

**Molekularbiologische, biophysikalische und
physiologische Untersuchungen zur Funktion der
purinergischen Rezeptoren**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von Dipl. Biol. Willem Bintig
geboren am 29.09.1981 in Hannover

Hannover, 2010

Referent: Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo
Korreferent: Prof. Dr. Alexander Heisterkamp
Tag der Promotion: 21. Dezember 2010

Für Leonie T.

..in stiller Liebe und Verbundenheit..

Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung.....	5
Purinergische Rezeptoren	5
Die P2-Rezeptor vermittelten Signalwege über die PLC β und die AC	8
Die Signalwege der Second Messenger cAMP und Ca ²⁺	11
Calcium Imaging	13
Elektrophysiologie / Patch-Clamp-Technik.....	14
PCR / quantitative RealTime-PCR	16
Transfektion / Optoperforation.....	18
RNA Interferenz / gene silencing.....	22
2. Ergebnisse	25
Purinergic signalling in rat GFSHR-17 granulosa cells: an <i>in vitro</i> model of granulosa cells in maturing follicles (Bintig et al., 2009) [Anhang A].....	27
Purinergic receptors and Ca ²⁺ signalling in the human blood-brain barrier endothelial cell line hCMEC/D3 (Bintig et al., 2011, in submission) [Anhang B]:	30
Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living GFSHR-17 and MTH53a cells (Baumgart et al., 2008) [Anhang C]	34
3. Diskussion und Ausblick	38
Literaturverzeichnis	44
Abkürzungen.....	53
Lebenslauf	55
Publikationsliste	56
Publikationen	56
Abstracts.....	56
Danksagung	59
Anhang A: Purinergic signalling in rat GFSHR-17 granulosa cells: an <i>in vitro</i> model of granulosa cells in maturing follicles (Bintig et al., 2009).....
Anhang B: Purinergic receptors and Ca²⁺ signalling in the human blood-brain barrier endothelial cell line hCMEC/D3 (Bintig et al., 2011, in submission).....
Anhang C: Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living GFSHR-17 and MTH53a cells (Baumgart et al., 2008).....

Zusammenfassung

Purinergische Rezeptoren sind nukleotidsensitive, transmembrane Rezeptoren. Eingeteilt werden sie in die metabotropen G-Protein gekoppelten P2Y-Rezeptoren (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11-14}) und in die ionotropen P2X-Rezeptoren (P2X₁₋₇). Eine Stimulation der unterschiedlichen Rezeptorsubtypen durch ihre spezifischen Agonisten der Purin- oder Pyrimidin-Familie (z. B. ATP, BzATP, ATPγS, αβ-meATP, ADP oder UTP und UDP) resultiert in einer Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden.

Die ionotropen P2X₁₋₇-Rezeptorsubtypen vermitteln nach einer Stimulation aufgrund der gegebenen Ionenverteilung in der Zelle und dem äußeren Raum einen Einstrom von Natrium- (Na⁺) oder Calcium- (Ca²⁺) Ionen aus dem extrazellulären Medium in das Cytosol. Die Ca²⁺-Ionen können im Cytosol der Zelle als Second Messenger intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren.

Die metabotropen G_{q/11}-Protein gekoppelten P2Y_{1, 2, 4, 6} und 11-Rezeptorsubtypen vermitteln die Phospholipase Cβ (PLCβ) gesteuerte Spaltung des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). Das IP₃ aktiviert und öffnet die ionotropen IP₃-Rezeptoren des Endoplasmatischen Retikulums, einem Ca²⁺-Speicher, und induziert somit die Freisetzung des Second Messengers Ca²⁺ in das Cytosol. Die P2Y₁₁₋₁₄-Rezeptorsubtypen sind mit dem G_{i/o} bzw. dem G_s-Protein gekoppelt, welches die membranständige Adenylylcyclase (AC) inhibiert oder aktiviert. Die AC wandelt im Cytosol der Zelle enzymatisch intrazelluläres ATP in den Second Messenger cyclisches Adenosin 5'-monophosphat (cAMP) um.

Die durch die beiden Second Messenger Ca²⁺ und cAMP induzierten Signalwege und Kaskaden können eine Vielzahl an zellphysiologischen Prozessen wie z. B. die Genexpression, die Zelldifferenzierung, die Apoptose, die Proliferation, die Muskelkontraktion und die Ca²⁺ abhängigen Ionenkanäle steuern und beeinflussen.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Rolle der purinergischen Rezeptoren in den Endothelzellen der humanen Blut-Hirn Schranke (hCMEC/D3) und in den Granulosazellen aus der Ratte (GFSHR-17) untersucht. Mittels der Ca²⁺-Imaging Methode, Genexpressionsanalysen, der Patch-Clamp-Technik und dem siRNA induzierten *gene silencing* (RNA-Interferenz) konnte eine Expression und Funktionalität der P2Y₂-, P2Y₄- und P2Y₆-Rezeptorsubtypen in den Zellen nachgewiesen werden. In den Granulosazellen induziert die Applikation verschiedener Nukleotide einen P2Y-Rezeptorvermittelten Anstieg in der

intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) und Änderungen in dem Membranpotential der Zelle durch Ca^{2+} abhängige Cl^- -Kanäle. In der humanen Endothelzelllinie konnte eine P2Y_2 -Rezeptorsubtypen vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung beobachtet werden. Durch das gezielte *gene silencing* des P2Y_2 -Rezeptors kann in den hCMEC/D3 Zellen nach der Applikation von einer Vielzahl von verschiedenen Agonisten kein Ca^{2+} -Signal mehr induziert werden. Die Transfektion der Zellen mit der siRNA wurde hierbei mit einer chemischen Transfektionsmethode, der sogenannten Lipofektion, durchgeführt. In weiteren Versuchen in Kooperation mit dem Laser Zentrum Hannover e. V. wurden die Zelllinien GFSHR-17 aus der Ratte und die Brustkrebszelllinie MTH53a aus dem Hund durch eine laserbasierte Transfektionsmethode transfiziert. Im Gegensatz zu der Lipofektion wird bei der laserbasierten Optoperforation mittels eines Femtosekundenlasers und dessen genaue Fokussierung auf die Zellmembran eine einzelne Zelle gezielt perforiert. Dieser Vorgang ermöglicht die Diffusion von genetischem Material in das Zellinnere der ausgewählten Zelle. Ein Ziel der Versuche war es, die physikalischen und biologischen Effekte während der Optoperforation zu analysieren. Bei der Perforation der Zellmembran konnten mit elektrophysiologischen Messungen Membranpotentialänderungen und Ionenströme über die Membran detektiert werden. Die induzierte Pore besitzt einen Durchmesser, der groß genug ist, dass organische Farbstoffe, genetisches Material und Proteine hindurchdiffundieren können. Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik und verschiedenen Farbstofftransferversuchen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass es bei der Optoperforation zu einem Volumenaustausch von etwa 40 % zwischen dem intra- und extrazellulären Medium kommt. Über diese Näherung kann der Gehalt der im Medium gelösten Moleküle, welche von der Zelle aufgenommen werden (z. B. DNA oder siRNA) berechnet werden. Darüber hinaus bietet diese Transfektionsmethode die Möglichkeit, Primär- und Stammzellen, bei denen chemische Transfektionsmethoden oftmals nicht oder nur bedingt funktionieren, sowie einzelne ausgewählte Zellen in einer Zellpopulation oder in einem Gewebe gezielt zu transfizieren.

Schlagwörter: Purinergische Rezeptoren; laserbasierte Optoperforation; Ca^{2+} Signalwege

Summary

Purinergic receptors are membrane bound receptors which bind external nucleotides. They are divided into metabotropic G-protein coupled receptors (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11-14}) and in ligand gated ionotropic receptors (P2X₁₋₇). A stimulation of the receptor subtypes by their specific agonists of the purin or pyrimidin family (e. g. ATP, BzATP, ATP γ S, $\alpha\beta$ -meATP, ADP or UTP and UDP) activates different signalling pathways. The activation of the ionotropic P2X₁₋₇ receptor subtypes can induce an influx of extracellular Na⁺- or Ca²⁺-ions into the cytosol because of the different given intra- and extracellular ion concentrations. Cytosolic Ca²⁺-ions can activate intracellular signalling cascades.

The metabotropic G_{q/11}-protein coupled P2Y_{1, 2, 4, 6 und 11}-receptor subtypes activate the phospholipase C β (PLC β) mediated cleavage of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) in inositoltrisphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG). IP₃ activates and opens the ionotropic IP₃ receptors in the endoplasmatic reticulum which mediates a release of the second messenger Ca²⁺ into the cytosol. The P2Y₁₁₋₁₄-receptor subtypes are coupled to G_{i/o}- or G_s-proteins. They inhibit or activate the membrane bound adenylylcyclase (AC) which converts intracellular ATP into the second messenger cyclic adenosin 5'-monophosphat (cAMP).

The second messengers Ca²⁺ and cAMP induce different intracellular signalling pathways and regulate a multiplicity of cell physiological processes like the gene expression, cell differentiation, apoptosis, proliferation, muscle contraction and Ca²⁺ dependent ion channels.

In the present doctoral thesis, the role of the purinergic receptors were analysed in a human blood-brain barrier endothelial cell line (hCMEC/D3) and in a rat granulososa cell line (GFSHR-17). The expression and the functionality of the P2Y₂-, P2Y₄- und P2Y₆-receptor subtypes were shown by Ca²⁺-imaging techniques, analysis of the gene expression, the patch-clamp-technique, and the gene silencing by siRNA's (RNA interference). In the granulososa cells, the application of different nucleotides activate the P2Y-receptors and induce an increase in the intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) and changes in the membrane potential mediated by Ca²⁺ dependent Cl⁻ channels. In the human blood-brain barrier endothelial cell line, an exclusive P2Y₂ receptor subtype mediated Ca²⁺-release could be observed. This nucleotide mediated Ca²⁺-signal was inhibited by an siRNA dependent gene silencing of the P2Y₂ receptor subtype. The transfection of the cells with siRNA was done by a chemical method, the so called lipofection. In additional experiments performed in cooperation with the Laser

Zentrum Hannover e. V., the GFSHR-17 granulosa cells and a canine mammary MTH53a cell line were transfected by a femtosecond-laser based optoperforation. In comparison to the lipofection, this technique uses a femtosecond-laser to open the membrane of a single targeted cell by focussing the beam on the cell membrane. The optoperforation allows a delivery of foreign genetic materials into the targeted cell. Furthermore, we aimed to analyse the physical and biological effects of the optoperforation. With the patch-clamp-technique, it was possible to follow the changes in the membrane potential and ion fluxes induced by the optoperforation. The induced pore had a diameter large enough to allow organic dyes, even genetic material or proteins to enter the cells. By combination of patch-clamp-technique and cell imaging methods, we could estimate a volume exchange of about 40 % between the intra- and extracellular space during the perforation. This approach opens the possibility to quantify the uptake of extracellular molecules (e. g. DNA or siRNA) by the cells. Moreover, the technique offers the possibility to transfect difficult transfectable cells like cultivated primary or stem cells, if for e. g. chemical methods fail. It opens also the possibility for a cell specific transfection in a mixed cell population or even in a tissue.

Keywords: Purinergic receptors; laser based optoperforation; Ca²⁺ signalling

1. Einleitung

Purinergische Rezeptoren

Purinergische Rezeptoren werden durch die Bindung von extrazellulären Liganden bzw. Agonisten der Purin- und Pyrimidin-Klasse aktiviert. Die ersten Untersuchungen an den Rezeptoren wurden mit den Nukleotiden Adenosin-5'-monophosphat (AMP), Adenosin-5'-diphosphat (ADP), Adenosin-5'-triphosphat (ATP) und später dann auch mit den Pyrimidinnukleotiden Uridin-5'-triphosphat (UTP) und Uridin-5'-diphosphat (UDP) durchgeführt (Drury & Szent-Györgyi, 1929; Hashimoto et al., 1964; Boyd & Forrester, 1968). Das jeweilige Nukleotidmolekül besteht im Grundaufbau aus der Nukleinbase Adenin oder Uracil, welches über eine glycosidische Bindung mit einem Monosaccharid (Pentose) verbunden ist. An der Pentose wiederum können bis zu drei Phosphate (Mono-, Di- oder Triphosphat) gebunden sein. Die Nukleinbase Adenin ist eine heterobicyclische, aromatische Verbindung und gehört zu der Klasse der Purine, Uracil hingegen gehört zu der Klasse der monocyclischen, aromatischen Pyrimidine. Die verschiedenen Agonisten binden alle extrazellulär an die purinergischen Zelloberflächenrezeptoren.

Bereits 1929 konnten Drury und Szent-Györgyi den Einfluss von extrazellulären Purinen als Signalmolekül auf das kardiovaskuläre System zeigen. Sie induzierten durch die Zugabe von Adenosin und AMP eine Reduzierung des Blutdrucks oder die Erweiterung von Arterien (Drury & Szent-Györgyi, 1929). Gillespie nutzte im Jahr 1933 erstmals das Nukleotid ATP als Agonist, welcher um ein Vielfaches besser als Adenosin oder AMP Kontraktionen im Ileum und im Uterus des Meerschweinchens hervorrufen konnte. Dies waren zudem erste Hinweise auf verschiedene Rezeptorklassen (Gillespie, 1934). G. Burnstock beschrieb 1970 erstmals, dass ATP auch als physiologischer Agonist an der Stimulation von autonomen Nerven in viszeralen Organen beteiligt sei und dort eine Neurotransmitterfunktion ausübt. Er zeigte damit einen neuen Signalweg in Nervenzellen, der nicht über die damals bereits bekannten cholinergen oder adrenergen Signalwege vermittelt wurde (Burnstock et al., 1970; Burnstock, 1972). Die untersuchte Rezeptorklasse bezeichnete die Arbeitsgruppe um Burnstock aufgrund des damals genutzten Purinnukleotidagonisten ATP als *purinergic receptors* oder *purinoceptors* (Burnstock, 1972).

In den letzten Jahrzehnten konnten neben den ursprünglichen Agonisten weitere Agonisten und Antagonisten der purinergischen Rezeptoren entdeckt und auch neue künstlich synthetisiert werden, welche nur noch in ihrem Grundgerüst einem Purin oder einem

Pyrimidin entsprechen (von Kügelgen & Wetter, 2000; von Kügelgen, 2006). Die Entwicklung und Suche nach neuen, spezifischen Agonisten und Antagonisten der purinergischen Rezeptoren wurde vorangetrieben, da es sich um eine deutlich größere und komplexere Rezeptorklasse handelte als ursprünglich vermutet wurde. Die anfänglichen Forschungen mit den Purinen im kardiovaskulären System und im Blutgefäßsystem, sowie die damals von Burnstock publizierten neuen Hinweise, dass die Nukleotide als Neurotransmitter oder Signalmolekül in Nervenzellen eine bedeutende Rolle einnehmen, intensivierten die Forschung an den purinergischen Rezeptoren. Es zeigte sich, dass die purinergischen Rezeptoren in fast allen Organen und Geweben exprimiert werden und an wichtigen Körperfunktionen beteiligt sind (Ralevic & Burnstock, 1998).

Aufgrund der zunehmenden Komplexität in der Bezeichnung von neu identifizierten und untersuchten Rezeptorsubtypen wurde eine neue, übersichtliche Klassifizierung der Rezeptoren eingeführt (Burnstock & Kennedy, 1985). Diese Einteilung berücksichtigte neue genetische und molekularbiologische Studien, neue Veröffentlichungen und Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen in Bezug auf die Funktionalität und Physiologie der verschiedenen Rezeptoren. Es ergab sich eine Nomenklatur, in der die purinergischen Rezeptoren in zwei große Klassen, die P2X- und P2Y-Rezeptoren, eingeteilt wurden. Bei den P2X-Rezeptoren handelt es sich um ionotrope ligandengesteuerte Ionenkanal-Rezeptoren. Die P2Y-Rezeptoren hingegen sind metabotrope G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Burnstock & Kennedy, 1985; Benham & Tsien, 1987; Dubyak, 1991; Abbracchio & Burnstock, 1994). Diese zwei Rezeptorklassen und ihre Subtypen unterscheiden sich erheblich von ihren Eigenschaften und ihren Signalwegen, lediglich ihr Agonist ist ein Nukleotid der Purin- oder Pyrimidinklasse.

Im Jahr 1994 gelang es erstmals zwei ionotrope P2X-Rezeptorsubtypen zu klonieren und dessen Peptidsequenz zu bestimmen (Brake et al., 1994; Valera et al., 1994). Sieben verschiedene P2X-Rezeptorsubtypen (P2X₁₋₇) sind bis heute aus Säugetieren kloniert worden. Das Expressionsprofil der verschiedenen Subtypen kann von Zelltyp zu Zelltyp variieren (North, 2002; Ralevic & Burnstock, 1998). Ein P2X-Rezeptorsubtyp ist molekular aus einer Polypeptidkette von 379 (P2X₆) bis maximal 595 (P2X₇) Aminosäuren aufgebaut und besitzt zwei Transmembrandomänen (Köles et al., 2008). Der C-Terminus und der N-Terminus des Polypeptids liegen intrazellulär, ein langer extrazellulärer Loop ist außerhalb der Zellmembran angeordnet [Abbildung 1 A] (Newbolt et al., 1998).

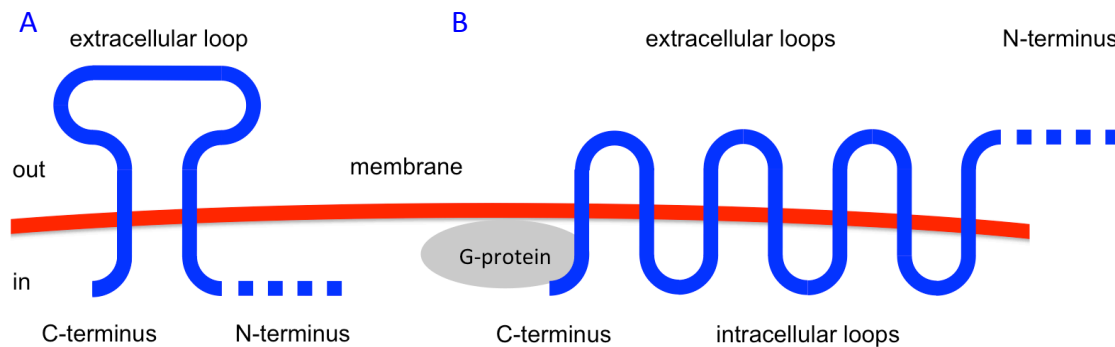


Abbildung 1

(A) Schematische Darstellung des ionotropen P2X-Rezeptors mit zwei Transmembrandomänen. Drei Untereinheiten lagern sich zu einem funktionellen Rezeptor mit einer integrierten Pore zusammen und ermöglichen den Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen über die Membran zu strömen. (B) Der metabotrope P2Y-Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen. Der C-Terminus der P2Y-Rezeptoren interagiert mit dem G-Protein und kann verschiedene Signalwege aktivieren. An den extrazellulären Loops beider Klassen können die spezifischen Agonisten binden.

Durch elektrophysiologische Messungen und Kristallstrukturanalysen hat sich gezeigt, dass die P2X-Rezeptoren oligomerisieren. Vermutlich immer drei P2X-Rezeptorsubtypeneinheiten lagern sich zu einem ligandengesteuerten ionotropen Rezeptor zusammen und bilden in ihrer Mitte eine für Ionen permeable zentrale Pore aus (Nörenberg & Illes, 2000; Kawate et al., 2009). Die Aktivierung eines ionotropen P2X-Rezeptors durch seinen spezifischen Agonisten resultiert in einer Änderung der Konformation des Ionenkanals und beeinflusst somit dessen Permeabilität für spezifische Ionen. Die Änderungen in der Permeabilität des Kanals können zu einem Einstrom von Ca^{2+} - und Na^+ -Ionen aus dem extrazellulären Raum in die Zelle aufgrund ihrer spezifischen Konzentrationen führen (Bean, 1992; North, 1996; Köles et al., 2008). Vermutlich sind alle P2X-Rezeptorsubtypen in der Lage, sich zu funktionellen homomeren P2X-Rezeptoren zusammenzulagern (Burnstock, 2007a). Zu der beschriebenen homomeren Zusammenlagerung ist eine heteromere Zusammenlagerung verschiedener P2X-Subtypen bekannt. Gut untersucht ist hier z. B. die heteromere Zusammenlagerung von den P2X₂- und P2X₃-Rezeptorsubtypen (Burnstock, 2007a).

Die metabotrope G-Protein gekoppelte P2Y-Rezeptorfamilie und ihre physiologischen Eigenschaften sind um ein Vielfaches komplexer als bei den ionotropen P2X-Rezeptoren (Barnard et al., 1994; Boarder et al., 1995; Barnard et al., 1997; North & Barnard, 1997). Auch diese werden bei Säugetieren, ähnlich den P2X-Rezeptorsubtypen, in verschiedene P2Y-Rezeptorsubtypen unterteilt und besitzen die Nomenklatur P2Y₁⁻, P2Y₂⁻, P2Y₄⁻, P2Y₆⁻,

P2Y₁₁⁻, P2Y₁₂⁻, P2Y₁₃⁻ und P2Y₁₄⁻-Rezeptor (Abbraccio et al., 2003; Abbraccio et al., 2006). Den Arbeitsgruppen um Lustig et al. und Webb et al. gelang es 1993 erstmals einen G-Protein gekoppelten P2Y-Rezeptoren zu klonieren (Lustig et al., 1993; Webb et al., 1993). Die metabotropen P2Y-Rezeptoren besitzen sieben Transmembrandomänen und ihre Polypeptidsequenz hat eine Länge zwischen 308 und 377 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von etwa 40 bis 55 kDa entspricht (Ralevic & Burnstock, 1998). Der N-Terminus der Polypeptidkette und drei Loops liegen im extrazellulären Raum. Einige positiv geladene Aminosäurereste konnten als mögliche Nukleotidbindestellen in den äußeren Bereichen der Transmembrandomänen identifiziert werden (Jiang et al., 1997; Abbraccio et al., 2006; Erb et al., 2006). Die drei intrazellulären Loops und der C-Terminus liegen im Cytosol und können mit den membranverankerten trimeren G-Proteinen interagieren [Abbildung 1 B]. Diese Interaktionsmöglichkeit erklärt die Einteilung der P2Y-Rezeptoren in die Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen. In den letzten Jahren konnte die Interaktion verschiedener P2Y-Rezeptorsubtypen mit den vier unterschiedlichen heterotrimeren G-Proteinen G_s, G_{i/0}, G_{q/11} und G_{12/13} gezeigt werden (Abbraccio et al., 2006; Köles et al., 2008). Derzeit am besten untersucht sind die G_{q/11} vermittelten Signalwege der P2Y_{1, 2, 4, 6 und 11}-Rezeptorsubtypen und die G_{i/0} vermittelten Signalwege der P2Y_{12, 13 und 14}-Rezeptoren. Der P2Y₁₁-Rezeptorsubtyp kann sowohl mit dem G_{q/11}⁻, als auch mit dem G_s-Protein interagieren. Bei dem P2Y₂⁻ und P2Y₁₂⁻-Rezeptorsubtypen ist zudem bekannt, dass sie mit dem G_{12/13}-Protein wechselwirken können (Erb et al., 2006; Köles et al., 2008). Das G_s-Protein kann die Adenylylcyclase (AC) aktivieren, das G_{i/0}-Protein hingegen inhibiert sie. Das G_{q/11}-Protein aktiviert die Phospholipase Cβ (PLCβ) [Abbildung 2 und 3].

Die P2-Rezeptor vermittelten Signalwege über die PLCβ und die AC

Die PLCβ und die AC werden durch unterschiedliche G-Proteine aktiviert. Sie selbst sind in eukaryotischen Zellen an verschiedenen Signaltransduktionswegen beteiligt und interagieren mit verschiedenen Effektorproteinen. Die Aktivierung der PLCβ durch das G_{q/11}⁻ Protein induziert die enzymatische Spaltung des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphats (PIP₂) in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃). Das IP₃ kann frei im Cytosol diffundieren und aktiviert den in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) befindlichen ionotropen IP₃-Rezeptor [Abbildung 2]. Die Bindung von IP₃ an den ionotropen IP₃-Rezeptor öffnet den integrierten Kanal und ermöglicht so das Passieren von Ca²⁺-Ionen.

Das ER, das Periplasma des Zellkerns und die Mitochondrien können als Ca^{2+} -Speicher fungieren (Berridge, 1993; Moccia et al., 2002).

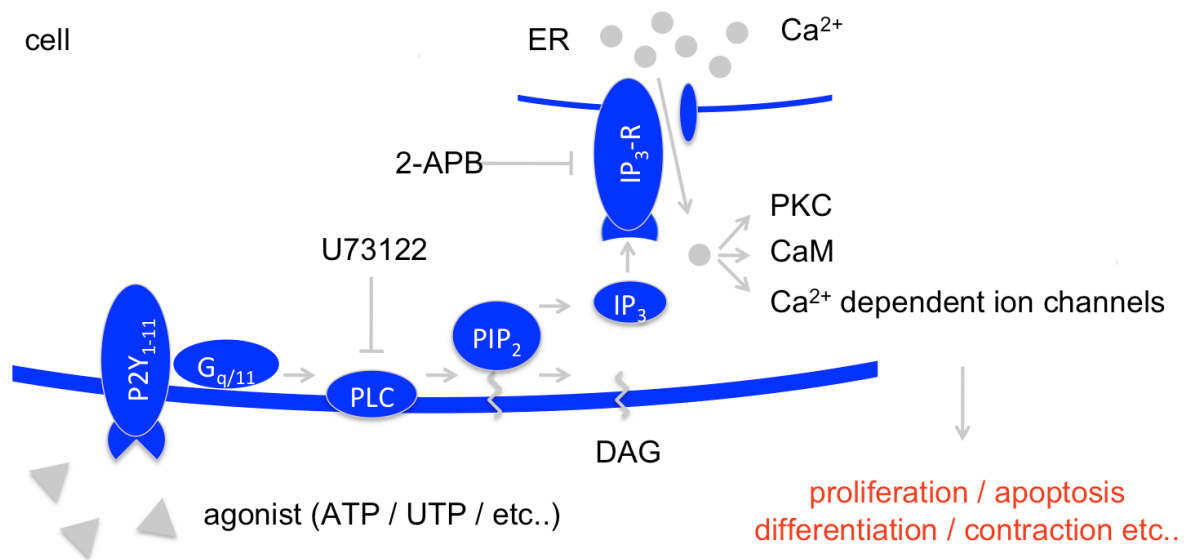


Abbildung 2

Der Signalweg der $\text{G}_{q/11}$ -Protein gekoppelten P2Y-Rezeptorsubtypen. Nach der Bindung des Agonisten an den P2Y-Rezeptor wird das $\text{G}_{q/11}$ -Protein aktiviert. Dieses aktiviert die PLC β , welche die enzymatische Spaltung des PIP₂ in IP₃ und DAG induziert. Das IP₃ kann die ionotropen IP₃-Rezeptoren des ERs aktivieren und so zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung führen (PLC = Phospholipase C β ; PIP₂ = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; DAG = Diacylglycerin; IP₃ = Inositoltrisphosphat; IP₃-R = IP₃-Rezeptor; ER = Endoplasmatisches Retikulum) Mit den Inhibitoren U73122 oder 2-APB kann der $\text{G}_{q/11}$ -Protein gekoppelte Signalweg inhibiert werden. Das Ca^{2+} als Second Messenger kann die Proteinkinase C (PKC), Calmodulin (CaM) und Ca^{2+} abhängige Ionenkanäle steuern, was Auswirkungen auf die Zellphysiologie haben kann.

Im ER lassen sich Ca^{2+} -Konzentrationen im mikromolaren (μM) Bereich messen, im Cytosol liegen die Ca^{2+} -Konzentrationen im Bereich von nur 100 - 300 Nanomolar (nM) und extrazellulär hingegen im millimolaren (mM) Bereich (Munaron, 2006). Die sehr niedrige Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol der Zelle wird durch den aktiven Transport von Ca^{2+} -Ionen über die Zellmembran in den extrazellulären Raum bzw. über die ER-Membran in das Lumen des ERs hinein bewerkstelligt. Bestimmte Pumpen, die *plasma membrane calcium ATPase* (PMCA) sowie die *Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase* (SERCA), befördern Ca^{2+} unter Energieverbrauch gegen den Konzentrationsgradienten in den extrazellulären Raum oder in die Speicher und halten auf diese Weise die niedrige Konzentration von wenigen nM im Cytosol aufrecht (Carafoli & Brini, 2000). Die Aktivierung der $\text{G}_{q/11}$ -Protein gekoppelten P2Y₁-, P2Y₂-, P2Y₄-, P2Y₆- und ₁₁-Rezeptorsubtypen durch ihre jeweiligen Agonisten können

letztendlich über den Signalweg P2Y / G_{q/11}-Protein / PLCβ / IP₃ / IP₃-Rezeptor die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem ER induzieren [Abbildung 2].

Bei den über das G_{i/o}- bzw. G_s-Protein vermittelten Signalwegen der P2Y₁₁₋₁₄-Rezeptorsubtypen und dessen anschließende Interaktion mit der AC wird hingegen die enzymatische Umsetzung von cytosolischen ATP in den Second Messenger cyclisches Adenosin 5'-monophosphat (cAMP) gesteuert. Das durch die P2Y₁₁₋₁₄-Rezeptorsubtypen aktivierte G_{i/o}-Protein inhibiert bzw. das G_s-Protein aktiviert die AC und führt somit letztendlich zu einer Erhöhung oder Erniedrigung in der Konzentration des cytosolischen Second Messengers cAMP im Cytosol [Abbildung 3] (Erb et al., 2006; Köles et al., 2008).

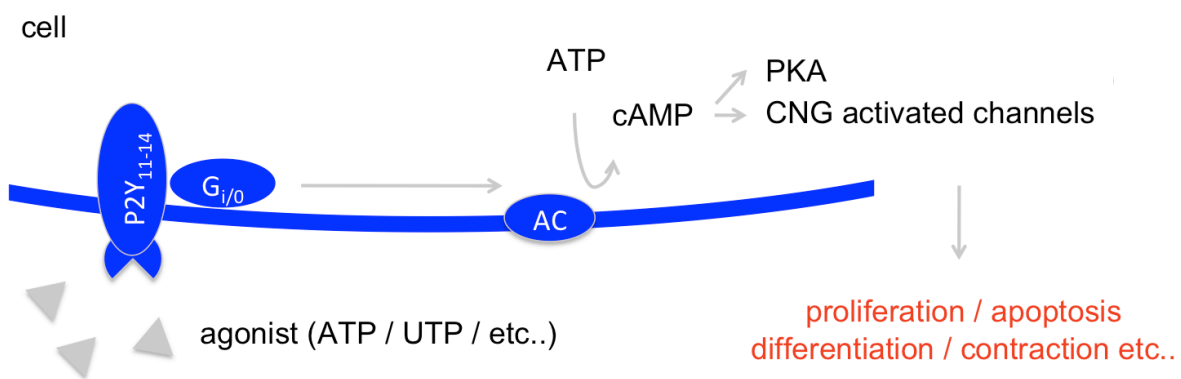


Abbildung 3

Der Adenylylcyclase (AC) vermittelte Signalweg der P2Y_{11, 12, 13 und 14}-Rezeptorsubtypen. Über G_{i/o} oder G_s-Proteine kann die AC inhibiert oder aktiviert werden und so die intrazelluläre Konzentration des Second Messengers cyclisches Adenosin 5'-monophosphat (cAMP) regulieren. cAMP kann die Proteinkinase A (PKA) aktivieren. Diese kann mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren interagieren und so Einfluss auf die Genexpression verschiedener Gene ausüben. Die simultane Aktivierung des hier beschriebenen und des in Abbildung 2 beschriebenen Signalweges in einer Zelle ist möglich, wenn die Zelle parallel mehrere Subtypen der P2Y-Rezeptoren exprimiert.

Die Pharmakologie der P2-Rezeptoren und dessen Aktivierung bzw. Inhibition durch unterschiedliche Agonisten und Antagonisten ist komplex. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die derzeit bekannten und gut untersuchten rezeptorspezifischen Agonisten oder Antagonisten einiger P2-Rezeptoren [Tabelle 1]. Deutlich wird, dass eine gezielte Inhibition oder eine gezielte Aktivierung einzelner Rezeptorsubtypen durch die unspezifischen Reaktionsweisen der Subtypen nur eingeschränkt möglich ist.

Fast alle Rezeptoren, P2X und P2Y gleichermaßen, reagieren sensitiv auf das Purinnukleotid ATP. Die P2X-Rezeptoren besitzen eine hohe Affinität für α,β -methylene ATP ($\alpha\beta$ -meATP) und Benzoylbenzoyl-ATP (BzATP). Die P2Y-Rezeptoren sind zusätzlich zu dem Agonisten ATP

zumeist auch sensitiv für das Nukleotid-Diphosphat ADP (P2Y₁) oder UDP (P2Y₆). Das Pyrimidinnukleotid UTP aktiviert die P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptorsubtypen. Adenosine 5'-(3-thiotriphosphate) (ATP_γS) kann die P2Y₁-, P2Y₂- und P2Y₁₁-Rezeptorsubtypen aktivieren.

Tabelle 1

Liste der verschiedenen Agonisten und Antagonisten der in den Publikationen untersuchten purinergischen Rezeptoren. ATP ist in der Lage, fast alle Rezeptorsubtypen zu aktivieren. UDP ist in niedrigen Konzentrationen hoch spezifisch für den metabotropen P2Y₆-Rezeptorsubtyp. UTP ist der Agonist der P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptoren. Die P2X₄-, P2X₅- und P2X₇-Rezeptorsubtypen können durch BzATP und αβ-meATP aktiviert werden.

Rezeptor	Agonisten							Antagonisten
	ATP	ADP	UTP	UDP	ATP _γ S	αβ-meATP	BzATP	
P2Y ₁	++	++			+			Suramin, PPADS, RB-2
P2Y ₂	++		++		+			Suramin
P2Y ₄	++		++					RB-2, PPADS
P2Y ₆		+	+	++				RB-2, Suramin, MRS 2578
P2Y ₁₁	+				+		+	Suramin, NF157
P2X ₄	++					+	+	Brilliant blue G
P2X ₅	++				+	+	+	Suramin, PPADS
P2X ₇	+						++	Brilliant blue G, KN-62

Es gibt nur wenige Inhibitoren, die spezifisch einen einzelnen Subtyp inhibieren können. 1,4-Di(3-(3-isothiocyanatophenyl)thioureido)butane (MRS2578), ein Analog des Disodium 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonate (DIDS), hemmt im Konzentrationsbereich einiger nM spezifisch den P2Y₆-Rezeptor. Zumeist jedoch inhibieren die bekannten Blocker wie z. B. Pyridoxal phosphate-6-azo(benzene-2,4-disulfonic acid) (PPADS) oder Suramin eine Vielzahl an verschiedenen P2-Rezeptorsubtypen, was die genaue Analyse einzelner Rezeptorsubtypen erschwert (von Kügelgen, 2006).

Die Signalwege der Second Messenger cAMP und Ca²⁺

Die P2-Rezeptor vermittelten Konzentrationsänderungen der Second Messenger Ca²⁺ und cAMP sind eng verknüpft mit verschiedenen Signalwegen, welche in der Physiologie der Zelle eine bedeutende Rolle spielen und mit gravierenden Änderungen im Zellverhalten der

Zelle einhergehen können [Abbildung 2 und 3] (Erb et al., 2006). So kann z. B. Ca^{2+} als Second Messenger Ca^{2+} abhängige Ionenkanäle wie die *Ca²⁺ dependent chlorid channels* oder die *Ca²⁺ activated K⁺ channels* beeinflussen (Vergera et al., 1998; Nilius & Droogmans, 2003). Der bekannteste Signalweg des Ca^{2+} wird über die Proteinkinase C (PKC) vermittelt (Nishizuka, 1995). Die PKC wird durch cytosolisches Ca^{2+} und DAG aktiviert, wobei letzteres aus der Spaltung des PIP_2 durch die $\text{PLC}\beta$ entsteht. Die aktivierte PKC kann bestimmte Zielproteine phosphorylieren, unter anderem sogenannte Transkriptionsfaktoren, und diese so aktivieren bzw. inhibieren. Die Transkriptionsfaktoren regulieren die Genexpression von einer Vielzahl an verschiedenen Genen in der Zelle.

Eine dritte Möglichkeit ist die Interaktion von Ca^{2+} mit Calmodulin (CaM), einem Ca^{2+} bindenden regulatorischen Protein, welches unter anderem die Calmodulin abhängige Kinase (CaMK) aktivieren kann. Diese Kinase kann, ähnlich der PKC, verschiedene gen-regulierende Proteine wie z. B. das *cAMP response element binding protein* (CREB) aktivieren, welches ebenfalls als Transkriptionsfaktor im Zellkern beteiligte Gene am Zellwachstum, der Apoptose oder der Differenzierung zu regulieren vermag (Erb et al., 2006).

Eine Änderung in der Konzentration des zweiten intrazellulären Second Messengers cAMP kann ähnliche Auswirkungen auf die Genexpression der Zelle haben. cAMP reguliert unter anderem die Proteinkinase A (PKA), welches wiederum ähnlich wie die PKC verschiedene Transkriptionsfaktoren regulieren und auch im Cytosol mit unterschiedlichen Enzymen wechselwirken kann.

