

Aus dem Physiologischen Institut,  
Lehrstuhl für Vegetative Physiologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. U. Pohl

**Einfluss von oxLDL auf die Apoptoseinduktion  
und Zellkopplung über Gap Junctions**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Natascha Khandoga  
aus Minsk/Weißrussland

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. U. Pohl
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Ziegler-Heitbrock Priv. Doz. Dr W. Erl
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. P. Kameritsch
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	26.07.2007

***MEINEN ELTERN***

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>6</b>
1.1. ATHEROSKLEROSE.....	6
1.2. DIE ROLLE VON oxLDL IN DER PATHOGENESE DER ATHEROSKLEROSE .....	8
1.3. APOPTOSE.....	9
1.4. GAP JUNCTION-KANÄLE.....	12
<b>2. ZIELSETZUNG .....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>20</b>
3.1. MATERIAL .....	20
3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	20
3.1.2. Kommerzielle Analysesysteme.....	22
3.1.3. Primäre Antikörper .....	22
3.1.4. Sekundärantikörper .....	22
3.1.5. Biologisches Material.....	23
3.1.6. Puffer, Lösungen und Medien.....	23
3.2. METHODEN.....	24
3.2.1. Zellkultur .....	24
3.2.2. Präparation von n-LDL und oxLDL.....	26
3.2.3. Farbstoffinjektion .....	26
3.2.4. Immunzytochemie .....	29
3.2.5. Quantitative Analyse der Apoptose .....	30
3.3. VERSUCHSPROTOKOLLE .....	34
3.3.1. Systematische Analyse der Rolle von oxLDL für die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions .....	34
3.3.2. Einfluss der Zell-Zell-Kommunikation auf die Apoptose .....	38
3.4. STATISTISCHE ANALYSE.....	42
<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>43</b>
4.1. SYSTEMATISCHE ANALYSE DER INTERZELLULÄREN KOMMUNIKATION ÜBER GAP JUNCTIONS.....	43
4.1.1. OxLDL erhöht die Zellkopplung in humanen Endothelzellen .....	43
4.1.2. Der Effekt von oxLDL auf die Zell-Zell-Kommunikation ist dosisabhängig .....	45
4.1.3. Nicht oxidiertes LDL (n-LDL) hat keinen Effekt auf die endotheliale Zell- Zell-Kommunikation .....	47
4.1.4. Superoxiddismutase (SOD) hemmt die Zellkopplung in HUVEC .....	48
4.1.5. Die OxLDL-induzierte Erhöhung in der Zellkommunikation ist cAMP/PKA abhängig .....	49
4.1.6. OxLDL (26 µg/ml) und Forskolin haben keinen sichtbaren Einfluss auf die Membranexpression von Connexinen 37 und 43 in HUVEC .....	52
4.1.7. OxLDL aktiviert die Zellkommunikation nicht durch einen LPA-Rezeptor ..	54
4.1.8. Der Effekt von oxLDL auf die Zellkopplung ist Prostaglandin abhängig....	57
4.2. BEDEUTUNG DER ZELL-ZELL-KOMMUNIKATION FÜR DIE APOPTOSEINDUKTION..	59
4.2.1. OxLDL induziert Apoptose in HUVEC.....	59
4.2.2. OxLDL induziert Apoptose in Cx40- und Cx43-HeLa-Zellen jedoch nicht in Cx37- oder Wildtyp-HeLa-Zellen .....	61
4.2.3. Das Ausmaß der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - und Streptonigrin-induzierten Apoptose ist ebenfalls Connexin-abhängig .....	64

4.2.4. Cx43-transfizierte HeLa-Zellen zeigen eine höhere Apoptoserate als Wildtyp-HeLa-Zellen .....	66
4.2.5. Cx43-transfizierte HeLa-Zellen zeigen in Zellsuspension weniger Apoptose als adhärenzte Cx43-HeLa-Zellen .....	72
4.2.6. Einfluss von neu gebildeten Gap Junctions auf die Apoptoserate.....	75
4.2.7. Proapoptotische Signale werden nicht durch Connexone (Halbkanäle) transportiert.....	77
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>79</b>
5.1. FRAGESTELLUNG UND HAUPTBEFUNDE .....	79
5.2. DISKUSSION DER METHODEN .....	81
5.2.1. Zellkultur .....	81
5.2.2. Farbstofftransfer.....	82
5.2.3. Detektion der Apoptose .....	84
5.3. DISKUSSION DER ERGEBNISSE .....	87
5.3.1. OxLDL erhöht die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions in Endothelzellen .....	87
5.3.2. Mechanismen der oxLDL-induzierten Erhöhung der Zellkopplung.....	90
5.3.3. OxLDL induziert Apoptose in HUVEC.....	95
5.3.4. Das Ausmaß der Apoptose in HeLa-Zellen ist Connexin-abhängig.....	97
5.3.5. Die Rolle der Zell-Zell Kommunikation für die Apoptoseinduktion.....	99
<b>6. SCHLUSSFOLGERUNG .....</b>	<b>105</b>
<b>7. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>107</b>
<b>8. ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>110</b>
<b>9. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>113</b>
<b>10. DANKSAGUNG .....</b>	<b>131</b>
<b>11. LEBENSLAUF .....</b>	<b>133</b>

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Atherosklerose

Kaum eine Krankheit steht seit mehreren Jahrzehnten so im Blickfeld der medizinischen und biochemischen Forschung wie die **Atherosklerose**. Atherosklerose ist ein komplexer, aktiver Prozess im Arteriensystem, der sich langsam entwickelt und über Jahre und Jahrzehnte symptomlos verläuft, bis er sich durch Ischämie, Thrombose, Angina pectoris, Herzinfarkt, Schlaganfall oder plötzlichen Tod manifestiert. An den Folgen der Atherosklerose sterben ca. 50% der Menschen in den westlichen Industrienationen (77; 110). Kennzeichen der Erkrankung ist eine chronisch fortschreitende Degeneration der großen Arterien mit progressiven Veränderungen der Gefäßwand. Durch Zellproliferation, intra- und extrazelluläre Einlagerungen von Cholesterin, Fettsäuren und Kalk sowie Akkumulation von Kollagen und Proteoglykanen kommt es zu einer Verhärtung und Verdickung der Gefäße, die mit Verengungen und Elastizitätsverlusten einhergehen. Aufgrund der Beteiligung von Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Monozyten, Makrophagen, Thrombozyten sowie Lipoproteinen, Wachstumsfaktoren, Cholesterin, Fetten, Kollagen und chemotaktischen Faktoren (Zytokinen) war es bisher schwierig, eine plausible Hypothese für das komplexe atherosklerotische Geschehen zu formulieren. Bestärkt durch zahlreiche epidemiologische und klinische Studien herrscht zumindest Einigkeit in der Bewertung von Faktoren, welche die Krankheit begünstigen (110; 156; 158). Als Risikofaktoren für die Entstehung atherosklerotischer Gefäßkrankheiten gelten heute Hypertonie, Übergewicht, Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie, Diabetes Mellitus, männliches Geschlecht, Alter, aber auch die Lebensweise, wie kalorien- und fettreiche Ernährung, Rauchen, Stress, sowie genetische und konstitutionelle Faktoren. Die herausragende

Rolle bei dieser Aufzählung fällt dem Cholesterin zu. In Bezug auf die Aufklärung der Mechanismen, die zur Initiierung der Atherosklerose führen, haben sich in den letzten Jahrzehnten zwei zentrale Hypothesen herauskristallisiert: i) die "*response to injury*" Hypothese und ii) die "*lipoprotein-induced atherosclerosis*" Hypothese.

