegen die Frames aufgetragen. Ein Frame entspricht 5 Sekunden.

Tabelle 20: Messwerte der FRET-Messung der Zelle 3.4 mit SponGee. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Das CFP/YFP-Verhältnis ist proportional zu der zellulären cGMP-Konzentration.

Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP
1	0,77286059	42	0,77666718	83	0,85083097
2	0,76927394	43	0,77669287	84	0,85087538
3	0,76793444	44	0,77790999	85	0,85328001
4	0,76674223	45	0,78268325	86	0,85279471
5	0,76470769	46	0,78211838	87	0,85379142
6	0,76397562	47	0,78403252	88	0,85236180
7	0,76411301	48	0,78688002	89	0,85344374
8	0,76357651	49	0,78863376	90	0,85417390
9	0,76140350	50	0,79044640	91	0,85352665
10	0,76143616	51	0,79257393	92	0,85349029
11	0,75970364	52	0,79433310	93	0,85347390
12	0,76078612	53	0,79773408	94	0,85311204
13	0,75904924	54	0,80066782	95	0,85284007
14	0,75852835	55	0,80393857		
15	0,75983477	56	0,80733007		
16	0,76558459	57	0,81183338		
17	0,76589024	58	0,81344241		
18	0,76528090	59	0,81604153		
19	0,76446295	60	0,81882626		
20	0,76463312	61	0,81965601		
21	0,76516539	62	0,82293278		
22	0,76440692	63	0,82536060		
23	0,76618582	64	0,82594240		
24	0,76736283	65	0,82716298		
25	0,76709682	66	0,82886219		
26	0,76915366	67	0,83103263		
27	0,76878411	68	0,83144051		
28	0,76865649	69	0,83282816		
29	0,76952338	70	0,83457404		
30	0,77065897	71	0,83580804		
31	0,77234763	72	0,83657759		
32	0,77030659	73	0,83849776		
33	0,77143937	74	0,83691698		
34	0,77231729	75	0,83891606		
35	0,77270979	76	0,83776265		
36	0,77463955	77	0,83962393		
37	0,77439863	78	0,83967006		
38	0,77279043	79	0,84069717		
39	0,77529317	80	0,84234452		
40	0,77623510	81	0,84914315		
41	0,77644897	82	0,85036582		

Zelle 4.1:

Zugabe SNP bei Frame 12, Sildenafil bei Frame 40 und IBMX/CNP bei Frame 102

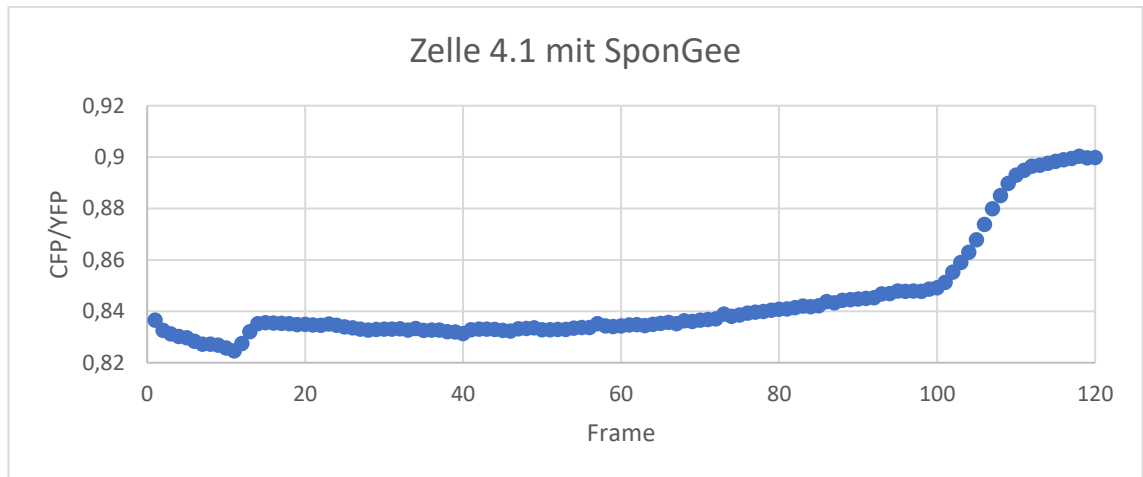


Abbildung 36: Diagramm der FRET-Messung von der Zelle 4.1 mit SponGee. Das CFP/YFP-Verhältnis ist gegen die Frames aufgetragen. Ein Frame entspricht 5 Sekunden.