Die Second Messenger und auch weitere hier nicht genannte P2-Rezeptorvermittelte Signalwege üben u. a. Einfluss auf die Differenzierung, die Proliferation, die Muskelkontraktion und die Zellbewegung von Zellen aus (Burnstock, 2006; Erlinge & Burnstock, 2008). Eine Beteiligung der P2-Rezeptoren über die oben beschriebenen Signalwege konnte in einer Vielzahl von Zellen und Geweben gezeigt werden. Frühe Studien zu den purinergischen Rezeptoren und ihren Signalwegen wurden am Herzen und am Blutgefäßsystem durchgeführt, später erweitert auf die Thrombozytenaggregation (Emmelin & Feldberg, 1948; Born, 1962; Hashimoto et al., 1964). An einer Beteiligung der Rezeptoren an der Muskelkontraktionen (Herz-, glatte und gestreifte Muskelzellen), an der Neurotransmission (Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten, etc.), im zentralen und peripheren Nervensystem, an der Immunantwort, bei Entzündungsreaktionen, dem Schmerz, an der Modulation der Herzfunktion und der endo- und exokrinen Sekretion und

anderen Transportwegen wird geforscht und publiziert (Gordon, 1986; Seifert & Schultz, 1989; Olsson & Pearson, 1990; Dubyak & El-Moatassim, 1993; Dalziel & Westfall, 1994; Fredholm, 1995; Ralevic & Burnstock, 1998).

Calcium Imaging

Ein *Monitoring* des intrazellulären Calciums $[Ca^{2+}]_i$ und dessen Änderungen in einer Zelle ist erschwert durch die geringe Konzentration an Ca^{2+} -Ionen im Inneren der Zelle - aber zugleich von größtem Forschungsinteresse, da Ca^{2+} als Second Messenger in der Physiologie der Zelle eine bedeutende Rolle einnimmt. Grynkiewicz, Poenie und Tsien haben in dem *Journal of Biological Chemistry* 1985 die Synthese neuartiger Fluoreszenzfarbstoffe beschrieben, mit welchen ein genaues Messen des intrazellulären Calciums $[Ca^{2+}]_i$ möglich geworden ist (Grynkiewicz et al., 1985). Die chemischen Strukturen der Fluoreszenzfarbstoffe ermöglichen den Molekülen über eine Tetra-Anionen Struktur zweiwertige Ionen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} zu binden. Durch die Bindung der Ionen werden die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs verändert, wobei sich wiederum die Fluoreszenzintensität ändert. Die Fluoreszenzfarbstoffe aus der Arbeitsgruppe von Tsien besaßen im Gegensatz zu älteren Vorgängern eine deutlich höhere Affinität für Ca^{2+} -Ionen und eine bessere Selektivität für Ca^{2+} -Ionen gegenüber anderen zweiwertigen Ionen. Zudem wurde die Fluoreszenzintensität einiger Farbstoffe um ein Vielfaches erhöht und ein leichter Anregungswellenlängenshift weg vom ultravioletten Bereich erzielt, was die Farbstoffe attraktiver in Bezug zu der Beladung der Zellen (geringere Mengen), in der Selektivität für Ca^{2+} -Ionen (spezifischere Signale), in der Photonenausbeute (geringere Anregungsenergien) und die Verträglichkeit für die Zellen (weniger UV-Bestrahlung) gemacht hat.

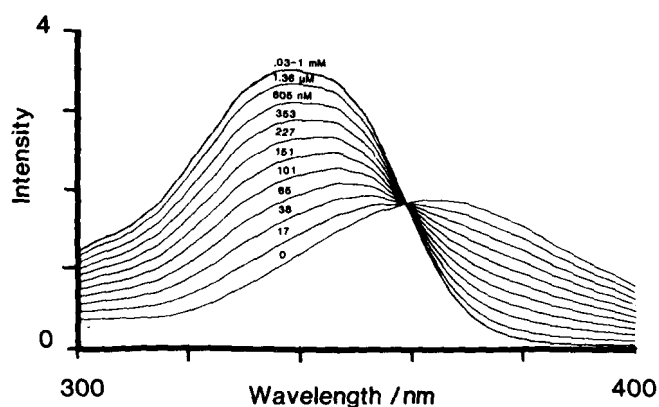


Abbildung 4

Das Anregungsspektrum von 1 mM Fura-2 AM bei 20 °C mit variierenden freien Ca^{2+} -Konzentrationen zwischen 1 nM und 10 pM im Puffermedium. Die Emission des Farbstoffes wurde bei 510 nm detektiert (Grynkiewicz et al., 1985).

Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 Acetoxymethylester (AM) konnte Veränderungen in der $[Ca^{2+}]_i$ in Zellen oder in Geweben deutlich besser detektieren als Farbstoffe der älteren Generation. Fura-2 AM wird mit den zwei Wellenlängen 340 und 380 nm (*Dual excitation ratio Imaging*) angeregt. Eine gegenläufige Änderung in der Fluoreszenzintensität [Abbildung 4] ist in Abhängigkeit des Konformationszustandes des Farbstoffes zu beobachten.

Die ionengebundene Konformationsform zeigt eine hohe Fluoreszenzintensität bei der Anregungswellenlänge 340 nm, die ionenfreie Konformation hingegen eine hohe Intensität bei 380 nm Anregungswellenlänge. Durch die anschließende Berechnung des Ratio-Wertes

$$Ratio = \frac{F_{340\text{ nm}}}{F_{380\text{ nm}}}$$

kann die relative intrazelluläre Calciumkonzentrationsänderung einzelner, ausgewählter Zellen bestimmt werden, wobei die Änderungen des Ratio-Wertes proportional zu den Änderungen in der $[Ca^{2+}]_i$ sind.

Bei Fura-2 AM liegt die Anregungswellenlänge im ultravioletten Bereich, wobei aber durch die erhöhte Photonenausbeute in der Fluoreszenz des Farbstoffes die Anregungsenergie sehr gering gehalten werden kann. Dies minimiert zellschädigende Effekte wie Apoptose oder Nekrose. Ein weiterer Ca^{2+} sensitiver Farbstoff ist Fluo-4 AM (Gee et al., 2000). Die Anregungs- und Emissionswellenlängen des Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-4 AM liegen im sichtbaren Bereich bei 490 / 515 nm (Gee et al., 2000).

Die Beladung der Zellen mit den Farbstoffen wird durch die an ihnen synthetisch angefügte Acetoxymethylestergruppe gewährleistet. Die AM-Gruppe macht den Farbstoff permeabel für die Zellmembran. Im Inneren der Zelle werden diese durch zelleigene Esterasen abgeschnitten, was die weitere Diffusion des Farbstoffes über Membranen, z. B. wieder in den extrazellulären Raum zurück, verhindert.

Elektrophysiologie / Patch-Clamp-Technik

Die elektrophysiologische Patch-Clamp-Technik ermöglicht das Messen von kleinsten Ionenströmen über die Membran und das Detektieren von Veränderungen im Membranpotential der Zelle. Leider ist die Messmethode auch eine der zeitaufwändigsten und komplexesten Methoden der Zellbiologie. Zeitweise auch eine der Frustrierendsten. Dennoch

ist mit viel Geduld und Beharrlichkeit die Möglichkeit gegeben, am Ende einen detaillierten Einblick in die komplexen physiologischen Prozesse einer Zelle zu bekommen.

Ursprünglich wurde die Patch-Clamp-Technik von Erwin Neher und Bert Sakmann 1976 auf Basis der Voltage-Clamp-Technik entwickelt (Neher & Sakmann, 1976; Cole, 1979). Mit Hilfe dieser Methode gelang es ihnen, in Einzelkanälen der Zelle erstmals Ströme im Bereich von wenigen Picoampere (pA) zu messen und so die bis dato unbekannt komplexen Eigenschaften einiger Ionenkanäle zu verstehen und zu erklären (Neher & Sakmann, 1976, Sakmann & Neher, 1984; Neher & Sakmann, 1992). Die Technik hat die Ionenkanalforschung revolutioniert und damit zu enormen Fortschritten in den Wissensgebieten der Neurobiologie, der Pharmakologie und der Medizin geführt.

Bei der Patch-Clamp-Methode kann mittels einer Referenzelektrode im Außenmedium und einer zweiten Elektrode in einer feingezogenen Glaskapillare, welche mit einem Mikro-manipulator an die Zellmembran herangefahren wird, über eine komplexe elektrische Schaltung der Strom bzw. das Membranpotential der Zelle gemessen werden [Abbildung 5].

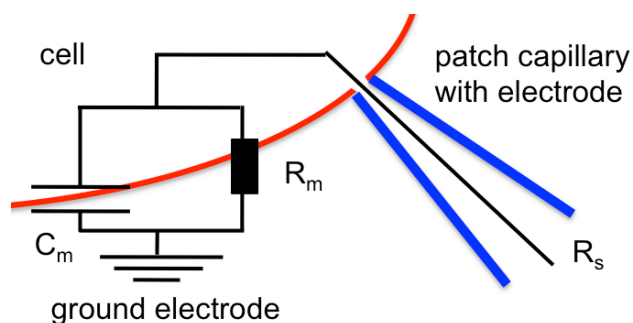


Abbildung 5

Vereinfachtes Schaltbild des Patch-Clamp-Aufbaus in der Whole-Cell-Konfiguration. R_m ist der Membranwiderstand. R_s deutet den Serienwiderstand der Kapillare an. C_m ist die Kapazität der Membran

Die *Perforated-Patch-Clamp*- und *Whole-Cell-Patch-Clamp-Configuration* sind zwei Messkonfigurationen der Patch-Clamp-Technik für Ganzzelleableitungen. Beide Konfigurationen erlauben die Messung von Strömen oder Spannungen über die gesamte Zellmembran einer Zelle (Hamill et al., 1981; Rae et al., 1991). In der *Whole-Cell-Patch-Clamp-Configuration* wird der Membranfleck unter der Kapillare durch einen starken Unterdruck aufgerissen. Die Elektrode der Glaskapillare befindet sich nun bildlich gesprochen "in" der Zelle. Mit Hilfe der zweiten Elektrode im Außenmedium können so Spannungen und Ströme über die Membran induziert, bzw. gemessen werden. Bei der *Whole-Cell-Patch-Clamp-Configuration* muss das Pipettenmedium optimal an die inneren cytosolischen Verhältnisse der jeweiligen gepatchten Zelllinie angepasst sein, um das physiologische Gleichgewicht der

Zellen nicht zu stören oder zu beeinflussen, da die beiden Flüssigkeiten ein Kontinuum bilden [Abbildung 6 A] (Hamill et al., 1981).

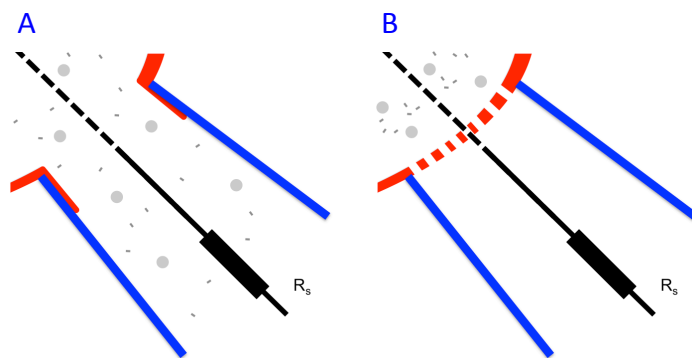


Abbildung 6

Whole-Cell-Patch-Clamp-Konfiguration (A) und Perforated-Patch-Clamp-Konfiguration (B)

In der *Perforated-Patch-Clamp-Konfiguration* wird die Membran unter dem Patch nicht zerstört sondern durch ein in dem Kapillarium enthaltendes Antibiotikum perforiert (Rae et al., 1991). Die Poren ermöglichen Leitfähigkeitsmessungen ähnlich wie in der *Whole-Cell-Patch-Clamp-Konfiguration*, verhindern aber aufgrund ihrer geringen Größe das Passieren von Metaboliten aus der Zelle in die Kapillare [Abbildung 6 B]. In den Ganzzellableitungen kann das Membranpotential der Zelle oder aber auch die Ströme über die gesamte Zellmembran gemessen werden. Mit der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung kann das Membranpotential U_m der Zelle - unter der Voraussetzung, dass die Ionenkonzentrationen der verschiedenen Räume (innen und außen) und die Permeabilitäten der einzelnen Ionen näherungsweise bekannt sind - theoretisch berechnet werden,

$$U_m = \frac{R \cdot T}{F} \ln \frac{p_K [K^+]_o + p_{Na} [Na^+]_o + p_{Cl} [Cl^-]_i}{p_K [K^+]_i + p_{Na} [Na^+]_i + p_{Cl} [Cl^-]_o}$$

wobei R die Gaskonstante ($8,3143 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), T die Temperatur in Kelvin (Raumtemperatur 298 K), F die Faradayische Konstante ($96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$) ist (Offner, 1991).

PCR / quantitative RealTime-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Standard-Methode zur Genexpressionsanalyse (Kleppe et al., 1971; Saiki et al., 1985; Mullis & Faloona, 1987). Mit der PCR kann ein definierter Teil der DNA unter Zuhilfenahme von zwei flankierenden, kurzen komplementären Oligonukleotiden (sogenannte *Primer*) und einer hitzestabilen DNA-Polymerase (einem DNA-Synthese Enzym) amplifiziert, also vervielfältigt werden. Bei der

PCR wird die doppelsträngige Ausgangs-DNA erhitzt, wobei sie in die Einzelstränge denaturiert (*denaturation*). Anschließend wird der Reaktionsansatz abgekühlt, wobei sich die *Primer* an die Einzelstränge anlagern können (*annealing*). Zuletzt wird der Reaktionsansatz auf die optimale Temperatur der DNA-Polymerase wieder erhitzt, welche nun die beiden Einzelstränge komplementär ergänzt (*elongation*) [Abbildung 7].

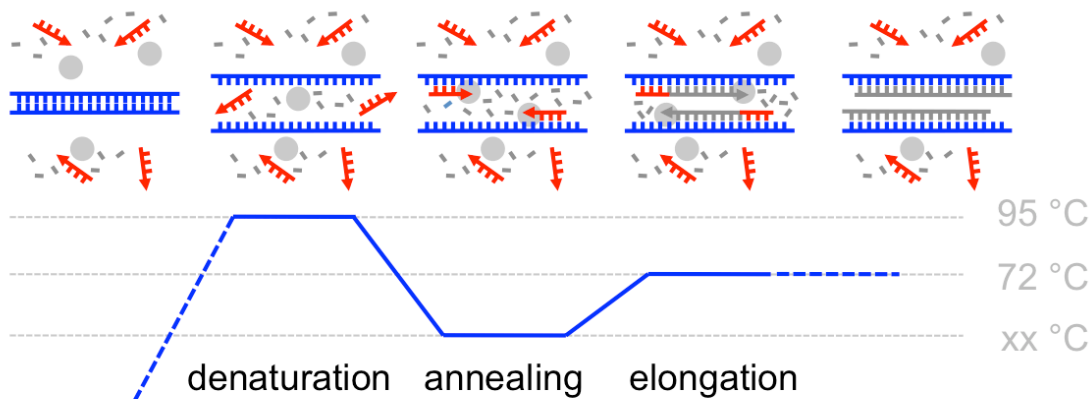


Abbildung 7

Die DNA kann in der PCR mittels spezifischer *Primer* und einer hitzestabilen Polymerase amplifiziert werden. Bei der Denaturierung trennen sich die komplementären DNA-Stränge. Anschließend wird der Reaktionsansatz abgekühlt, wobei die zu dem zu amplifizieren Bereich passenden *Forward* und *Reverse Primer* spezifisch binden können. Die DNA-Polymerase ergänzt die DNA-Stränge in der Elongation und vervielfältigt sie damit.

In diesem Ablauf der Temperaturwechsel entsteht als Produkt die doppelte Menge an eingesetzter Ausgangs-DNA. Wird dieser Zyklus mehrere Male wiederholt, so kann eine große nachweisbare Menge an DNA gewonnen werden. Um eine erfolgreiche Amplifikation zu detektieren, werden die unterschiedlichen PCR-Produkte in einem Gel aufgetrennt und angefärbt. Bei Bedarf können sie sequenziert werden, die Nukleotidabfolge bestimmt und mit Gen-Datenbanken verglichen werden.

Die eingesetzte Ausgangs-DNA für die PCR ist ein Pool an in den Zellen vorhandener mRNA, welche isoliert und in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben wird. Die letztendlich vorhandenen cDNAs geben indirekt darüber Auskunft, welche Gene die Zelle zu dem Zeitpunkt der RNA-Isolierung exprimiert hat und welche Proteine mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Zelle synthetisiert werden.

Die quantitative RealTime-PCR beruht auf dem Prinzip der konventionellen PCR und erlaubt zu der qualitativen Bestimmung zusätzlich eine Quantifizierung der eingesetzten Nukleinsäuren bzw. der ursprünglich isolierten RNA-Moleküle. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen, deren Signal während eines PCR-Zyklus erfasst werden ([Wittwer et al., 1997](#); [Bustin, 2000](#)). Ein für die quantitative RealTime-PCR genutzter Farbstoff ist das *SYBR Green*, welcher mit der doppelsträngigen DNA interkalieren kann. Der daraus resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex und die gemessene Fluoreszenz zwischen den Zyklen nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Für die quantitative Analyse wird die exponentielle Phase wegen der optimalen Reaktionsbedingungen herangezogen. Die Quantifizierung selbst wird mit Hilfe einer internen Kontrolle als Bezugsgröße durchgeführt, womit die zu untersuchenden Proben untereinander verglichen werden können. Als interne Kontrolle wird ein *housekeeping gene* verwendet, welches in allen Zellen eines Gewebes oder auch in unterschiedlichen Geweben möglichst mit gleicher Kopienzahl exprimiert wird ([Bustin, 2000](#)).

Transfektion / Optoperforation

In der Experimentator-Buchreihe „Molekularbiologie / Genomics“ wird die Thematik dieses Abschnittes mit folgendem Satz eingeleitet: „Die Zahl der Methoden, DNA in eine kleine, wehrlose Zelle zu befördern, ist erstaunlich groß.“ ([Mülhardt, 2006](#)). Der Begriff „Transfektion“ umschreibt diese Vielzahl an verschiedenen Methoden zum Einbringen von Fremd-DNA oder RNA in eine eukaryotische Zelle. Das Problem fast aller Transfektionsmethoden ist dabei, dass die DNA oder RNA aufgrund ihrer elektrischen Ladung und Größe impermeabel für tierische und pflanzliche Zellwände und Zellmembranen ist. Die Aufnahme des fremden genetischen Materials muss bei den meisten Transfektionsmethoden darum förmlich „erzwungen“ werden.

Eine gute Transfektionsmethode sollte zellfreundlich sein, eine hohe Viabilität der Zellen gewährleisten (bzw. eine niedrige Mortalitätsrate) und dennoch eine gute Transfektionseffizienz besitzen. Es hat sich gezeigt, dass bei einer ausgewählten Zelllinie abhängig von der gewählten Methode Schwankungen in der Effizienz der Transfektion von 20 - 90 % zu beobachten sind. Gleiches ist bei der Mortalitätsrate der Zellen zu beobachten. Besitzt die Wissenschaftlerin oder der Wissenschaftler jedoch nur eine begrenzte Menge an (kostbaren)

lieb gehegten und gepflegten Zellen, gar Raritäten wie Stammzellen oder mühsam isolierte Primärzellen, dann ist eine hohe Effizienz und eine niedrige Mortalitätsrate wünschenswert. Zumeist wird bei der Transfektion das genetische Material in Form von ringförmigen DNA-Molekülen, sogenannter Expressionsvektoren (Plasmide oder Vektoren), in die Zelle eingebracht. Das Zielgen in ihrer DNA-Sequenz kann von der Zelle exprimiert, die Proteine synthetisiert und dann in ihrer Funktionalität untersucht werden. Mittels der RNA-Interferenz ist es zudem seit einigen Jahren möglich, in Zellen spezifische Proteine mit recht geringem Aufwand in ihrer Expression herunterzuregulieren, also eine Art von kurzfristigem *knock-out* zu induzieren. Auch hierzu muss fremdes genetisches Material, in diesem Fall RNA, in die Zelle eingebracht werden.

Die Transfektionsmethoden selbst unterscheiden sich in ihren Verfahren, um das genetische Material in die Zelle einzubringen. Der virusvermittelte Gentransfer wird als Transduktion bezeichnet und nutzt komplexe virale Systeme zum Einbringen des genetischen Materials. Nicht-virale Vektoren sind normalerweise nicht immunogen und apathogen, was mit einer geringen Toxizität einhergeht (Douglas, 2008). Physikalische Transfektionsmethoden wie die Mikroinjektion oder die Transfektion durch Beschuss (*particle delivery*) werden hauptsächlich für die Herstellung transgener Tiere oder für die Transfektion von Pflanzenzellen genutzt. Bei der Mikroinjektion wird die zu transfizierende Zelle mit einer Glaskapillare angestochen und das genetische Material direkt in die Zelle oder in den Zellkern injiziert. Hierbei muss jede Zelle einzeln mit der Kapillare angefahren werden was mit einem hohen Zeit- und Arbeitsaufwand, Expertise und Geschicklichkeit verbunden ist [Abbildung 8] (Capecchi, 1980).

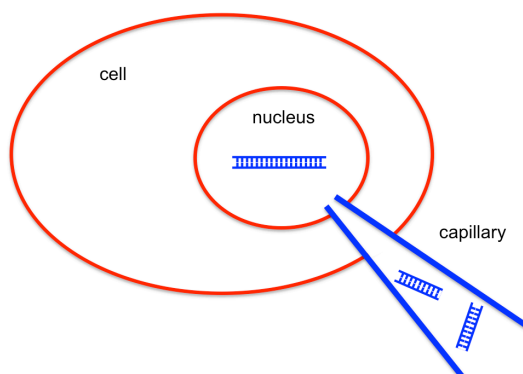


Abbildung 8

Bei der Mikroinjektion wird das genetische Material mittels einer feinen Glaskapillare direkt in die Zelle, bzw. in den Kern injiziert.

Bei der Transfektion durch Beschuss werden kleinste Wolfram- oder Goldpartikel mit dem genetischen Material beschichtet, durch eine *particle gun* beschleunigt und auf die Zellen

geschossen. Die beladenen Partikel werden durch ein grobmaschiges Sieb abgebremst, wobei sich die DNA löst und im Anschluss mit großer Geschwindigkeit auf die Zellen trifft und letztendlich so in die Zellen integriert wird (Klein et al., 1987).

Zur Zeit am Besten etablierte Transfektionsmethoden sind die sogenannte Elektroporation und die Transfektion mit kationischen Liposomen (= Lipofektion). Bei der Elektroporation werden Suspensionszellen zusammen mit dem genetischen Material in ein Elektroporationsmedium gegeben. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes an diese Flüssigkeit werden die darin enthaltenen Zellen kurzfristig permeabilisiert. Vermutlich kann über die induzierten Poren das genetische Material in die Zelle diffundieren (Zimmermann et al., 1974; 1996; Somiari et al., 2000). Bei falsch gewählten elektrischen Feldern jedoch induziert die Methode ein großes Zellsterben. Die Mortalitätsrate kann teilweise 50–80 % betragen, was die Methode für Primär- oder Stammzellen oftmals ungeeignet macht.

Die Lipofektion, ein chemisches Verfahren, nutzt positiv geladene Lipide für die Transfektion. Aufgrund ihrer Ladung können diese mit der negativ geladenen DNA oder RNA interagieren (Felgner et al., 1987; Templeton, 2002). Gleichzeitig bilden sich aufgrund des amphiphilen Charakters der Phospholipide in wässriger Lösung sogenannte Liposomen. Diese können mit der Zellmembran fusionieren oder durch Endozytose von der Zelle aufgenommen werden und so ihre DNA- oder RNA-Fracht in die Zellen schleusen [Abbildung 9 A und B] (Templeton, 2002).

Um diese Methode zu beschleunigen, haben Scherer et al. die Magnetofektion entwickelt (Scherer et al., 2002, Plank et al., 2003). Die Transfektionseffizienz der Lipofektion hängt zumeist davon ab, inwieweit die Lipid/DNA-Komplexe Kontakt zu den Zellen ausüben können, um zu fusionieren oder durch Endozytose aufgenommen zu werden.

Im wesentlichen ist es eine Frage der Anziehung, des Wartens und der Hoffnung, dass die Lipokomplexe beim Herabfallen auf Zellen treffen und vielleicht fusionieren. Um dies zu beschleunigen und die Kontaktaufnahme zu erzwingen, werden bei der Magnetofektion superparamagnetische Nanopartikel mit dem genetischen Material beladen. Diese Partikel, meist aus Eisenoxid, werden mit Polyethylenimin beschichtet, welches in wässriger Lösung als Polykation vorliegt (ähnlich der Lipofektion) und ebenso mit der negativ geladenen DNA oder RNA interagieren kann. Diese Superparamagnetischen-DNA-Nanopartikel-Komplexe werden anschließend zu den Zellen gegeben und ein externes magnetisches Feld mit Hilfe

von Magneten angelegt, welche die Partikel auf die Zellen herabzieht und so den Kontakt „erzwingt“ (Scherer et al., 2002, Plank et al., 2003).

Die Transfektion mit kationischen Lipiden besitzt bei den meisten Zelllinien eine hohe Transfektionseffizienz und eignet sich, um Plasmide und siRNA in Zellen zu transfizieren.

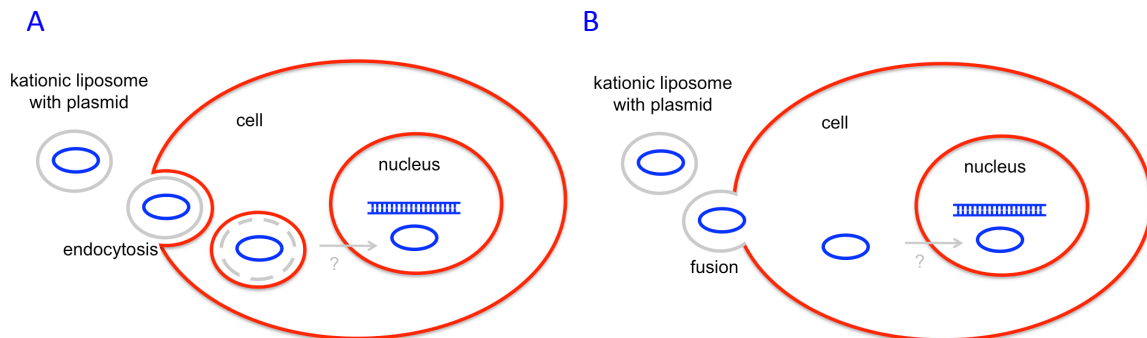


Abbildung 9

Schematische Darstellung der Lipofektion: (A) zeigt den endozytotischen Weg, bei dem die DNA oder RNA beladenen Liposomen in die Zelle internalisiert werden. Bei (B) fusionieren die Liposomen mit der Zellmembran und schleusen so ihre Fracht in die Zelle. Der Transport des fremden genetischen Materials in den Kern hinein ist noch nicht eindeutig geklärt.

Die Arbeitsgruppe um Karsten König veröffentlichte im Jahr 2002 eine laserbasierte Transfektionsmethode, bei der in Einzelzellen gezielt eine Transfektion herbeigerufen werden konnte (Tirlapur & König, 2002). Mittels eines auf die Zellmembran fokussierten Femtosekundenlasers mit einer Zentralwellenlänge im nahen Infrarotbereich (800 nm) kann eine lokale, transiente Pore in der Membran erzeugt werden. Hierfür wird der ultrakurz gepulste Laser mittels eines Objektivs mit einer hohen numerischen Apertur in einem möglichst kleinen Fokusvolumen auf die Plasmamembran der Zelle fokussiert [Abbildung 10] (Zeira et al., 2007; Uchugonova et al., 2008). Durch die Pore kann genetisches Material aus dem Außenmedium in die Zellen hineindiffundieren (Tirlapur & König, 2002; Baumgart et al., 2008).

Eine darauf aufbauende laserbasierte Transfektionsmethode kann mittels Gold-Nanopartikeln durchgeführt werden. Bei der Wechselwirkung von Laserstrahlung mit den plasmonischen Nanopartikeln kann abhängig von den Laserbestrahlungsparametern, der Größe und der Form der Partikel ein optischer Durchbruch an dessen Oberfläche erzeugt werden (Pitsillides et al., 2003; Pustovalov et al., 2008). Die Nanopartikel können während

der Bestrahlung fragmentieren oder schmelzen (Pustovalov et al., 2008). Die Gold-Nanopartikel (80 – 250 nm) werden dafür zu den Zellen gegeben, für einige Stunden inkubiert und dann mit einem schwach fokussiertem Femtosekundenlaser großflächig bestrahlt. Die Bestrahlung lässt die Zellmembran an den Stellen perforieren, an denen sich Nanopartikel befinden - dies ermöglicht die Diffusion von genetischem Material in die Zelle hinein.

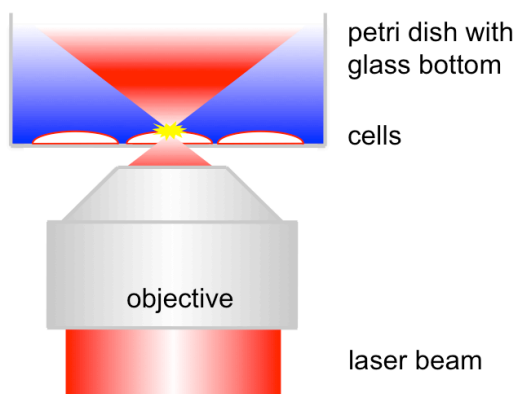


Abbildung 10

Schematische Darstellung der laserbasierten Transfektion. Der auf die Membran fokussierte Laserstrahl perforiert diese und ermöglicht so einen Austausch an intra- und extrazellulärer Flüssigkeit. Durch die Diffusion gelangen die im extrazellulären Medium gelösten DNA oder RNA-Moleküle in die Zelle.

Bei der Transfektion ist die Effizienz des Gentransfers und die Viabilität der Zellen von entscheidender Bedeutung. Nicht jede Zelle oder jeder Zellverbund lässt sich mit jeder Methode gleich gut und gleich schnell transfizieren. Wie viel an genetischem Material pro Zelle eingebracht wird, ist zumeist unbekannt. Zudem ist der Weg der DNA/RNA-Aufnahme und der Transport dieser in den Zellkern (Überqueren der Zellmembranen, Internalisierung und intrazelluläre Transportwege) noch nicht bei jeder Transfektionsmethode bekannt oder im Detail untersucht worden.

RNA Interferenz / gene silencing

Die RNA Interferenz (RNAi) beschreibt einen auf RNA basierten molekularbiologischen Effekt mit dem es möglich ist, gezielt die Expression einzelner Gene zu unterdrücken. Die Unterdrückung in der Expression des Gens verhindert die Synthese des Proteins und damit dessen Funktion. Bisher wurden Untersuchungen zur Genexpression bestimmter Einzelgene zumeist mittels transgener Organismen durchgeführt. Diese herzustellen ist arbeitsaufwendig und häufig führen bereits die induzierten *knock-outs* eines einzelnen Gens zu nicht lebensfähigen Organismen, da das Gen für die Entwicklung unabdingbar ist.

Zwei Arbeitsgruppen versuchten 1990 ein pigmentproduzierendes Gen in die Pflanzenart der Gattung *Petunia* einzubringen, um die tiefviolette Färbung der Blüten zu verstärken (Napoli et al., 1990; van der Krol et al., 1990). Sie erreichten jedoch mit ihrer Methode einen gegenteiligen Effekt - die Blüten verloren ihre Pigmentierung. Heute ist bekannt, dass das künstlich eingeführte Gen und das natürliche, homologe endogene Gen sich gegenseitig auf der posttranskriptionalen RNA-Ebene (*post-transcriptional gene silencing*) unterdrückt haben. Es hat sich gezeigt, dass das *gene silencing* die Genexpression, bzw. die Transkription vieler Gene reguliert, indem es die mRNA-Stabilität und die Chromatinstruktur kontrolliert. 1998 konnte die Arbeitsgruppe um A. Fire erstmals zeigen, dass doppelsträngige RNA (dsRNA) an der Unterdrückung der Genexpression einzelner Gene beteiligt ist (Fire et al., 1998). Es konnte damit geklärt werden, wie eine spezifische Inaktivierung einzelner mRNA's und dessen Translation möglich ist.

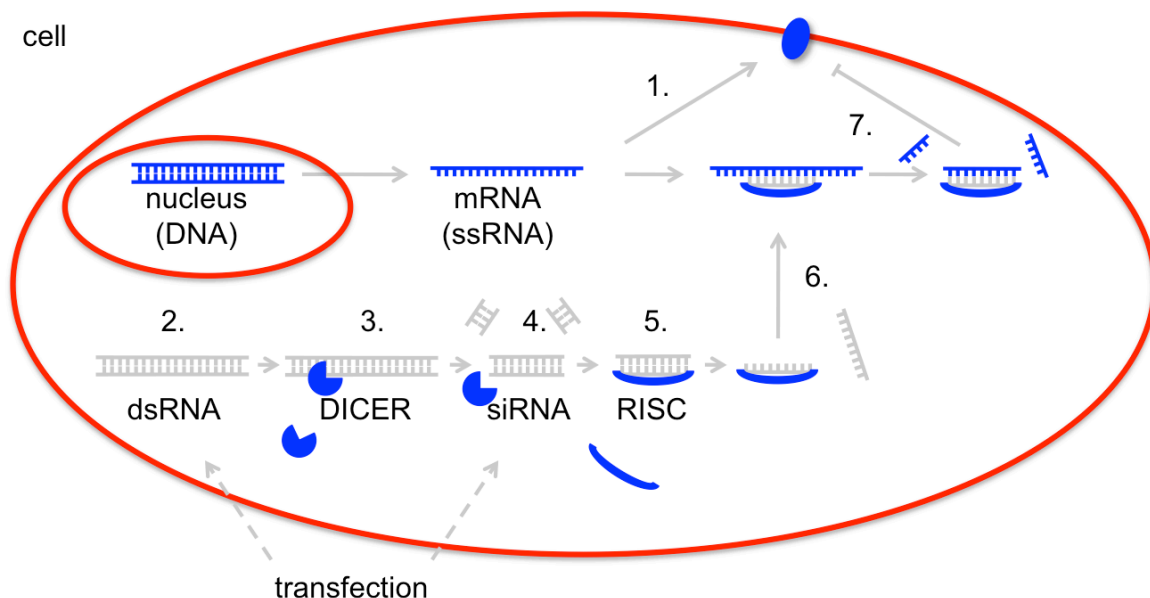


Abbildung 11

(1.) zeigt den normalen Weg der Proteinbiosynthese. Teilbereiche der doppelsträngigen DNA im Zellkern werden in einzelsträngige mRNA transkribiert. Die mRNA wird translatiert und das Protein synthetisiert. Wird doppelsträngige RNA in die Zellen eingebracht (2. oder 4.), so wird diese von dem Enzym Dicer erkannt (3.) und in kleine 21 Basen lange doppelsträngige siRNA-Moleküle geschnitten (4.). Diese werden von dem RISC-Komplex gebunden (5.). Einen der Stränge entfernt der RISC-Komplex. Der RISC-Komplex mit der gebundenen einzelsträngigen RNA kann nun über diese die komplementäre zugehörige einzelsträngige mRNA binden (7.) Es entsteht erneut doppelsträngige RNA in der Zelle, welche ebenfalls abgebaut wird. Hierbei wird die für das Protein kodierende mRNA zerstört, was die Synthese des Proteins verhindert.

Die doppelsträngigen RNA-Moleküle werden von einem Enzym namens Dicer (RNase) erkannt und in kurze etwa 20-28 Basen lange dsRNA-Moleküle geschnitten, welche als *short-* oder *small-interfering RNA* (siRNA) bezeichnet werden. Diese siRNA's werden von einem weiteren Enzymkomplex namens *RNA-Induced Silencing-Complex* (RISC) erkannt, gebunden und zuletzt spezifisch einer der beiden Stränge entfernt [Abbildung 11].

Der RISC und der verbliebene einzelsträngigen RNA-Strang kann andere noch intakte komplementäre und spezifisch passende mRNA's in der Zelle binden und inaktivieren, indem er sie ebenfalls zerschneidet. Durch diesen Effekt werden nach und nach die zur siRNA passenden komplementären mRNA-Moleküle in der Zelle abgebaut und eine Synthese des eigentlichen Proteins letztendlich verhindert.

In der Regel werden 21 Basen lange *ex vivo* synthetisierte siRNA's für ein *gene silencing* genutzt. Bei längeren Molekülen kann bei Säugerzellen eine Interferon-Antwort induziert werden, was zu einer Reduzierung der gesamten Proteinbiosynthese und zusätzlich zu einem Abbau aller vorhandenen mRNA's in der Zelle führt (Elbashir et al., 2001; Meister & Tuschl et al., 2004). Die siRNA-Moleküle können mittels der Transfektion in die Zielzellen zu einem gewünschten Zeitpunkt eingebracht werden und dort die Herunterregulation des betreffenden Gens zeitlich begrenzt induzieren.