### **Die "response to injury" Hypothese**

Die von *Ross et al* formulierte "response to injury" Hypothese sieht in der Verletzung der an das Blut grenzenden endothelialen Schicht die Initiierung des komplexen atherosklerotischen Geschehens (154-158). Zu den möglichen Ursachen, welche Verletzungen der Endothelzellschicht induzieren können, gehören mechanische Verletzungen, biochemische Veränderungen durch bakterielle Toxine, Angriff durch Viren oder Antigen-Antikörper-Reaktionen, sowie biophysikalische Einflüsse auf molekularer Ebene. Als Folge der Verletzung der Endothelzellschicht werden zwei für die Entstehung dieser Krankheit typische Phänomene beobachtet: i) die durch Wachstumsfaktoren bzw. Zytokine ausgelöste Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen aus der mehrschichtigen Media in die Intima; ii) die durch LDL-Cholesterin (Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin) verursachte Bildung von Schaumzellen in Intima und Media. Diese beiden Erscheinungen führen über einen längeren Zeitraum zur Bildung von sogenannten Plaques, die für das makroskopische Bild der Atherosklerose charakteristisch sind.

### **Die "lipoprotein-induced atherosclerosis" Hypothese**

Der amerikanische Forscher Joseph Goldstein (17-20) berichtete als erster von einer raschen Aufnahme chemisch modifizierten LDL durch Makrophagen und der darauf folgenden Umwandlung zu Schaumzellen. In Anbetracht der wichtigen Rolle von LDL und seiner modifizierten (oxidierten) Formen, sogenannten **oxLDL**, für die Entstehung der Atherosklerose, kristallisierte sich hieraus eine neue Hypothese, welche die

Verletzung von Endothelzellen nur als einen Teilschritt in einer Abfolge von komplexen Vorgängen sieht. In der oxidativen Modifizierung von LDL wird die eigentliche Ursache für die Initiierung des atherosklerotischen Geschehens gesehen.

Die beiden Hypothesen unterstreichen die essentielle Rolle von oxLDL in den pathophysiologischen Vorgängen in der Arterienwand. Zahlreiche Studien haben bereits bewiesen, dass LDL einen kausalen Faktor bei der Entwicklung der Atherosklerose darstellt: je höher die LDL-Konzentration ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Atherosklerose sich entwickelt oder fortschreitet (43; 69; 71; 85; 132).

## **1.2. Die Rolle von oxLDL in der Pathogenese der Atherosklerose**

OxLDL induziert eine endotheliale Dysfunktion, indem es chemotaktisch auf zirkulierende Monozyten wirkt, ihre Adhärenz am Endothel und ihre Penetration in den subendothelialen Raum fördert (76; 180; 187). Die im subendothelialen Raum zu Makrophagen werdenden Monozyten nehmen immer mehr LDL-Cholesterin-Partikel auf und entwickeln sich in die mit LDL übersättigten Schaumzellen (153; 209). Nach dem Sterben und Auflösen der Schaumzellen kommt es zu einer Deposition von Lipiden, LDL-Cholesterin und Kalk im subendothelialen Raum, was über einen längeren Zeitraum zur Bildung von atherosklerotischen Plaques führen kann. OxLDL induziert jedoch schon vor der Ausbildung von Plaques eine ganze Reihe von Prozessen, die zur Induktion der Atherosklerose beitragen. So beeinträchtigt oxLDL die endothelabhängige Relaxation durch die reduzierte Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und die Bildung vaskulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)(99; 104). Darüber hinaus induziert oxLDL die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle und chemotaktischer Faktoren (29; 95) sowie die Differenzierung von Monozyten zu



Makrophagen und die Expression von Scavenger-Rezeptoren (147; 210). Dies begünstigt die Infiltration von Makrophagen in die Intima und ihre Transformation zu Schaumzellen. Durch Stimulation der Proliferation von glatten Muskelzellen trägt oxLDL zum Prozess des „intimal thickening“ bei, der an der Einengung des Gefäßlumens bei fortschreitender Atherosklerose beteiligt ist (4; 23; 24). Auch prokoagulatorische Effekte werden durch oxLDL vermittelt, wie die Induktion von *tissue factor*, *plasminogen activator inhibitor II* und die Thrombozytenaggregation (2; 40; 149; 202). Die Untersuchungen der letzten Jahre konnten an humanen Atheroektomien die **Apoptose** in atherosklerotischen Plaques nachweisen (54; 63; 78), was auf eine potentielle Rolle dieses, auch physiologisch vorkommenden, Prozesses bei der Entstehung oxLDL-induzierter Atherosklerose hindeutet.

### **1.3. Apoptose**

Die Apoptose ist ein physiologischer Prozess, bei dem eine Zelle selbst aktiv Prozesse in Gang setzt, die zu ihrem eigenen Tod führen. Im Gegensatz zur Nekrose erfolgt die Apoptose durch gerichtete Aktivierung von Signaltransduktionswegen, die zum programmierten Tod einer einzelnen Zelle mit charakteristischer DNA-Fragmentierung in Mono- und Oligonukleosomen, Chromatin-Kondensation, Ruptur der Nukleusmembran, Schrumpfen der Zelle und Membranausstülpungen führt (83; 173). Das Signal für den Selbstmord stammt häufig von außen und wird über die Oberflächenrezeptoren vermittelt. Der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) tritt über spezifische TNF- $\alpha$ -Rezeptoren mit Zellen in Kontakt. Die Rezeptoren haben auf der Außenseite der Plasmamembran TNF-Bindungsstellen und eine „Todesdomäne“, die das Signal zur Selbstzerstörung über die Membran zu zytosolischen Proteinen wie

TRADD (*TNF receptor-associated death domain*) weiterleitet. Ein anderer Rezeptor, FAS, hat eine ähnliche Todesdomäne, die es ihm ermöglicht, mit dem zytosolischen Protein FADD (*Fas-associated death domain*) zu interagieren. Als Folge wird aus den Mitochondrien Zytochrom C freigesetzt. Dieses verbindet sich mit einem Protein namens Apaf1 und von diesem entstandenen Komplex wird die sogenannte Caspase-Reaktion gestartet. Wenn die Caspasen einmal aktiviert sind, spalten sie andere zelluläre Proteine, um so den schnellen Tod der Zelle herbeizuführen. So werden die Proteine, die die Kernmembran stützen (Laminine) gespalten und die DNA wird freigelegt. Danach werden Proteine gespalten, welche Nukleasen binden, wodurch Letztere frei werden und die DNA fragmentieren können. Außerdem werden die Proteine des Zytoskeletts und Adhäsionsmoleküle angegriffen. Infolgedessen löst sich die Zelle von anderen Zellen los, rundet sich ab und kann leichter verdaut werden. Eine apoptotische Zelle wird durch Phagozytose von den Nachbarzellen eliminiert, ohne eine inflammatorische Antwort auszulösen (35). Die Signale für die Phagozytose werden dabei hauptsächlich über den Phosphatidylserin- (7; 47) bzw. Vitronektinrezeptor (62; 169) sowie CD14 (35) vermittelt.