Tabelle 21: Messwerte der FRET-Messung der Zelle 4.1 mit SponGee. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Das CFP/YFP-Verhältnis ist proportional zu der zellulären cGMP-Konzentration.

Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP
1	0,83654755	42	0,83300543	83	0,84206021
2	0,83259147	43	0,83300680	84	0,84171641
3	0,83117616	44	0,83291227	85	0,84218264
4	0,83015269	45	0,83259356	86	0,84372413
5	0,82962591	46	0,83231086	87	0,84325349
6	0,82831645	47	0,83311695	88	0,84422481
7	0,82718128	48	0,83329350	89	0,84447897
8	0,82716537	49	0,83354926	90	0,84480500
9	0,82679170	50	0,83273256	91	0,84503412
10	0,82570231	51	0,83276707	92	0,84527618
11	0,82459670	52	0,83285660	93	0,84671676
12	0,82742524	53	0,83291805	94	0,84685093
13	0,83209252	54	0,83347476	95	0,84784776
14	0,83514184	55	0,83365285	96	0,84779269
15	0,83547765	56	0,83363485	97	0,84781569
16	0,83538336	57	0,83519787	98	0,84778470
17	0,83530301	58	0,83426970	99	0,84857565
18	0,83521438	59	0,83408147	100	0,84906209
19	0,83472902	60	0,83424437	101	0,85125113
20	0,83493811	61	0,83462119	102	0,85521162
21	0,83463544	62	0,83476263	103	0,85898978
22	0,83455735	63	0,83436471	104	0,86292297
23	0,83497506	64	0,83490729	105	0,86779064
24	0,83457243	65	0,83532339	106	0,87375832
25	0,83391219	66	0,83567923	107	0,87986958
26	0,83356088	67	0,83517486	108	0,88503057
27	0,83299571	68	0,83631009	109	0,88974607
28	0,83262849	69	0,83605117	110	0,89290845
29	0,83295041	70	0,83658826	111	0,89486313
30	0,83303893	71	0,83671862	112	0,89647573
31	0,83308172	72	0,83700085	113	0,89678145
32	0,83318514	73	0,83890033	114	0,89749301
33	0,83270592	74	0,83805317	115	0,89832693
34	0,83324987	75	0,83855844	116	0,89887029
35	0,83252555	76	0,83930188	117	0,89946652
36	0,83266997	77	0,83967656	118	0,90029770
37	0,83269084	78	0,83984190	119	0,89967668
38	0,83201957	79	0,84040260	120	0,89976233
39	0,83186203	80	0,84071660		
40	0,83131182	81	0,84090322		
41	0,83274335	82	0,84144288		

Zelle 4.2:

Zugabe SNP bei Frame 12, Sildenafil bei Frame 40 und IBMX/CNP bei Frame 102

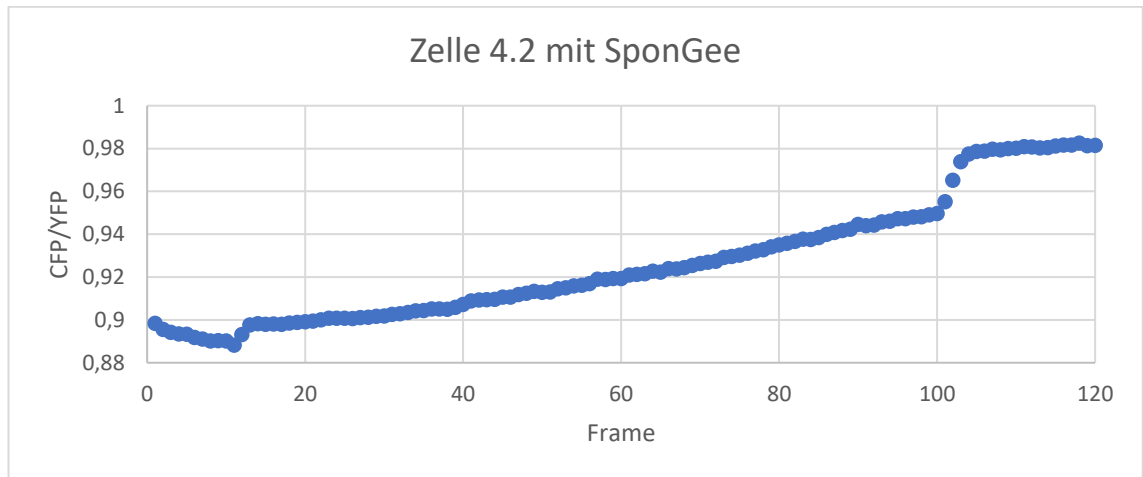


Abbildung 37: Diagramm der FRET-Messung von der Zelle 4.2 mit SponGee. Das CFP/YFP-Verhältnis ist gegen die Frames aufgetragen. Ein Frame entspricht 5 Sekunden.

Tabelle 4: Messwerte der FRET-Messung der Zelle 4.2 mit SponGee. Ein Frame entspricht 5 Sekunden. Das CFP/YFP-Verhältnis ist proportional zu der zellulären cGMP-Konzentration.

Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP	Frame	CFP/YFP
1	0,89837211	42	0,90919501	83	0,93760216
2	0,89545715	43	0,90944827	84	0,93754762
3	0,89418447	44	0,90959060	85	0,93837339
4	0,89334321	45	0,91053921	86	0,93981981
5	0,89332646	46	0,91065800	87	0,94080180
6	0,89181197	47	0,91171944	88	0,94173211
7	0,89096367	48	0,91234285	89	0,94221598
8	0,89006716	49	0,91334873	90	0,94445556
9	0,89027154	50	0,91289800	91	0,94385094
10	0,89018047	51	0,91295624	92	0,94415420
11	0,88819236	52	0,91453654	93	0,94572079
12	0,89315003	53	0,9149344	94	0,94601744
13	0,89765680	54	0,91584295	95	0,94716281
14	0,89819825	55	0,91608882	96	0,94721800
15	0,89794630	56	0,91691285	97	0,94788760
16	0,89801979	57	0,91900736	98	0,94816566
17	0,89791423	58	0,91878748	99	0,94901621
18	0,89851165	59	0,91932976	100	0,94962442
19	0,89883828	60	0,91932744	101	0,95506775
20	0,89904034	61	0,92083103	102	0,96506536
21	0,89943600	62	0,92125285	103	0,97380179
22	0,90002751	63	0,92153502	104	0,97740251
23	0,90072417	64	0,92264372	105	0,97866273
24	0,90072358	65	0,92227060	106	0,97874671
25	0,90076655	66	0,92388862	107	0,97970313
26	0,90054125	67	0,92379236	108	0,97929287
27	0,90107328	68	0,92429441	109	0,97988683
28	0,90116274	69	0,92536241	110	0,98011017
29	0,90168166	70	0,92622805	111	0,98079735
30	0,90178293	71	0,92691851	112	0,98065656
31	0,90254456	72	0,92730755	113	0,98021847
32	0,90278316	73	0,92907566	114	0,98038346
33	0,90338701	74	0,92959988	115	0,98119646
34	0,90411025	75	0,93019450	116	0,98162699
35	0,90428263	76	0,93109465	117	0,98156005
36	0,90507257	77	0,93210298	118	0,98252839
37	0,90500599	78	0,93273807	119	0,98129576
38	0,90492523	79	0,93412381	120	0,98147446
39	0,90583551	80	0,93493134		
40	0,90708834	81	0,93565202		
41	0,90875459	82	0,93660462		