2. Ergebnisse

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Physiologie der unterschiedlichen purinergischen Rezeptoren in zwei Zelllinien, einer Granulosazelllinie aus der Ratte und einer humanen Endothelzelllinie der Blut-Hirn Schranke.

Endothelzellen der Blut-Hirn Schranke umkleiden die kapillaren Blutgefäße und halten die verschiedenen Milieubedingungen im angrenzenden Gehirngewebe aufrecht. Sie verhindern das Eindringen von Viren, Pathogenen und Toxinen in das Hirngewebe. Selektiv transportieren sie Nährstoffe für den hohen Stoffwechsel- und Nährstoffbedarf des Gehirns in das Gehirngewebe und zudem Stoffwechsel-Abbauprodukte aus dem Gewebe in den Blutkreislauf. Sie sind mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung und Regulation des Ionenhaushaltes der extrazellulären Umgebung in dem Hirngewebe, welche für die neuronale Reizweiterleitung elementar ist ([Abbott et al., 2006](#)). Die Neuronen, die glatten Muskelzellen und die Zellen des Blutsystems (z. B. Thrombozyten, rote Blutkörperchen, Mastzellen, etc.) können ATP sezernieren und freisetzen, was die Permeabilität der Blut-Hirn Schranke kontrollieren oder auch Stoffwechselwege wie z. B. die Sezernierung von Prostaglandinen und Stickstoffmonoxiden beeinflussen kann ([Olesen, 1989](#); [Boarder & Hourani, 1998](#)).

Die Granulosazellen hingegen sind Follikelepithelzellen, die maßgeblich an der Entwicklung und Reifung der Oocyte während des Ovarialzyklus beteiligt sind. Auch diese regulieren den Austausch von Nährstoffen, Ionen, Wachstumsfaktoren und verschiedenen Second Messengern. Die Oocyte und die umliegenden Follikelepithelzellen bzw. Granulosazellen bilden das Ovarialfollikel.

Die für die Differenzierung der Oocyte wichtigen Faktoren werden direkt über Zell/Zell-Verbindungen transportiert (Gap Junctions) oder durch die Sekretion von Molekülen vermittelt, an denen die Granulosazellen maßgeblich mitbeteiligt sind ([Albertini & Anderson, 1974](#); [Li & Mather, 1997](#); [Wright et al., 2001](#)). Während der Entwicklung und Reifung der Oocyte nimmt dessen Größe im Durchmesser durch eine erhöhte Teilungsrate der Granulosazellen und durch die Ausbildung eines flüssigkeitsgefüllten Raumes im Follikel, dem sogenannten Antrum, um ein Vielfaches zu. Granulosazellen exprimieren während der Differenzierung als einzige Zellen des weiblichen Organismus den FSH-Rezeptor (Follikelstimulierendes Hormon). Das von dem Hypophysenvorderlappen produzierte FSH induziert über diese ebenfalls G-Protein gekoppelten Rezeptoren das Follikelwachstum und die Follikelreifung in den Eierstöcken über cAMP vermittelte Signalwege ([Keren-Tal et al., 1993](#)).

Die Entstehung des Antrums wird in dieser Entwicklungsphase vermutlich durch die Sezernierung von Wasser, Ionen, cAMP, Proteinen, Hormonen und anderen organischen Molekülen induziert.

Es konnte bereits in älteren Studien gezeigt werden, dass Granulosazellen funktionelle nukleotidsensitive Rezeptoren exprimieren (Kamada et al., 1994; Tai et al., 2000, 2001). Auch in den Endothelzellen der Blut-Hirn Schranke verschiedener Spezies, unter anderem in der Ratte und in dem Rind, wurden funktionelle P2X- und P2Y-Rezeptoren nachgewiesen (Vigne et al., 1994; Albert et al., 1997; Sipos et al., 2000; Yamazaki et al., 2006). Die Rolle der purinergischen Rezeptoren in ihrer Funktion für die Granulosazellen und den Endothelzellen der Blut-Hirn Schranke sind jedoch weitestgehend unbekannt.

Um die Funktionalität der purinergischen Rezeptoren in den Endothelzellen und Granulosazellen detailliert zu analysieren, wurde die Ca^{2+} -Imaging Technik und die Patch-Clamp-Technik genutzt. Mit der Ca^{2+} -Imaging Technik werden Konzentrationsänderungen des Second Messengers Ca^{2+} in dem Cytosol der Zelle gemessen. Die verschiedenen Nukleotidagonisten wie z. B. ATP oder UTP vermitteln über die P2-Rezeptoren unterschiedliche Ca^{2+} -Signale. Abhängig davon, welche Rezeptorsubtypen, G-Proteine und Ionenkanäle die Zelle exprimiert, werden unterschiedliche Signalwege in der Zelle aktiviert. Mit der Patch-Clamp-Technik können P2-Rezeptorvermittelte Membranpotentialänderungen detektiert werden.

Mit der PCR kann auf genetischer Ebene überprüft werden, welche mRNA's der verschiedenen P2-Rezeptoren in der Zelle vorhanden sind und welche Rezeptorsubtypen somit eventuell in der Zelle funktionell translatiert werden und an möglichen physiologischen Reaktionen beteiligt sind. Mit dem siRNA vermittelten *gene silencing* werden gezielt einzelne dieser Rezeptorsubtypen in ihrer Expression reduziert. Auf diese Weise kann der Einzelbeitrag einzelner P2-Rezeptorsubtypen zu den aktivierten Signalwegen analysiert werden. Mit der quantitativen RealTime-PCR kann die siRNA induzierte Reduzierung der mRNA quantifiziert werden. Die siRNA kann mittels verschiedener Transfektionsmethoden, z. B. der Lipofektion, in die Zellen eingebracht werden. Eine weitere mögliche Transfektionsmethode ist die laserbasierte Optoperforation, mit der ebenfalls genetisches Material gezielt in ausgewählte Einzelzellen transfiziert werden kann.

Die vorliegende kumulative Dissertation bezieht sich auf die drei Publikationen „*Purinergic signalling in rat GFSHR-17 granulosa cells: an in vitro model of granulosa cells in maturing follicles*“ (Bintig et al., 2009) [Anhang A], „*Purinergic receptors and Ca^{2+} signalling in the*

human blood-brain barrier endothelial cell line hCMEC/D3“ (Bintig et al., 2011, in submission) [Anhang B] und „Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living GFSHR-17 and MTH53 a cells“ (Baumgart et al., 2008) [Anhang C]. Diese drei ausgewählten Publikationen sind aufgrund der Thematik, der genutzten Zelllinien und den Methoden nah beieinander einzugliedern. Die nächsten drei Abschnitte dieser Arbeit geben die jeweiligen Inhalte der einzelnen Publikationen kurz zusammengefasst wieder und diskutieren diese.

Purinergic signalling in rat GFSHR-17 granulosa cells: an in vitro model of granulosa cells in maturing follicles (Bintig et al., 2009) [Anhang A]

In der Ratten Granulosazelllinie GFSHR-17 wurde die Expression und Funktionalität von purinergischen Rezeptoren der P2Y-Rezeptorsubtypenklasse gezeigt. Die extrazelluläre Nukleotidzugabe im mikromolaren Bereich (μM) induziert in den Granulosazellen eine Ca^{2+} -Freisetzung im Cytosol. Diese Änderung in der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) ist in den Granulosazellen P2Y₂-, P2Y₄- und P2Y₆-Rezeptorsubtypenvermittelt und konnte mittels der Ca^{2+} -Imaging Technik unter Zuhilfenahme des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 AM gezeigt werden. Bei der Applikation des Agonisten ATP nimmt die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von etwa 100 nM auf 200 nM zu [Abbildung 12 A]. Die Ca^{2+} -Freisetzung kann mit Purin-Agonisten wie ATP, aber auch mit Pyrimidinen wie UTP, induziert werden [Anhang A, Fig. 1 B, S. 88; Fig. 2 B, S. 89].

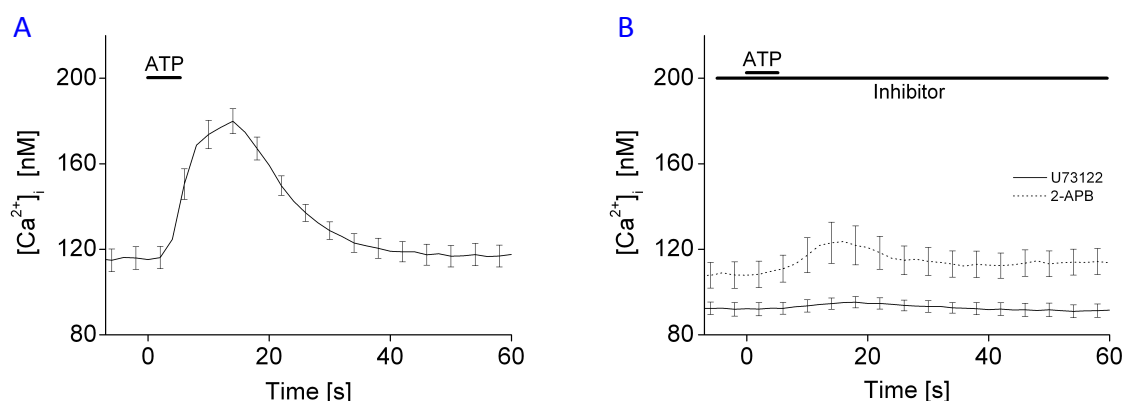


Abbildung 12

Die Nukleotidzugabe von 25 μM ATP für 3-5 Sekunden induziert in den Granulosazellen eine intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (A). Durch die Inhibitoren der Phospholipase C β (U73122, 10 μM) oder der IP₃-Rezeptoren (2-APB, 100 μM) wird eine Änderung in der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unterdrückt (B).

Eine UTP vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung deutet direkt auf das Vorhandensein von metabotropen G-Protein gekoppelten P2Y-Rezeptorsubtypen hin, da dieser Agonist ausschließlich Rezeptorsubtypen wie P2Y₂ und ₄, sowie mit etwas schlechterer Affinität den P2Y₆ Rezeptorsubtypen aktiviert [Tabelle 1 und Abbildung 2].

Eine ATP vermittelte Änderung in der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ könnte auch durch einen Ca^{2+} -Ioneneinstrom aus dem extrazellulären Medium durch die Aktivierung eventuell exprimierter ionotroper P2X-Rezeptoren zurückzuführen sein. Um dies zu prüfen, wurde (i) ATP in Ca^{2+} freiem Medium appliziert. Hierbei zeigt sich, dass weiterhin eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in der Zelle zu beobachten ist [Anhang A, Fig. 2 A, S. 89]. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Änderung ist somit nicht von einem Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum abhängig. Hingegen kann (ii) bei der Inhibition der PLC β mit dem Blocker U73122 und auch bei der Inhibition der IP₃-Rezeptoren mit 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) nach der ATP-Applikation keine Ca^{2+} -Freisetzung mehr beobachtet werden [Abbildung 12 B]. Beide Inhibitoren blockieren den G_{q/11}-Protein vermittelten Signalweg der P2Y-Rezeptorsubtypen, nicht aber eine mögliche Aktivierung der P2X-Rezeptoren [Abbildung 2]. Die Versuche lassen auf die Expression der G_{q/11}-Protein gekoppelten P2Y-Rezeptorsubtypen P2Y₂, P2Y₄ und P2Y₆ in den Granulosazellen schließen. Mit dem Western Blot, einer analytischen Technik zum Nachweis von Proteinen mittels spezifischer Antikörper, wurde das Vorhandensein der P2Y₂-, P2Y₄- und P2Y₆-Rezeptorsubtypen in den Zellen verifiziert [Anhang A, Fig. 2 E, S. 89].

Zusätzlich zu den Ca^{2+} -Messungen wurden simultan mit der Patch-Clamp-Technik elektro-physiologische Messungen durchgeführt. Hier hat sich gezeigt, dass die Zugabe der Nukleotide ATP oder UTP (zusätzlich zu den induzierten Ca^{2+} -Freisetzungen) eine Änderung in dem Membranpotential der Zelle hervorruft. Die Applikation der Agonisten ließ die Zellen von ihrem Ruhemembranpotential (etwa -40 mV) um etwa 30 mV auf Membranpotentiale um die -70 mV hyperpolarisieren [Abbildung 13 A]. Bei der Berechnung des Ruhemembranpotentials und dessen Änderungen mit der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung unter Berücksichtigung der gegebenen intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen und den verschiedenen Permeabilitäten der einzelnen Ionen in Granulosazellen ist die Hyperpolarisation entweder durch eine erhöhte K⁺-Ionenpermeabilität oder durch eine verminderte Cl⁻-Ionenpermeabilität vermittelt.

Die ATP (oder auch UTP) induzierte Hyperpolarisation wurde durch Inhibitoren der PLC β (U73122) oder der IP₃-Rezeptoren (2-APB) inhibiert [Abbildung 13 B]. Diese Versuche

verdeutlichen, dass erst spät im Signalweg der Rezeptoren die Hyperpolarisation induziert wird und die P2Y-Rezeptoren (sowie auch eventuell exprimierte P2X-Rezeptoren) selbst nicht direkt an der Membranpotentialänderung in den Granulosazellen beteiligt sind.

Mit Cyclopiazonic Acid (CPA), einem Inhibitor der *Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase* (SERCA-Pumpe), kann eine intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER induziert werden, ohne purinergischen Signalwege zu aktivieren. Der fehlende Rücktransport der Ca^{2+} -Ionen aufgrund der inhibierten Funktion der SERCA-Pumpen führt zu einer Entleerung der Ca^{2+} -Speicher [Anhang A, Fig. 3 B & C, S. 90].

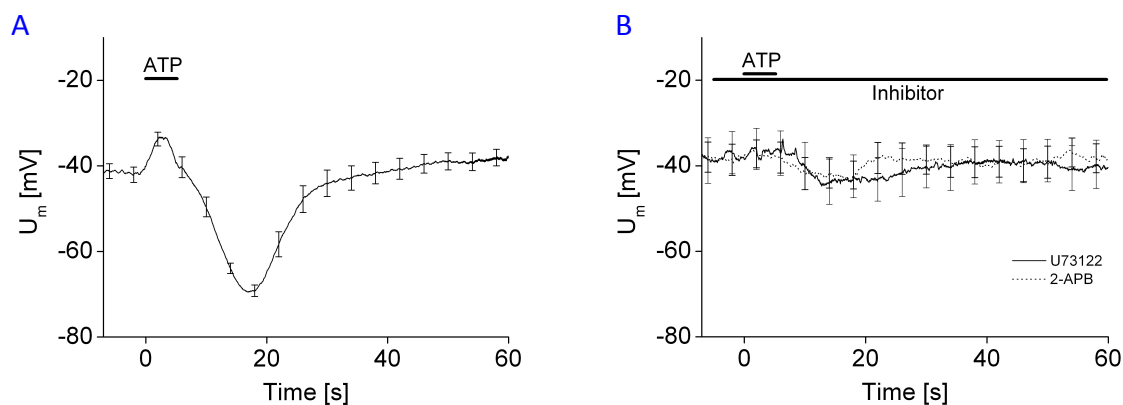


Abbildung 13

Die Nukleotidzugabe von $25 \mu\text{M}$ ATP für 3-5 Sekunden induziert in den Granulosazellen eine Depolarisation von etwa 10 mV gefolgt von einer starken Hyperpolarisation von etwa 30 mV (A). Durch die Inhibition der $\text{G}_{\alpha/11}$ -Protein gekoppelten Signalwege durch die Inhibitoren der Phospholipase $\text{C}\beta$ (U73122, $10 \mu\text{M}$) oder der IP_3 -Rezeptoren (2-APB, $100 \mu\text{M}$) werden die Membranpotentialänderungen unterdrückt (B).

Die durch CPA vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung im Cytosol resultiert direkt in einer Hyperpolarisation. Diese Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist somit bereits ausreichend, in den Granulosazellen eine Hyperpolarisation zu induzieren. Es konnte so gezeigt werden, dass die P2Y-Rezeptorvermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER die Hyperpolarisation induziert. Vermutlich werden über die freigesetzten Ca^{2+} -Ionen im Cytosol Ca^{2+} abhängige Kanäle aktiviert, was die Hyperpolarisation auslösen lässt. Mögliche Ca^{2+} abhängige Kanäle, die an der Hyperpolarisation beteiligt sein könnten, wären Ca^{2+} aktivierte K^+ -Kanäle (erhöhte Permeabilität für K^+ -Ionen; z. B. $p\text{K}^+ = 1 \rightarrow p\text{K}^+ = 10$) oder Ca^{2+} abhängige Cl^- -Kanäle (verminderte Permeabilität für Cl^- -Ionen; z. B. $p\text{Cl}^- = 1 \rightarrow p\text{Cl}^- = 0,01$). Eine erhöhte Kaliumionenpermeabilität geht aufgrund der unterschiedlichen intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen einher mit einem K^+ -Ausstrom. Eine erniedrigte Permeabilität für Cl^- -Ionen resultiert in einem verminderten Ausstrom an Cl^- -Ionen - beides würde die Zelle

hyperpolarisieren lassen. In der Publikation konnte mit elektrophysiologischen Versuchen geklärt werden, dass die nukleotidinduzierte Hyperpolarisation durch Ca^{2+} abhängige Cl^- -Kanäle hervorgerufen wird und nicht durch Ca^{2+} aktivierte K^+ -Kanäle. Eine Blockade der K^+ -Kanäle mit Apamin, Clotrimazol, Iberiotoxin oder Tetraethylammoniumchlorid (TEA) zeigte keinen Einfluss auf die nukleotidinduzierte Hyperpolarisation [Anhang A, Fig. 4 B, S. 91]. Eine Zugabe von den Chloridionenkanalinhibitoren Diphenylamine-2-carboxylic Acid (DPC), Disodium 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonate (DIDS) oder Mibefradil lassen hingegen das Ruhemembranpotential direkt auf Werte um die -70 mV hyperpolarisieren, da p_{Cl^-} vermindert ist [Anhang A, Fig. 4C, S. 91].

Unter der Annahme, dass eine Zugabe von ATP die Permeabilität von $p_{\text{Cl}^-} = 1$ auf $p_{\text{Cl}^-} = 0,01$ reduziert, die Permeabilität der Kanäle jedoch schon durch den Chloridionenkanalinhibitor (z. B. DPC) blockiert und vermindert ist, dürften laut der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung keine weitere Hyperpolarisation nach der Applikation von ATP beobachtet werden. Sollte ATP hingegen die Permeabilität von $p_{\text{K}^+} = 1$ auf $p_{\text{K}^+} = 10$ erhöhen, so könnte trotz des Chloridionenkanalinhibitors und der verminderten Permeabilität von p_{Cl^-} laut der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung noch eine weitere zusätzliche, leichte Hyperpolarisation auf etwa -80 mV bei der Zugabe des Agonisten ATP beobachtet werden. Diese zusätzliche ATP induzierte Hyperpolarisation konnte jedoch nicht gezeigt werden, was letztendlich auf Ca^{2+} abhängige Cl^- -Kanäle schließen lässt [Anhang A, Table 3, S. 92; Fig. 4 C, S. 91].

Purinergic receptors and Ca^{2+} signalling in the human blood-brain barrier endothelial cell line hCMEC/D3 (Bintig et al., 2011, in submission) [Anhang B]:

In den humanen Mikrovaskulärzellen der Blut-Hirn Schranke wurde die Physiologie der P2Y-Rezeptorsubtypen untersucht und charakterisiert. Die Endothelzellen der Blut-Hirn Schranke, welche das Mikrovaskularsystem auskleiden, unterscheiden sich elementar von anderen Endothelzellen durch die Fähigkeit, eine Art von physikalischer Barriere auszubilden. Sie interagieren dabei mit den ihnen umgebenen Astrocyten, Pericyten und Neuronen – und anders herum. Im Zusammenspiel regulieren sie das *Microenvironment* der Neurovaskulären Einheit (Abbott et al., 2006).

Die mögliche Interaktion der Neuronen und Astrocyten von der Gehirnseite aus mit den Endothelzellen der Blut-Hirn Schranke durch die Sekretion oder Freisetzung von ATP und anderen Neurotransmittern, sowie der Kontakt des Blutes mit den darin enthaltenen

Nukleotiden auf der anderen Seite der Endothelzellen lässt auf nukleotidvermittelte Signalwege schließen.

Für die physiologische Charakterisierung der purinergischen Rezeptoren in den Endothelien der Blut-Hirn Schranke wurde in dieser Publikation die humane Blut-Hirn Schranken Endothelzelllinie hCMEC/D3 genutzt (Weksler et al., 2005). In der Zelllinie wurde mit Hilfe der PCR die Expression der P2Y₂, P2Y₆ und P2Y₁₁, sowie der P2X₄, P2X₅ und P2X₇-Rezeptorsubtypen gezeigt [Abbildung 14]. Bei durchgeführten Ca²⁺-Imaging Messungen mit Fluo-4 AM zeigte sich eine starke Ca²⁺-Freisetzung (4-5 facher Anstieg in der Fluoreszenzintensität) bei der Applikation der Agonisten ATP und UTP (P2Y₂ und P2Y₄). Agonisten wie UDP (P2Y₆), BzATP (P2X₇ und P2Y₁₁), sowie ATPγS (P2Y₂ und P2Y₁₁) induzierten nur ein kleines Ca²⁺-Signal (2-3 facher Anstieg in der Fluoreszenzintensität) bei oftmals deutlich höher applizierten Konzentrationen [Abbildung 15]. Der Agonist αβ-meATP (P2X₄ und P2X₅) induzierte keine messbaren Ca²⁺-Signale. Die UTP (und ATP) vermittelte Ca²⁺-Freisetzung konnte durch die Inhibition der PLCβ mit U73122 verhindert werden [Abbildung 15] was auf G_{q/11}-Protein / PLCβ / IP₃ / IP₃-Rezeptor vermittelte Ca²⁺-Signale über die P2Y₂, P2Y₆ und P2Y₁₁-Rezeptorsubtypen schließen lässt. Die Applikation von UTP induziert die stärksten Ca²⁺-Signale, was den P2Y₂-Rezeptor als ehesten Kandidaten für die nukleotidvermittelte Ca²⁺-Freisetzung in der hCMEC/D3 Zelllinie macht [Abbildung 15].

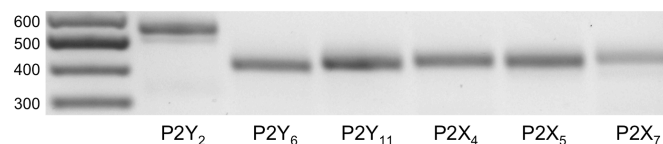


Abbildung 14

Das PCR-Gelbild zeigt die Expression der verschiedenen P2-Rezeptorsubtypen P2Y₂, P2Y₆ und P2Y₁₁, sowie P2X₄, P2X₅ und P2X₇ in den hCMEC/D3 Zellen. Mit genspezifischen *Primern* konnten die einzelnen Rezeptoren amplifiziert und später dessen PCR-Produkte sequenziert und bestätigt werden.

Um den Anteil der einzelnen Rezeptorsubtypen an dem Ca²⁺-Signal zu analysieren, wurden die P2Y₂- und P2Y₆-Rezeptoren durch ein siRNA induziertes *gene silencing* ausgeschaltet. Hierzu wurden die Zellen mittels der Lipofektion mit der jeweiligen siRNA für 48 Stunden transfiziert. Um die Effizienz des *gene silencing* zu bestimmen, wurde 48 Stunden nach der Transfektion die RNA aus den Zellen isoliert und eine quantitative RealTime-PCR durchgeführt. Der mRNA-Gehalt des P2Y₂-Rezeptors ist zu diesem Zeitpunkt mit der

spezifischen siRNA um 98.0 % verringert gewesen. Die mRNA des P2Y₆-Rezeptors um 83.7 % [Anhang B, Fig. 3, S. 25]. Diese Abnahme der P2Y₂ mRNA-Moleküle ging einher mit einer deutlichen Reduzierung in dem Ca²⁺-Signal nach der Zugabe der verschiedenen Agonisten [Abbildung 16].

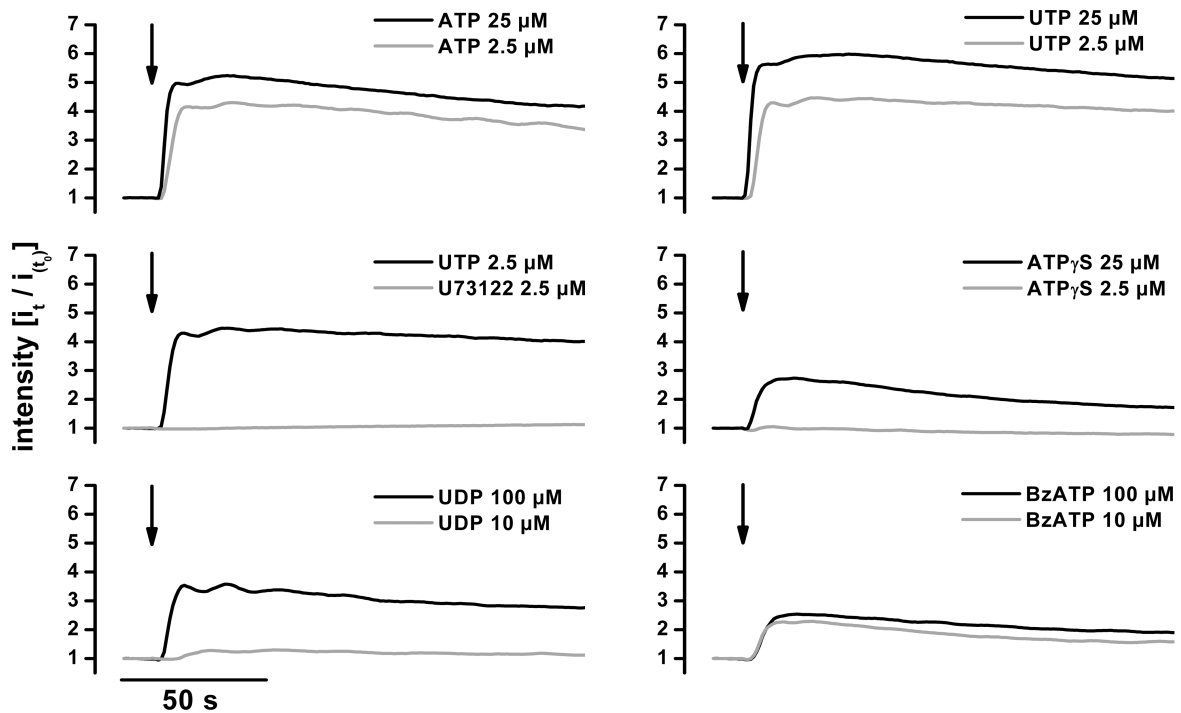


Abbildung 15

Änderungen in den Fluo-4 Fluoreszenzintensitäten nach der Zugabe der verschiedenen Agonisten mit verschiedenen Konzentrationen. ATP und UTP induzieren ähnliche Ca²⁺-Freisetzungen. ATPγS, UDP und BzATP induzieren kleinere Ca²⁺-Signale selbst bei deutlich höheren Konzentrationen. Der PLCβ-Inhibitor U73122 verhindert eine UTP vermittelte Ca²⁺-Freisetzung.

Bei der Applikation von UTP zu Zellen, welche mit einer Negativ-siRNA (*nonsense-sequence*; Kontrolle, induziert kein *gene silencing*) transfiziert wurden, reagierten 86.1 % der Zellen mit einem Ca²⁺-Signal. Für die Definition „Zelle reagiert“ und weitere Auswertungen wurden die Zellen gezählt, bei denen ein zweifacher oder höherer Anstieg in der Fluoreszenzintensität zu der Ausgangsfluoreszenzintensität beobachtet werden konnte. Bei transfizierten Zellen mit der siRNA gegen die P2Y₂ mRNA reagierten nur noch 25.4 % der Zellen. Zusätzlich hat auch die Sensitivität der P2Y₂ siRNA behandelten Zellen für die Agonisten UDP, BzATP und ATPγS um ein Vielfaches abgenommen [Abbildung 16]. Bei der Zugabe von 100 µM UDP konnte

eine Reduzierung von 34.4 % auf 3.4 %, bei 100 μM BzATP von 58.3 % auf 9.8 % und bei 2.5 μM ATP γS von 15.2 % auf 0.0 % beobachtet werden [Anhang B, Table 3, S. 23].

Obwohl die Agonisten UDP, BzATP und ATP γS eher andere Rezeptorsubtypen als den P2Y $_2$ -Rezeptor aktivieren, wurde bereits nach dessen *gene silencing* eine deutliche Reduzierung in der Ca $^{2+}$ -Freisetzung beobachtet. Es wurde damit gezeigt, dass die beobachteten Ca $^{2+}$ -Freisetzungen der Agonisten UDP, BzATP und ATP γS durch eine (unspezifische) Aktivierung der P2Y $_2$ Rezeptoren vermittelt wird [Abbildung 15 und 16].

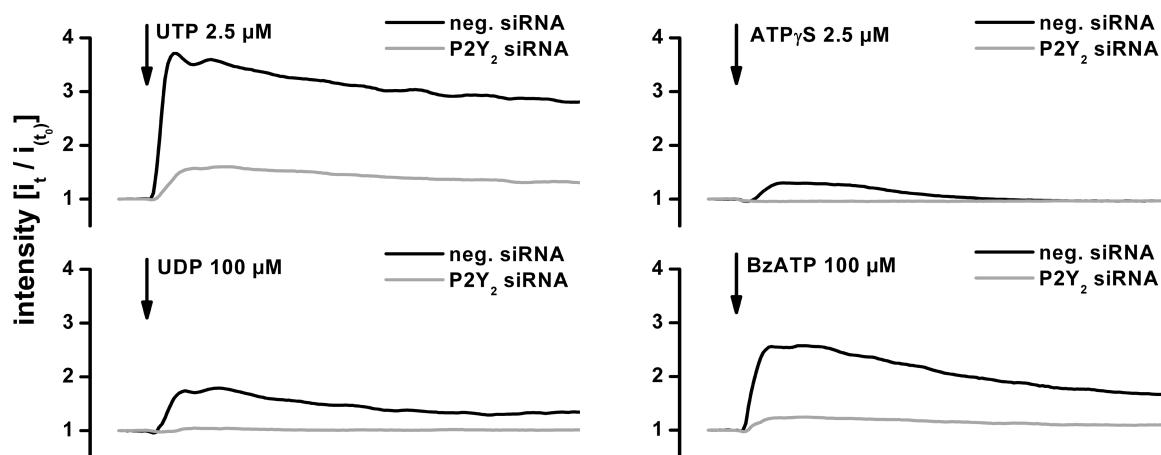


Abbildung 16

Das *gene silencing* des P2Y $_2$ Rezeptorsubtypen mit der spezifischen siRNA reduziert die Ca $^{2+}$ -Signale bei UTP deutlich und unterdrückt sie fast vollständig bei den Agonisten UDP, ATP γS und BzATP. Gezeigt sind hier für den jeweiligen Agonisten die Mittelwerte der normierten Ca $^{2+}$ -Fluoreszenzintensitätsänderungen aus 200-300 Einzelzellen.

Die Reduzierung der P2Y $_6$ mRNA um 83.7 % [Anhang B, Fig. 3, S. 25] durch eine Transfektion der Zellen mit der siRNA gegen die P2Y $_6$ mRNA übt keine Änderungen auf die nukleotid-vermittelten Ca $^{2+}$ -Freisetzungen aus. Die Zugabe verschiedener Agonisten (unter anderem auch UDP) resultiert nicht in einer verminderten Ca $^{2+}$ -Freisetzung wie sie bei dem *gene silencing* des P2Y $_2$ -Rezeptorsubtypen zu beobachten sind (Daten nicht gezeigt).

In dieser Publikation wurde gezeigt, dass die hCMEC/D3 Zellen der Blut-Hirn Schranke funktionelle P2Y $_2$ -Rezeptorsubtypen exprimieren, welche für die beobachteten Ca $^{2+}$ -Freisetzungen verantwortlich sind. Auf der mRNA-Ebene lassen sich zusätzlich zu dem P2Y $_2$ -Rezeptorsubtypen auch die P2Y $_6$ - und P2Y $_{11}$ -, sowie die P2X $_4$ -, P2X $_5$ - und P2X $_7$ -Rezeptorsubtypen nachweisen, wobei diese aber nicht direkt an Ca $^{2+}$ vermittelten Signalwegen beteiligt sind [Abbildung 14 und 16]. Die Zellen reagieren sensitiv auf ATP und UTP. Höhere

Konzentrationen der Agonisten UDP, BzATP und ATP γ S induzieren kleine Ca²⁺-Signale [Abbildung 15]. Die Änderungen in der [Ca²⁺]_i werden nicht durch einen Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺-Ionen durch ionotrope P2X-Rezeptoren hervorgerufen, sondern durch eine Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern wie dem ER. Die Freisetzung der Ca²⁺-Ionen kann durch die Zugabe des PLC β Inhibitors U73122 unterbunden werden. Alle Agonist induzierten Ca²⁺-Freisetzungen können durch das gezielte *gene silencing* des P2Y₂-Rezeptorsubtypen unterbunden werden. Der P2Y₂-Rezeptor ist der dominierende purinergische Rezeptor in der Ca²⁺ vermittelten Signalgebung in den hCMEC/D3 Zellen.

Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living GFSHR-17 and MTH53a cells (Baumgart et al., 2008) [Anhang C]

In dieser Publikation wurde in Kooperation mit dem Laser Zentrum Hannover e. V. eine laserbasierte Zelltransfektion an den GFSHR-17 Granulosazellen durchgeführt. Zusätzlich konnte die Hundezelllinie MTH53a transfiziert werden. Anders als bei der Lipofektion wurde hier mittels eines auf die Membran fokussierten Femtosekundenlasers (fs-Laser) mit Laserpulsenergien von 0,9 Nanojoule (nJ) und einer Einstrahldauer von 40 ms eine Pore induziert, durch die eine Aufnahme von Makromolekülen wie zum Beispiel DNA herbeigeführt werden konnte. In der Arbeit konnte die Hundezelllinie MTH53a erfolgreich mit verschiedenen GFP-Vektoren (pEGFP-C1 und pEGFP-HMGB1) transfiziert werden. Das Markerprotein GFP wurde nach 48 Stunden in den Zellen exprimiert, so dass bei der Anregung mit 488 nm die erfolgreich transfizierten Zellen grün fluoreszierten [Abbildung 17 A und B].

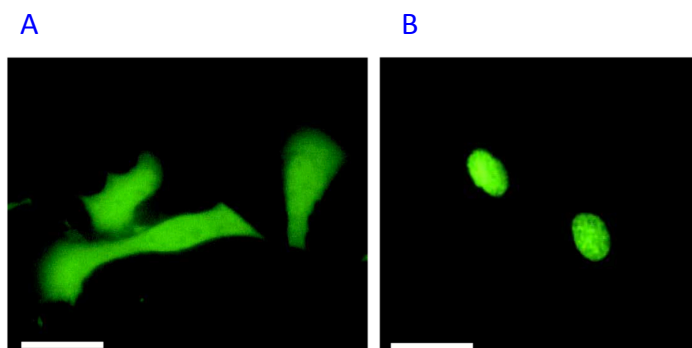


Abbildung 17

MTH53a Zellen transfiziert mit dem Leervektor pEGFP-C1 (A) oder dem Vektorkonstrukt pEGFP-HMGB1 (B). Das Fusionsprotein EGFP-HMGB1 ist im Kern lokalisiert, da es eine Kern-Transportsequenz besitzt. Die Bilder wurden 48 Stunden nach der Transfektion aufgenommen, wobei keine Anzeichen von Apoptose oder Nekrose beobachtet werden konnten.

Bei der Entstehung der Pore durch die Optoperforation entsteht ein bidirektionaler Volumenaustausch zwischen dem intra- und dem extrazellulärem Medium. Stevenson et al.

prognostizierten ein Volumen von wenigen Femtolitern (fl) (Stevenson et al., 2006). Die Patch-Clamp-Technik ermöglicht einen genaueren Einblick in die Vorgänge während der Optoperforation. Hierzu wurden die GFSHR-17 Granulosazellen optoperforiert und simultan Patch-Clamp-Messungen durchgeführt. Während der Laserbestrahlung und der induzierten Porenbildung wurden die Membranpotentialänderungen der perforierten Zelle gemessen. Das Ruhemembranpotential der Zelle betrug etwa -40 mV. Die Bestrahlung mit dem fs-Laser resultierte in einer Depolarisation der Zelle, wobei zwei verschiedene Verläufe abhängig von der Fokussierung des Lasers zur Membran, der Pulsenergie und der Einstrahldauer beobachtet werden konnten. In beiden Fällen stieg das Membranpotential um 2 bis 5 mV [Abbildung 18 A]. Wurde während der Perforation an der Membran keine Gasblase beobachtet, so repolarisierte das Membranpotential langsam auf das Ausgangs-Ruhemembranpotential zurück. Wenn eine Gasblase, beziehungsweise eine Pore erzeugt worden ist, entwickelte sich aus der ersten leichten Depolarisation eine starke Depolarisation um etwa 10-20 mV [Abbildung 18 B]. Die Repolarisierung der Membran erfolgte anschließend innerhalb einiger Sekunden, teilweise bis zu einige Minuten nach der Bestrahlung (Daten nicht gezeigt).