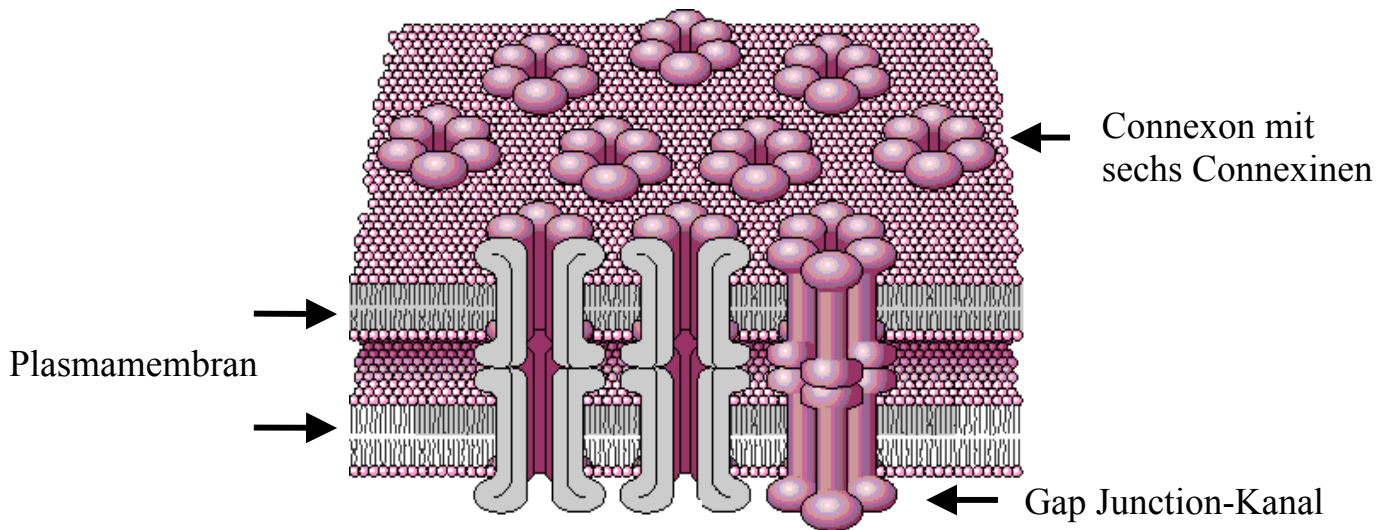
Das vermehrte Auftreten von Apoptose konnte bereits im Herzgewebe beim Myokardinfarkt und beim Herzversagen als Folge der Herztransplantation sowie in atherosklerotischen Plaques gezeigt werden (54; 63; 74; 136). In fortgeschrittenen Plaques stellt die Apoptose eine zweigeteilte Problematik dar: zum einen scheint die Apoptose von Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen durch eine verminderte Kollagensynthese zu Plaqueruptur und Myokardinfarkt zu führen (87), während zum anderen die Apoptose von infiltrierenden Makrophagen-Schaumzellen zur Plaquestabilisierung zu führen scheint.

Die entscheidende Rolle von oxLDL bei der Apoptoseinduktion in atherosklerotischen Plaques wird in aktuellen Studien intensiv diskutiert (1; 96; 127; 166). Wie von *Kockx et al* berichtet wurde (86), resultierte Cholesterinentzug bei Kaninchen in einer kompletten Hemmung der Apoptose sowie in einer starken Reduktion der Zellproliferation in durch Hyperlipidämie induzierten atherosklerotischen Plaques. In Plaques wurde eine Apoptose von glatten Muskelzellen, von Makrophagen sowie von Schaumzellen beobachtet (9; 10; 66; 148). Eine ganze Reihe von *in vitro* und *in vivo* Studien deutet auch auf eine wichtige Rolle von Endothelzellapoptose bei der Atherogenese hin (37; 38; 50; 51; 96). Durch seine einzigartige Stellung ist das Endothel einer Vielzahl im Blut zirkulierender pro-atherogener Substanzen wie z.B. oxLDL, Angiotensin II oder pro-inflammatorischen Zytokinen ausgesetzt, die prinzipiell in der Lage sind, Apoptose von Endothelzellen zu induzieren (159). Das kann zu Veränderungen der vaskulären Eigenschaften des Endothels führen (158). Darüber hinaus kann eine verringerte Anzahl von Endothelzellen den Verlust der endothelialen Integrität bedeuten. Die Konsequenzen sind ein vereinfachter Übertritt und Ablagerung von Lipiden und Monozyten in den extravaskulären Raum sowie die Induktion der Muskelzellproliferation (26). Zusätzlich verliert das Endothel seine anti-thrombogenen Eigenschaften. Es konnte gezeigt werden, dass apoptotische Zellen pro-thrombogen sind und dadurch die Adhäsion nicht-aktivierter Thrombozyten fördern können (13; 14). Zusammen deuten diese Studien darauf hin, dass kausale und funktionelle Verbindungen zwischen apoptotischen Zellschäden und atherosklerotischen Veränderungen in der Gefäßwand bestehen dürften. Es bleibt jedoch ungeklärt, welche Mechanismen für die Induktion der Apoptose in Endothelzellen bei der Atherosklerose verantwortlich sind.

## 1.4. Gap Junction-Kanäle

Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass die sogenannten **Gap Junctions** eine Rolle sowohl bei der Atherosklerose als auch bei der Apoptoseinduktion spielen. So zeigen die Ergebnisse von *Kwak et al* (97), dass in frühen Stadien der Atherosklerose in den Plaques eine veränderte Expression der Connexine, der Bestandteile von Gap Junctions, auftritt. Es wurde ebenfalls berichtet, dass eine verstärkte Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions mit einer signifikanten Erhöhung der Apoptose assoziiert ist (141). Basierend auf diesen Ergebnissen sowie Befunden aus anderen Studien (12; 93), stellten wir uns die Frage, welche Bedeutung den Gap Junctions bei der Atherosklerose und der Apoptoseinduktion zukommt. Darüber hinaus scheint es denkbar, dass die Atherosklerose-assoziierten Veränderungen der Zellkommunikation über Gap Junctions in der Pathogenese der Endothelzellapoptose eine Rolle spielen.