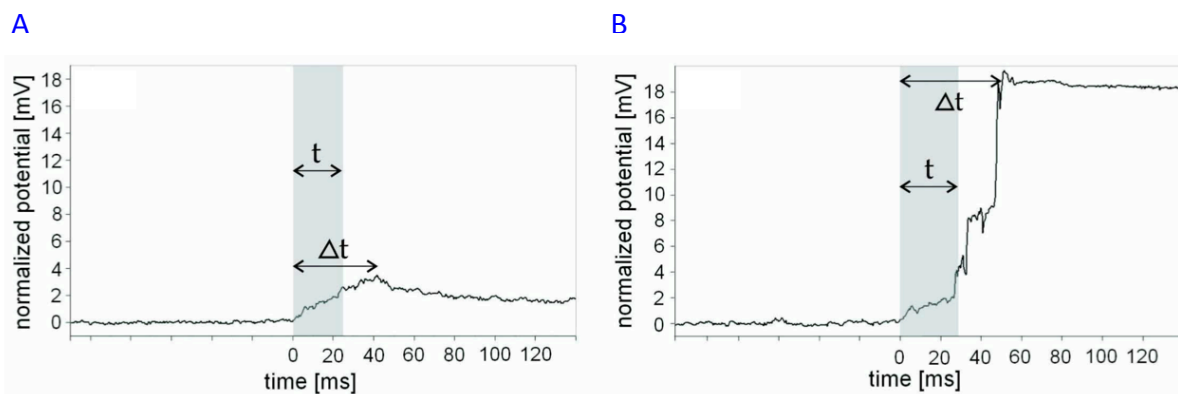


Abbildung 18

Das Membranpotential der Granulosazellen während der laserbasierten Optoperforation. Die 30 ms Einstrahldauer bei einer Pulsenergie von 0.9 nJ sind grau hinterlegt. Bei (A) konnte keine Gasblase, bei (B) konnte eine Blase an der Zellmembran beobachtet werden.

Für die Messung der Viabilität und die Effizienz der Optoperforation wurde der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid verwendet. Dieser Farbstoff kann die intakte Zellmembran nicht überwinden und fluoresziert erst nachdem er mit der DNA interkaliert. Nur wenn eine Gasblase und die starken Membranpotentialänderungen erzeugt und beobachtet werden

konnten, wurde eine Fluoreszenz im Zellkern beobachtet. Verschiedene Pulsenergien und Einstrahldauern hatten Einfluss auf die Aufnahme des Farbstoffes und auf die Viabilität der Zellen. Pulsenergien größer als 1 nJ und Einstrahldauern länger als 40 ms reduzierten die Überlebensraten der Zellen. Eine gute Effizienz in der Farbstoffaufnahme und eine hohe Viabilität der Zellen konnte mit Pulsenergien um die 0.9 nJ und 40 ms Einstrahldauer erreicht werden [Abbildung 19]. Wurde während der Perforation keine Gasblase erzeugt oder nur eine geringe Depolarisation gemessen, so konnte keine Farbstoffaufnahme beobachtet werden.

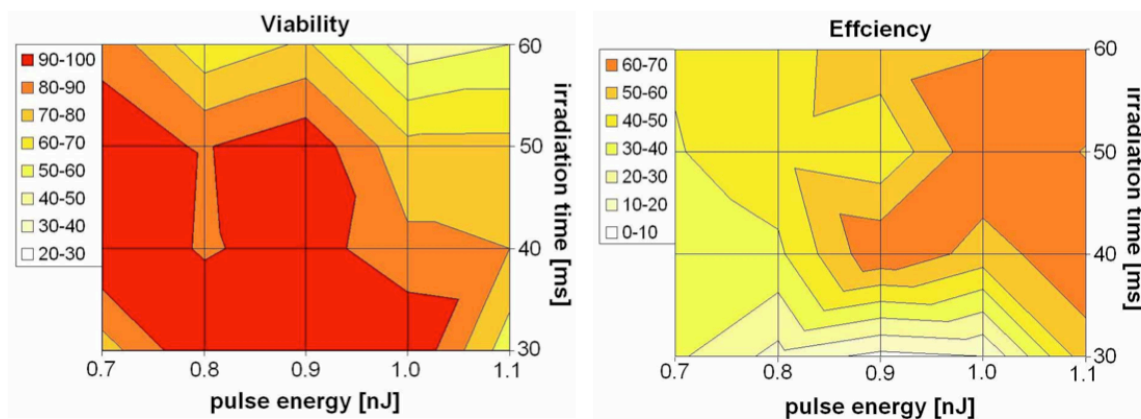


Abbildung 19

Zell-Viabilitäts- und Effizienz-Messungen durchgeführt mit Propidiumiodid in Abhängigkeit von der Einstrahldauer und der Pulsenergie.

Mit den gewonnenen Daten aus den Patch-Clamp-Messungen konnte unter Zuhilfenahme der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung und mit der Annahme, dass das Zellvolumen während des Prozesses konstant bleibt, der relative Volumenaustausch mit der Gleichung

$$\frac{\alpha}{V} = \frac{1 - e^{(-\Delta U_m F / RT)}}{1 - e^{(U_m F / RT)}}$$

berechnet werden, wobei V das Zellvolumen, α das ausgetauschte Volumen, F die Faraday-Konstante ($96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$), T die Temperatur in Kelvin (Raumtemperatur 298 K), R die allgemeine Gaskonstante ($8,3143 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), ΔU_m die Membranpotentialänderung und U_m das Ruhemembranpotential in Volt wiedergibt. Das relativ ausgetauschte Volumen α/V liegt bei 0.4 unter Berücksichtigung der in der Patch-Clamp-Messung gemessenen Membranpotentialänderungen von etwa 10 mV und dem Ruhemembranpotential von etwa -40 mV.

Bei einem ungefähren Durchmesser der Granulosazellen von etwa 10 μm ergibt sich ein Volumen von etwa 500 fl pro Zelle. Bei der Optoperforation und einem α/V von 0.4 würden so circa 200 fl ausgetauscht werden.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde eine Kalibrierungsreihe mit definierten Farbstoffkonzentrationen erstellt, um den berechneten Faktor 0.4 zu verifizieren. Hierzu wurden mittels der Patch-Clamp-Technik definierte Farbstoffkonzentrationen des Farbstoffes Lucifer Yellow in einzelne Zellen injiziert und dessen Fluoreszenzintensitäten gemessen. In nachfolgenden Versuchen wurden gleiche, definierte Farbstoffkonzentrationen im extrazellulären Medium zugegeben und die Zellen im Anschluss optoperforiert. Nach dem Waschen der Zellen durch Austauschen des extrazellulären Mediums wurde anschließend die intrazelluläre Fluoreszenzintensität des und durch die Perforation aufgenommenen und somit in der Zelle verbliebenen Farbstoffes bestimmt [Anhang C, Fig. 4, S. 3027; Table 1, S. 3028]. Bei einer extrazellulären Lucifer Yellow Konzentration von 1 mM wird mit dem Faktor 0.4 nach der Optoperforation intrazellulär eine Konzentration von 400 μM erwartet. Nach der erstellten Kalibrierungsreihe entspricht dies einer Fluoreszenzintensität von ca. 180 Einheiten. Nach der Optoperforation mit der besagten Farbstoffkonzentration konnten wir eine Fluoreszenzintensität von etwa 155 Einheiten messen, was einer Konzentration von 332 μM und einem α/V von 0,33 entspricht. Mit weiteren Lucifer Yellow Konzentrationen (600 μM , 200 μM und 100 μM) konnten wir die α/V -Werte 0.44, 0.35 und 0.37 bestimmen, was den mit der obigen Gleichung berechneten Wert von 0.4 nahe kommt.

Die laserbasierte Optoperforation in Kombination mit den durchgeführten Farbstofftransfermessungen, den elektrophysiologischen und den Viabilitätsmessungen lassen neue Einblicke in diese Transfektionsmethode gewähren. Erstmals konnte hier eine Quantifizierung des aufgenommenen Materials (z. B. DNA oder siRNA) durch den ermittelten Volumenaustauschfaktor gezeigt werden. Desweiteren wurden Laserparameter für eine optimale Transfektionseffizienz bestimmt. Zusätzlich konnten die physiologischen Veränderungen im Ionenhaushalt der Zelle gezeigt werden und das sich die Pore nach erfolgreicher Perforation wieder schließen kann.

3. Diskussion und Ausblick

In zwei verschiedenen Zelllinien konnten die purinergischen Rezeptoren detailliert untersucht werden. In beiden Zelllinien konnte eine nukleotidvermittelte Ca^{2+} -Freisetzung beobachtet werden. In der Granulosazelllinie GFSHR-17 war diese P2Y_2 -, P2Y_4 - und P2Y_6 -Rezeptorsubtypenvermittelt. In den Endothelzellen ist sie P2Y_2 -Rezeptorsubtypen vermittelt gewesen. Zusätzlich ging die Nukleotidzugabe mit einer Änderung in dem Membranpotential der Zelle einher. In den Granulosazellen konnte eine Hyperpolarisation gezeigt werden, welche durch Ca^{2+} abhängige Cl^- -Kanäle induziert wurde (Bintig et al., 2009; Bintig et al., 2011, in submission).

Die Publikation „*Purinergic signalling in rat GFSHR-17 granulosa cells: an in vitro model of granulosa cells in maturing follicles*“ (Bintig et al., 2009) [Anhang A] stellt einen Link zwischen den purinergischen Rezeptoren und dem Membranpotential in den Granulosazellen eines sich entwickelnden Follikels da. Im Eierstock ist aufgrund der periodischen Natur des Eisprungs, vermittelt durch eines der wohl komplexesten Zusammenspiele zwischen der zyklischen Ausschüttung von neuronalen Transmitterstoffen und Ovarialhormonen der Hypophyse und der kontrollierten Eireifung, eine neue Dimension in der Kontrolle bzgl. der Proliferation, der Differenzierung und dem Tod von Zellen entstanden. Die Follikelreifung, der Eisprung und die Bildung des Gelbkörpers sind strikt definiert in ihrer Reihenfolge und hierfür bedarf es einen schnellen Wechsel zwischen stark proliferierenden Granulosazellen und sich nicht teilende, ausdifferenzierten Zellen im Gelbkörperstadium (Schultze-Mosgau et al., 2000). Zusätzlich zu den Hormonen und neuronalen Transmitterstoffen können auch ATP oder andere Nukleotide *in vivo* durch die parakrine Sekretion in den extrazellulären Raum sezerniert werden oder von Neuronen als Co-Transmitter ausgeschüttet werden und so in den folliculären interstitiellen Raum des sich entwickelnden Follikels gelangen (Aguado, 2002; Burnstock, 2007b; Tai et al., 2000). Die vom *ovarian nerve* ausgeschütteten Neurotransmitter und Neuropeptide konnten als Regulatoren für die Reifung und für das Überleben eines Follikels identifiziert werden (Aguado, 2002). Die Interaktion der Nukleotide mit den im Follikel exprimierten purinergischen Rezeptoren könnten an ähnlichen Aufgaben beteiligt sein wie die Neurotransmitter. Ob durch die P2 -Rezeptorvermittelten Signalwege in Granulosazellen die Proliferation, die Genexpression oder die Ausbildung des Antrums gefördert, inhibiert oder anders reguliert wird, ist zum Teil noch unklar. Möglich wären langfristige physiologische

Änderungen in den Granulosazellen durch eine frequentierte oder andauernde Nukleotidfreisetzung im interstitiellen Raum des Follikels. Eine veränderte Teilungsrate der Ratten GFSHR-17 Granulosazelllinie durch die Zugabe von ATP zu dem Zellkulturmedium konnte nicht gezeigt werden (Bintig et al., 2009). In humanen epithelialen Ovarialkarzinomzellen, den EFO-21 und EFO-27 Zelllinien, konnte hingegen eine ATP γ S vermittelte reduzierte Teilungsrate beobachtet werden (Schultze-Mosgau et al., 2000). Dem gegenüber stehen die Ergebnisse aus anderen Untersuchungen an einer weiteren humanen epithelialen Karzinomzellen, der sogenannten SKOV-3 Zelllinie, bei denen lediglich bei sehr hohen ATP-Konzentrationen (>100 μ M) eine reduzierte, bei niedrigen Konzentrationen aber eine erhöhte Proliferation zu beobachten gewesen ist (Batra & Fadeel, 1994).

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Granulosazellen sensitiv auf den Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) reagieren. ACh aktiviert hierbei muskarinische ACh-Rezeptoren und induziert, ähnlich den purinergischen Rezeptoren, eine Ca²⁺-Freisetzung im Cytosol humaner Granulosazellen (Mayerhofer & Kunz, 2005). Auch hier resultiert die erhöhte [Ca²⁺]_i in einer Hyperpolarisation – in diesem Fall vermutlich durch Ca²⁺ gesteuerte K⁺-Kanäle vermittelt (Kunz et al., 2006). Dennoch konnte noch nicht geklärt werden, welche und ob die Hyperpolarisation überhaupt in den Granulosazellen eine physiologische Wirkung ausübt. Auch gilt es zu klären, welche Ca²⁺ abhängigen Ionenkanäle in Granulosazellen exprimiert werden und ob diese zwischen den Spezies Ratte und Mensch identisch sind.

In der Publikation „*Purinergic receptors and Ca²⁺ signalling in the human blood-brain barrier endothelial cell line hCMEC/D3*“ (Bintig et al., 2011, in submission) [Anhang B] konnte, ähnlich wie bei den Granulosazellen, eine nukleotidinduzierte Ca²⁺-Freisetzung in den humanen Endothelzelllinie hCMEC/D3 induziert werden. Diese wird in den Endothelzellen hauptsächlich über den P2Y₂-Rezeptorsubtypen vermittelt. Durch die Transfektion der Zellen mit spezifischen siRNA's gegen die mRNA des P2Y₂-Rezeptorsubtypen konnte dessen spezifisches *gene silencing* induziert werden. Der Verlust des P2Y₂ Rezeptorsubtypen ging einher mit einer stark reduzierten Ca²⁺-Freisetzung. Die über andere Rezeptorsubtypen vermittelten möglichen Ca²⁺-Freisetzungen mit anderen Agonisten wie z. B. UDP (P2Y₆), BzATP (P2X₇) oder ATP γ S (P2Y₁₁) konnte nach dem *gene silencing* des P2Y₂-Rezeptorsubtypen nicht mehr hervorgerufen werden (Bintig et al., 2011, in submission).

Ob die in der PCR zu dem P2Y₂-Rezeptorsubtypen zusätzlichen detektierten mRNA's der P2Y₆, P2Y₁₁ und P2X₄, P2X₅ und P2X₇-Rezeptorsubtypen translatiert und dessen Proteine funktionell synthetisiert werden ist nicht geklärt. Proteinbiochemische Methoden könnten hier helfen, dies detaillierter zu untersuchen. Dennoch, in den hCMEC/D3 Endothelzellen scheinen die übrigen P2Y-Rezeptorsubtypen an einer Ca²⁺-vermittelten Signalgebung nicht beteiligt zu sein. Das Ca²⁺-Signal wird ausschließlich über den P2Y₂-Rezeptorsubtypen vermittelt (Bintig et al., 2011, in submission). Denkbar und nicht ausgeschlossen wäre bei dem P2Y₁₁-Rezeptorsubtypen eine Aktivierung des G_s-Proteins und eine daraus resultierende Aktivierung der AC. Änderungen in der intrazellulären Konzentration des Second Messengers cAMP und die daraus resultierenden Signalwege wurden in der hCMEC/D3 Zelllinie bisher nicht untersucht. Zudem könnte bei der Applikation der P2X₄, P2X₅ und P2X₇-Rezeptorsubtypen-Agonisten ATP, BzATP und αβ-meATP ein Einstrom von Na⁺-Ionen induziert werden. Mit elektrophysiologischen Untersuchungen an den hCMEC/D3 Endothelzellen mittels der Patch-Clamp-Technik konnte nach einer Nukleotidzugabe des Agonisten ATP nur in seltenen Fällen eine Änderung in dem Membranpotential der Zelle beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ob eventuell deutlich höhere ATP-Konzentrationen oder die P2X-Rezeptor-Agonisten BzATP oder αβ-meATP vielleicht doch Auswirkungen auf das Membranpotential haben gilt noch zu prüfen.

Das Expressionsprofil der verschiedenen purinergischen Rezeptorsubtypen in der humanen Endothelzelllinie hCMEC/D3 ähnelt denen anderer Spezies, wobei der P2Y₂-Rezeptorsubtyp auch in der Ratte und in dem Rind eine dominierende Rolle in den Endothelzellen der Blut-Hirn Schranke einzunehmen scheint (Sipos et al., 2000; Albert et al., 1997). Abhängig von dem Differenzierungsstadium der *in vitro* kultivierten Endothelzellen der Blut-Hirn Schranke oder auch von isolierten Primärzellen gibt es unterschiedliche Angaben bzgl. der Sensitivität gegenüber verschiedener Nukleotide (Sipos et al., 2000). Ob die Nukleotidsensitivität der *in vitro* kultivierten hCMEC/D3 Zellen vergleichbar ist mit denen der *in vivo* Zellen ist zu prüfen. Inwieweit die P2Y-Rezeptorsubtypen vermittelten Ca²⁺-Signale Einfluss auf eine Änderung in der Genexpression, der Differenzierung oder andere Bereiche der endothelialen Blut-Hirn Schranken Zelllinie hCMEC/D3 oder auf *in vivo* Endothelzellen haben, ist ebenfalls noch nicht geklärt.

Unabhängig von dem genauen Expressionsprofil der verschiedenen P2-Rezeptorsubtypen konnte eine Beteiligung der purinergischen Rezeptoren an einigen verschiedenen

physiologischen Prozessen in Endothelzellen gezeigt werden. In aortischen Endothelzellen des Rinds konnte eine nukleotidvermittelte gesteigerte Freisetzung von Prostaglandinen gezeigt werden (Needleman et al., 1974; Pearson et al., 1983). Diese wird über die Proteinkinase C gesteuert (Patel et al., 1996). Die Prostaglandine sind an Entzündungsreaktionen beteiligt und können Einfluss auf die Gefäßpermeabilität haben (Becker et al., 2000). Bezüglich der Gefäßpermeabilität ist ein weiterer P2Y-Rezeptor vermittelter Signalweg, ebenfalls PKC und zudem auch Calmodulin vermittelt, bekannt. ATP und UTP können über P2Y₁- und P2Y₂-Rezeptorsubtypen die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) aktivieren (da Silva et al., 2009). Die eNOS ist an der Produktion von Stickstoffmonoxid beteiligt, welches unter anderem in vaskulären System den Blutdruck reguliert, Endothelzellen vor Apoptose schützt und das Wachstum von Blutgefäßen fördert (da Silva et al., 2009). An endothelialen Dysfunktionen wie Atherosklerose oder dem Schlaganfall ist eine Beteiligung der eNOS bekannt. Ob in den Endothelzellen der Blut-Hirn Schranke ähnliche Effekte über die P2Y-Rezeptor-Signalwege bzgl. der eNOS vermittelt werden, wäre interessant für die Untersuchung und Behandlung von pathophysiologischen Prozessen.

Die siRNA wurde bei der hCMEC/D3 Zelllinie mittels der Lipofektion transfiziert. In der bestehenden Kooperation mit dem Laser Zentrum Hannover e. V. wurden mittels einer laserbasierten Optoperforation die Granulosazelllinie GFSHR-17 und die Brustkrebszelllinie MTH53a transfiziert. Die zugrundeliegende Porenbildung wurde in der Publikation „Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living GFSHR-17 and MTH53a cells“ (Baumgart et al., 2008) [Anhang C] mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik und mit Farbstofftransfermessungen detailliert untersucht. Es wurde gezeigt, dass Ionen, Farbstoffe und genetisches Material über die Pore von der Zelle aufgenommen werden kann. Zusätzlich wurde die Viabilität der Zellen nach der Optoperforation und die Effizienz der Transfektion bei verschiedenen Einstrahldauern und Pulsenergien bestimmt. Aufgrund der kurzzeitigen Porenbildung kommt es zu einem Volumenaustausch zwischen dem intra- und extrazellulären Medium, wobei etwa 40 % des Zellvolumens ausgetauscht werden (Baumgart et al., 2008).

Die genauen physikalischen und chemischen Effekte, welche für die Porenbildung verantwortlich sind, sind noch nicht bekannt. Möglich sind Effekte wie die Photoablation, bei der es zu einer Materialabtragung durch das explosionsartige Verdampfen des Gewebe-

wassers kommt. Eine weitere Möglichkeit wäre die Photodisruption, bei der es zu einer lokalen Plasmabildung mit einer freien Elektronendichte von bis zu 10^{23} Elektronen/cm³ im Fokusvolumen kommt. Das laserinduzierte Plasma führt zu einem optischen Durchbruch, wobei Material abgetragen wird und sich Kavitationsblasen bilden (Tirlapur & König, 2002; Stevenson et al., 2006). Die Ausbildung einer Kavitationsblase führt zusätzlich zu einer mechanischen Belastung der Membran, wenn diese sich in der unmittelbaren Umgebung befindet. Die resultierende Druckveränderung zerreißt die Membran oder stört die Integrität der Membranstruktur, so dass diese durchlässig für Moleküle wird, die normalerweise diese nicht passieren können (Kodama et al., 2000; Koshiyama et al., 2006).

Vogel et al. konnten zudem zeigen, dass auch mit Energien unterhalb des Schwellenwertes für einen optischen Durchbruch eine Ablation von Material durch ein sogenanntes *Low-Density-Plasma* herbeigeführt werden kann. Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden in dem von Vogel et al. beschriebenen *Low-Density-Plasma* Regime durchgeführt. Hierbei werden im Bereich der Laserfokussierung keine Kavitationsblasen sondern langlebigere Gasblasen erzeugt (wenige Millisekunden bis zu mehreren Sekunden). Vermutlich bilden sich diese aufgrund anhäufender chemischer und thermischer Effekte und können die Membran ebenso wie Kavitationsblasen mechanisch beeinflussen. Die Effekte können Molekülbindungen zerstören und so aufsummiert Material abtragen (Vogel et al., 2005). Die chemischen und physikalischen Effekte auf Ebene der Lipiddoppelschicht bei der Optoperforation sind weitestgehend unbekannt. Es ist fraglich, auf welche Art Löcher in der Zellmembran entstehen. Die gemessenen Membranpotentialänderungen (leichte Depolarisation) lassen eine chemische Destabilisierung der Membranintegrität vermuten, was auf Permeabilitätsänderungen in der Membran für bestimmte Ionen hindeutet. Ob die Destabilisierung ausreicht, dass größere Moleküle (z. B. genetisches Material) aufgenommen wird, konnte bisher nicht gezeigt werden. Bei dem Aufschwingen einer Gasblase (starke Depolarisation) ist mit einer hohen mechanischen Störung der Membranintegrität zu rechnen. Hier konnten ein Volumenaustausch beobachtet werden (Baumgart et al., 2008).

Ob die gezielte Fokussierung des Lasers auf die Membran und die induzierte Porenbildung durch die chemischen und thermischen Effekte die Zelle in physiologischer Hinsicht beeinflusst, ist erst anfänglich untersucht wurden. Aufgrund der hohen extrazellulären Ca²⁺-Konzentration im extrazellulären Medium kommt es bei der Optoperforation und dem induzierten Volumenaustausch zu einem Ca²⁺-Einstrom (Baumgart et al., 2010). Die dadurch

erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ könnte verschiedene Signalkaskaden aktivieren, welche im Normalfall inaktiviert blieben. Die Viabilität bleibt hingegen bei geringen Einstrahldauern und Pulsenergien unverändert, dennoch könnten mögliche zellschädigende Effekte induziert werden (Baumgart et al., 2009). Die Perforation der Zellen in einem Ca^{2+} -freien Medium verhindert die Ausbildung dieser unphysiologischen Signalkaskaden. Eine Ablation von Molekülen in wässriger Umgebung geht zusätzlich mit der Produktion von reaktiven Sauerstoffpezies (ROS, *reactive oxygen species*) einher (Vogel et al., 2005). Eine verstärkte ROS-Produktion wurde nach der Bestrahlung und der Ablation von Zellkernbestandteilen in Endothelzellen aus dem Rind beobachtet (Baumgart et al., 2009). Diese ROS-Moleküle führen im Falle einer Anhäufung in Zellen zu oxidativen Stress. Hierbei können die Moleküle zelleigene Makromoleküle schädigen und in ihrer Funktion einschränken, was pathophysiologische Effekte hervorruft (Baumgart et al., 2009; Victor et al., 2009). Der oxidative Stress, der durch die Laserbestrahlung entsteht, kann durch die Zugabe von Antioxidantien wie Ascorbinsäure vermindert werden (Baumgart et al., 2009). Es gilt zu klären, ob eine erhöhte ROS-Molekülbildung während der Optoperforation induziert wird.

Die beschriebenen Nebenwirkungen der Laserbehandlung führen jedoch bei den Zellen nur in wenigen Fällen zum Zelltod, was durch die geringe Mortalitätsrate der mit dieser Methode perforierten Zellen zeigt. Deshalb kann mit der laserbasierten Optoperforation eine gezielte *single cell transfection* durchgeführt werden, was bei vielen anderen Standard-Transfektionsmethoden nicht möglich ist. Ausgewählte Einzelzellen in einem Verbund aus Zellen können gezielt transfiziert und damit manipuliert werden. Eine Behandlung der Zellen mit chemischen Reagenzien oder modifizierten Viren ist nicht notwendig.

In weiteren Versuchen sollten einzelne hCMEC/D3 Zellen mit verschiedenen siRNA's durch die laserbasierte Optoperforation transfiziert werden, um ein gezieltes *gene silencing* gegen die unterschiedlichen P2Y-Rezeptorsubtypen in ausgewählten Einzelzellen zu induzieren. Um einen höheren Durchsatz von transfizierten Zellen zu erlangen, wurde die Optoperforations-Methode an den Endothelzellen mit Hilfe von Gold-Nanopartikeln und einem fs-Laser durchgeführt (Pitsillides et al., 2003; Pustovalov et al., 2008; Schomaker et al., 2010). Erste Versuche zeigen, dass eine Transfektion mit genetischem Material möglich sind (Schomaker et al., 2010). Physiologische Messungen mit der Ca^{2+} -Imaging Methode, der Patch-Clamp-Technik und der quantitativen RealTime-PCR sind noch nicht durchgeführt worden. Sie sind Bestandteil weiterer Forschungsvorhaben.

Literaturverzeichnis

Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7: 41-53.

Abbracchio MP, Burnstock G. (1994) Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64: 445-75.

Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, King BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA, Burnstock G. (2003) Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 24: 52-5.

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. (2006) International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 58: 281-341.

Aguado LI. (2002) Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microsc Res Tech* 59: 462-73.

Albert JL, Boyle JP, Roberts JA, Challiss RA, Gubby SE, Boarder MR. (1997) Regulation of brain capillary endothelial cells by P2Y receptors coupled to Ca²⁺, phospholipase C and mitogen-activated protein kinase. *Br J Pharmacol* 122: 935-41.

Albertini DF, Anderson E. (1974) The appearance and structure of intercellular connections during the ontogeny of the rabbit ovarian follicle with particular reference to gap junctions. *J Cell Biol* 63 :234-50.

Barnard EA, Burnstock G, Webb TE. (1994) G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 15: 67-70.

Barnard EA, Simon J, Webb TE. (1997) Nucleotide receptors in the nervous system. An abundant component using diverse transduction mechanisms. *Mol Neurobiol* 15: 103-29.

Batra S, Fadeel I. (1994) Release of intracellular calcium and stimulation of cell growth by ATP and histamine in human ovarian cancer cells (SKOV-3). *Cancer Lett* 77: 57-63.

Baumgart J, Bintig W, Ngezahayo A, Willenbrock S, Murua Escobar H, Ertmer W, Lubatschowski H, Heisterkamp A. (2008) Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living GFSHR-17 and MTH53a cells. *Opt Express* 16: 3021-31.

Baumgart J, Kuetemeyer K, Bintig W, Ngezahayo A, Ertmer W, Lubatschowski H, Heisterkamp A. (2009) Repetition rate dependency of reactive oxygen species formation during femtosecond laser-based cell surgery. *J Biomed Opt* 14: 054040.

Baumgart J, Bintig W, Ngezahayo A, Lubatschowski H, Heisterkamp A. (2010) Fs-laser-induced Ca^{2+} concentration change during membrane perforation for cell transfection. *Opt Express* 18: 2219-29.

Bean BP. (1992) Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 13: 87-90.

Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S. (2000) Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol* 89: 160-7.

Benham CD, Tsien RW. (1987) A novel receptor-operated Ca^{2+} -permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature* 16-22; 328: 275-8.

Berridge MJ. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315-25.

Bintig W, Baumgart J, Walter WJ, Heisterkamp A, Lubatschowski H, Ngezahayo A. (2009) Purinergic signalling in rat GFSHR-17 granulosa cells: an in vitro model of granulosa cells in maturing follicles. *J Bioenerg Biomembr* 41: 85-94.

Bintig W, Begandt D, Schlingmann B, Gerhard L, Pangalos M, Dreyer L, Hohnjec N, Couraud JP, Romera AI, Weksler B, Ngezahayo A. (2010) Purinergic receptors and Ca^{2+} signalling in the human blood-brain barrier endothelial cell line hCMEC/D3. Submitted to *FASEB J*

Boarder MR, Weisman GA, Turner JT, Wilkinson GF. (1995) G protein-coupled P2 purinoceptors: from molecular biology to functional responses. *Trends Pharmacol Sci* 16: 133-9.

Boarder MR, Hourani SM. (1998) The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors. *Trends Pharmacol Sci* 19: 99-107.

Born GV. (1962) Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194; 927-9.

Boyd IA, Forrester T. (1968) The release of adenosine triphosphate from frog skeletal muscle in vitro. *J Physiol* 199: 115-35.

Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D. (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371: 519-23.

Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. (1970) Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* 40: 668-88.

Burnstock G. (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24: 509-81.

Burnstock G, Kennedy C. (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 16: 433-40.

- Burnstock G. Purinergic signalling--an overview. (2006) *Novartis Found Symp* 276: 26-48; discussion 48-57, 275-81.
- Burnstock G. (2007a) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64: 1471-83.
- Burnstock G. (2007b) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87: 659-797.
- Bustin SA. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25: 169-93.
- Capecchi MR. (1980) High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 22: 479-88.
- Carafoli E, Brini M. (2000) Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr Opin Chem Biol* 4: 152-61.
- Cole KS. (1979) Mostly Membranes. *Annu. Rev Physiol* 41: 1-24.
- Dalziel HH, Westfall DP. (1994) Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: subclassification, distribution, and molecular characterization. *Pharmacol Rev* 46: 449-66.
- da Silva CG, Specht A, Wegiel B, Ferran C, Kaczmarek E. (2009) Mechanism of purinergic activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *Circulation* 119: 871-9.
- Douglas KL. (2008) Toward development of artificial viruses for gene therapy: a comparative evaluation of viral and non-viral transfection. *Biotechnol Prog* 24: 871-83.
- Drury AN, Szent-Györgyi A. (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68: 213-37.
- Dubyak GR. (1991) Signal transduction by P2-purinergic receptors for extracellular ATP. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4: 295-300.
- Dubyak GR, El-Moatassim C. (1993) Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 265: C577-606.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-8.
- Emmelin N, Feldberg W. (1948) Systemic effects of adenosine triphosphate. *Br J Pharmacol Chemother* 3: 273-84.
- Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA. (2006) P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch* 452: 552-62.
- Erlinge D, Burnstock G. (2008) P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal* 4: 1-20.

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci* 84: 7413-7.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-11.

Fredholm BB. (1995) Purinoceptors in the nervous system. *Pharmacol Toxicol* 76: 228-39.

Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I. (2000) Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium* 27: 97-106.

Gillespie JH. (1934) The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol* 80: 345-59.

Gordon JL. (1986) Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 233: 309-19.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-50.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100.

Hashimoto K., Kumakura S, and Tanemura I. (1964) Mode of action of adenine, uridine and cytidine nucleotides and 2,6-bis(diethanolamino)-4,8-dipiperidinopyrimido-(5,4-d) pyrimine on the coronary, renal and femoral arteries. *Arzneimittelforschung* 14: 1252-1254.

Jiang Q, Guo D, Lee BX, Van Rhee AM, Kim YC, Nicholas RA, Schachter JB, Harden TK, Jacobson KA. (1997) A mutational analysis of residues essential for ligand recognition at the human P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol* 52: 499-507.

Kamada S, Blackmore PF, Oehninger S, Gordon K, Hodgen GD. (1994) Existence of P2-purinoceptors on human and porcine granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 650-6.

Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E. (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 2009; 460: 592-8.

Keren-Tal I, Dantes A, Sprengel R, Amsterdam A. (1993) Establishment of steroidogenic granulosa cell lines expressing follicle stimulating hormone receptors. *Mol Cell Endocrinol* 95: R1-10.

Klein RM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC. (1987, 1992) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Biotechnology* 24: 384-6.

Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol* 56: 341-61.

Kodama T, Hamblin MR, Doukas AG. (2000) Cytoplasmic molecular delivery with shock waves: importance of impulse. *Biophys J* 79: 1821-32.

Köles L, Gerevich Z, Oliveira JF, Zadori ZS, Wirkner K, Illes P. (2008) Interaction of P2 purinergic receptors with cellular macromolecules. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377: 1-33.

Koshiyama K, Kodama T, Yano T, Fujikawa S. (2006) Structural change in lipid bilayers and water penetration induced by shock waves: molecular dynamics simulations. *Biophys J* 91: 2198-205.

Kunz L, Roggors C, Mayerhofer A. (2007) Ovarian acetylcholine and ovarian KCNQ channels: insights into cellular regulatory systems of steroidogenic granulosa cells. *Life Sci* 80: 2195-8.

Li R, Mather JP. (1997) Lindane, an inhibitor of gap junction formation, abolishes oocyte directed follicle organizing activity in vitro. *Endocrinology* 138: 4477-80.

Lustig KD, Shiau AK, Brake AJ, Julius D. (1993) Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci* 90: 5113-7.

Mayerhofer A, Kunz L. (2005) A non-neuronal cholinergic system of the ovarian follicle. *Ann Anat* 187: 521-8.

Meister G, Tuschl T. (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431: 343-9.

Moccia F, Berra-Romani R, Baruffi S, Spaggiari S, Signorelli S, Castelli L, Magistretti J, Taglietti V, Tanzi F. (2002) Ca²⁺ uptake by the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in rat microvascular endothelial cells. *Biochem J* 364: 235-44.

Munaron L. (2006) Intracellular calcium, endothelial cells and angiogenesis. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 1: 105-19.

Mülhardt C. (2006) *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag 5. A.

Mullis KB, Faloona FA. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-50.

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2: 279-289.

Needleman P, Minkes MS, Douglas JR. (1974) Stimulation of prostaglandin biosynthesis by adenine nucleotides. Profile of prostaglandin release by perfused organs. *Circ Res* 34: 455-60.

- Neher E, Sakmann B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802.
- Neher E, Sakmann B. (1992) The patch clamp technique. *Sci Am* 266: 44-51.
- Newbolt A, Stoop R, Virginio C, Surprenant A, North RA, Buell G, Rassendren F. (1998) Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). *J Biol Chem* 273: 15177-82.
- Nilius B, Droogmans G. (2003) Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand* 177: 119-47.
- Nishizuka Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 9: 484-96.
- Nörenberg W, Illes P. (2000) Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 324-39.
- North RA. (1996) P2X receptors: a third major class of ligand-gated ion channels. *Ciba Found Symp* 198: 91-105; discussion 105-9.
- North RA, Barnard EA. (1997) Nucleotide receptors. *Curr Opin Neurobiol* 7: 346-57.
- North RA. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82: 1013-67.
- Offner FF. (1991) Ion flow through membranes and the resting potential of cells. *J Membr Biol* 123: 171-82.
- Olesen SP. (1989) An electrophysiological study of microvascular permeability and its modulation by chemical mediators. *Acta Physiol Scand Suppl* 579: 1-28.
- Olsson RA, Pearson JD. (1990) Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev* 70: 761-845.
- Patel V, Brown C, Boarder MR. (1996) Protein kinase C isoforms in bovine aortic endothelial cells: role in regulation of P2Y- and P2U-purinoceptor-stimulated prostacyclin release. *Br J Pharmacol* 118: 123-30.
- Pearson JD, Slakey LL, Gordon JL. (1983) Stimulation of prostaglandin production through purinoceptors on cultured porcine endothelial cells. *Biochem J* 214: 273-6.
- Pitsillides CM, Joe EK, Wei X, Anderson RR, Lin CP. (2003) Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles. *Biophys J* 84: 4023-32.
- Plank C, Scherer F, Schillinger U, Bergemann C, Anton M. (2003) Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery with superparamagnetic nanoparticles and magnetic fields. *J Liposome Res* 13: 29-32.

Pustovalov VK, Smetannikov AS, Zharov VP. (2008) Photothermal and accompanied phenomena of selective nanophotothermolysis with gold nanoparticles and laser pulses. *Laser Phys Lett* 5, 775-792

Rae J, Cooper K, Gates P, Watsky M. (1991) Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J Neurosci Methods* 37: 15-26.

Ralevic V, Burnstock G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50: 413-92.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-4.

Sakmann B, Neher E. (1984) Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol* 46: 455-72.

Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Krüger A, Gänsbacher B, Plank C. (2002) Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther* 9: 102-9.

Schomaker M, Fehlauer H, Bintig W, Ngezahayo A, Nolte I, Escobar HM, Lubatschowski H, Heisterkamp A. (2010) Fs-laser cell perforation using gold nanoparticles of different shapes, *Proc. SPIE*, 7589

Schultze-Mosgau A, Katzur AC, Arora KK, Stojilkovic SS, Diedrich K, Ortmann O. (2000) Characterization of calcium-mobilizing, purinergic P2Y(2) receptors in human ovarian cancer cells. *Mol Hum Reprod* 6: 435-42.

Seifert R, Schultz G. (1989) Involvement of pyrimidinoceptors in the regulation of cell functions by uridine and by uracil nucleotides. *Trends Pharmacol Sci* 10: 365-9.

Singer SJ, Nicolson GL. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-31.

Sipos I, Dömötör E, Abbott NJ, Adam-Vizi V. (2000) The pharmacology of nucleotide receptors on primary rat brain endothelial cells grown on a biological extracellular matrix: effects on intracellular calcium concentration. *Br J Pharmacol* 131: 1195-203.

Somiari S, Glasspool-Malone J, Drabick JJ, Gilbert RA, Heller R, Jaroszeski MJ, Malone RW. (2000) Theory and in vivo application of electroporative gene delivery. *Mol Ther* 2: 178-87.

Stevenson D, Agate B, Tsampoula X, Fischer P, Brown CT, Sibbett W, Riches A, Gunn-Moore F, Dholakia K. (2006) Femtosecond optical transfection of cells: viability and efficiency. *Opt Express* 14: 7125-33.

- Tai CJ, Kang SK, Cheng KW, Choi KC, Nathwani PS, Leung PC. (2000) Expression and regulation of P2U-purinergic receptor in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 1591-7.
- Tai CJ, Kang SK, Tzeng CR, Leung PC. (2001) Adenosine triphosphate activates mitogen-activated protein kinase in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 142: 1554-60.
- Templeton NS. (2002) Cationic liposome-mediated gene delivery in vivo. *Biosci Rep* 22: 283-95.
- Tirlapur UK, König K. (2002) Targeted transfection by femtosecond laser. *Nature* 418: 290-1.
- Uchugonova A, König K, Bueckle R, Isemann A, Tempea G. (2008) Targeted transfection of stem cells with sub-20 femtosecond laser pulses. *Opt Express* 16: 9357-64.
- Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G. (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371: 516-9.
- van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR. (1990) Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2: 291-9.
- Vergara C, Latorre R, Marrion NV, Adelman JP. (1998) Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* 8: 321-9.
- Victor VM, Rocha M, Solá E, Bañuls C, Garcia-Malpartida K, Hernández-Mijares A. (2009) Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 15: 2988-3002.
- Vigne P, Feolde E, Breittmayer JP, Frelin C. (1994) Characterization of the effects of 2-methylthio-ATP and 2-chloro-ATP on brain capillary endothelial cells: similarities to ADP and differences from ATP. *Br J Pharmacol* 112: 775-80.
- Vogel A, Noack J, Huettman G, Paltauf G. (2005) Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. *Appl Phys B* 81, 1015–1047
- von Kügelgen I, Wetter A. (2000) Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 310-23.
- von Kügelgen I. (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 110: 415-32.
- Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson AN, Smart TG, King BF, Burnstock G, Barnard EA. (1993) Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett* 324: 219-25.

Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA, Couraud PO. (2005) Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J* 19: 1872-4.

Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. (1997) The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 22: 176-81

Wright CS, Becker DL, Lin JS, Warner AE, Hardy K. (2001) Stage-specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation. *Reproduction* 121 : 77-88.

Yamazaki D, Aoyama M, Ohya S, Muraki K, Asai K, Imaizumi Y. (2006) Novel functions of small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel in enhanced cell proliferation by ATP in brain endothelial cells. *J Biol Chem* 281: 38430-9.

Zeira E, Manevitch A, Manevitch Z, Kedar E, Gropp M, Daudi N, Barsuk R, Harati M, Yotvat H, Troilo PJ, Griffiths TG, Pacchione SJ, Roden DF, Niu Z, Nussbaum O, Zamir G, Papo O, Hemo I, Lewis A, Galun E. (2007) Femtosecond laser: a new intradermal DNA delivery method for efficient, long-term gene expression and genetic immunization. *FASEB J*; 21: 3522-33.

Zimmermann U, Pilwat G, Riemann F. (1974) Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophys J* 14: 881-99.

Zimmermann U, Neil GA. (1996) *Electromanipulation of cells*. CRC Press

Abkürzungen

2-APB	2-aminoethoxydiphenyl borate
AC	Adenylylcyclase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AM	Acetoxymethylester
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP γ S	Adenosine 5'-(3-thiotriphosphate)
BzATP	Benzoylbenzoyl-ATP
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumkonzentration
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosin-5'-monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
Cl ⁻	Chlorid
CPA	Cyclopropanoic acid
Creb	cAMP response element binding protein
DAG	Diacylglycerin
DIDS	Disodium 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPC	Diphenylamine-2-carboxylic Acid
dsRNA	doppelsträngige RNA
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Faraday Konstante
fl	Femtoliter
fs	Femtosekunde
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GFP	Green fluorescent protein
IP ₃	Inositoltriphosphat
IP ₃ -R	Inositoltriphosphat-Rezeptor
K ⁺	Kalium

Abkürzungen

kDa	Kilodalton
Na ⁺	Natrium
μM	Mikromolar
mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA
mV	Millivolt
nJ	Nanojoule
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
<i>p</i>	Permeabilität
pA	Picoampere
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLCβ	Phospholipase Cβ
PMCA	plasma membrane calcium ATPase
R	allgemeine Gaskonstante
RISC	RNA-Induced Silencing-Complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reactive oxygen species
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
siRNA	short- oder small-interfering RNA
ssRNA	Einzelsträngige RNA
TEA	Tetraethylammonium chlorid
U73122	1-(6-(((17β)-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-2,5-pyrrolidinedione
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat
V	Volumen
W	Watt

Lebenslauf

Willem Bintig

curriculum vitae

Persönliche Daten

Vor- und Zuname: Willem Bintig
Geburtsdatum: 29. September 1981
Geburtsort: Hannover
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung

07/2001 Abitur an der Leibnizschule Hannover, Gymnasium
10/2001 Aufnahme des Biologiestudiums an der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
11/2003 Beginn des Hauptstudiums mit den Schwerpunktfächern
**Zell- und Entwicklungsbiologie, Biophysik und
Immunologie**
09/2006 Abschluss als **Diplom Biologe** (Note: sehr gut)
03/2007 Promotionsstudium Biologie, **Institut für Biophysik**,
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Beruflicher Werdegang

02/2007 – 02/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Laser Zentrum Hannover
e.V.
seit 02/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am **Institut für Biophysik**,
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Nebentätigkeiten

2001 – 2007 Messestanddesign und Messestandbau,
Firma SB Holzkonzepte

Sonstige Kenntnisse

Qualifikation: Absolvierter Kurs in **gentechnischer Sicherheit** (2005)

Willem Bintig, Fridastraße 6, 30161 Hannover
Mobil 0179 5993070
E-Mail wbintig@gmx.de

Publikationsliste

Publikationen

Baumgart J, **Bintig W**, Ngezahayo A, Willenbrock S, Murua Escobar H, Ertmer W, Lubatschowski H, Heisterkamp A. (2008) Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living GFSHR-17 and MTH53a cells. *Opt Express* 16: 3021-31.

Walter WJ, Zeilinger C, **Bintig W**, Kolb HA, Ngezahayo A. (2008) Phosphorylation in the C-terminus of the rat connexin46 (rCx46) and regulation of the conducting activity of the formed connexons. *J Bioenerg Biomembr* 40: 397-405.

Bintig W, Baumgart J, Walter WJ, Heisterkamp A, Lubatschowski H, Ngezahayo A. (2009) Purinergic signalling in rat GFSHR-17 granulosa cells: an in vitro model of granulosa cells in maturing follicles. *J Bioenerg Biomembr* 41: 85-94.

Baumgart J, Kuetemeyer K, **Bintig W**, Ngezahayo A, Ertmer W, Lubatschowski H, Heisterkamp A. (2009) Repetition rate dependency of reactive oxygen species formation during femtosecond laser-based cell surgery. *J Biomed Opt* 14: 054040.

Begandt D, **Bintig W**, Oberheide K, Schlie S, Ngezahayo A. (2010) Dipyridamole increases gap junction coupling in bovine GM-7373 aortic endothelial cells by a cAMP-protein kinase A dependent pathway. *J Bioenerg Biomembr* 42: 79-84.

Baumgart J, **Bintig W**, Ngezahayo A, Lubatschowski H, Heisterkamp A. (2010) Fs-laser-induced Ca^{2+} concentration change during membrane perforation for cell transfection. *Opt Express* 18: 2219-29.

Pangalos M, **Bintig W**, Schlingmann B, Feyerabend F, Witte F, Begandt A, Heisterkamp A, Ngezahayo A (2011) Action potentials in primary osteoblasts and in the MG-63 osteoblast-like cell line. *J Bioenerg Biomembr*, in press.

Bintig W, Begandt D, Schlingmann B, Gerhard L, Pangalos M, Dreyer L, Hohnjec N, Couraud JP, Romera AI, Weksler B, Ngezahayo A. (2011) Purinergic receptors and Ca^{2+} signalling in the human blood-brain barrier endothelial cell line hCMEC/D3. In submission.

Abstracts

Bintig W, Buchholz V, Schlie S, Baumgart J, Heisterkamp A, Ngezahayo A (2007) Gap Junction hemichannels of GFSHR-17 granulosa cells are mechano-sensitive. *Acta Physiologica* 189:P10

Baumgart J, **Bintig W**, Ngezahayo A, Ertmer W, Lubatschowski H, Heisterkamp A. (2007) Live cell opto-injection by femtosecond laser pulses. *Proc. SPIE. Optical Interactions with Tissue and Cells XVIII*, Vol 6435

Baumgart J, **Bintig W**, Ngezahayo A, Ertmer W, Lubatschowski H, Heisterkamp A. (2007) Live cell opto-perforation by femtosecond laser pulses. *European Conference on Biomedical Optics*

Bintig W, Baumgart J, Walter WJ, Heisterkamp A, Lubatschowski H, Ngezahayo A. (2008) ATP modulates Cl⁻ channels in GFSHR-17 granulosa cells, the in vitro model of granulosa cells in maturing follicle. 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology

Ngezahayo A, Baumgart J, Przemeck S, Kütemeyer K, Kruppe L, **Bintig W**, Heisterkamp A, Lubatschowski H. (2008) Intracellular manipulation of single cells using ultrashort laser pulses: Mitochondria and cytoskeleton. 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology

Baumgart J, Murua Escobar H, Willenbrock S, **Bintig W**, Ngezahayo A, Ertmer W, Nolte I, Lubatschowski H, Heisterkamp A. (2008) Femtosecond laser transfection of canine cells as basis for cell therapeutic approaches. In Proceedings of the 1st WorldVetCancer, Joint ESVONC & VCS Meeting

Baumgart J, **Bintig W**, Ngezahayo A, Willenbrock S, Murua Escobar H, Ertmer W, Lubatschowski H, Heisterkamp A. (2008) Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living cells, Proc. LPM, 9th International Symposium on Laser Precision Microfabrication

Baumgart J, Murua Escobar H, Willenbrock S, **Bintig W**, Ngezahayo A, Ertmer W, Nolte I, Lubatschowski H, Heisterkamp A. (2008) Femtosecond laser transfection of canine cells as basis for cell therapeutic approaches. European Society of Veterinary Oncology

Baumgart J, Murua Escobar H, Willenbrock S, **Bintig W**, Ngezahayo A, Nolte I, Ertmer W, Lubatschowski H, Heisterkamp A. (2008) Femtosecond laser based transfection of mammalian cells - a door for novel cell therapeutic approaches. XX. International Congress of Genetics

Baumgart J, Kütemeyer K, **Bintig W**, Ngezahayo A, Ertmer W, Lubatschowski H, Heisterkamp A. (2008) Investigation of reactive oxygen species in living cells during femtosecond laser based cell surgery. Proc. SPIE Optical Interactions with Tissue and Cells XIX, Vol. 6854.

Baumgart J, Kütemeyer K, **Bintig W**, Ngezahayo A, Ertmer W, Lubatschowski H, Heisterkamp A. (2008) Reactive oxygen species formation due to fs laser based intracellular cell surgery, Proceedings of the EOS Meeting

Begandt D, Oberheide K, **Bintig W**, Ngezahayo A. (2009) Dipyrindamole Increases the Gap Junction Coupling of Bovine GM-7373 Aortic Endothelial Cells by a cAMP/PKA Dependent Phosphorylation Mechanism. 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology

Jachowski T, **Bintig W**, Eckert S, Baumgart J, Ngezahayo A, Heisterkamp A, Vogel A. (2009) Mechanisms of Femtosecond Laser Cellular Optoporation. Proc. SPIE 7373,

Baumgart J, Kütemeyer K, **Bintig W**, Ngezahayo A, Willenbrock S, Murua Escobar H, Ertmer W, Lubatschowski H, Heisterkamp A. (2009) Fs-laser-induced reactive oxygen species formation during opto-perforation for cell transfection. Proc. SPIE

Ngezahayo A, Baumgart J, Przemeck S, Küttemeyer K, Kruppe L, Witte F, **Bintig W**, Lubatschowski H, Heisterkamp A. (2009) Intracellular manipulation of single cells using ultrashort laser pulses: mitochondria and cytoskeleton. *European Journal of Cell Biology*, 88, 76-76

Schomaker M, Fehlauer H, **Bintig W**, Ngezahayo A, Nolte I, Escobar HM, Lubatschowski H, Heisterkamp A. (2010) Fs-laser cell perforation using gold nanoparticles of different shapes, *Proc. SPIE*, 7589

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo für seine langjährige Unterstützung und Betreuung, für das entgegengebrachte Vertrauen, für die vielen Denkanstöße, für konstruktive Kritik und für den Freiraum, mich selbst verwirklichen zu können. Ein Mentor, Betreuer und Freund, wie ich ihn mir nicht hätte besser wünschen können..

Meinem Korreferenten Prof. Dr. Alexander Heisterkamp und seinem Team vom Laser Zentrum Hannover danke ich für die produktive Kooperation, die mir einen kleinen Einblick in die Physik gewährt hat. Besonderer Dank gilt hier Markus Schomaker und meiner langjährigen Physikberaterin Dr. Judith Baumgart für ihre Hilfe bei Fragen aller Art und ihre unermüdlichen Versuche mir die Physik näher zu bringen. Dank dieser hervorragenden Zusammenarbeit mit ihr, den tollen Projekten und der immer guten Arbeitsatmosphäre in der Abteilung Biomedizinische Optik sind viele hervorragende Arbeiten entstanden, die maßgeblich mit zu dieser Dissertation beigetragen haben.

Für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bei der Disputation danke ich Herrn Prof. Dr. Küster. Ein großes Dankeschön gilt ihm und seiner Arbeitsgruppe für die Benutzung des qRT-PCR Cyclers und für das molekularbiologische Feedback bei Problemen aller Art.

Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Lubatschowski und der Rowiak GmbH.

Dem Team um Pierre-Olivier Couraud danke ich für die Bereitstellung der hCMEC/D3 Zelllinie.

Dr. Hugo Murua Escobar und seinem Team danke ich für die mir entgegengebrachten Hilfen bzgl. biologischer und molekularbiologischer Fragen.

Weiterer Dank gilt meinen beiden großartigen Freunden Anastasia und Gregor, die mir in den wirren Zeiten der letzten Jahre und auch sonst immer eine große Hilfe und eine konstante moralische Stütze gewesen sind. Ebenso gilt es dem Thomas, der Elena, der kleinen Goldschuh-Leonie, Karina, Daniela, Babsi, Wim, Sabrina, Lutz, der großartigen Maria und vielen weiteren meiner Freundinnen und Freunden herzlichst zu danken, weil ich mit ihnen zusammenarbeiten durfte, weil sie mich unterstützt haben und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben..

.. weil sie einfach da sind, wenn ich sie brauche..

..was sehr, sehr großartig ist.. Danke Euch allen vielmals..

Bei allen weiteren Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Biophysik und der Werkstatt möchte ich mich ebenfalls bedanken. Sie haben es mir leicht gemacht, mich hier in diesem „zweiten Zuhause“ sehr wohl zu fühlen. Danke Heidi, danke Ingrid, danke Andrea..

Besonderer Dank gilt Miss Piggy Peywi für die Freundschaft der letzten Jahre und für die gemeinsamen (Aus/Reißaus)-Zeiten am Blauen See.. ..hier am Teich..

Zuletzt gilt es meiner immer größer werdenden und tollen Familie ganz besonderen Dank auszusprechen.

Anhang A: Purinergic signalling in rat GFSHR-17 granulosa cells: an *in vitro* model of granulosa cells in maturing follicles (Bintig et al., 2009)

With kind permission from Springer Science+Buisness Media:

JOURNAL OF BIOENERGETICS AND BIOMEMBRANES

Volume 41, Number 1, 85-94, 2009, DOI: 10.1007/s10863-009-9199-5

Purinergic signalling in rat GFSHR-17 granulosa cells: an *in vitro* model of granulosa cells in maturing follicles

Willem Bintig, Judith Baumgart, Wilhelm J. Walter, Alexander Heisterkamp, Holger Lubatschowski and Anaclet Ngezahayo

Originalveröffentlichung erschienen auf

<http://www.springerlink.com>

Purinergic signalling in rat GFSHR-17 granulosa cells: an *in vitro* model of granulosa cells in maturing follicles

Willem Bintig · Judith Baumgart · Wilhelm J. Walter ·
Alexander Heisterkamp · Holger Lubatschowski ·
Anaclet Ngezahayo

Received: 18 October 2008 / Accepted: 21 January 2009 / Published online: 4 February 2009
© Springer Science + Business Media, LLC 2009

Abstract Purinergic signalling in rat GFSHR-17 granulosa cells was characterised by Ca^{2+} -imaging and perforated patch-clamp. We observed a resting intracellular Ca^{2+} -concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) of 100 nM and a membrane potential of -40 mV. This was consistent with high K^+ - and Cl^- permeability and a high intracellular Cl^- concentration of 40 mM. Application of ATP for 5–15 s every 3 min induced repeated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases and a 30 mV hyperpolarization. The phospholipase C inhibitor U73122 or the IP_3 -receptor antagonist 2-aminoethoxyethyl diphenyl borate suppressed ATP responses. Further biochemical and pharmacological experiments revealed that ATP responses were related to stimulation of P2Y_2 and P2Y_4 receptors and that the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase was a prerequisite for hyperpolarization. Inhibitors of Ca^{2+} -activated channels or K^+ channels did not affect the ATP-evoked responses. Conversely, inhibitors of Cl^- channels hyperpolarized cells to -70 mV and suppressed further ATP-evoked hyperpolarization. We propose that P2Y_2 and P2Y_4 receptors in granulosa cells modulate Cl^- permeability by regulating Ca^{2+} -release.

Keywords Granulosa cells · Purinergic receptors · Cl^- channels · Follicle maturation · Perforated patch-clamp · Ca^{2+} -imaging

Introduction

Granulosa cells form a monolayer that surrounds oocytes in primary follicles. Upon external stimulation, granulosa cells begin to proliferate simultaneously with an increase in oocyte volume. Proliferating granulosa cells express FSH receptors as this hormone begins to be secreted by the pituitary gland. The proliferation of the granulosa cells and the volume increase in the oocyte correlate with the reorganization of the follicle. An antral cavity is formed, which contains a fluid consisting of water, ions and many other components such as peptides. The antral fluid is secreted by the granulosa cells via a mechanism that remains to be elucidated. The granulosa cells of the maturing follicles express receptors for pituitary hormones and other physiological ligands such as ATP. It has been shown that ATP, at physiologically relevant concentrations, stimulates an increase in the intracellular free Ca^{2+} -concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Tai et al. 2000) and that ATP modulates K^+ as well as Cl^- channels in cumulus cell-enclosed oocytes mainly composed of granulosa cells (Arellano et al. 2002). These findings demonstrate the expression of purinergic receptors by granulosa cells.

Two families of purinergic receptors are known. The P2X receptors (P2X_{1-7}), which are not sensitive to UTP, form a family of related ionotropic receptors (King and Townsend-Nicholson 2003). The binding of ATP to P2X receptors opens the channels and allows the flow of cations through the membrane, which can lead to increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The P2Y receptor family consists of eight subtypes (P2Y_1 ,

W. Bintig · A. Ngezahayo (✉)
Institute of Biophysics, Leibniz University Hannover,
Herrenhäuser-Str. 2,
D-30419 Hannover, Germany
e-mail: ngezahayo@biophysik.uni-hannover.de

J. Baumgart · A. Heisterkamp · H. Lubatschowski
Laser Zentrum Hannover e.V.,
Hollerithallee 8,
D-30419 Hannover, Germany

W. J. Walter
Molecular and Cell Physiology, Hannover Medical School,
Carl-Neuberg-Str. 1,
D-30625 Hannover, Germany

P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ and P2Y_{11–14}) and belongs to the class of seven-transmembrane G-protein-coupled receptors (7TM-GPCRs). These receptors share a common membrane topology and the ability to stimulate various G-proteins. Like other metabotropic 7TM-GPCRs, the P2Y purinergic receptors stimulate various intracellular signalling pathways (Abbracchio et al. 2006; King and Townsend-Nicholson 2003; von Kügelgen 2006). For instance, P2Y_{12–14} receptors block the synthesis of cAMP by inhibiting adenylyl cyclase via the activation of G_i proteins. The P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ and P2Y₆ receptors act via the activation of G_q proteins, stimulate phospholipase C (PLC), and can be distinguished by their different agonists and inhibitors (Abbracchio et al. 2006; von Kügelgen 2000, 2006). P2Y₁ is not sensitive to UTP (Abbracchio et al. 2006; von Kügelgen 2000, 2006). P2Y₁₁ is sensitive to UTP and inhibited by reactive blue or suramin (Abbracchio et al. 2006; King and Townsend-Nicholson 2008; von Kügelgen 2000, 2006; White et al. 2003). However, P2Y₁₁ receptor gene is absent in murine and rat genome (Abbracchio et al. 2006). In rat cells such as GFSHR-17 granulosa cells, P2Y₂ and P2Y₄ can be distinguished from other G_q coupled P2Y receptors by their sensitivity to UTP and insensitivity to UDP. Conversely, P2Y₆ can be stimulated by UDP and inhibited by reactive blue as well as by pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate (PPADS) (Abbracchio et al. 2006; Burnstock 2007a, b; von Kügelgen 2000, 2006). At low ATP concentration (<10 μM), the stimulation of P2Y₂ and P2Y₄ receptors can be antagonized by reactive blue (Wildman et al. 2003). P2Y₂ and P2Y₄ can be distinguished by the P2Y₄ sensitivity to Zn²⁺. Applied together with ATP, Zn²⁺ blocked P2Y₄ but does not affect P2Y₂ (Wildman et al. 2003). The P2Y receptors that activate G_q stimulate PLC and thereby induce hydrolysis of the membrane phosphoinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) to yield inositol-1,4,5-trisphosphate (IP₃) and 1,2-diacylglycerol (DAG). As an intracellular second messenger, IP₃ activates the IP₃ receptor, a ligand-gated Ca²⁺ channel expressed in the ER membrane that releases Ca²⁺ into the cytosol when activated. The increased [Ca²⁺]_i is involved in stimulating various signal transduction pathways and, along with DAG, activates protein kinase C (PKC), which in turn stimulates various cellular activities such as proliferation. Ca²⁺ can also activate or inhibit Ca²⁺-sensitive ion channels and thus alter the membrane potential. These alterations can be registered as hyperpolarization or depolarization of the cell membrane.

We used the perforated patch-clamp technique coupled with imaging of [Ca²⁺]_i by the Fura 2/AM ratiometric method (Gryniewicz et al. 1985) in rat GFSHR-17 granulosa cells expressing FSH receptors. These cell line represents an *in vitro* model for rat granulosa cells in maturing follicle (Keren et al. 1993). We observed a high

permeability of the cells to K⁺ and Cl⁻, which could be involved in the secretion of antral fluid. We also found that Cl⁻ permeability is modulated by P2Y₂ and P2Y₄ receptors via regulation of Ca²⁺-release from intracellular stores.

Materials and methods

Chemicals

If not otherwise stated, all chemicals and cell culture media were obtained from Sigma–Aldrich (Taufkirchen, Germany).

Cell culture

The rat GFSHR-17 granulosa cells (Keren et al. 1993) were seeded (2–5 × 10⁵ cells/ml) on cover slips in petri dishes containing Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 5% foetal calf serum, penicillin and streptomycin. Cells were cultivated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The culture medium was renewed every 2–3 days. Cells were used for the experiments 2–5 days after plating. The GFSHR-17 cells were used up to a total of 25 passages.

Electrophysiological measurements

A cover slip with cells was transferred to a superfusion chamber containing 0.5 ml of a bath solution composed of (in mM) 121 NaCl, 5 KCl, 6 NaHCO₃, 5.5 glucose, 0.8 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, and 25 HEPES. The pH was adjusted to 7.4 by addition of 10–15 mM NaOH. The chamber was mounted on a Zeiss inverted microscope (Oberkochen, Germany). Cells were washed with 10 ml (2 ml/min) of the bath solution and allowed to adapt to room temperature (20–24°C) for at least 30 min. Perforated patch-clamp configuration was established on single cells using a patch-clamp amplifier EPC 7 (List Medical, Darmstadt, Germany). A stock solution of 50 mg/ml amphotericin B in DMSO was diluted to 250 μg/ml in the pipette filling solution composed of (in mM) 140 KCl, 5 NaCl, 1 MgCl₂, 0.25 CaCl₂, 0.5 EGTA, 1 glucose, and 10 HEPES (pH 7.4). A stable perforated patch-clamp configuration was achieved within 3–5 min of the establishment of the cell-attached patch-clamp configuration. The membrane potential was registered in current-clamp mode. The data were filtered at 3 kHz and digitised at 10 kHz via an interface ITC 16 (Instrutech, Minnesota, USA). Data acquisition and off-line analyses were performed using the software Pulse Pulsefit (HEKA Electronics, Lamprecht, Germany), Excel (Microsoft, USA) and Origin (Microcal Software, Inc, Northampton, USA).

Measurement of $[Ca^{2+}]_i$

Measurements of $[Ca^{2+}]_i$ concentration were performed as described previously (Gryniewicz et al. 1985; Ngezahayo et al. 2003). Cells were loaded with Fura 2/AM (Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach am Taunus, Germany) for 20–30 min at room temperature. The Fura 2/AM loaded cells were then transferred to the superfusion chamber mounted on an inverted microscope (see above). Cells were then washed with the bath solution (2 ml/min) for at least 5 min to remove external Fura 2/AM. The dye in the cells was excited at 340 nm and 380 nm using a monochromator polychrome II (T.I.L.L. Photonics GmbH, Planegg, Germany) equipped with a 75 W XBO xenon lamp. The fluorescent images and intensities at 510 nm were registered with a digital CCD camera (C4742-95, Hamamatsu Photonics K.K.; Japan) and used to calculate the fluorescence ratio (F_{340}/F_{380}). $[Ca^{2+}]_i$ was estimated from F_{340}/F_{380} ratio as described by Gryniewicz et al. (1985) using the program Aquacosmos (Hamamatsu Photonics K.K.; Japan). Agonists or inhibitors were applied during electrophysiological as well as Ca^{2+} -imaging experiments using a Small Volume Perfusion System setup (Bioscience Tools, San Diego, USA).

Western blot

To isolate the proteins, cells were collected from culture dishes in ice cold phosphate buffered solution (PBS) containing (in mM): 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na_2HPO_4 , and 1.8 KH_2PO_4 (pH 7.4). After centrifugation at 500 g at 4°C for 5 min, the supernatant was discarded and the cells were diluted in a lysis buffer containing (in mM): 10 NaCl, 25 HEPES, 2 EDTA, and protease inhibitors (aprotinin and phenylmethylsulphonyl fluoride), (pH 7.5). Cells were then sonicated at 4°C for 10 min followed by a centrifugation step at 15,000 g at 4°C for 30 min. The supernatant was again discarded and the pellet was dissolved in 30–50 μ l of a solubilization buffer containing (in mM): 200 NaCl, 50 HEPES, protease inhibitors (pH 7.5). An equal volume of a 2% Chaps solution was added to the solubilization buffer, and a centrifugation step was performed at 6,500 g at 4°C for 10 min. The protein concentration in the supernatant was estimated using the Bradford technique. For each experiment, samples containing 5–10 μ g of protein were applied to the SDS polyacrylamide gel and separated by electrophoresis. The separated proteins were transferred to a nitrocellulose membrane using 1.2 mA/cm² for 120 min. Staining the nitrocellulose membrane was performed by overnight incubation at 4°C with the corresponding primary anti-P2Y receptor antibodies (Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel) diluted to 1:1000 (P2Y₂, 0.8 mg/ml) or 1:500 (P2Y₄, 0.3 mg/ml). The membrane was washed with TBST

containing (in mM): 137 NaCl, 20 Tris-HCl, 0.1% Tween (pH 7.5) and then incubated for 1–2 h with goat-anti-rabbit IgG secondary antibodies conjugated with alkaline phosphatase and diluted to 1:500. Proteins were visualised using Sigma Fast BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium) followed by a final washing step in H₂O. During all washing steps and the incubations with primary and secondary antibody, milk (3%) was used to neutralize non-specific binding.

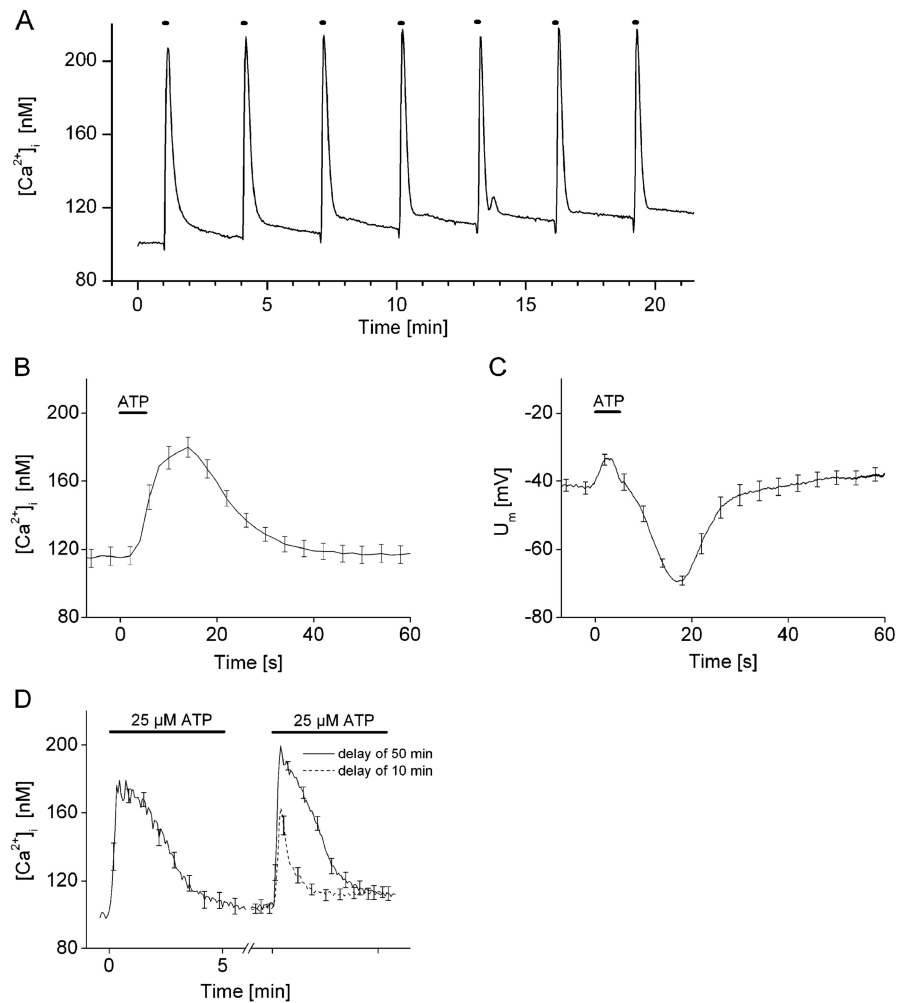
Results

Stimulation of rat GFSHR-17 granulosa cells with ATP

Repeated pulse applications of ATP (10–50 μ M) to rat GFSHR-17 granulosa cells every 3 min for 3–15 s stimulated a repetitive increase in $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 1a). This Ca^{2+} signal was characterized by an increase from a non-stimulated $[Ca^{2+}]_i$ of about 100 nM to a maximum concentration of approximately 200 nM within 5–10 s (Fig. 1b). The increase was followed by a decrease to the initial concentration within 30 s. The ATP-related stimulation of $[Ca^{2+}]_i$ increase could be repeated every 3 min by applying ATP for less than 15 s (Fig. 1a). Simultaneous Ca^{2+} -imaging and membrane potential measurement using the perforated patch-clamp technique revealed a resting membrane potential of approximately –40 mV. Application of ATP induced a 10 mV depolarization of the cells (Fig. 1c) followed by a hyperpolarization of approximately 30 mV (Fig. 1c, Table 1). The depolarization and hyperpolarization corresponded to inward and outward current (results not shown). The GFSHR-17 are strongly coupled via gap junctions (Ngezahayo et al. 2003) which renders difficult to adequately space-clamp in order to measure the currents through the single cell membrane. We therefore measured the membrane potential in the current clamp mode. The depolarization could also be induced by pressure (superfusion with control bath solution). This was not observed in all experiments, and was most likely related to pressure-dependent opening of gap junction hemichannels (Bintig et al. 2007).

Extending the duration of the presence of ATP or reducing the intervals between successive ATP applications compromised the ability to stimulate the cells, indicating a desensitization of the receptors (Fig. 1d). For a ATP presence longer than 1 min, the desensitization was characterised by a continuous reduction of the Ca^{2+} signal. The decline of the signal began even when ATP was still present. The removal of ATP was not followed by a spontaneous recovery of purinergic sensitivity. The recovery from the desensitization took a long time of 30–60 min (Fig. 1d).

Fig. 1 Intracellular Ca^{2+} homeostasis in rat GFSHR-17 granulosa cells. **a** Repeated application of $25 \mu\text{M}$ ATP (bars) for 5–15 s every 3 min induced a repetitive Ca^{2+} signal. **b** Applying $25 \mu\text{M}$ ATP induced an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$; and **c** a depolarization of approximately 10 mV followed by a hyperpolarization of approximately 30 mV. A detailed analysis showed that the depolarization was most likely unrelated to ATP. The results in **b** and **c** are averages, the error bars represent the SEM for $n=25$ experiments, respectively. The result in **a** is an average for $n=42$. For clarity, the errors are not indicated but are comparable to those shown in **b**. **d** Ca^{2+} signals evoked by consecutive ATP application for 5 min each. Depending on the delay of the second application, the amplitude and duration of the induced Ca^{2+} signal was reduced in comparison to the first one, indicating a desensitization of the receptors. To evoke a signal comparable to the first one, a delay of 45–60 min was requested



The purinergic receptors of rat GFSHR-17 granulosa cells

Two families of purinergic receptors are known. There are the ionotropic P2X receptors, which allow a Ca^{2+} influx from the extracellular space, and the metabotropic P2Y

receptors, which induce the release of Ca^{2+} from intracellular stores. To analyse whether the ATP-evoked $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -increase was related to an influx of Ca^{2+} from the extracellular solution (i.e., P2X receptors) or to a Ca^{2+} -release from intracellular stores (i.e., P2Y receptors), ATP was applied in

Table 1 The values of the membrane potential predicted by the Goldman–Hodgkin equation and measured values at various $[\text{K}^+]_o$ in non-stimulated cells and in ATP-stimulated cells ($25 \mu\text{M}$)

$[\text{K}^+]_o$ (mM)	Control		25 μM ATP		
	Predicted U_m (mV)	Measured U_m (mV)	Predicted U_m (mV) with assumption that pK^+ was increased ($pK^+=10$)	Predicted U_m (mV) with assumption that pCl^- was decreased ($pCl^-=0.01$)	Measured U_m (mV)
5	-43.8	-40.6±0.2 (n = 25)	-71.1	-71.1	-67.5±2.1 (n = 25)
20	-36.9	-34.8±0.4 (n = 8)	-45.8	-45.5	-45.0±2.9 (n = 8)
35	-31.5	-35.2±0.2 (n = 12)	-34.5	-33.0	-31.6±2.4 (n = 12)
60	-24.5	-24.2±0.1 (n = 15)	-22.0	-20.3	-21.7±1.2 (n = 15)

For the calculation of U_m , $pK^+ = pCl^- = 1$, $pNa^+ = 0.025$, as well as intracellular concentrations for $K^+ = 140$ mM, $Na^+ = 10$ mM, $Cl^- = 40$ mM, and external concentrations for $K^+ = 5–60$ mM, $Na^+ = 140$ mM and $Cl^- = 130$ mM were assumed for non-stimulated cells. The results are average ± SEM

the presence of EGTA in the external bath solution. We found that the absence of Ca^{2+} in the bath solution did not alter the ATP-evoked increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, indicating a Ca^{2+} -release from intracellular stores (Fig. 2a). This result suggests that the observed ATP-evoked response of rat GFSHR-17 granulosa cells was mainly due to P2Y receptors and not P2X receptors. Consistent with this conclusion, the application of P2X receptor agonists such as α , β -methyleneadenosine 5'-triphosphate lithium salt (α , β -meATP) did not induce any measurable changes in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ concentration of the cells (results not shown). Moreover, UTP which does not stimulate

P2X receptors, was equally efficient in stimulating the rat GFSHR-17 cells (Figs. 1b, 2b).