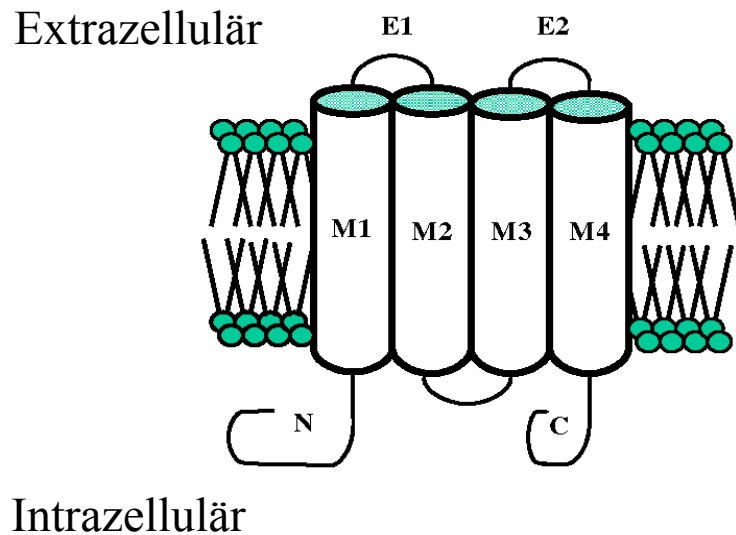
Gap Junctions sind Membranstrukturen an den Kontaktstellen zwischen benachbarten Zellen (21). Sie bestehen aus einer Ansammlung von Kanälen, die das Zytoplasma zweier Nachbarzellen verbinden und für Ionen sowie für Moleküle bis zu einer molekularen Masse von etwa 1,8 kD (z.B. cAMP, cGMP oder IP<sub>3</sub>) durchlässig sind. Ein Gap Junction-Kanal besteht aus zwei Halbkanälen (Connexonen). Die beiden Connexone eines Gap Junction-Kanals bilden über den extrazellulären Spalt hinweg eine Kopf-an-Kopf-Verbindung, wobei jede der beteiligten Zellen ein Connexon beiträgt. Dabei entsteht eine Pore zwischen dem Zytoplasma der beiden kontaktierenden Zellen, die gegenüber dem extrazellulären Raum dicht ist (Abb.1).



**Abb.1: Gap Junctions-Kanäle** (Beschreibung im Text). [www.chemistry.emory.edu](http://www.chemistry.emory.edu)

Jedes Connexon ist aus je sechs gleichwertigen Untereinheiten, den **Connexinen (Cx)** aufgebaut. Es sind inzwischen mehr als 20 verschiedene Typen von Connexinen bekannt, die nach ihrem Molekulargewicht (kDa) benannt werden (8; 94; 205; 206). Alle Connexine haben eine prinzipiell gleichartige Struktur. Wie in der Abbildung 2 dargestellt ist, besitzen sie vier Membrandomänen und formen somit zwei extrazelluläre Schleifen, die für die Kopplung mit dem Connexon der Nachbarzelle von Bedeutung sind. Die N- und C-Termini liegen intrazellulär, wobei der letztere verschiedene Phosphorylierungsstellen aufweist. Phosphorylierungen an unterschiedlichen Stellen, im wesentlichen am intrazellulär liegenden C-Terminus, scheinen von Bedeutung für den Membraneinbau und für die Modulation der Leitfähigkeit des Kanals aber auch für den Abbau eines Connexins zu sein (88; 120). Die intrazelluläre Schleife und vor allem der C-Terminus sind für jedes Connexin verschieden. Gap Junctions können aus einem einzigen Connexintyp oder aus verschiedenen Connexintypen aufgebaut sein. Man nimmt an, dass die Expression verschiedener Connexine für die Variabilität der

Leitfähigkeit von Gap Junctions von Bedeutung ist; darüber ist jedoch bislang noch wenig bekannt.



**Abb.2: Strukturmodell des Kanalproteins Connexin** (Beschreibung im Text).

<http://herkules.oulu.fi/isbn9514268040/html/i1002636.html>

### Die Funktionen von Gap Junctions

Gap-Junctions leisten einen wichtigen Beitrag zur Homeostase innerhalb eines Gewebeverbands und sind damit von großer physiologischer und entwicklungsbiologischer Bedeutung. Ihre Rolle in verschiedenen Geweben ist vielfältig: in schwach durchbluteten Geweben wie der Linse oder im Knorpelgewebe gewährleisten sie den Nährstoffaustausch zwischen peripheren Zellen und dem vaskulär unversorgten Zentrum (55, 56), im Herzmuskel dienen sie der schnellen Weiterleitung elektrischer Signale über Zellgrenzen hinweg (58) und in Drüsen wie dem Pankreas helfen sie bei der Koordination sezernierender Zellen (131). Gap Junctions wird ebenfalls eine Rolle bei der Wachstumskontrolle und damit in der Tumorentstehung zugewiesen (102). Der Verlust der Zellkopplung wurde als charakteristisch für

unkontrolliertes Wachstum in Tumorzellen beschrieben (161). Diese wichtige Funktion wird auch dadurch unterstrichen, dass innerhalb eines Organismus nur sehr wenige Zelltypen existieren, die keine Gap Junctions ausbilden können. Dies sind entweder Zellen die normalerweise einzeln vorliegen (z.B. Erythrozyten oder Spermien) oder solche, bei denen aus Gründen ihrer Funktion kein Signalaustausch zwischen Zellen stattfinden darf (z.B. Skelettmuskelzellen).

### **Gap Junctions im Gefäßsystem**

Sowohl Endothel- als auch glatte Muskelzellen exprimieren Cx40 und Cx43, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß (194). Im Gegensatz dazu scheint Cx37 im Gefäßsystem auf das Endothel beschränkt zu sein. In glatten Muskelzellen kommt möglicherweise auch Cx45 vor (91). Gap Junctions zwischen Endothelzellen können demnach Cx40, 43 und 37 enthalten (151, 162), während glatte Muskelzellen über Cx40, Cx43 oder Cx45 gekoppelt sind (61; 70; 177; 179). Endothel- bzw. glatte Muskelzellen sind über Gap Junctions untereinander sowie - zumindest in kleinen Gefäßen- auch myoendothelial gekoppelt. Über die funktionelle Bedeutung dieser Zellkopplung ist erstaunlich wenig bekannt. Vorstellbar ist, dass sich elektrische Signale über Gap Junctions ausbreiten können (174). In Analogie zu Leberzellen ist auch eine metabolische Kopplung denkbar, bei der Hormone nicht nur auf ihre Zielzelle, sondern indirekt über die Ausbreitung von „*Second Messengers*“ über Gap Junctions auch auf benachbarte Zellen wirken (163). Schließlich könnten gezielt Moleküle ausgetauscht werden, die Wachstumsverhalten und Funktion der Zellen eines Verbandes kontrollieren. In allen Fällen würde so ein koordiniertes Verhalten benachbarter Zellen in der Gefäßwand bzw. eines Gefäßabschnittes im Netzwerk erreicht. Tatsächlich wurde in der Mikrozirkulation

experimentell eine „fortgeleitete Vasodilatation“ nachgewiesen: bei einer lokalen Applikation bestimmter Vasodilatoren tritt auch bis zu mehreren Millimetern proximal und distal der Applikationsstelle eine Dilatation auf, die nach Behandlung mit Hemmstoffen der Zellkopplung abgeschwächt wird oder verschwindet (174). Dieser Mechanismus stimmt vermutlich das Verhalten von kleinen Leitungsgefäßen und Widerstandsgefäßen als Voraussetzung für eine effektive Mehrdurchblutung funktionell aufeinander ab.