In rat cells, P2Y₂, P2Y₄ and to a minor extent P2Y₆ can be stimulated by UTP (Abbracchio et al. 2006; von Kügelgen 2006). The P2Y₂, P2Y₄ and P2Y₆ receptors activate G_q proteins, which are linked to PLC, PIP₂ hydrolysis and increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. We found that the Ca^{2+} signal could be completely suppressed by the PLC inhibitor U73122 or by the IP₃ receptor blocker 2-aminoethoxyethyl diphenyl borate (2-APB; Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach am Taunus, Germany) (Fig. 2 c). These results

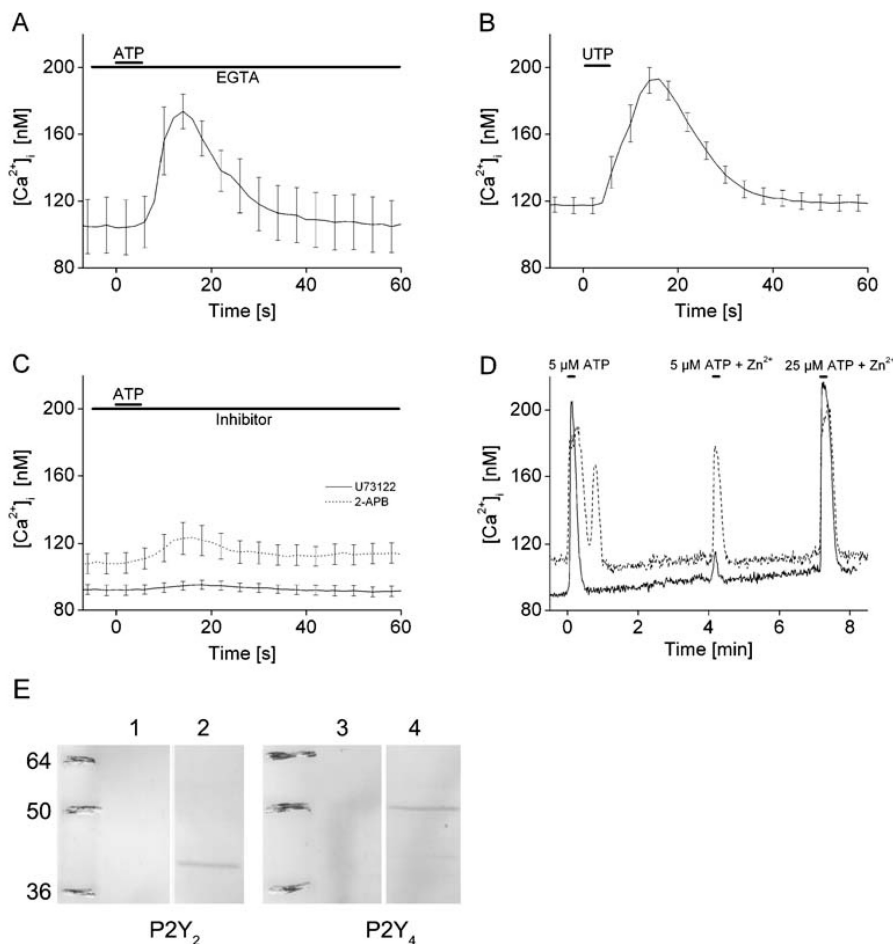


Fig. 2 Pharmacological analysis of the ATP-related Ca^{2+} response in rat GFSHR-17 granulosa cells. **a** EGTA in the extracellular solution did not alter the Ca^{2+} response to 25 μM ATP. **b** UTP (25 μM) was equally efficient in stimulating the Ca^{2+} response. **c** The presence of U73122 (10 μM), an inhibitor of PLC or 2-APB (100 μM), an IP₃ receptor antagonist, suppressed the Ca^{2+} response to ATP. The results are averages and the error bars represent the SEM for at least seven experiments for each treatment. **d** Stimulation of the rat GFSHR-17 granulosa cells by 5 μM ATP. Some cells could be stimulated while others could not. Within the responding population Zn^{2+} could

suppress the ATP (5 μM) related stimulation. Zn^{2+} did not suppress the stimulation by 25 μM ATP which stimulated almost the whole cell population. The experiments are representative of 36 cells (note the oscillating Ca^{2+} signal elicited by 5 μM ATP. This was observed in some cells. Currently we do not understand how such oscillations are regulated). **e** P2Y₂ and P2Y₄ expression was analyzed by Western blot. The P2Y₂ and P2Y₄ antibodies stained bands at ~42 kDa and ~50 kDa, respectively (lanes 2 and 4). The bands were absent when the primary antibodies were pre-absorbed with the respective antigenic peptides (lanes 1 and 3)

suggest the presence of only P2Y₂, ₄ and ₆ receptor types. An extended pharmacological battery showed that antagonists of P2Y₆ receptors such as reactive blue or PPADS (Abbraccio et al. 2006; von Kügelgen 2006) did not affect ATP-evoked responses. Furthermore, UDP, the agonist of the P2Y₆ receptor, was able to stimulate the cells, but only at a high concentration of 200 μ M (results not shown). These pharmacological experiments indicate that the observed ATP-dependent stimulation of the rat GFSHR-17 granulosa cells was mainly related to the P2Y₂ and P2Y₄ receptors. Working with low ATP concentration (5–10 μ M), we observed that the likelihood to stimulate the cells with ATP was reduced. Some cells responded while others did not. Within the responding cell population, Zn²⁺ which is known to inhibit P2Y₄ receptors (Wildman et al. 2003) blocked the response of some cells to stimulation with 5–10 μ M ATP. At 25 μ M however, ATP was able to stimulate almost all cells even in presence of 300 μ M Zn²⁺ (Fig. 2d). We also analyzed the expression of both molecules with western blot experiments. Monoclonal antibodies against P2Y₂ and P2Y₄ receptors recognized molecules of about 42 kDa and 50 kDa, respectively (Fig. 2e).

Simultaneous [Ca^{2+}]_i imaging and electrophysiological measurements showed that the suppression of the [Ca^{2+}]_i signal using a PLC inhibitor or an IP₃ receptor antagonist (Fig. 2c) correlated with the suppression of hyperpolarization (Fig. 3a). Additionally, it was found that applying the SERCA pump inhibitor cyclopiazonic acid (CPA) in the

absence of any ligand induced an increase in [Ca^{2+}]_i followed by the hyperpolarization of the cells (Fig. 3b, c).

Hyperpolarization of rat GFSHR-17 granulosa cells and ion flow

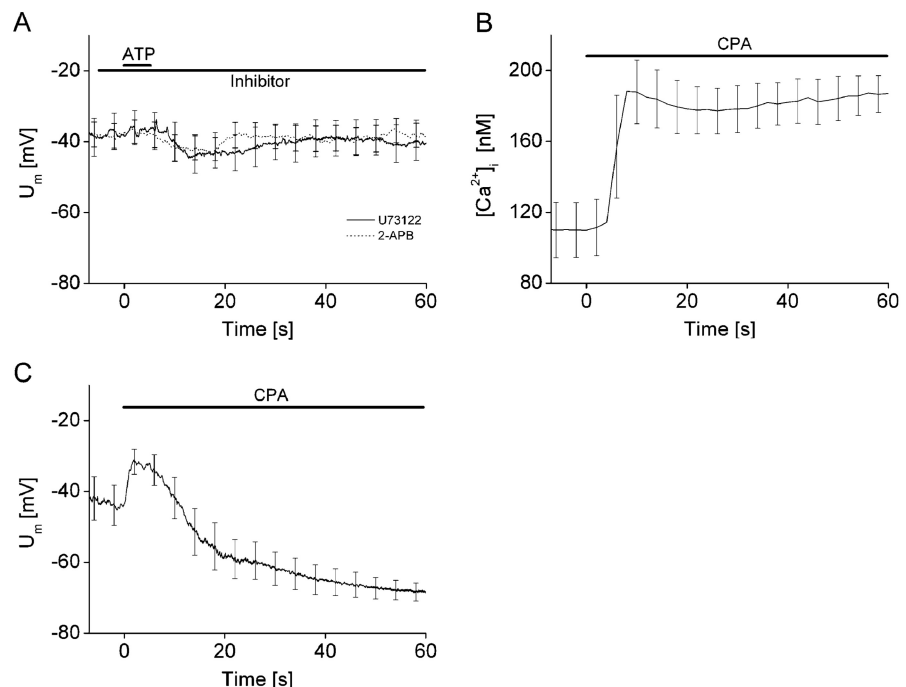
In the perforated patch-clamp configuration, rat GFSHR-17 granulosa cells showed a resting membrane potential (U_m) of approximately -40 mV (Table 1). We estimated the U_m using the Goldman–Hodgkin equation:

$$U_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{p_{K^+}[K^+]_o + p_{Na^+}[Na^+]_o + p_{Cl^-}[Cl^-]_i}{p_{K^+}[K^+]_i + p_{Na^+}[Na^+]_i + p_{Cl^-}[Cl^-]_o}$$

where p is the coefficient of membrane permeability to the respective ion and indices _i and _o indicate intracellular and extracellular spaces, respectively. The gas constant (8.314 J mol⁻¹ K⁻¹), the temperature in Kelvin (room temperature: 295°K) and the Faraday constant (96,485 C mol⁻¹) are represented by R , T , and F , respectively. In our experiments, the extracellular bath solution contained 5 mM K⁺, 140 mM Na⁺, and 130 mM Cl⁻. In the intracellular space, the values of 140 mM K⁺ and 10 mM Na⁺ were assumed. To achieve the observed resting potential of approximately -40 mV, the values $p_{K^+} = p_{Cl^-} = 1$ and $p_{Na^+} = 0.025$ as well as 40 mM Cl⁻ in the intracellular space were estimated.

The ATP-stimulated increase of [Ca^{2+}]_i was followed by a hyperpolarization to -67.5 mV (Fig. 1c, Table 1). The

Fig. 3 The relationship between the increase in [Ca^{2+}]_i and hyperpolarization. **a** The presence of U73122 (10 μ M) or 2-APB (100 μ M) suppressed both the ATP-induced Ca^{2+} response and hyperpolarization. **b** Applying CPA (50 μ M) induced an increase in [Ca^{2+}]_i that was followed by **c** hyperpolarization of the membrane potential. The results are averages and the error bars represent the SEM for at least five experiments for each treatment. It is noteworthy that CPA induced an increase in [Ca^{2+}]_i and a hyperpolarization with amplitudes similar to those stimulated by 25 μ M ATP



ATP-induced hyperpolarization was suppressed by U73122 (an inhibitor of PLC) as well as by 2-APB (IP₃-receptor antagonist) (Fig. 3a). Furthermore, inhibition of SERCA pumps using CPA stimulated an increase in [Ca²⁺]_i and was able to induce hyperpolarization of the cells (Fig. 3b, c), indicating that the [Ca²⁺]_i-increase was a prerequisite for the hyperpolarization. The hyperpolarization could be achieved by opening K⁺ channels or by inhibiting Cl⁻ channels. To achieve the observed U_m of -67.5 mV by ATP application, the Goldman–Hodgkin equation would predict that ATP induces an increase of pK^+ to 10 or a decrease of pCl^- to 0.01.

Changes in the external concentrations of K⁺ ([K⁺]_o) or the substitution of Cl⁻ with gluconate in the extracellular solution affected the U_m as predicted by the Goldman–Hodgkin equation (Tables 1, 2), if we assume a permeability of gluconate of 0.3 (Kim et al. 2003). It was not possible to distinguish whether the ATP-related hyperpolarization was due to the activation of K⁺ channels or the inhibition of Cl⁻ permeability by application of ATP in presence of various [K⁺]_o concentrations (Fig. 4a, Table 1). When NaCl was replaced by Na-gluconate in external solution, however, the application of ATP hyperpolarized the cell to -80 mV. If ATP were increasing the pK^+ to 10 or reducing the pCl^- to 0.01, the Goldman–Hodgkin equation would predict a U_m of -69 mV and -77 mV, respectively (Table 2). The comparison between the measured and the estimated values for U_m suggests that an inhibition of Cl⁻ permeability likely produced the ATP-evoked hyperpolarization. Accordingly,

apamine, clotrimazole (CLT) or iberiotoxin (IbTx), the blockers of Ca²⁺-activated K⁺-channels with low conductance (SK-channels), intermediate conductance (IK-channels) or high conductance (BK-channels), respectively, did not alter ATP-related stimulation individually or as a three-drug cocktail (Fig. 4b). Other inhibitors of K⁺ channels such as tetraethylammonium chloride (TEA) also failed to affect the ATP-stimulated hyperpolarization (results not shown). Pharmacological inhibition of Cl⁻ channels with DIDS, mibefradil or diphenylamine-2-carboxylic acid (DPC) hyperpolarized the cells to a level comparable to that achieved by ATP application under control conditions and suppressed further ATP-induced hyperpolarization (Fig. 4c, Table 3).

Discussion

This report characterises the link between purinergic receptors and the regulation of membrane potential in granulosa cells of maturing follicles using the rat GFSHR-17 granulosa cell line. The GFSHR-17 granulosa cells express the FSH receptor and are therefore a suitable in vitro model for this purpose (Keren et al. 1993). The aim of this study was to elucidate the role of purinergic receptors in the granulosa cells during follicular maturation.

Purinergic receptors are classified in two groups: ionotropic P2X receptors and metabotropic P2Y receptors. The P2X receptors are mainly permeable to cations when activated by purines and can induce depolarization as well

Fig. 4 **a** Increasing [K⁺]_o from 5 mM to 35 mM shifts the membrane potential as predicted by the Goldman–Hodgkin equation (Table 1) and suppressed ATP-induced hyperpolarization. **b** The continuous presence of a cocktail containing the inhibitors of Ca²⁺-activated K⁺ channels (0.1 μM iberiotoxin, 2 μM clotrimazole, 1 μM apamin) did not alter the ATP induced Ca²⁺ release (not shown) or hyperpolarization. **c** The inhibition of Cl⁻ channels by DPC (2.5 mM) induced hyperpolarization. Similar results were obtained using DIDS (500 μM) or mibefradil (30 μM). The results are averages and the error bars represent the SEM for at least five experiments

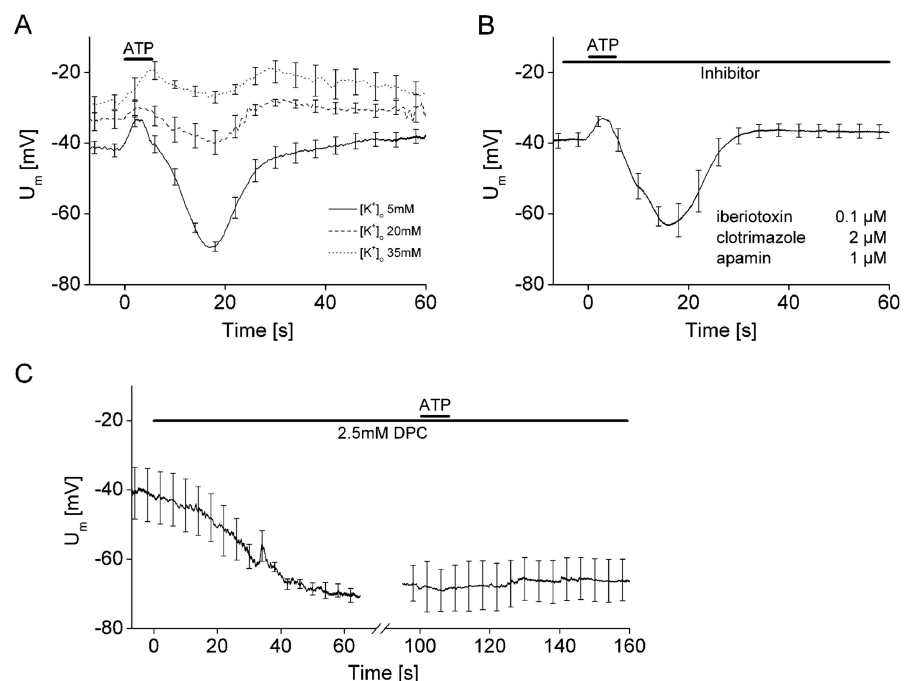


Table 2 The values of the membrane potential predicted by the Goldman–Hodgkin equation and measured values under ATP (25 μM) and non-ATP-induced stimulation of the cells when NaCl in external solution was replaced by Na-Gluconate ($p\text{Gluconate}=0.3$; $[\text{Cl}^-]_o=10\text{ mM}$)

Substitution of NaCl by Na-Gluconate ($p\text{Gluconate}=0.3$)		Na-Gluconate + 25 μM ATP		
Predicted U_m (mV)	Measured U_m (mV)	Predicted U_m (mV) with assumption that pK^+ was increased ($pK^+=10$)	Predicted U_m (mV) with assumption that pCl^- was decreased ($pCl^-=0.01$)	Measured U_m (mV)
-34.7	-36.9\pm0.3 ($n = 5$)	-69.7	-76.7	-81.5\pm1.9 ($n = 5$)

The results are average \pm SEM

as increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ due to the influx of cations, primarily Na^+ and Ca^{2+} from the external space. It is shown that applying ATP stimulates depolarization of the rat GFSHR-17 granulosa cells (Fig. 1c). As proposed by Bintig et al. (2007), however, it seems that this depolarization is not related to the activation of P2X receptors but to opening gap junction hemichannels. This is consistent with observations by other authors. It was recently shown that granulosa cells express gap junction hemichannels (Tong et al. 2007). Additionally, the hemichannels are mechanosensitive and function as ATP-release channels (Bintig et al. 2007; Gomes et al. 2005; Romanello et al. 2001). Moreover, it is shown that the ATP-related Ca^{2+} signal could be elicited even in the presence of EGTA in the extracellular solution (Fig. 2a). These results strongly suggest that the ATP-related increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ does not depend on the stimulation of P2X receptors, but on the activation of P2Y receptors.

Two physiological processes can be evoked that explain the rise of ATP in the extracellular space of the maturing follicle: paracrine secretion and nervous co-stimulation (Aguado 2002; Burnstock 2007a, b; Tai et al. 2000).

As for co-stimulation, the survival and maturation of the follicle are controlled by neurotransmitters such as acetylcholine and norepinephrine, as well as neuropeptides secreted by the ovarian nerve (Aguado 2002). It can therefore be assumed that ATP appears in the extracellular space of the maturing follicle as a co-transmitter with other neurotransmitters, as suggested by Tai et al. (2000). Upon arriving in the follicular interstitial space by either paracrine secretion or co-stimulation, we suggest that ATP binds to the P2Y receptors and induces the cascade of reactions to increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and stimulate hyperpolarization. Maturing

follicle are characterized by a strong proliferation of the granulosa cells. Whether purinergic stimulation is involved in regulation of the proliferative activity of the granulosa cells is at moment matter of speculation. We estimated the doubling time of the rat GFSHR-17 granulosa cells. For cell cultivated under control conditions and in presence of ATP or the non hydrolysable ATP- γ -S, doubling times of 25.8 h, 24.5 h and 24.2 h were respectively found. These values are not significantly different. Because of desensitization, a long lasting presence of ATP induced a single Ca^{2+} signal (Fig. 1d). It could therefore be expected that cultivation of the cells with ATP would not affect the proliferation activity. However, the doubling times show a tendency that the purinergic stimulation could increase the proliferative activity of granulosa cells. A careful study combining analysis of frequency of ATP application and the whole duration of stimulation is needed for a definitive conclusion.

P2Y₂ and P2Y₄ receptors are expressed in rat GFSHR-17 granulosa cells

The different subtypes of P2Y receptors can be distinguished by their pharmacology as well as by their intracellular signalling cascades. We observed that P2Y receptors of the rat GFSHR-17 granulosa cells could be stimulated by UTP (Fig. 2b) but not by ADP (results not shown). We also found that blocking the IP₃ pathway inhibits ATP stimulation in the cells (Figs. 2c and 3a). It can therefore be assumed that rat GFSHR-17 granulosa cells express P2Y receptor subtypes that are sensitive to UTP and are linked to the IP₃ pathway. Only P2Y₂, P2Y₄ and P2Y₆ are UTP-sensitive and are linked to the activation of

Table 3 The values of the membrane potential predicted by the Goldman–Hodgkin equation and measured values under ATP (25 μM) and non-ATP-induced stimulation of the cells, when Cl^- permeability was inhibited with DPC (2.5 mM)

DPC		DPC + 25 μM ATP		
Predicted U_m (mV)	Measured U_m (mV)	Predicted U_m (mV) with assumption that pK^+ was increased ($pK^+=10$)	Predicted U_m (mV) with assumption that pCl^- was decreased ($pCl^-=0.01$)	Measured U_m (mV)
-71.1	-68.2\pm0.5 ($n = 8$)	-83.0	-71.1	-72.9\pm1.1 ($n = 8$)

The results are average \pm SEM. Similar results were obtained with Mibefradil (30 μM) or DIDS (500 μM)

the $\text{IP}_3\text{-Ca}^{2+}$ -cascade at the intracellular site (Burnstock and Williams 2002; King and Townsend-Nicholson 2003). The agonist of P2Y_6 UDP (Abbracchio et al. 2006; King and Townsend-Nicholson 2003; von Kügelgen 2000, 2006), however, could stimulate the rat GFSHR-17 granulosa cells only at concentrations of 200 μM . Moreover, reactive blue, an inhibitor of P2Y_6 (Abbracchio et al. 2006; von Kügelgen 2000, 2006) did not affect the ATP evoked response (results not shown). These results suggest a minor role of P2Y_6 receptor and a major role of P2Y_2 and P2Y_4 receptors in ATP-induced activity in rat GFSHR-17 granulosa cells. This assumption is supported by Western blot experiments, which showed that the rat GFSHR-17 granulosa cells expressed molecules specifically recognized by anti- P2Y_2 and anti- P2Y_4 antibodies (Fig. 2e). The anti- P2Y_2 antibody stained a molecule with ~ 42 kDa (Fig. 2e, lane 2), which correlates to the predicted size of 42.0 kDa for the P2Y_2 receptor Sage and Marcus 2002). A size of 40.7 kDa was predicted for P2Y_4 receptor. The anti- P2Y_4 antibody, however, recognized a molecule of approximately 50 kDa (Fig. 2e, lane 4). These bands disappeared when the antibodies were blocked with the corresponding antigenic peptides (Fig. 2e, lane 1 and 3). The discrepancy between the predicted band at 40.7 kDa for P2Y_4 and the specifically stained band at 50 kDa can be explained by posttranslational modifications such as glycosylation (Sage and Marcus 2002). It is therefore tempting to assume that the ATP-evoked Ca^{2+} and electrical responses in the rat GFSHR-17 granulosa cells are related to the activation of P2Y_2 and P2Y_4 receptors. Further pharmacological experiments revealed that the density of each receptor type could be variable. Using low ATP concentration (5–10 μM), there were cells which could not be stimulated. Within the responding cell population, Zn^{2+} (300 μM) which inhibited P2Y_4 receptors was able to suppress the Ca^{2+} evoked response by 5–10 μM ATP in some cells, while other cells were not affected (Fig. 2d). At 25 μM ATP the inhibitory effect of Zn^{2+} could not be observed (Fig. 2d). These results could be related to a various density of the P2Y_2 and P2Y_4 receptors in the membrane of the rat GFSHR-17 granulosa cells. How both receptor subtypes participate to the regulation of the ATP-evoked response in granulosa cells remains an interesting question. A combination of biochemical analysis and molecular biological dissection is needed to determine the contribution of each receptor to the observed ATP-evoked response in granulosa cells.

ATP stimulates hyperpolarization in rat GFSHR-17 granulosa cells

The measured resting potential suggests a high $p\text{Cl}^-$ and $p\text{K}^+$ ($\cong 1$) and an elevated $[\text{Cl}^-]_i$ of about 40 mM under control conditions. This suggestion is supported by the

following experimental observations: (i) Gradual increase of $[\text{K}^+]_o$ from 5 mM to 20 mM, 35 mM and 60 mM and substitution of NaCl in the external solution with Na-gluconate depolarized the cells as predicted by the Goldman-Hodgkin equation from -40 mV to -34.8 mV, -35.2 mV, -24.2 mV and -37 mV, respectively (with assumed $p\text{Gluconate} = 0.3$ suggested by Kim et al. 2003) (Fig. 4a, Tables 1, 2). (ii) Inhibitors of Cl^- channels such as DPC, DIDS or mibefradil induced hyperpolarization of the cells to approximately -70 mV (Fig. 4c, Table 3). (iii) $[\text{Cl}^-]_i$ in the range of 40 mM has been measured in various non-excitable cells such as astrocytes and in rat GFSHR-17 granulosa cells under the whole-cell patch-clamp configuration using a pipette solution containing 140 mM K^+ , 10 mM Na^+ and 30–40 mM Cl^- (Ngezahayo et al. 2003). Since the theoretically predicted U_m under various conditions and the measured U_m are very close, it can be assumed that non-stimulated rat GFSHR-17 granulosa cells are equally permeable to K^+ and Cl^- . This permeability to ions must be compensated by a large permeability to water. Since rat GFSHR-17 granulosa cells are an in vitro model for the granulosa cells of maturing follicle, we propose that this mechanism is involved in the secretion of the antral fluid during follicle maturation.

The ATP-induced hyperpolarization can be associated with an increase in membrane permeability to K^+ or a decrease in membrane permeability to Cl^- . To achieve the observed U_m of -67.5 mV by ATP application, the

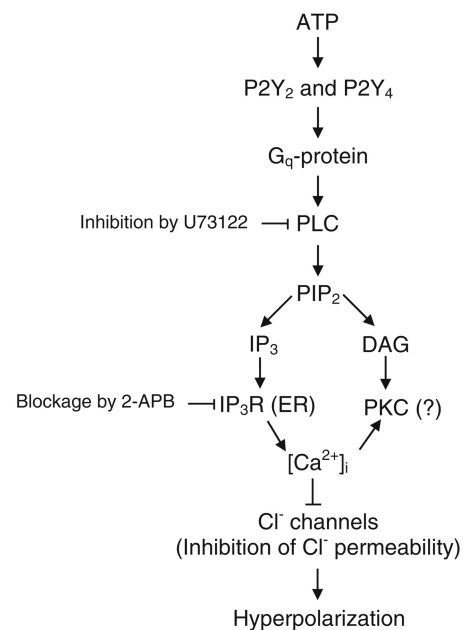


Fig. 5 Schematic representation of ATP signalling in granulosa cells of maturing follicle. The question mark shows possible pathways that remain to be elucidated

Goldmann–Hodgkin equation would predict that ATP induces an increase of pK^+ to 10 or a decrease of pCl^- to 0.01. Accordingly, we predicted the U_m that would be achieved by application of ATP under various conditions with the assumption that ATP affects the permeability of either K^+ or Cl^- (Tables 1, 2, and 3). At various $[K^+]_o$, the Goldmann–Hodgkin equation predicted values that were very close when we assumed that ATP affected either K^+ or Cl^- permeability. The measured values agree with the prediction of the Goldmann–Hodgkin equation; however, these experiments cannot decipher which ion is affected by ATP-application. After substitution of external NaCl with Na-gluconate, ATP-application hyperpolarized the cells to a membrane potential of -81 mV (Table 2). If we assume that ATP was activating K^+ -channels, a U_m of -69 mV would be predicted by the Goldmann–Hodgkin equation. Conversely, if we assume that ATP reduced pCl^- , the Goldmann–Hodgkin equation would predict a U_m of -77 mV. The results therefore suggest that ATP induced an inhibition of Cl^- permeability. Furthermore, the inhibition of Ca^{2+} -release with inhibitors of PLC or IP_3 -receptors blocked the hyperpolarization (Fig. 3a). The SERCA pump inhibitor CPA yielded an increase in $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 3b) and thereby induced hyperpolarization (Fig. 3c). If we assume that the ATP-evoked hyperpolarization was related to the activation of K^+ channels, it would be correct to assume that these channels are Ca^{2+} -activated. Pharmacological inhibition of the putative Ca^{2+} -activated BK, IK and SK channels by IbTx, CLT, apamin or a cocktail containing all these inhibitors (Fig. 4a) did not alter the ATP-induced hyperpolarization, nor did inhibitors of K^+ channels such as TEA. The Cl^- channel inhibitors DPC, DIDS or mibefradil hyperpolarized the cells to -70 mV as predicted by the Goldmann–Hodgkin equation (Table 3). An additional application of ATP was not able to provoke a further hyperpolarization, even though the Goldmann–Hodgkin equation predicted a reinforcement of hyperpolarization to -83 mV under the assumption that the permeability for K^+ would be increased by ATP ($pK^+=10$) (Fig. 4c, Table 3). Biophysical analysis, combined with pharmacological dissection, allow us to postulate that ATP-induced stimula-

tion of $P2Y_2$ and $P2Y_4$ receptors in rat GFSHR-17 granulosa cells induces a Ca^{2+} -dependent inhibition of Cl^- channels and thereby promotes hyperpolarization (Fig. 5). We propose that an ATP-dependent inhibition of Cl^- permeability in granulosa cells of the maturing follicle is a key mechanism in regulating the secretion of antral fluid.

Acknowledgments The work was partly supported by the NANOTOME project; Biophotonik III.

References

- Abbraccio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA (2006) *Pharmacol Rev* 58:281–341
- Aguado LI (2002) *Microsc Res Tech* 59:462–473
- Arellano RO, Martinez-Torres A, Garay E (2002) *Biol Reprod* 67:837–846
- Bintig W, Buchholz V, Schlie S, Baumgart J, Heisterkamp A, Ngezahayo A (2007) *Acta Physiologica* 188(Suppl. 653):P10
- Burnstock G (2007a) *Physiol Rev* 87:659–797
- Burnstock G (2007b) *Cell Mol Life Sci* 64:1471–1483
- Burnstock G, Williams MJ (2002) *Pharmacol Exp Ther* 295:862–869
- Gomes P, Srinivas SP, Van Driessche W, Vereecke J, Himpens B (2005) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:1208–1216
- Grynkiwicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) *J Biol Chem* 260:3440–3450
- Keren TI, Dantes Sprengel AR, Amsterdam A (1993) *Mol Cell Endocrinol* 95:R1–R10
- Kim SJ, Shin SY, Lee JE, Kim JH, Uhm DY (2003) *Prostate* 55:118–127
- King BF, Townsend-Nicholson A (2003) *Toxicol Reviews* 23:1–12
- King BF, Townsend-Nicholson A (2008) *J Pharmacol Exp Ther* 324:1055–1063
- Ngezahayo A, Altmann B, Kolb HA (2003) *J Membr Biol* 194:165–176
- Romanello M, Pani B, Bicego M, D'Andrea P (2001) *Biochem Biophys Res Commun* 289:1275–1281
- Sage CL, Marcus DC (2002) *J Membr Biol* 185:103–115
- Tai CJ, Kang SK, Cheng KW, Choi KC, Nathwani PS, Leung PCK (2000) *J Clin Endocrinol Metab* 85:591–597
- Tong D, Li TY, Naus KE, Bai D, Kidder GM (2007) *J Cell Sci* 120:4016–4024
- von Kügelgen I (2000) *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 362:310–323
- von Kügelgen I (2006) *Pharmacol Ther* 110:415–432
- White PJ, Webb TE, Boarder MR (2003) *Mol Pharmacol* 63:1356–1363
- Wildman SS, Unwin RJ, King BF (2003) *Br J Pharmacol* 140:1177–1186

Anhang B: Purinergic receptors and Ca²⁺ signalling in the human blood-brain barrier endothelial cell line hCMEC/D3 (Bintig et al., 2011, in submission)

Purinergic receptors and Ca²⁺ signalling in the human blood-brain barrier endothelial cell line hCMEC/D3

Willem Bintig¹, Daniela Begandt¹, Barbara Schlingmann^{1, 2}, Linda Gerhard¹, Maria Pangalos¹, Lutz Dreyer¹, Natalija Hohnjec³, Pierre-Olivier Couraud^{4, 5}, Ignacio A. Romero⁶, Babette B. Weksler⁷, and Anaclet Ngezahayo^{1, 2#}

¹ Leibniz University Hannover, Institute of Biophysics, Hannover, Germany

² Center of Systemic Neurosciences (ZSN), Hannover, Germany

³ Leibniz University Hannover, Institute for Plant Genetics, Unit IV-Plant Genomics, Hannover, Germany

⁴ Institut Cochin, CNRS UMR 8104, Université Paris Descartes, Paris, France

⁵ INSERM U1016, Paris, France

⁶ Department of Biological Sciences, The Open University, Walton Hall, Milton Keynes, UK

⁷ Weill Medical College of Cornell University, New York, New York, USA

Running title:

P2 receptors in human blood-brain barrier endothelium

Corresponding Author:

Anaclet Ngezahayo, Leibniz University Hannover, Institute of Biophysics, Herrenhäuserstr. 2, D-30419 Hannover, Germany

Phone: +49-511-7624568

Fax: +49-511-7622606

E-mail: ngezahayo@biophysik.uni-hannover.de

Abstract

The expression and physiology of purinergic receptors of the human blood-brain barrier endothelial cells were characterised by application of molecular biological, gene silencing, and Ca^{2+} imaging techniques to hCMEC/D3 cells. RT-PCR showed the expression of the G-protein coupled receptors P2Y₂-, P2Y₆-, P2Y₁₁- as well as the ionotropic P2X₄-, P2X₅-, and P2X₇-receptors. Fura-2 ratiometry revealed that ATP or UTP mediated a change in the intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) from 150 nM to 300 nM in single cells. The change in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ corresponded to a 4-5 fold increase in the fluorescence intensity of Fluo-4, which was used for high-throughput experiments. Pharmacological dissection using different agonists (ATP γ S, UDP, ADP, BzATP, $\alpha\beta$ -meATP) and inhibitors of intracellular mediators (U73122 and 2-APB) showed a G_q-protein - PLC - IP₃ cascade mediated Ca^{2+} release, indicating that the nucleotide induced Ca^{2+} signal was mainly related to P2Y₂, 6, and 11 receptors. The gene silencing of the P2Y₂ receptor reduced the ATP or UTP induced Ca^{2+} signal and suppressed the Ca^{2+} signal mediated by P2Y₆ and P2Y₁₁ more specific agonists like UDP (P2Y₆), BzATP (P2Y₁₁), and ATP γ S (P2Y₁₁). This report identifies the P2Y₂ receptor subtype as the main purinergic receptor involved in Ca^{2+} signalling of the hCMEC/D3 cells.

Keywords:

P2 receptors; G-Protein; Neurovascular unit; Gene silencing, siRNA

Introduction

The endothelial cells which line the microvasculature of the central nervous system (CNS) form a dynamic interface between the blood tissue and the brain parenchyma. They are responsible for the maintenance of ionic and metabolic homeostasis in the brain (1, 2). They differ fundamentally from other endothelia by the presence of tight junctions which allow them to constitute the blood-brain barrier (BBB), a highly selective dam between the blood and the brain parenchyma (3). To supply the brain with nutrients while maintaining the selective barrier function, the endothelial cells express active transport systems for ions and nutrients such as glucose and amino acids and transporters which are responsible for the removal of metabolic wastes from the brain parenchyma into the blood circulation. The transport across the BBB endothelial cells is controlled by inputs from the nervous tissue as well as the blood (4, 5). These inputs reach the endothelial cells in form of neurotransmitters, hormones and cytokines which bind to specific receptors expressed at the plasma membrane of the endothelial cells (4, 6). This functional interaction between the neurons, the glial cells, the endothelial cells, and the blood tissue has established the concept of the neurovascular unit (2, 7). This concept refers also to recent observations that pathophysiological processes such as inflammation in the BBB are associated with pathologies such as stroke or neurodegenerative diseases (8, 9).

Purinergic signalling was identified as a very important signalling system for the normal function of the neurovascular unit (4). On one side (abluminal), the purinergic receptors of the endothelial cells could be stimulated by a release of purines or pyrimidines like ATP or UTP from astrocytes in response to stimulation by neurons (10, 11). On the other (luminal) side, purinergic receptors of the endothelial cells could be stimulated by the agonists released from blood cells. Moreover, it was shown that pathophysiological conditions such as inflammatory processes could affect the ATP release at either side of the endothelial cells. This increase of

ATP release could result in a pathological stimulation of the purinergic signalling of the BBB endothelial system (12, 13).

The family of purinergic receptors are membrane-bound receptors for extracellular nucleosides (P1-receptors) or nucleotides such as ATP or UTP (P2-receptors). The P2-receptors are subdivided into P2X receptors which are ligand-gated ion channels and G-protein coupled P2Y receptors with seven transmembrane regions (14-16). The binding of ATP to the ionotropic P2X receptors allows the flux of cations (mainly Na^+ and Ca^{2+}) across the membrane. The different P2Y receptors are activated by di- or triphosphates of the nucleosides adenosine and uridine in varying orders of potency. The P2Y_{1, 11, 12, and 13} receptors respond mainly to adenosine nucleotides, the P2Y₂ and P2Y₄ receptors respond equally to adenosine and uridine nucleotides, the P2Y₆ receptor subtype is predominantly sensitive to uridine nucleotides, while P2Y₁₄ is stimulated mainly by UDP-glucose (17). The P2Y_{1, 2, 4, 6, and 11} receptor subtypes are coupled to PLC via G_{q/11} proteins located at the intracellular side of the membrane, resulting in an IP₃ mediated Ca^{2+} release from internal stores. The P2Y₁₁ also mediates stimulation of adenylyl cyclase (AC) via G_s protein. The P2Y_{12, 13, and 14} subtypes are linked to AC inhibition via G_i protein (17, 18). The expression pattern of the purinergic receptors is species and cell characteristic and seems to be controlled by various physiological states of the tissue (19). The expression of purinergic receptors was shown in primary cultivated rat BBB endothelial cells by Ca^{2+} measurements. The Ca^{2+} signalling was probably related to the stimulation of the P2Y₂ receptor and to a minor extent to the activation of the P2Y₁ receptor subtype. The P2Y₁ receptor mediated Ca^{2+} release was not related to the IP₃ cascade (20, 21). RT-PCR experiments could identify mRNA for P2Y_{1, 2, 4, and 6} (22).

The goal of this report was to characterise the functional expression of the purinergic receptors in human BBB endothelial cells using hCMEC/D3, a human brain endothelial cell line which recapitulates most of the unique properties of brain endothelium with respect to the transport processes, permeability and pharmacology (23). At the mRNA level P2X_{4, 5, and 7} as

well as P2Y₂, 6, and 11 were identified. When stimulated, the cells responded with a Ca²⁺ signal. Pharmacological and gene silencing experiments showed that this Ca²⁺ signal was exclusively related to the P2Y₂ receptor subtype.

Materials and methods

Chemicals

If not otherwise stated, all chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany).

Cell culture

The human hCMEC/D3 cells were cultivated as previously described (23). Briefly, we used EBM-2 medium (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 5% foetal calf serum, 1.4 μM hydrocortisone, 5 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid, 10mM HEPES, 1 ng/ml bFGF, and chemically defined lipid concentrate (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) diluted at 1:100. The cells were placed in a cell culture incubator in which a humidified atmosphere composed of 95 % air and 5 % CO_2 at 37 °C was maintained. The culture medium was changed every 2-3 days. For experiments, hCMEC/D3 cells up to passage 37 were used.

For the calcium imaging, glass cover slips were coated with rat collagen-1 in a 24 multiwell plate (150 $\mu\text{g/ml}$, Trevigen, Gaithersburg, USA). After washing with H_2O , cells (6×10^5 cells/well) were added and cultivated in 1 ml culture medium as described above. The Ca^{2+} imaging experiments were performed 2-3 days after plating.

Measurement of $[\text{Ca}^{2+}]_i$

The intracellular Ca^{2+} concentration was measured using the Fura-2 ratiometric method as previously described (24, 25). This method allowed us an estimation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in single cells but was not efficient for high-throughput experiments. Therefore, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was measured using the Fluo-4 AM dye (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany). A dye loading mixture was produced by addition of 1 μl of a 2 mM Fluo-4 AM (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) stock solution dissolved in DMSO, 1 μl of 20 % pluronic acid F-127 dissolved in DMSO (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) and 500 μl of a bath solution composed of (in mM)

121 NaCl, 5 KCl, 6 NaHCO₃, 5.5 glucose, 0.8 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, and 25 HEPES (pH 7.4). A cover slip covered with adherent cells was transferred into the loading mixture and incubated in a cell culture incubator at 37 °C for 60 min. After loading, the cells were washed twice with fresh bath solution to remove external Fluo-4 AM. The dye-loaded cells were transferred into a superfusion chamber mounted on an inverted Nikon Eclipse TE2000-E confocal laser scanning microscope with a 10 × objective (Nikon, Düsseldorf, Germany). The intracellular dye was excited with an argon-ion laser at 488 nm and the emitted fluorescence was registered at 515 nm. For each experiment, 300 images were recorded at 1 Hz. Ten seconds after the beginning of recording, the respective agonists were applied. The images were recorded and conserved using the software EZ-C1 3.50 (Nikon, Düsseldorf, Germany) for later analysis with the software Image J.

For evaluation of single experiments, we defined the measured cells as regions of interest (ROI). The average intensity of the first ten images was generated using the z-project (<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/menus/image.html#stacks>). To this average image, an automatic adjustment of the brightness and contrast was applied (<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/menus/image.html#adjust>) to generate an image where all Fluo-4 loaded cells could be easily recognised. Using the ROI Manager and the elliptical tool (<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/menus/analyze.html#manager>), up to 100 cells were randomly marked as ROI. To measure the fluorescence intensity of the cells, a multi measurement was executed for the marked ROI in all 300 images of the respective experiments giving intensity values for each ROI in each image of the experiment. These data were imported in Excel (Microsoft) and Origin (OriginLab) for further calculation, evaluation and graphic representation of the fluorescence intensities. For each cell, the fluorescence intensities measured during the 300 s were normalised to the average of the intensities of the first 10 measured pictures prior the addition of the agonist. The results are given as average of at least 3 independent experiments. For each treatment 200-300 cells were considered.

P2Y receptor screening

Total RNA from hCMEC/D3 cells (about 2 million cells) was extracted using the Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Genomic DNA was removed by digestion with RNase-free DNase (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) for 60 minutes at 37°C. First strand cDNA synthesis of total RNA using the M-MLV RT (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) was performed according to manufacturer's protocols with poly(dT)primer.

cDNA fragments of the various P2Y and P2X receptor subtypes were amplified using a set of self designed sense and antisense primers (DNA-Star, <http://www.dnastar.com>) as reported in Table 1. PCR experiments were run on a 96 Universal Gradient PeqStar Thermocycler (PeqLab, Erlangen, Germany) in a final volume of 25 µl containing 50 ng first strand cDNA as template.

siRNA transfection and quantitative RT-PCR analysis

The human P2Y₂ and P2Y₆ Silencer Select Validated siRNAs for the gene silencing of the P2Y receptors were obtained from Applied Biosystems (Darmstadt, Germany). siRNA s9966 and s9967 for the human P2Y₂ receptor, as well as the siRNA s9972 and s224151 for the human P2Y₆ receptor subtype were tested. The respective target sequences were: s9966 sense 5'-GCUUCAACGAGGACUUCAAtt-3' and s9966 antisense 5'-UUGAAGUCCUCGUUGAAGCgg-3'; s9967 sense 5'-UCUUCUACACCAACCUUUAtt-3' and s9967 antisense 5'-UAAAGGUUGGUGUAGAAGAgg-3'; s9972 sense 5'-CGUGUACACCCUAAACCUUtt-3' and s9972 antisense 5'-AAGGUUUAGGGUGUACACGgc-3'; s224151 sense 5'-GAAGCUCACCAAAAACUAUtt-3' and s224151 antisense 5'-AUAGUUUUUGGUGAGCUUCtg-3'. As control, the Silencer Select Negative Control #2 (neg. siRNA) and the Silencer Select GAPDH siRNA were used.

For silencing the receptors, the hCMEC/D3 cells were transfected by reverse transfection with Lipofectamine 2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) in serum free Opti-MEM medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany). The respective siRNAs were diluted in Opti-MEM medium to achieve a final concentration of 10 nM. The respective siRNA/Lipofectamine complexes were given in tissue culture dishes (Ø 35 mm) (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and $2.5 - 4.0 \times 10^5$ cells in EBM-2 culture medium were plated. For control experiments, cells were cultivated in presence of the transfection reagents without siRNA.

After 48 hours, total RNA was isolated with the Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Genomic DNA was removed by digestion with RNase-free DNase at 37°C and for 60 min according to the manufacturer's protocols (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany). 70 ng RNA was used in the qRT-PCR amplification. Gene-specific PCR primer pairs for GAPDH, P2Y₂, P2Y₆ and the housekeeping gene hACTB (Table 2) designed by Primer3, v 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) were used.

The PCR amplification was performed with the Quantace SensiMix SYBR One-Step Kit (Bioline, Luckenwalde, Germany). The amplification was performed in 44 cycles (15 sec. at 94°C, 15 sec at 53°C and 15 sec at 72°C). The PCR products were separated on 2% agarose gels and stained with GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA).

The gene silencing of the P2Y receptors was quantified by the estimation of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ value as described by Schmittgen and Livak (26, 27). The amount of the respective mRNA was averaged over three biological and also three technical replicates using the constitutive housekeeping gene hACTB for internal normalization. Average values were used to calculate relative gene expression levels ($2^{-\Delta CT}$; $\Delta CT = CT_{\text{gene}} - CT_{\text{hACTB}}$). The presented results (Fig. 3) were calculated as means \pm SEM. The significance of the change in mRNA content was analyzed using the Student's t-test (*: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$).

Results

Molecular and functional analysis of P2 receptors in hCMEC/D3 cells

Expression of P2 receptors in the hCMEC/D3 cell line, an *in vitro* model of the human blood-brain barrier (BBB) endothelial cells was evaluated by RT-PCR. Various pairs of primers against the different P2 receptor subtypes (Table 1) recognised P2Y₂, P2Y₁₁, and minimally detectable P2Y₆ as well as P2X₄, P2X₅, and P2X₇ receptors in these cells (Fig. 1). To access the functionality of the receptors, we applied various purinergic agonists to the cells while following changes in the fluorescence intensity of Fluo-4 in the cells to detect changes in the intracellular concentration of free Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i). The results revealed that either ATP or UTP induces an increase in the fluorescence intensity of Fluo-4 loaded cells. Application of 2.5 μM ATP or UTP induces a 4-fold increase of the fluorescence intensity within five seconds relative to the initial intensity (Fig. 2). The rapid increase in the fluorescence intensity was followed by a decrease to the level of non-stimulated cells within ten minutes. Fura-2 ratiometric experiments (24, 25) revealed a resting [Ca²⁺]_i in single hCMEC/D3 cells of about 150 nM which was increased to 300 nM by stimulation with ATP or UTP (data not shown). We assume that the four-fold fluorescence increase of Fluo-4 loaded cells correlated with a [Ca²⁺]_i increase by about 150 nM. In the following discussion, the agonist related increase of the fluorescence intensity of Fluo-4 loaded cells also will be referred to as Ca²⁺ signal.

Higher ATP or UTP concentrations (25 μM) enhanced the stimulation of the induced increase in the fluorescence intensity of Fluo-4 loaded cells up to 5-6 fold (Fig. 2). Considering single cells, we defined a cell as stimulated if the fluorescence intensity measured in this particular cell was increased two-fold over to the non stimulated intensity. Interestingly, the total number of single cells which were stimulated by the agonists did not increase with ATP or UTP concentrations. With 2.5 and 25 μM ATP, 88.4 % and 88.9 % of the cells could be stimulated, respectively (Table 3). A similar result was also obtained for UTP, which stimulated 90.1 % and 93.3 % of the cells at 2.5 and 25 μM, respectively (Table 3).

The finding that UTP, an agonist which does not stimulate P2X receptors, could induce a Ca^{2+} signal in the hCMEC/D3 cells indicates that the ATP or UTP related Ca^{2+} signal was probably related to P2Y receptors. The following observations are also in agreement with this concept.

(i) The ATP or UTP induced Ca^{2+} signal was not affected by EGTA in the external bath solution (data not shown). (ii) The ATP and UTP related Ca^{2+} signal was suppressed by the PLC inhibitor U73122 (2.5 μM) or by the IP_3 -receptor blocker 2-APB (100 μM) (Fig. 2). (iii) The P2X specific agonist $\alpha\beta$ -meATP (500 or 1000 μM) did not induce a remarkable Ca^{2+} signal in the hCMEC/D3 cells (data not shown). Taken together, the results indicate that the purinergic stimulation of Ca^{2+} signalling in the hCMEC/D3 cells acts via the G-protein coupled P2Y receptor subtypes, which are highly sensitive to ATP and UTP.

Since we observed a possible expression of the G_q protein coupled receptors P2Y₂ and P2Y₆ as well as P2Y₁₁, we tested whether more specific agonists for P2Y₆ (UDP) or P2Y₁₁ (ATP γ S or BzATP) could induce Ca^{2+} signals. UDP (100 μM), ATP γ S (25 μM) as well as BzATP (10 or 100 μM) were able to induce a limited increase in the fluorescence intensity of Fluo-4 loaded cells. Compared to non stimulated cells, a maximal increase of the fluorescence intensity up to 3.0, 2.7, and 2.5 fold was induced respectively by UDP (100 μM), ATP γ S (25 μM) as well as by BzATP (100 μM) (Fig. 2).

At single cell level, UDP, ATP γ S, and BzATP stimulated a smaller population of cells compared to ATP or UTP (Table 3). Considering single cells as stimulated if the agonist induces an increase of the fluorescence of Fluo-4 loaded cells by at least two-fold, we observed that 10 or 100 μM of UDP stimulated 50 % and 72,5 % of the cells. 2.5 and 25 μM ATP γ S stimulated respectively 7.9 % and 54.5 % of the cells. BzATP stimulated 46 % of the cells at 10 μM or 60.8 % at 100 μM (Table 3).

P2Y₂ receptor siRNA suppresses the purinergic signalling in the hCMEC/D3 cell line

Based on the RT-PCR and our physiological results, we assumed that the P2Y₂ receptor

subtype is the most important subtype of the G-protein coupled purinergic receptor family in these cells. In further studies, we induced gene silencing of the P2Y₂ receptor using specific siRNA. The amount of the P2Y₂ receptor mRNA was reduced by about 98 % at 48 h after transfection of the cells with P2Y₂ receptor siRNA (s9967) as revealed by quantitative RT-PCR (Fig. 3). At the functional level, the reduction of the P2Y₂ receptor mRNA correlated with a reduction of the cell sensitivity towards UTP (2.5 μM). UTP (2.5 μM) induced an increase in the fluorescence intensity in cells transfected with siRNA against the P2Y₂ mRNA by only 1.5 fold compared to a four-fold increase in fluorescence of cells transfected with nonspecific siRNA (Fig. 4). At single cell level and again considering single cells as stimulated if the agonist induced an increase in the fluorescence of Fluo-4 loaded cells by at least two-fold, we found that only 25.4 % of cells transfected with P2Y₂ siRNA were stimulated by UTP (2.5 μM). In comparison, 86.1 % of the cells which were transfected with nonspecific siRNA were stimulated by UTP application (Table 3). Interestingly, the sensitivity of the cells to the agonists UDP (100 μM) or ATP_γS (2.5 μM) and BzATP (100 μM) of the P2Y₆ or P2Y₁₁ receptor subtypes was completely abolished in cells transfected with P2Y₂ siRNA (Fig. 4 and Table 3). Furthermore, using P2Y₆ siRNA to silence the P2Y₆ receptor subtype mRNA did not affect UDP (100 μM) mediated Ca²⁺ release (data not shown) despite an 83.7 % reduction of the P2Y₆ mRNA (Fig. 3). This result indicates that the P2Y₆ receptor is not involved in the nucleotide mediated Ca²⁺ signal.

Discussion

Endothelial cells express different purinergic receptors that are involved in the regulation of various pathological processes such as inflammation (12). Recent results show the importance of inflammatory processes in stroke-related injury to the neurovascular units of the blood brain barrier (8, 9, 12). In the present report, we used the hCMEC/D3 cell line, an *in vitro* model of human cerebral microvascular endothelial cells (23) to determine the expression and the physiology of purinergic receptors involved in the blood brain barrier. At the mRNA level, RT-PCR revealed that the hCMEC/D3 cells express the G-protein coupled P2Y-receptor subtypes P2Y₂, P2Y₁₁, and minimally detectable P2Y₆ as well as the ionotropic P2X₄, P2X₅, and P2X₇ receptors (Fig. 1). Other purinergic receptor subtypes could not be found although the used primers were able to detect the other receptor subtypes in other human cell lines. For G-protein coupled receptors, the P2Y₁ and P2Y₆ used primers were able to detect the corresponding receptor mRNAs in HUVECs (data not shown). As for the P2Y₄ receptor, a primer pair was also used that had been shown to recognise this receptor (28) but failed to detect the P2Y₄ receptor in hCMEC/D3 cells. The results suggest that purinergic receptor subtypes that were not detected were not expressed in the hCMEC/D3 cells. The expression of P2Y₂, 6, and 11 as well as P2X₄, 5, and 7 seems to be a blood-brain barrier (BBB) endothelial cell specific profile since a slightly different expression pattern of purinergic receptor was observed in HUVEC (29).

We performed physiological experiments to address the contribution of each receptor subtype to the physiology of the endothelial BBB cells. We found that the stimulation of hCMEC/D3 cells with ATP (2.5 or 25 μ M) induces an increase in $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 2). Analysing other purinergic agonists, we found that UTP could also elicit the Ca^{2+} signal and more efficiently than ATP (Fig. 2). The UTP mediated Ca^{2+} signal could be suppressed by inhibition of the G_q-protein coupled signal transduction pathways with the PLC-inhibitor U73122 or the IP₃-receptor blocker 2-APB (Fig. 2). The results indicate that the purinergic stimulation of the

Ca^{2+} signalling was related to stimulation of the G_q -protein coupled receptor subtypes P2Y_2 and P2Y_6 which activate the IP_3 signalling cascade (16, 30) as well as to stimulation of the P2Y_{11} receptor which activates G_q as well as G_s protein (17, 18, 30). The ionotropic P2X receptor subtypes also allow an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ when stimulated by ATP. However, this P2X receptor mediated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is related to Ca^{2+} influx from the extracellular space. In our case, the absence of external Ca^{2+} did not suppress the ATP induced Ca^{2+} signal (data not shown) suggesting that the observed P2X receptors are not involved in the induced Ca^{2+} signalling. This assumption is further emphasized by the finding that a high concentration of the P2X specific agonist $\alpha\beta\text{-meATP}$ (500-1000 μM) did not affect the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (results not shown). Taken together, the RT-PCR and the physiological results indicate that the purinergic receptor system of hCMEC/D3 cells is mainly linked to Ca^{2+} signalling induced by P2Y_2 and probable P2Y_6 as well as P2Y_{11} receptor subtypes. After those findings we then turned to the question whether the three P2Y receptor subtypes participate equally in the induced Ca^{2+} response or not. For this we used UDP which stimulates specifically P2Y_6 receptors and the agonists BzATP or $\text{ATP}\gamma\text{S}$ which bind more to P2Y_{11} than to the other P2Y receptor subtypes. 10 μM of UDP or BzATP were not able to elicit a significant Ca^{2+} signal. $\text{ATP}\gamma\text{S}$ (2.5 μM) stimulated a very limited Ca^{2+} signal (Fig. 2). Higher concentrations of the agonists were able to elicit a Ca^{2+} signal in a subpopulation of hCMEC/D3 cells. $\text{ATP}\gamma\text{S}$ at 25 μM could stimulate 54.5 % of the cells, whereas UDP or BzATP at 100 μM stimulated 72.5 % or 60.8 % of the cells, respectively (Table 3). The results could be interpreted as a minor involvement of P2Y_6 and P2Y_{11} in Ca^{2+} signalling in BBB endothelial cells. A second possibility is that neither P2Y_6 nor P2Y_{11} is involved in the Ca^{2+} signalling of the endothelial cells of the BBB but that Ca^{2+} signals induced by high concentrations of UDP, $\text{ATP}\gamma\text{S}$, or BzATP (Fig. 2) might reflect non-specific binding of these agonists to the P2Y_2 receptors. To decide between these two possibilities, we applied siRNA technology to silence P2Y_2 receptors achieving a reduction in P2Y_2 mRNA within 48 hours by 98 % (Fig. 3). This

mRNA silencing correlated with a reduction in the percentage of cells which could be stimulated by 2.5 μ M UTP from \sim 86.1 % to 25.4 % (Table 3). Furthermore, gene silencing of the P2Y₂ mRNA completely suppressed induction of a Ca²⁺ signal in the hCMEC/D3 cells by UDP, ATP γ S, or BzATP (Fig. 4). We propose therefore that the Ca²⁺ signal observed with purinergic stimuli is exclusively related to stimulation of the P2Y₂ receptor subtype and not due to other receptors such as P2Y₆. This proposition is consistent with our further observation that silencing of the P2Y₆ receptor with specific P2Y₆ siRNA did not reduce the UDP mediated Ca²⁺ signal (data not shown).

Ca²⁺ imaging experiments have shown that primary cultures of BBB endothelial cells from rats express mainly P2Y₂ receptors (20, 21). From our molecular biological and physiological experiments we can postulate that the human system is similar to the rat system where the purinergic stimulation of the Ca²⁺ signalling is only related to P2Y₂ receptor subtype (20, 21). The PCR experiments did show expression of P2Y₁₁ receptor in hCMEC/D3 (Fig. 1). However, both physiological and gene silencing experiments showed that P2Y₁₁ was not involved in nucleotide mediated Ca²⁺ signalling. It was shown that ATP could induce cAMP synthesis in rat BBB endothelial cells by a non identified mechanism (20, 22). Since P2Y₁₁ is coupled to G_s protein, it is tempting to speculate that the P2Y₁₁ receptor could be a regulator of cAMP production in endothelial cells of the BBB. The role of the P2X receptor subtypes in the physiology of the endothelial cells of the BBB is also not clear. So far, we have shown that these receptors are not involved in Ca²⁺ signalling. As ionotropic receptors, the detected P2X₄, 5 and 7 may be involved in regulation of the membrane potential of the cells. Further combined electrophysiological and molecular biological experiments should clarify this issue in the future.

Conclusion

In this report, we analysed the expression of the purinergic receptors in the human BBB

endothelial cell line hCMEC/D3. The receptor subtypes P2Y₂, P2Y₆, and P2Y₁₁ as well as P2X₄, P2X₅, and P2X₇ are expressed at the mRNA level. At functional levels we found that purinergic stimulation of the hCMEC/D3 cells induced Ca²⁺ signalling only by the P2Y₂ receptor which activated Ca²⁺ release from intracellular stores. This exclusively P2Y₂ dependent signalling was also identified in primary cultivated rat BBB endothelial cells. Our results show that at a physiological level human BBB endothelial cells express a purinergic receptor system similar to that of the rat. Furthermore, it is shown that the hCMEC/D3 cell line is a suitable model for *in vitro* analysis of further purinergic signalling cascades in the human BBB and for nucleotide mediated interactions in the neurovascular unit.

Acknowledgments

The authors thank Prof. Dr. Helge Küster and his team for discussion on the manuscript. The work was supported by the NANOTOME project (Biophotonik III) and by Boehringer Ingelheim International GmbH.

References

1. Drewes, L. R. (2001) Molecular architecture of the brain microvasculature: perspective on blood-brain transport. *J. Mol. Neurosci.* **16**, 93-98
2. Abbott, N. J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 41-53
3. Banks, W. A. (1999) Physiology and pathology of the blood-brain barrier: implications for microbial pathogenesis, drug delivery and neurodegenerative disorders. *J. Neurovirol.* **6**, 538-555
4. Iadecola, C., and Nedergaard, M. (2007) Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat. Neurosci.* **10**, 1369-1376
5. del Zoppo, G. J. (2008) Virchow's triad: the vascular basis of cerebral injury. *Rev. Neurol. Dis.* **5**, S12-S21
6. Paemeleire, K. (2002) Calcium signaling in and between brain astrocytes and endothelial cells. *Acta Neurol. Belg.* **102**, 137-140
7. del Zoppo, G. J. (2010) The neurovascular unit in the setting of stroke. *J. Intern. Med.* **67**, 156-171
8. del Zoppo, G. J. (2009) Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia. *Neuroscience* **158**, 972-982
9. Stolp, H. B., and Dziegielewska, K. M. (2009) Role of developmental inflammation and blood-brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **35**, 132-146
10. Lazarowski, E. R., and Harden, T. K. (1999) Quantification of extracellular UTP using a sensitive enzymatic assay. *Br. J. Pharmacol.* **127**, 1272-1278
11. Xu, H. L., and Pelligrino, D. A. (2007) ATP release and hydrolysis contribute to rat pial arteriolar dilatation elicited by neuronal activation. *Exp. Physiol.* **92**, 647-651

12. Di Virgilio, F., Ceruti, S., Bramanti, P., and Abbracchio, M. P. (2009) Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. *Trends Neurosci.* **32**, 79-87
13. Pineau, I., and Lacroix, S. (2009) Endogenous signals initiating inflammation in the injured nervous system. *Glia* **57**, 351-361
14. King, B. F., and Townsend-Nicholson, A. (2003) Nucleotide and nucleoside receptors. *Tocris Reviews* **23**, 1–12
15. von Kügelgen, I. (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol. Ther.* **110**, 415-432
16. Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Knight, G. E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K. A., and Weisman, G. A. (2006) International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* **58**, 281-341.
17. Fischer, W., and Krügel, U. (2007) P2Y receptors: focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain. *Curr. Med. Chem.* **14**, 2429-2455
18. Erb, L., Liao, Z., Seye, C. I., and Weisman, G. A. (2006) P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch.* **452**, 552-562
19. Ralevic, V., and Burnstock, G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **50**, 413-492
20. Albert, J. L., Boyle, J. P., Roberts, J. A., Challiss, R. A., Gubby, S. E., and Boarder, M. R. (1997) Regulation of brain capillary endothelial cells by P2Y receptors coupled to Ca²⁺, phospholipase C and mitogen-activated protein kinase. *Br. J. Pharmacol.* **122**, 935-941
21. Sipos, I., Dömötör, E., Abbott, N. J., and Adam-Vizi, V. (2000) The pharmacology of nucleotide receptors on primary rat brain endothelial cells grown on a biological extracellular matrix: effects on intracellular calcium concentration. *Br. J. Pharmacol.* **131**, 1195-1203

22. Anwar, Z., Albert, J. L., Gubby, S. E., Boyle, J. P., Roberts, J. A., Webb, T. E., and Boarder, M. R. (1999) Regulation of cyclic AMP by extracellular ATP in cultured brain capillary endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **128**, 465-471
23. Weksler, B. B., Subileau, E. A., Perrière, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., Tricoire-Leignel, H., Nicotra, A., Bourdoulous, S., Turowski, P., Male, D. K., Roux, F., Greenwood, J., Romero, I. A., and Couraud, P. O. (2005) Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J.* **19**, 1872-1884
24. Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450
25. Bintig, W., Baumgart, J., Walter, J. W., Heisterkamp, A., Lubatschowski, H., and Ngezahayo, A. (2009) Purinergic signalling in rat GFSHR-17 granulosa cells: an in vitro model of granulosa cells in maturing follicles. *J. Bioenerg. Biomembr.* **41**, 85-94
26. Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* **3**, 1101-8.
27. Baier, M. C., Keck, M., Gödde, V., Niehaus, K., Küster, H., and Hohnjec, N. (2010) Knockdown of the symbiotic sucrose synthase MtSucS1 affects arbuscule maturation and maintenance in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant. Physiol.* **152**, 1000-14
28. Hansen, M. R., Krabbe, S., and Novak, I. (2008) Purinergic receptors and calcium signalling in human pancreatic duct cell lines. *Cell Physiol. Biochem.* **22**, 157-168
29. Wang, L., Karlsson, L., Moses, S., Hultgårdh-Nilsson, A., Andersson, M., Borna, C., Gudbartsson, T., Jern, S., and Erlinge, D. (2002) P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **40**, 841-853
30. von Kügelgen, I., and Wetter, A. (2000) Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* **362**, 310-323

Legends for tables and figures**Table 1**

List of the primers used for the RT-PCR.

Table 2

List of the primers used for the quantitative RT-PCR.

Table 3

The fraction of the cells which react to stimulation with different agonists. The fluorescence images of Fluo-4 loaded cells were taken every second for 300 s. After measuring the fluorescence intensity of the non-stimulated cells during the first 10 s, the respective agonists were added at indicated concentrations while the fluorescence images were continuously monitored. For evaluation, the images were analysed using Image J software (s. main text). Each cell was defined as a region of interest and the fluorescence intensity of each individual cell evaluated. The fluorescence intensity registered in each cell for the first 10 s was average and the fluorescence intensity measured at each s in each cell was normalised to the respective averaged value. A cell was considered as stimulated if the fluorescence intensity of this cell was increased by at least two-fold the average value after addition of the agonist. Three independent experiments were performed and at least 200 single cells were measured for each treatment.

Figure 1

The different purinergic receptor expressed by the hCMEC-D3 cells as revealed by the RT-PCR. The photograph shows an expression of P2Y₂, ₆, and ₁₁ as well as P2X₄, ₅, and ₇ subtypes. The other P2X and P2Y receptor subtypes were not found.

Figure 2

Change in fluorescence intensity induced by stimulation of the cells with different agonist concentration. The data show that the cell sensitivity to ATP and UTP was similar. ATP γ S, UDP or BzATP could also stimulate the cells. However the change in fluorescence intensity was reduced (even at high concentrations) in comparison to stimulation with ATP or UTP. The PLC inhibitor U73122 could block the UTP or ATP induced increase in fluorescence intensity. The graphs represent averages of at least 200 cells for each treatment. For the sake of clarity, the error bars are not shown. The maximal SEM was $\pm 0,21$.

Figure 3

The gene silencing of P2Y₂ and P2Y₆ receptor using specific siRNAs was estimated by quantitative RT-PCR experiments. Relative to negative siRNA, the P2Y₂ siRNA (s9967) and the P2Y₆ siRNA (s224151) reduced the mRNA for the receptors by 98 % and 83.7 %, respectively. The data were normalised to the housekeeping gene hACTB.

Figure 4

Silencing the P2Y₂ receptor reduced the sensitivity of the cells to UTP and suppressed the sensitivity to UDP, ATP γ S, BzATP. It is noteworthy that the negative siRNA reduced the sensitivity of the cells to the agonists. This is probable due to a non-specific effect related to the Lipofectamine 2000 used during the transfection.

Tables and figures

Table 1

Target		Primer sequence 5'-3'	Acc. no	Amplicon (bp)
P2RX1	F	CGTCATCGGGTGGGTGTTTCTCTA	NM_002558	400
	R	AGGGCGCGGGATGTCGTCA		
P2RX2	F	GGGCCCCGAGAGCTCCATCATC	NM_012226	464
	R	GCAGGCAGGTCCAGGTCACAGTCC		
P2RX3	F	ACTGGCCGCTGCGTGA ACTACA	NM_002559	522
	R	CACGTCTGAAGCGGATGCCAAAAG		
P2RX4	F	CGGCACCCACAGCAACGGAGTCT	NM_002560	433
	R	TGTATCGAGGCGGCGGAAGGAGTA		
P2RX5	F	GGCCCCAAGAACC ACTACTGC	NM_002561	430
	R	CCTCGGCCTCCTGGGA ACTGTCT		
P2RX6	F	AGTTGGTGCCCCGTGGAGAGTGG	NM_005446	499
	R	GTGTGACGGCCGTGGGGATGAG		
P2RX7	F	CCGGCCACA ACTACACCACGAG	NM_002562	446
	R	GGCCAGACCGAAGTAGGAGAGG		
P2RY1	F	GGGCCGGCTCAAAAAGAAGAATG	NM_002563	505
	R	TCCCGCCAAGAAATAGAGAATG		
P2RY2	F	GCCGTGGCGCTCTACATCTTCTTG	NM_002564	546
	R	CGAGGTCCCGTAGGCTGGCTTTAG		
P2RY4	F	TCGGCCTGAAGAGTTTGACCAC	NM_002565	412
	R	GGGCTTGCCACCACCACAGA		
P2RY6	F	CCGCCTGGTCCGCTTCCTCT	NM_004154	412
	R	CTTGCCACGCCGCTCCTG		
P2RY11	F	GCTGCCGGCTGGGTCCTG	NM_002566	427
	R	CTGTGGCCTGGGCTATGTCTGC		
P2RY12	F	CTGGGCATT CATGTTCTTACTCTC	NM_022788	509
	R	AATTGGGGCACTTCAGCATACT		
P2RY13	F	TTTGGTGGCCGACTTGATAATGAC	NM_176894	415
	R	TTTGCTCCAGCTTTTGTGTT		
P2RY14	F	AGGGTCTCTGCCGTGCTCTT	NM_014879	506
	R	GCTTCGGTCTGACTCTTTGTGTAG		

Table 2

Target		Primer sequence 5'-3'	Acc. no	Amplicon (bp)
P2RY2	F	GGAATTAAGTTTCAAGAAAGG	NM_002564	252
	R	AACTCAGCCCTCATTACTTAC		
P2RY6	F	ACCCCATCCTCTTCTACTT	NM_004154	258
	R	TGAAGAAATAGTTTTTGGTGA		
GAPDH	F	GCTCATTTCTGGTATGAC	NM_002046	274
	R	ACAGGGTACTTTATTGATGGT		
ACTB	F	ATATGAGATGCGTTGTTACAG	NM_001101	257
	R	CAAAAGCCTTCATACATCTC		

Table 3

concentration [μ M]	UTP		ATP		UDP		ATPyS		BzATP		ADP	
	2.5	25	2.5	25	10	100	2.5	25	10	100	10	100
untransfected cells [%]	90.1	93.3	88.4	88.9	50.0	72.5	7.9	54.5	46.0	60.8	12.1	40.6
negative siRNA [%]	86.1	--	--	--	--	34.4	15.2	--	--	58.3	--	33.0
P2Y ₂ siRNA [%]	25.4	--	--	--	--	3.4	0	--	--	9.8	--	3.5

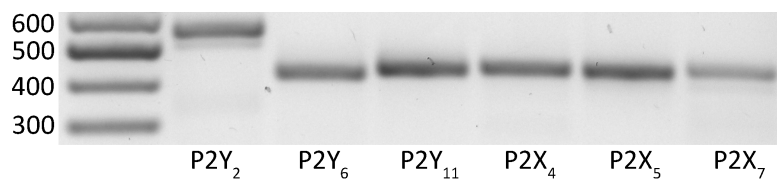


Figure 1

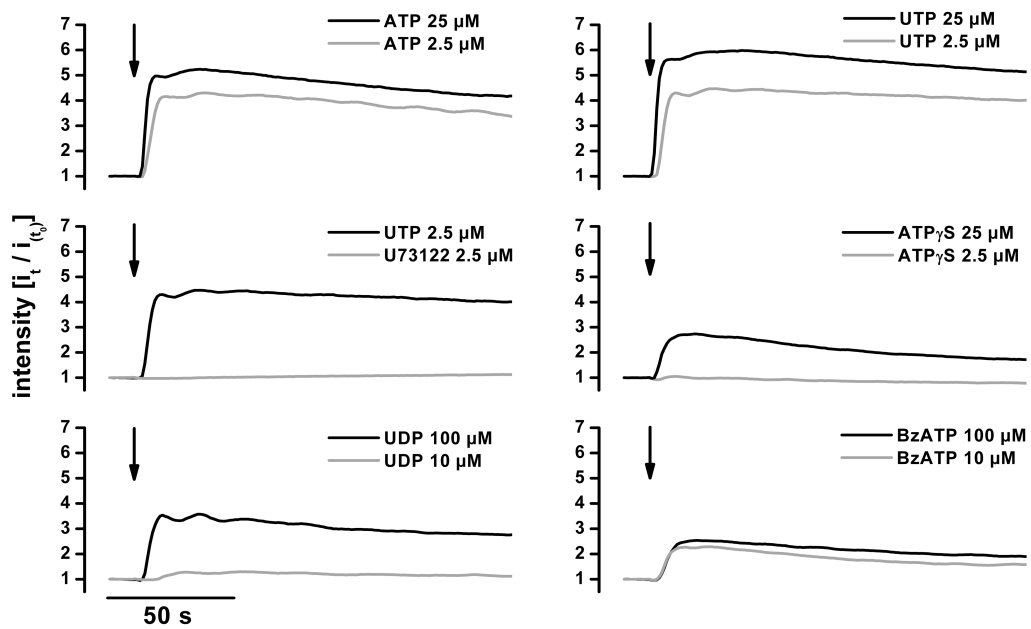


Figure 2

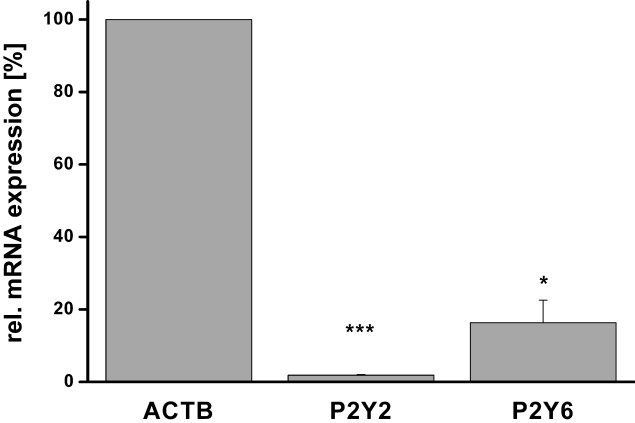


Figure 3

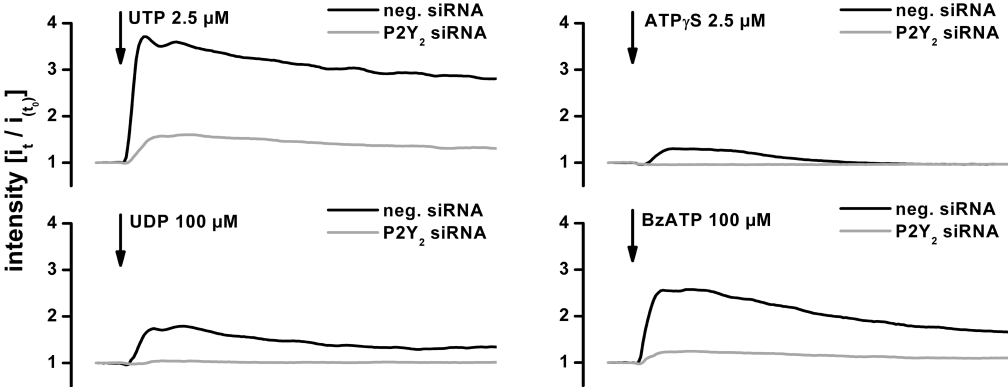


Figure 4

Anhang C: Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living GFSHR-17 and MTH53a cells (Baumgart et al., 2008)

This paper was published in Optics Express and is made available as an electronic reprint with the permission of OSA. The paper can be found at the following URL on the OSA website: <http://www.opticsinfobase.org/oe/abstract.cfm?URI=oe-16-5-3021>. Systematic or multiple reproduction or distribution to multiple locations via electronic or other means is prohibited and is subject to penalties under law.