Bei gezielter elektrischer Stimulation einzelner Muskelfasern ließ sich tatsächlich eine fortgeleitete Vasodilatation spezifisch in den Gefäßen nachweisen, die diese Muskelfasern mit Sauerstoff versorgen (48). In Versuchen an Cx40-defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass für die fortgeleitete Vasodilatation Cx40 besondere Bedeutung hat (33). Weiter konnte in Kapillaren *in situ* gezeigt werden, dass sich stromaufwärts entlang des Endothels Kalziumwellen ausbreiten, die von Schrittmacherzellen ausgehen und dass Gap Junctions notwendige Bestandteile des Ausbreitungsmechanismus sind. Auch die lokale Wirkung bestimmter vasoaktiver Substanzen hängt wesentlich von einer intakten Zellkopplung ab. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Wirkung von endothelabhängigen Vasodilatoren zumindest teilweise von der Ausbreitung endothelial-generierter Signale über myoendotheliale Gap Junctions in die darunter liegende glatte Muskulatur abhängen könnte (73). Allerdings ist über diese Substanzen sowie über die individuelle Rolle bestimmter Connexine in diesem Prozess bisher nichts bekannt.

Bei kardiovaskulären Erkrankungen, wie Hypertonie oder Atherosklerose ist die Expression der einzelnen Connexine im Gefäßsystem verändert (60). Polymorphismen des humanen Cx37 Proteins sind mit der Entwicklung von atherosklerotischen Plaques



assoziiert (12). Es wurde gezeigt, dass während der frühen Stadien der Atherosklerose eine hohe Cx43-Expression in Schaumzellen auftritt, die allerdings im Laufe der Zeit abnimmt (97; 145). Die Hypercholesterinämie-induzierte Atherosklerose in Kaninchen erhöhte die Expression von Cx43 in Makrophagen, reduzierte jedoch die Connexinexpression in glatten Muskelzellen (97). Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren nimmt die Expression von Cx43 im Endothel und anderen Zelltypen zu (139). Cx43 könnte dabei durchaus eine wichtige Rolle für die proliferative Antwort auf Wachstumsfaktoren spielen. Die Überexpression von Cx43 allein löste jedenfalls in einer Osteoblasten-Zelllinie eine verstärkte Proliferation aus (57).

Diese Studien legen nahe, dass sowohl die Connexine als auch die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions von erheblicher funktioneller Bedeutung für das vasomotorische Verhalten von Blutgefäßen sind. Insbesondere ist interessant, dass Gap Junctions eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung und Progression von atherosklerotischen Plaques spielen könnten. Es ist bislang jedoch nicht untersucht, ob bzw. inwiefern es sich dabei um kausale Veränderungen oder Epiphänomene handelt. Vor allem sind die Kenntnisse über die Wirkung von oxLDL auf endotheliale Gap Junctions sehr fragmentarisch.

In der Pathogenese von Apoptose scheinen Connexine ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen. Es wurde bereits berichtet, dass sowohl eine verstärkte interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions als auch die Cx43-Expression in Granulosazellen mit einer gesteigerten Apoptose assoziiert ist (93). Dagegen wurde in Astrozyten von Cx43-defizienten Mäusen nach zerebraler Ischämie eine höhere Apoptoserate beobachtet (126). Andererseits konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine verstärkte

Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions mit einer signifikanten Erhöhung der Apoptose im postischämischen Gehirn der Ratte einherging, welche in Folge einer Blockade von Gap Junctions deutlich geringer ausfiel (141). Darüber hinaus führte eine adenovirale Überexpression von Cx37 zu einem massiven Zelltod durch Apoptose in HUVEC (178). Diese Studien legen eine Verbindung zwischen Expression der Connexine, interzellulärer Kommunikation über Gap Junctions und einer veränderten Apoptoseinduktion nahe. Allerdings ist die Bedeutung von Gap Junctions für die Induktion der endothelialen Apoptose nur unzulänglich geklärt. Von besonderem Interesse ist auch die Frage, über welchen Mechanismus Gap Junctions zur Apoptoseinduktion beitragen und welche spezifische Rolle den einzelnen Connexinen in diesen Prozessen zukommt.

## **2. ZIELSETZUNG**

Ziele der vorliegenden Studie waren daher, zu analysieren

- i) ob und über welche Mechanismen oxLDL einen Einfluss auf die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions in Endothelzellen ausübt;
- ii) welche Bedeutung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions bei der Induktion der endothelialen Apoptose zukommt;
- iii) welche spezifische Rolle die einzelnen Connexine bei der Apoptoseinduktion spielen.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Alexa Fluor 488	Molecular Probes, Leiden, Niederlanden
Argon Gas	Linde AG, Höllriegelskreuth
CMTMR	Molecular Probes,
Collagen	Seromed Biochrom, Berlin
Collagenase	Genaxxon bioscience, Stafflangen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMEM-Medium	Sigma-Aldrich
Confocal-Matrix Medium	Micro-Tech-Lab, Graz, Austria
Endothelial Cell Growth Medium	Promocell, Heidelberg
Forskolin (FSK)	Alexis, Grünberg
Fötale Rinderserum (FCS)	Biochrome, Berlin
Glasplatten 10, 15, 42mm	Helmut Saur, Reutlingen
H-89	Alexis
HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich
IBMX	Sigma-Aldrich
Indomethacin (Confortid)	NetDoktor GmbH, München
L-NASPA	Biomol, Hamburg
Lysophosphatidsäure (LPA)	Sigma-Aldrich
Medium 199	Sigma-Aldrich

Mikropipetten zur Zellinjektion	Science Products GmbH, Hofheim
NBCS	Biochrome
N <sup>o</sup> -nitro- <i>L</i> -arginin (L-NA)	Roche, Mannheim
Para-Formaldehydlösung	Sigma-Aldrich
Parafilm	K & K Laborbedarf, München
Pasteur Glaspipetten	Hirschmann, Eberstadt
Penicillin	Sigma-Aldrich
Pipettenspitzen	Gilson International, Niederlanden
Plastikpipetten 5 und 10ml	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Puromycin	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	Biomol
β-D-Glucose	Sigma-Aldrich
Sterile 15 und 50ml Falcons	Falcon, Becton Dickinson
Sterile Filter FP030/2 und 030/3	Schleicher & Schulz, Dassel
Streptomycin	Sigma-Aldrich
Streptonigrin	Sigma-Aldrich
Superoxid dismutase (SOD)	Roche
T-75 Zellkulturflaschen	Falcon, Becton Dickinson
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA Lösung	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Applichem, Darmstadt
24-Well Zellkulturplatten	Falcon, Becton Dickinson
Zellkulturschalen (30, 60, und 100mm)	Falcon, Becton Dickinson