Quantified femtosecond laser based opto-perforation of living GFSHR-17 and MTH53a cells

J. Baumgart^{1*}, W. Bintig², A. Ngezahayo², S. Willenbrock³, H. Murua Escobar³, W. Ertmer⁴, H. Lubatschowski¹, and A. Heisterkamp¹

¹Laser Zentrum Hannover e.V., Hollerithallee 8, Hannover, Germany

²Institute of Biophysics, Leibniz University, Herrenhaeuserstr. 2, Hannover, Germany

³Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine, Bischofsholer Damm 15, Hannover, Germany

⁴Institute of Quantum Optics, Leibniz University, Welfengarten 1, Hannover, Germany

*Corresponding author: j.baumgart@lh.de

Abstract: Opto-perforation is an interesting alternative to conventional techniques for gene transfer into living cells. The cell membrane is perforated by femtosecond (fs) laser pulses, in order to induce an uptake of macromolecules e.g. DNA. In this study, we successfully transfected a canine cell line (MTH53a) with GFP vector or a vector coding for a GFP-*HMGB1* fusion protein. The transfected cells were observed 48 hours after treatment and they were not showing any signs of apoptosis or necrosis. Based on simultaneously measured membrane potential changes during the perforation, we were able to calculate and experimentally verify that the relative volume exchanged is 0.4 times the total cell volume. Thus, for first time a quantitative predication of the amount of uptaken molecules and therefore a quantification of the transfection is possible. Additionally, this method offers new high efficient possibilities for critical transfection approaches involving special cell types, e.g. primary and stem cells.

© 2008 Optical Society of America

OCIS codes: (170.0170) Medical optics and biotechnology; (350.4855) Optical tweezers or optical manipulation; (320.7090) Ultrafast lasers; (999.9999) Optical transfection

References and links

1. M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward, D.C. Prasher, "Green fluorescent protein as a marker for gene expression," *Science* **263**, 802–805 (1994)
2. D.C. Prasher, V.K. Eckenrode, W.W. Ward, F.G. Prendergast, M.J. Cormier, "Primary structure of the Aequorea Victoria green-fluorescent protein," *Gene* **111**, 229–233 (1992)
3. E. Tekle, R.D. Astumian, P.B. Chock, "Electroporation by Using Bipolar Oscillating Electric Field: An Improved Method for DNA Transfection of NIH 3T3 Cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4230–4234 (1991)
4. J.L. Stilwell, D.M. McCarty, A. Negishi, R. Superfine, R.J. Samulski, "Development and Characterization of Novel Empty Adenovirus Capsids and Their Impact on Cellular Gene Expression," *J. Virol.* 12881–12885 (2003)
5. W.S. Wold, K. Doronin, K. Toth, M. Kuppaswamy, D.L. Lichtenstein, A.E. Tollefson, "Immune responses to adenoviruses: viral evasion mechanisms and their implications for the clinic," *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 380–386 (1999)
6. P. Menendez, L. Wang, M. Bhatia, "Genetic Manipulation of Human Embryonic stem cells: A System to Study Early Human Development and Potential Therapeutic Applications," *Curr. Gene Ther.* **5**, 375–385 (2005)
7. U.K. Tirlapur, K. König, "Targeted transfection by femtosecond laser," *Nature (London)* **418**, 290–291 (2002)
8. D. Stevenson, B. Agate, X. Tsampoula, P. Fischer, C.T.A. Brown, W. Sibbett, A. Riches, F. Gunn-Moore, K. Dhollakia, "Femtosecond optical transfection of cells: viability and efficiency," *Opt. Express* **14**, 7125–7133 (2006)

9. V. Kohli, J.P. Acker, A.Y. Elezzabi, "Reversible permeabilization using high-intensity femtosecond laser pulses: applications to biopreservation," *Biotechnol. Bioeng.* **92**, 7 (2005)
10. A. Vogel, J. Noack, G. Huettman, G. Paltauf, "Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues," *Appl. Phys. B* **81**, 1015–1047 (2005)
11. A. Ngezahayo, B. Altmann, H.-A. Kolb, "Regulation of Ion Fluxes, Cell Volume and Gap Junctional Coupling by cGMP in GFSHR-17 Granulosa Cells," *J. Membrane Biol.* **194**, 165–176 (2003)
12. M. Bustin, "Regulation of DNA-Dependent Activities by the Functional Motifs of the High-Mobility-Group Chromosomal Proteins," *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5237–5246 (1999)
13. K. König, "Multiphoton Microscopy in Life Sciences," *J. Microscopy* **200**, 2, 83–104 (2000)
14. O.P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F.J. Sigworth, "Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches," *Pflügers Arch.* **391**, 85–100 (1981)
15. E. Neher, B. Sakmann, "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres," *Nature (London)* **260**, 799–802 (1976)
16. M. Numberger, A. Draguhn, *Patch-Clamp-Technik* (Spektrum Akademischer Verlag, 1996)
17. D. Goldman, "Potential, impedance, and rectification in membranes," *J. Gen. Physiol.* **27**, 37–60 (1943)

1. Introduction

DNA transfection is a central tool in cellular biology to study the effect of induced gene expression or negative gene regulation. For example gene transfer coding green fluorescent protein (GFP) fusion proteins [1, 2], allows to characterize the in vivo behavior and localization of these proteins, providing a central technique to understand the respective protein biology. Several methods were developed to introduce membrane impermeable molecules into the cells. Common methods are the use of viral vectors, chemical carriers and electroporation [3] to permeabilize the membrane so that the molecules can diffuse into the cell. However, the critical aspect in cell transfection remains the efficiency achieved, toxicity, and reproducibility depending on the characteristics of the used cells. Accordingly to this, primary cells are difficult to transfect using chemical reagents [4, 5]. Usage of electroporation might as well be limited because high electrical fields can induce irreversible cell damage to sensitive cells as primary cells and stem cells due to their limited cell population [6].

A novel alternative method avoiding the described problematics is the perforation of the membrane using fs-laser pulses [7, 8]. Whereas the whole membrane is perforated by electroporation, the fs-laser pulses are focused on a small region of the membrane less than one micrometer [9] in diameter. Due to the shortness of the laser pulses, almost no heating of the irradiated volume occurs as the applied pulse duration is shorter than the thermal conduction time. The manipulation induced by these pulses is limited to the focal volume, because the effect is based on multiphoton absorption [10] and therefore relies on very high photon densities. Thus, the perforation of the cell membrane by the fs-laser pulses does not damage the whole cell, affecting only a small volume of some femtoliters [8]. The opto-perforation technique allows a "single cell targeting" and hence provides a key advantage in respect to selectivity, when compared to standard transfection.

However, the optimum parameters in terms of viability of the cells after treatment, efficiency and reproducibility are still not well known and especially the basic mechanism of the process is not yet well understood. For example, at which time pores are created, for how long they remain open and which volume is exchanged during the perforation.

In this study we combined this method with the patch-clamp technique on GFSHR-17 granulosa cells to get more insight into the mechanisms of opto-perforation. The advantage of these cells was that we have determined the parameters, which could affect the membrane potential under whole-cell configuration, in previous experiments [11]. Thus the measurement of changes of the membrane potential allows to estimate the volume exchanged between the extracellular and the intracellular space during perforation relative to the cell volume (dilution factor) and gives an idea of the maximal life time of the induced transient pore. Additionally, the estima-

tion of the exchanged volume could be used to calculate the concentration of the internalized material e.g. DNA during perforation.

As proof of principle we opto-perforated canine mammary cells (MTH53a) and transfected them with a GFP vector or a vector coding for a GFP fusion protein with the architectural transcription factor *HMGB1* (GFP-*HMGB1*). Since previous experiments with MTH53a cells have shown that these cells are suitable for transfection and expression of GFP-*HMGB1* ([12]), they represent an advantageous model to study and compare transfection by opto-perforation with classical methods. The fs-laser based transfection resulted in either completely (GFP) or nucleus specific (GFP-*HMGB1*) fluorescing cells demonstrating the ability of the transfected cells to synthesis and process recombinant proteins.

2. Materials and methods

2.1. Laser system and microscope

The laser system used in this study is a tunable Ti:sapphire laser (Coherent, Chameleon) which generates ultrashort pulses of 140 fs at a repetition rate of 90 MHz. The accessible wavelength range is between 715 nm to 955 nm and the maximum pulse energy at 800 nm is 14 nJ. The pulse duration at the focus of the laser beam is about 210 fs due to dispersion in the optics, especially in the objective [13].

The laser beam is guided via a shutter (Thorlabs, SC10) and an attenuator to the microscope (Zeiss, Axiovert200) (Fig. 1). A 0.8-NA NIR water immersion objective (Zeiss, Achroplan) focuses the beam into the sample. The beam enters the tubus directly via a home built reflector cube without passing the UV lamp pathway, so that the fluorescence equipment can be used alternatively. A 0.8-NA NIR water immersion objective (Carl Zeiss AG, Achroplan) focuses the beam into the sample with a theoretical spot size of 600 nm at a central wavelength of 800 nm. The sample is placed in a chamber with a glass bottom having a thickness of 170 μm. Successful perforation of the cell membrane is observed by fluorescence visualized by a CCD-camera, concentration measurements were performed using an EM-CCD-camera (Andor Technology, iXon).

To allow the comparison of the different laser parameters as irradiation time and pulse energy, the irradiation time was regulated by a fast shutter between 30 ms and 60 ms with an accuracy

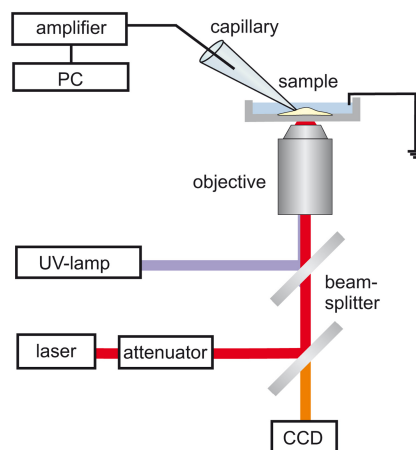


Fig. 1. (Color online) Schematic setup of the opto-perforation system.

of 1 ms and the pulse energy was changed by an attenuator consisting of a half waveplate and a polarizing beamsplitter cube. All experiments were realized at a central wavelength of 800 nm.

The imaging and manipulation program includes the manipulation tool for the nitrogen laser (Carl Zeiss AG, PALM), which was used to mark the manipulation area by cutting a rectangle into the glass cover slip. The microscope includes the fluorescence equipment, the UV lamp, the filters for propidium iodide (coupled to DNA) and for GFP, and the patch-clamp setup.

2.2. Patch-clamp studies

The membrane potential of the cells was measured by the patch-clamp technique [14] (Fig. 2) in current clamp modus using an amplifier (Axon Instruments, Axopatch-1D) and the computer interface (Instrutech Corporation).

The whole cell configuration was established on cells using a pipette-solution consisting of in mM: 100 K⁺-Gluconat, 40 KCl, 10 Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 5 Na₂ATP, 1 Glucose, 1 MgCl₂, 5 EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid), 0.25 cAMP (3'-5'-cyclic adenosine monophosphate), 0.5 cGMP (cyclic guanosine monophosphate), pH 7.4 and an osmolarity 295 ± 5. The patch electrode with the pipette-solution has a resistance of 10 MΩ.

During the patch-clamp measurements the cells were maintained in NaCl-media containing in mM: 121 NaCl, 5 KCl, 0.8 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 6 NaHCO₃, 5.5 glucose, 25 HEPES, pH 7.4 and an osmolarity 295 ± 5.

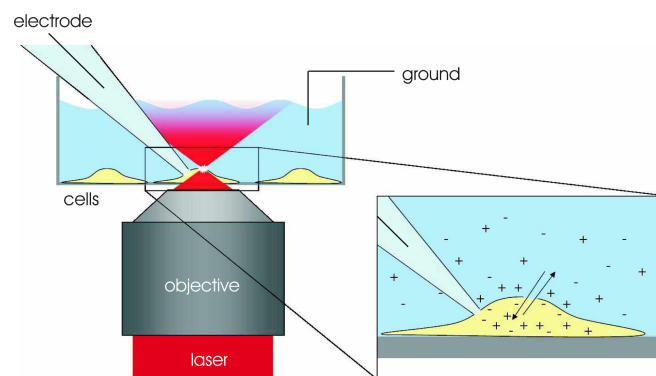


Fig. 2. (Color online) Sketch of simultaneous patch-clamp and opto-perforation of a living cell. The induced transient pore allows the diffusion of molecules through the membrane.

2.3. Cell cultures and labeling of granulosa cells

GFSHR-17 granulosa cells of rat were cultivated on cover slips using DMEM 8900 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS) and the antibiotics penicillin, streptomycin and partricin. For laser-manipulation, a cover slip with cells was transferred in a perfusion chamber containing 0.5 ml of NaCl-media and 100 to 1000 μM of lucifer yellow (LY) or 1.5 μM of propidium iodide (PI).

2.4. Opto-perforation and viability control

PI was dissolved in the media before manipulation. The laser was focussed onto the membrane of the cell to induce a transient pore and an uptake of the solution with the dye molecules by

diffusion. After treatment the cells were observed by fluorescence microscopy to verify the uptake of the dye and then washed with PBS and incubated in PBS for 90 minutes.

Then the viability of the treated cells was controlled by relabeling the sample with propidium iodide and comparing the fluorescence intensity before and after restaining. As the fluorescence intensity of the perforated cells is very low due to the small perforated area and the short interaction time of the laser, there should be an increase of fluorescence intensity in the cells with a damaged cell membrane which indicates the cells to be in a pathologic state.

2.5. Cell cultures of canine mammary cells and transfection by opto-perforation

Canine mammary cells MTH53a were cultivated in poly-L-lysine coated glass-bottom-dishes (MatTek) using M199 media (Gibco) supplemented with 20% FCS and penicillin and streptomycin. The demonstration of the principle of transfection using opto-perforation was performed either with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ non-recombinant pEGFP-C1 vector plasmid (BD Bioscience Clontech) for total cell labeling or with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ recombinant pEGFP-C1-*HMGB1* plasmid for nucleus specific labeling. The laser was focused onto the membrane to induce perforation. After treatment, the cells were washed with NaCl-media and incubated for 48 hours in the culture media. The uptake and expression of DNA was verified by fluorescence microscopy.

3. Results

3.1. Membrane potential measurement during opto-perforation by fs-laser pulses

During opto-perforation by fs-laser pulses neither shrinkage nor swelling of the cells under the present conditions were observed indicating that the cell volume was not affected. However, perforation of the membrane allows a bi-directional flux of solution into and out of the cells (Fig. 2). As long as the pore is open a volume exchange between the intracellular and extracellular space takes place. In the literature, a volume of some femtoliters is predicted [8]. For material e.g. DNA dissolved in the extracellular solution, the estimation of exchanged volume could give an indication of the concentration which can be achieved in the intracellular space after opto-perforation. Measurement of the change of membrane potential using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique [14, 15, 16] allows to determine the exchanged volume in relation to the cell volume during opto-perforation. The verification of the uptake of molecules in these experiments was performed with PI and LY dissolved in the extracellular media. PI is only fluorescent when bound to DNA. Thus, it is not necessary to wash the sample for the fluorescence observation which could lead to the loss of the whole-cell configuration. LY offers the advantage that it could be also added to the patch pipette solution at a determined concentration. Measurement of the fluorescence of LY introduced into the cells after establishment of whole-cell with different concentration of LY in the pipette solution offered a calibration for fluorescence of LY introduced in the cells by opto-perforation. Thus allowing a verification of the theoretical calculated relative volume exchanged.

The resting membrane potential of granulosa cells was found to be about -45 mV . Fs-laser irradiation divides two regimes of depolarization depending on the focusing of the laser relative to the membrane, characterized by the formation or absence of a visible gas bubble. This gas bubble is due to chemical and accumulative thermal effects, theoretically described as low density plasma regime at MHz repetition rate and pulse energies below the optical breakdown [10].

In both cases the membrane potential increases about 2 to 5 mV (Fig. 3(A)). The observed depolarization time Δt in both cases is some milliseconds longer than the laser irradiation time t .

$$\Delta t > t \quad (1)$$

While the cases showing no visible formation of the gas bubble were characterized by a slow potential repolarization, in the second case showing the gas bubble the depolarization was followed by a second step of a strong depolarization of 10 to 20 mV (Fig. 3(A) and 3(B)). After the manipulation, the potential repolarizes slowly or stays on the new level some mV above the initial value. The depolarization continues some milliseconds after the laser irradiation, as in the first case, $\Delta t > t$. After that, the cell repolarizes in some cases but slowly compared to the depolarization. The cases without bubble formation where only the first step of depolarization was achieved, no fluorescence was detectable whereas in the case of bubble formation an uptake of chromophores could be detected. Thus, the induced gas bubble can be used as indicator of perforation of the cell membrane and successful uptake of dye molecules.

3.2. Determination of the exchanged volume during opto-perforation

According to the Nernst and Goldman equations [17] (for constant dye-concentration in the media and constant cell volume) the relative exchanged cell volume can be calculated by the following equation:

$$\frac{\alpha}{V} = \frac{(1 - \exp(-\Delta U_m F / RT))}{(1 - \exp(U_m F / RT))} \quad (2)$$

where V is the cell volume, α the exchanged volume, R the gas constant, T the absolute temperature, F the Faraday constant, U_m the initial membrane potential and ΔU_m the change of membrane potential.

Knowing the membrane potential during laser irradiation, the relative exchanged cell volume can be calculated. With the mean value of 10 mV membrane potential depolarization, the relative exchanged volume α/V is about 0.4. For the GFSHR-17 granulosa cells with a diameter of 10 μm and a volume of 500 femtoliters (fl), the exchanged volume is 200 fl . At 600 μM dye concentration in the extracellular media, the intracellular dye concentration should be about 240 μM after opto-perforation.

These quantitative considerations were verified by measuring the fluorescence intensity of fs-laser induced uptake of LY by granulosa cells. Compared to PI, LY offers the advantage of a fluorescence independent on the binding to any other molecules and is therefore an excellent dye for concentration measurements. For calibration, fluorescence intensities were determined by introducing a defined LY concentration into the cell via the patch-clamp-pipette in whole-cell configuration, equilibration between the pipette-media and the cell was achieved after 15

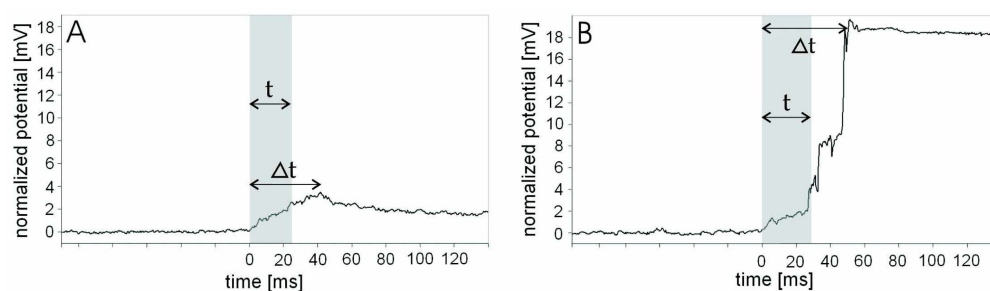


Fig. 3. The membrane potential of a granulosa cell during fs laser perforation. The laser pulse energy was 0.9 nJ. The grey bar represents the laser irradiation time t for the opto-perforation, Δt represents the maximum depolarization time. (A) There was no bubble formation during the treatment ($n = 7$); (B) a small gas bubble was created during the treatment ($n = 4$).

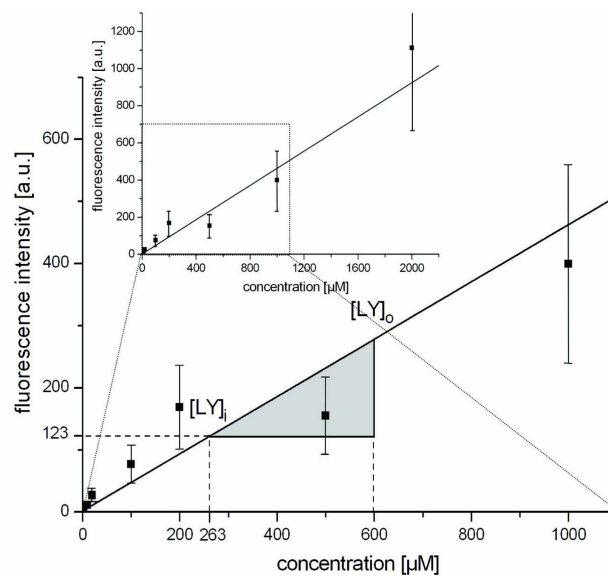


Fig. 4. The fluorescence intensity of LY introduced in cells at different concentrations via the patch-clamp pipette. The data points represent average standard deviation for at least 5 different cells for each concentration. The linear fit ($f(x) = 0.46x + 1.77$) was used to estimate the concentration of LY in the cells after opto-perforation induced uptake of the chromophor dissolved in the extracellular solution. The area of interest for the used extracellular concentrations during opto-perforation is zoomed out. As an example, to the extracellular LY concentration ($[LY]_o$) of $600 \mu M$ corresponds an intracellular concentration ($[LY]_i$) of $263 \mu M$ and a fluorescence intensity of $123 a.u.$ (table 3.2) represented by the grey triangle.

minutes. The fluorescence can then be linked to the concentration as reference intensity.

The concentration of the LY in the pipette-media was chosen between 2 and $2000 \mu M$. The fluorescence intensity increased linearly with increasing dye concentration (Fig. 4). The measured values fit well to the linear fit between $200 \mu M$ and $2 mM$. At lower concentrations (2 and $10 \mu M$) the fluorescence was too low to be clearly distinguished from the background.

We performed opto-perforation in presence of different concentrations of LY in the extracellular solution ($[LY]_o$). Since we assumed a relative volume exchange of 0.4 , a dilution of LY by a factor of 2.5 in the cell was expected. The mean fluorescence intensity of the cells after laser-manipulation and after washing with NaCl-media was measured for an extracellular concentration of $1 mM$, 600 , 200 , and $100 \mu M$ at standard laser parameters, $40 ms$ irradiation time and $0.9 nJ$ pulse energy (30 to 50 cells per concentration).

At a LY concentration of $1 mM$ in the extracellular media the calculation after equation (2) results in an intracellular concentration of $400 a.u.$ after opto-perforation. Following the reference curve for the concentration (Fig. 3), we expect a fluorescence intensity of $186 a.u.$ after perforation. We observed a mean intensity of $155 a.u.$ which leads to an intracellular concentration ($[LY]_i$) of $332 \mu M$ and a factor of exchanged media α/V of 0.33 . For 600 , 200 , and $100 \mu M$ the corresponding factor of relative exchanged media α/V is 0.44 , 0.35 , and 0.37 respectively (table 3.2). The comparison of the theoretical and the measured values show that a quantitative estimation of the amount of material e.g. DNA which is taken up during

opto-perforation is possible. This represents to our knowledge the first attempt to quantify this parameter.

Table 1. Fluorescence intensity of LY measured in cells after application of opto-perforation in presence of different LY concentrations in the extracellular solution ($[LY]_o$). The values were reported on the calibration line (Fig. 4) to estimate the intracellular LY concentration ($[LY]_i$). The measured relative volume exchanged is given as $[LY]_i/[LY]_o$. The expected intracellular concentrations were calculated by assuming $\alpha/V = 0.4$. These values were reported to the calibration curve to obtain the expected fluorescence intensities. All measured values include \pm standard deviation.

extra-cellular concentration ($[LY]_o$) [μM]	expected intracellular concentration [μM] (with $\alpha/V = 0.4$)	measured intracellular concentration ($[LY]_i$) [μM] (linear fit)	measured fluorescence intensity [<i>a.u.</i>]	relative exchanged volume α/V ($[LY]_i/[LY]_o$)
1000	400	304 ± 91	142 ± 30	0.33 ± 0.10
600	240	263 ± 79	123 ± 37	0.44 ± 0.13
200	80	70 ± 21	34 ± 12	0.35 ± 0.10
100	40	37 ± 11	19 ± 6	0.37 ± 0.11

3.3. Energy and irradiation time dependence of opto-perforation

The energy deposited into the cells has to be as low as possible to avoid damage while the efficiency of the uptake of molecules increases at longer irradiation times and higher pulse energies. The viability of the cells strongly depends on the used pulse energy, the irradiation time of the laser beam and the position of the focal point relatively to the membrane. The visualization of the viability was performed by restaining the cells with propidium iodide. In cells whose membrane is damaged, the fluorescence intensity is higher after the restaining as the fluorophore is impermeable to the membrane and it can not enter the cells if the physiologic structure is intact after the treatment. Thus the dye highlights the cells that are in a pathologic state (Fig. 5).

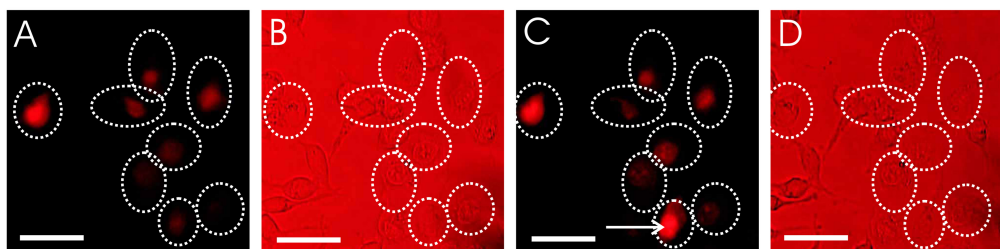


Fig. 5. (Color online) Opto-perforated granulosa cells in presence of PI. (A) Fluorescence image of granulosa cells growing on a cover slit during opto-perforation, the treated cells are highlighted by the dashed circles. $1.5 \mu M$ PI is solved in the media and the laser parameters were $0.9 nJ$ and $40 ms$. All manipulated cells are fluorescent. (B) Bright field image of the same cells. C: Fluorescence image of the cells after 90 minutes incubation in PBS. The cells were re-stained with PI to verify the viability. The cell pointed out by the arrow is representative for a cell whose membrane is damaged and therefore still permeable for the fluorophore. D: Bright field image after the incubation time. Scale bars: $30 \mu m$.

The parameters for the opto-perforation were chosen as follows. The central wavelength at 800 nm , a repetition rate of 90 MHz and pulse energies between 0.7 nJ and 1.1 nJ were used for the opto-perforation of the granulosa cells. The irradiation times were chosen between 30 ms and 60 ms (Fig. 6). The efficiency increased with the pulse energy and the irradiation time, while the viability observed 90 minutes after the treatment decreased. Every parameter combination was realized at 40 to 60 cells.

In the region of short irradiation time of 30 ms the viability of the cells is at up to 90% for pulse energies up to 0.9 nJ . For longer irradiation times as 60 ms and high pulse energy of 1.1 nJ the viability of the cells decreases to 40%.

In contrast, the efficiency of dye uptake is at 40% or lower for 30 ms irradiation time and pulse energies up to 1 nJ . The efficiency increases with increasing pulse energy and increasing irradiation time to 70% at 1.1 nJ and 60 ms (Fig. 6).

However, a good balance between viability and efficiency can be found at 40 ms irradiation time and thus 3.6 million pulses with an energy per pulse of 0.9 nJ . For these parameters, the viability is 90% and the efficiency 70%.

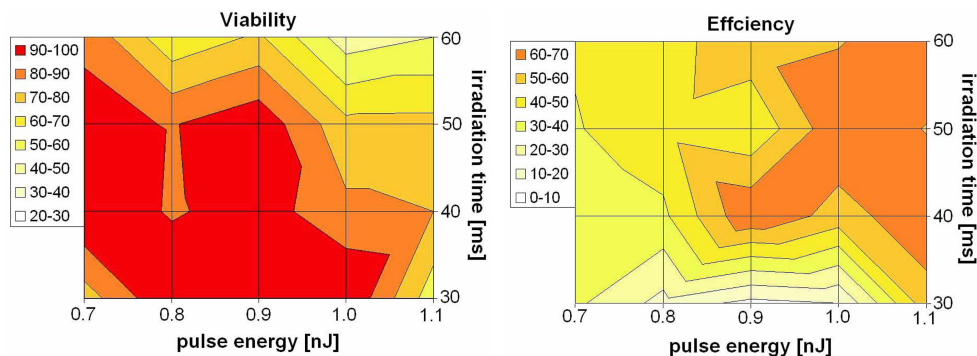


Fig. 6. (Color online) The viability of the cells (A) and the efficiency of the introduction of PI into the cells (B) dependent on the pulse energy and the irradiation time.

3.4. Transfection of *MTH53a* cells by fs-laser pulses with pEGFP-C1 and pEGFP-C1-HMGB1 vectors

The transfection of the canine mammary cells was performed at 40 ms irradiation time and thus 3.6 million pulses with an energy per pulse of 0.9 nJ , leading to a viability of the cells after treatment of about 90% and an efficiency of about 70%. The cells were treated either in presence of $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ non-recombinant pEGFP-C1 vector or recombinant pEGFP-C1-HMGB1 vector in the culture media. The fluorescence was observed 24 and 48 h after treatment allowing an expression and processing of the respective recombinant proteins. The cells transfected with pEGFP-C1 vector showed a labeling of the complete cell (Fig. 7) by the synthesized recombinant GFP proteins. The cells transfected with the pEGFP-C1-HMGB1 vector showed a specific labeling of the nucleus (fig. 4B). These specific labeling shows that the cells are post transfected still able to synthesis the pEGFP-C1-HMGB1 fusion protein and to transport the chromatin associated architectural transcription factor *HMGB1* to its native cellular localization in the nucleus.

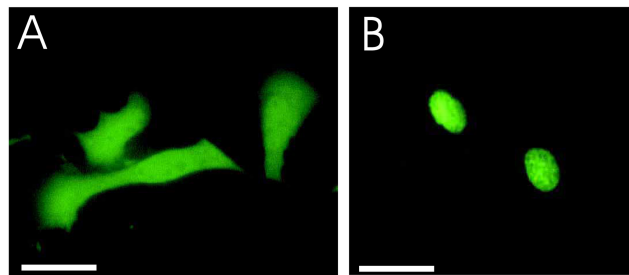


Fig. 7. (Color online) MTH53a cells transfected with either pEGFP-C1 or pEGFP-C1-*HMGB1* vectors. (A) Complete labelling of MTH53a cells by GFP. (B) Specific labelling of the MTH53a cell nucleus by pEGFP-C1-*HMGB1* fusion proteins. The opto-perforation was performed at a wavelength of 800 nm, a pulse energy of 0.9 nJ and an irradiation time of 40 ms. The images were taken 48 hours after the treatment. Scale bars: 20 μ m.

4. Discussion and conclusion

Transfection of macromolecules represents a key technique in molecular biology. The methods currently applied e.g. viral vectors, chemical carriers, lipofection and electroporation face several critical problems in terms of the achieved efficiency, toxicity, and reproducibility. Although for multiple applications the systems used are sufficient, several experimental approaches require more sophisticated methods. Parameters like a defined amount of induced molecule intake, reduced cell damage and high transfection efficiency represent critical parameters when working with cell type requiring extremely high complexity handling e.g. stem cells. The used fs-laser based opto-perforation of cells allows a defined control of the described critical parameters. In detail the measurements of the cell membrane potential showed two different behaviors during opto-perforation.

As described previously the membrane potential increased in both cases instantaneously about 2 to 5 mV at all parameters. If no bubble was created fluorescence analysis using PI did not show an uptake of the fluorophore in contrast to the case of bubble formation showing a characteristic high PI uptake. The critical parameters for formation or non-formation of gas bubbles are combination of irradiation time, pulse energy, and position of the laser focus relatively to the membrane. It can therefore be assumed that without induced bubble formation no pore was formed in the membrane and the observed change in membrane potential is related to change of permeability of the membrane to ions which did not involve larger molecules such as chromophores. It is also possible that an inadequate focusing of the laser beam generated a very small pore which closed too quickly to allow an uptake of the molecules dissolved in the extracellular solution.

In the case of bubble formation, the potential depolarized first as described above and, as soon as the bubble was created, the potential increased by another 10 mV or more. After the manipulation, the membrane potential repolarized again or stayed at the same level but did not rise to 0 mV in most cases. These results show that there was an exchange of intra and extracellular media, especially when a bubble was induced which can be used as an indicator for successful opto-perforation. Additionally it can be concluded that the cell is still alive and it is able to repair the laser induced damage.

The maximum depolarization time ($\Delta t = 60$ ms) is longer than the irradiation time ($t = 30$ ms). Thus the induced pore seems to be open longer than the increasing time of the potential. By a change in membrane potential of 10 mV, the relative volume exchange between the cells and the extra cellular solution during opto-perforation was calculated to be about 0.4 times

the cell volume. At extracellular LY concentration of 1000, 600, 200, and 100 μM , a relative volume exchange α/V of respectively 0.33, 0.44, 0.35, and 0.37 were found. The theoretically estimated value is in perfect agreement with the average value experimentally obtained of about 0.37 (table 3.2), indicating that a quantitative estimation of the material taken up during opto-perforation is possible.

The uptake of fluorochromes by perforation of the membrane by fs laser pulses was optimized in the *MHz* regime using propidium iodide as fluorescent molecule. In the range between 0.7 *nJ* and 1.1 *nJ* pulse energy and irradiation times between 25 *ms* and 60 *ms*, the viability of the cells varies between 20% and 90%. In the same manner, the efficiency varies between 90% and 10%. As a very satisfactory result the viability of the cells is about 80% at a pulse energy of 0.9 *nJ* and an irradiation time of 40 *ms* yielding an efficiency of succeed membrane perforation of about 70%.

At these parameters, we successfully transfected canine mammary cells with non-recombinant pEGFP-C1 vector or recombinant pEGFP-C1-*HMGB1* vector. This specific labeling shows that the fs-laser based transfection allows even to successfully transfect cells which are still able to synthesize and process recombinant proteins. For pEGFP-C1 or recombinant pEGFP-C1-*HMGB1* vector, 100 to 150 cells were targeted. 48 h after opto-perforation the expression of either gene was observed in about 30% of the targeted. The experiments with PI have shown that transfer of material and cell survival after opto-perforation is achieved in 70% of the targeted cells (Fig. 6). The observed difference may be related to different cellular behavior with respect to the introduced DNA. Further experiments should clarify this issue. The possibility of quantification could be used to calculate the number of DNA molecules taken up during opto-perforation. At an extracellular concentration of the pEGFP-*HMGB1* vector of 50 $\mu g/ml$, about 10 *fg* DNA molecules enter into the perforated cells during laser irradiation at a cell diameter of 10 μm .

The system established allows a controlled transfection including the possibility to determine the amount of uptake of molecules and thus allowing to regulate the amount of effector molecules transfected into the cell. Consequently this allows a gentle procedure for e.g. stem cell transfection opening new possibilities for stem cell based experimental and therapeutic approaches. Finally, the presented technique could also be applied for cell specific transfection in tissue (in situ) where various types of cells are present.

Acknowledgments

We would like to acknowledge Prof. Bernhard Keller (Georg-August University, Goettingen) for placing the patch-clamp setup to our disposal and BFI optilas for providing the EM-CCD camera. Parts of this work were funded by the German Research Foundation (DFG) (within the Transregio 37 and the excellence cluster REBIRTH).