### 3.1.2. Kommerzielle Analysesysteme

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit®	Becton Dickinson
Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit®	Biocarta, Hamburg

### 3.1.3. Primäre Antikörper

Primärer Antikörper	Spezies	Herkunft
Polyklonaler Cx37- bzw. Cx40- Antikörper	Kaninchen	Biotrend, Cologne
Monoklonaler Cx43 Antikörper	Maus	Becton Dickinson

### 3.1.4. Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Spezies	Herkunft
Anti-Kaninchen IgG	Ziege	Molecular Probes
Anti-Maus IgG	Ziege	Molecular Probes

### 3.1.5. Biologisches Material

#### 3.1.5.1. Primäre Zellen

Makrovaskuläre Endothelzellen: humane Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) wurden aus den Nabelschnüren isoliert, die in der Universitätsfrauenklinik Innenstadt München gesammelt und zur Verfügung gestellt wurden.

#### 3.1.5.2. Zelllinien

HeLa (*Human cervix carcinoma*) Wildtyp Zellen (ECACC No. 96112022) und HeLa-Zellen, die mit je einem der Connexine 37, 40 oder 43 transfiziert waren, wurden großzügig von Prof. Willecke, Universität Bonn, zur Verfügung gestellt.

### 3.1.6. Puffer, Lösungen und Medien

<u>PBS<sup>+</sup></u>	Phosphat gepufferte Salzlösung mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> : 160 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,7 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,25 mM MgCl <sub>2</sub>
<u>PBS<sup>-</sup></u>	Phosphat gepufferte Salzlösung ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> : 160 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<u>HUVEC Medium</u>	Medium 199 mit 20% fötalem Kälberserum (NBCS) und 20% Endothelial Cell Growth Medium, 0,006% (w/v) Penicillin, 0,013% (w/v) Streptomycin

<u>HeLa Wildtypmedium</u>	Medium DMEM mit 10 % NBCS, 0,006% (w/v) Penicillin, 0,013% (w/v) Streptomycin
<u>HEPES Puffer</u>	145 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O), 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> (2H <sub>2</sub> O), 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O), 10 mM Glukose, 10 mM Hepes. Der pH-Wert wurde durch Titration mit 1 mol/L NaOH auf 7.4 eingestellt.

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Zellkultur

#### *Primäre Zellen*

#### Isolierung von HUVEC

Die hier beschriebene Methode zur Gewinnung und Kultivierung von HUVEC geht auf das ursprünglich von Jaffe und seinen Mitarbeitern angewandte Verfahren zurück (75). HUVEC wurden aus frischen Nabelschnurvenen mit einer Länge von ca. 10–15 cm unter sterilen Bedingungen isoliert. Zu diesem Zweck wurden beide Venenenden kanüliert und die Vene mit sterilem PBS<sup>+</sup> durchspült. Anschließend wurden die Venen 30 min bei 37°C intraluminal mit Collagenase I (17U/ml in PBS<sup>+</sup>) inkubiert, wobei die Kanülenenden mit einem 3-Wege-Hahn verschlossen wurden. Die abgelösten Endothelzellen wurden durch Spülung mit 50 ml Medium 199 in ein Falconröhrchen überführt. Nach Zentrifugation (10 min mit 500 g) wurde das Pellet in 6 ml *Endothelial Cell Growth Medium* resuspendiert und auf eine T-75 Zellkulturflasche verteilt.



### Kultivierung von HUVEC

HUVEC wurden in Zellkulturschalen in HUVEC Medium bei 37°C im Inkubator bei einem Wasserdampf-gesättigten Luft-CO<sub>2</sub> Gemisch (5% CO<sub>2</sub>) gehalten. Nach jeweils 2 Tagen wurde das Medium gewechselt. Die Subkultivierung erfolgte nach Erreichen des Konfluenzstadiums. Hierfür wurden die Zellen 3x mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, 1-2 Minuten mit Trypsin-Lösung inkubiert und mit einem Schaber abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden dann mit HUVEC Medium aufgenommen und auf 10 cm Schalen verteilt (1. Passage). Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen entweder weiter kultiviert oder für Experimente (1. oder 2. Passage) verwendet.

### *Zelllinien*

#### Kultivierung von HeLa-Zellen

Die Rolle von einzelnen Connexinen wurde in HeLa-Zellen untersucht. Sowohl Wildtyp- als auch transfizierte HeLa-Zellen (44) wurden in Zellkulturschalen in HeLa-Medium kultiviert. Zu den transfizierten HeLa-Zellen wurde zusätzlich ein Selektionsmedium (Puromycin 1 µg/ml) gegeben. Das Medium wurde täglich gewechselt. Alle HeLa-Zelltypen wurden bei 37°C im Inkubator bei einem Wasserdampf gesättigten Luftgemisch mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach Erreichen des Konfluenzstadiums wurden die Zellen 3x mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, 3-4 Minuten mit Trypsin Lösung bei 37°C inkubiert und durch leichtes Klopfen abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden dann mit HeLa-Medium aufgenommen und entweder weiter kultiviert oder für Experimente verwendet.

### **3.2.2. Präparation von n-LDL und oxLDL**

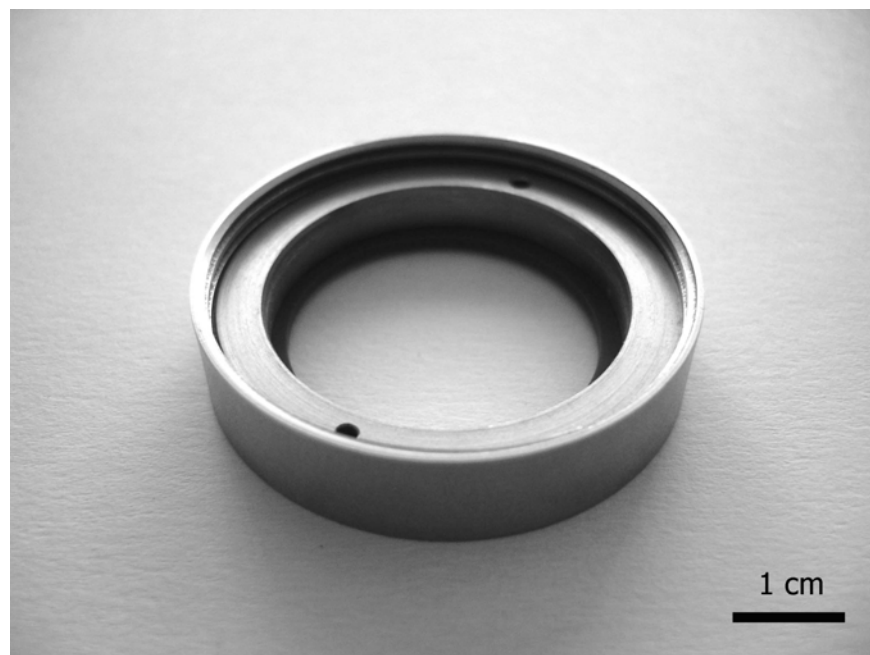
Native und oxidierte Lipoproteine wurden freundlicherweise von Herrn Prof. J. Galle (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Natives LDL (n-LDL) wurde durch sequenzielle Ultrazentrifugation aus humanem Spenderplasma isoliert (53). OxLDL wurde durch Oxidation von LDL (300µg Protein/ml) mit CuSO<sub>4</sub> (5 µmol/l) für 30 h bei 23°C hergestellt. Die oxidationsbedingte Veränderung des Proteinanteils der Lipoproteine wurde durch Agarosegel-Elektrophorese (Lipidophor electrophoresis kits, IMMUNO, Heidelberg) bestimmt (184). Sowohl n-LDL als auch oxLDL wurden bis zur Anwendung für maximal drei Wochen bei 4°C in Dunkelheit aufbewahrt, da in diesem Zeitintervall Apolipoprotein B nicht signifikant degradiert. Das *in vitro* oxidierte LDL ist in der aktuellen Literatur validiert und wurde in zahlreichen Studien zur Analyse der Rolle von oxLDL in Prozessen der Atherogenese verwendet (25; 142; 204).

### **3.2.3. Farbstoffinjektion**

Die Analyse der Farbstoffausbreitung nach der Injektion in eine Einzelzelle stellt eine gut etablierte Methode zur Untersuchung der Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions dar. Das Grundprinzip der Methode ist, dass der injizierte Fluoreszenzfarbstoff Alexa-Fluor 488 nicht membrangängig ist und sich daher ausschließlich über Gap Junctions in die benachbarten Zellen ausbreiten kann. Somit charakterisiert die Geschwindigkeit bzw. das Ausmaß der Diffusion des Farbstoffes zwischen benachbarten Zellen den funktionellen Zustand der Zell-Zell-Kommunikation via Gap Junctions.

Für die Injektionsversuche wurden HUVEC oder mit Cx37, -40 oder -43 transfizierte HeLa-Zellen verwendet. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit HUVEC bzw. HeLa-Medium aufgenommen und schließlich auf autoklavierten (bei HUVEC mit Collagen

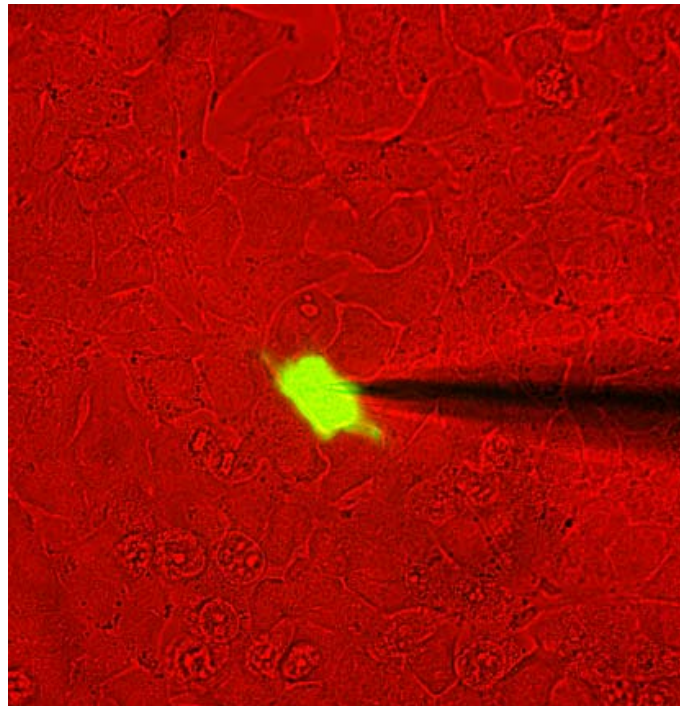
beschichteten) Glasscheiben ausgesät. Die Endothelzellen wurden untersucht, sobald sie zu einem konfluenten Monolayer gewachsen waren. Verwendet wurden HUVEC der ersten oder der zweiten Passage. HeLa-Zellen wurden analysiert, sobald sie eine 60-70-prozentige Konfluenz erreicht hatten. Die Glasscheiben mit den darauf gewachsenen Monolayern wurden mit einer Pinzette aus den Petrischalen entnommen und in einer speziellen Aluminiumkammer (Werkstatt des Physiologischen Instituts der Universität München, Abb.3) unter das inverse Mikroskop (Axiovert S 100, Zeiss, Göttingen, Deutschland) platziert. Die Temperatur der die Zellen umgebenden Lösung wurde mit Hilfe des beheizbaren Objektisches während des gesamten Versuchs auf 37°C gehalten. Das Kulturmedium wurde entfernt und in der Kammer durch 2 ml HEPES Puffer ersetzt.



***Abb.3: Zellkammer für die Farbstoffinjektion***

Die Mikropipetten für die Farbstoffinjektion wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) mit einem Außendurchmesser von 1

mm und einem Innendurchmesser von 0,54 mm in zwei Zügen mit einem Pipettenpuller (DMZ-Universal Puller, Zeitz-Instrumente, Deutschland) gezogen. Die Pipetten mit einem Spitzendurchmesser von  $<1 \mu\text{m}$  wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 (3,5 mM gelöst in 150 mM KCl) mit Hilfe einer ausgezogenen 2 ml Pipettenspitze (Eppendorf, Deutschland) gefüllt. Die mit dem Farbstoff gefüllte Mikropipette wurde an einen semi-automatischen Mikroinjektor (Femtojet, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) angeschlossen und mit Hilfe eines am Mikroskop befestigten Mikromanipulators (InjectMan, Eppendorf) direkt über der zu punktierende Zelle im Monolayer platziert. Die Position der Pipette wurde mittels Durchlichtmikroskopie kontrolliert. In die ausgewählte Zelle wurde mittels einer Abwärtsbewegung eingestochen (Abb. 4).



**Abb. 4: Technik der Zellinjektion.** Die Abbildung zeigt die Injektion einer einzelnen HeLa Zelle eines konfluenten Monolayers mit Alexa Fluor 488. Die eingestochene Mikropipette ist ebenfalls deutlich zu erkennen. Objektivvergrößerung 40x.

In jedem Monolayer wurden die Zellen mit einem relativ großen Abstand voneinander injiziert, so dass die von den injizierten Zellen ausgehende Farbstoffausbreitung nicht miteinander interferieren konnte. Während der Injektion wurde auf den Pipetteninhalt (für 1,2 Sekunden) ein Druck von 65 hPa ausgeübt. Innerhalb dieser Zeitspanne konnte der fluoreszierende Farbstoff in die penetrierte Zelle einströmen und sich anschließend von dieser Zelle ausgehend über die Gap Junctions in die benachbarten Zellen ausbreiten. Direkt nach der Injektion wurde die Mikropipette aus dem Gesichtsfeld des Mikroskops entfernt. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde bei 488 nm angeregt und die emittierte Fluoreszenz bei 515 nm aufgenommen. Die Bilder wurden mit Hilfe einer digitalen Kamera (Imago, Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland) über ein Objektiv mit 10-facher Vergrößerung (Zeiss Fluor) aufgenommen. Die Farbstoffausbreitung wurde direkt nach der Injektion und danach alle 20 Sekunden während einer Beobachtungszeit von 12 min digital aufgenommen. Im Laufe der Auswertung wurde die Anzahl fluoreszierender Zellen in den gespeicherten Aufnahmen mit Hilfe der zugehörigen Software (Tillvision von Till Photonics) bestimmt.

#### **3.2.4. Immunzytochemie**

HUVEC wurden auf mit Collagen beschichteten Glasplatten mit einem Durchmesser von 10 mm bis zum Erreichen des Konfluenzstadiums kultiviert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS<sup>+</sup> folgte eine 15-minütige Fixierung mit Para-Formaldehydlösung (3% in PBS<sup>+</sup>). Um die Bindung des anti-Connexin Antikörpers an den intrazellulären C-Terminus der Proteine zu ermöglichen, wurde die Zellmembran durch eine 3-minütige Behandlung mit Triton X-100 (0,2% in PBS<sup>+</sup>) permeabilisiert. Nach dreimaligem

Waschen der Zellen mit PBS<sup>+</sup> erfolgte eine einstündige Inkubation mit der Block-Lösung (BSA: 0,2% Kälberserum im PBS<sup>+</sup>), um ein unspezifisches Binden der Erstantikörper zu verhindern. Anschließend folgte die Inkubation mit den Erstantikörpern (1 µg/ml Kaninchen polyklonaler anti-Cx37; 2.5 µg/ml Maus monoklonaler anti-Cx43) für 2 Stunden. Dem dreimaligen Waschen mit Rinderserumalbumin (BSA) folgte die Inkubation mit den Alexa Fluor 488- bzw. Alexa Fluor 543-markierten Zweitantikörpern (10 µg/ml Ziege anti- Kaninchen IgG oder anti-Maus IgG) für 60 Minuten. Nach erneutem 3-maligen Waschen mit PBS<sup>+</sup> wurden die Glasplatten mit Confocal-Matrix Medium auf Objektträger geklebt. Die gefärbten Zellen wurden im Dunkeln aufbewahrt. Die Expression von membranständigen Connexinen wurde mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (LSM 410 Zeiss, Jena, Deutschland) bei den Anregungswellenlängen  $\lambda=488$  nm (Cx43) und  $\lambda=543$  nm (Cx37 oder Cx40) analysiert. Der Erstantikörper zeigte keine Färbung in nicht permeabilisierten Zellen. Auch der Zweitantikörper zeigte alleine keine Bindung, so dass eine unspezifische Bindung des Zweitantikörpers ausgeschlossen wurde.

### **3.2.5. Quantitative Analyse der Apoptose**

#### *3.2.5.1. Quantifizierung der Apoptose mittels Annexin V-Propidium Iodid - Färbung*

Apoptotische Zellen wurden mittels eines Annexin-V-Bindungsassays detektiert. Bei der initialen Apoptose wird Phosphatidylserin von der inneren zur äußeren Seite der Zytoplasmamembran gebracht. Dies kann man durch FITC-markiertes Annexin-V nachweisen, das unter Ca<sup>2+</sup>-Ionen mit hoher Affinität an Phosphatidylserin bindet und somit die apoptotischen Zellen für die FACS-Analyse sichtbar macht (89; 199). Um

apoptotische Zellen von nekrotischen unterscheiden zu können, wurden die Zellen zusätzlich mit Propidium Iodid gefärbt. Bei nekrotischen Zellen ist die Zellmembran zerstört. Dadurch nehmen die Zellen den Farbstoff auf, der anschließend die DNA anfärbt. Sie sind somit Annexin-V-FITC und Propidium Iodid positiv, dagegen sind apoptotische Zellen Annexin-V-FITC positiv und Propidium Iodid negativ. Die Annexin-V-Färbung wurde mittels eines Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit® (BD Biosciences) nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll mit einigen Modifikationen durchgeführt. In dieser Versuchsserie wurden HUVEC, Cx-37, -40 oder 43-transfizierte HeLa-Zellen sowie Connexin-defiziente Wildtyp-HeLa-Zellen verwendet. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit HUVEC- bzw. HeLa-Wildtyp-Medium aufgenommen und anschließend auf 24-Well Platten verteilt. Alle Zelltypen wurden mit verschiedenen Substanzen - je nach Versuchsansatz - bei 37°C im Inkubator bei einem Wasserdampf gesättigten Luftgemisch mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium gewechselt, Propidium Iodid - Lösung zugegeben und die Zellen wurden für 30 Minuten in den Inkubator gestellt. Danach wurden die Zellen 1x mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, 2-3 Minuten mit der Accutase-Lösung bei 37°C inkubiert und durch leichtes Klopfen abgelöst. Die Accutase-Reaktion wurde mit 200 ml Medium gestoppt und die abgelösten Zellen wurden 5 min bei 150 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Bindungspuffer gemäß dem Herstellerprotokoll resuspendiert und zu jeder Probe wurden 2,5 µl der Annexin-V-Lösung hinzugegeben. Die Ansätze wurden anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Direkt danach wurden 10 000 Zellen je eine Probe im FACS analysiert.

Zur Kontrolle wurden die Zellen entweder nur mit dem Bindungspuffer, Propidium Iodid oder Annexin-V-FITC inkubiert. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte

mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACScan, BectonDickinson,). Das Prinzip der Methode beruht auf der Emission optischer Signale (fluoreszenzmarkierten Antikörpern) seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Hierbei werden in einer Lösung befindliche Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Die Zelle emittiert dabei Streulicht und wenn Antikörper gebunden sind, Fluoreszenzimpulse, woraus man unterschiedliche Eigenschaften der Zelle ableiten kann. Das Streulicht wird durch Zellgröße, die Struktur der Zellwand sowie intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Unterschiedliche Zellfraktionen können dadurch quantifiziert werden.

Die Auswertung erfolgte durch Erfassung des Anteils Propidium Iodid - negativer und Annexin-V-FITC-positiver Zellen. Das FITC-Signal (FL1-H) wurde aufgenommen und im Dot Plot gegen das Propidium Iodid - Signal (FL3-H) aufgetragen. Anschließend wurden Quadranten (*gates*) eingesetzt, mit denen 1) die Autofluoreszenz (unbehandelte Zellen); 2) die toten Zellen (nur FL3-H, also Propidium Iodid positiv) und 3) die Annexin-V positiven Zellen (FL1-H) erfasst werden konnten. Die so erstellten Quadranten wurden auf den Dot Plot der Doppelfärbung übertragen wodurch der Prozentsatz apoptotischer (Annexin-V-positiver und Propidium Iodid negativer) Zellen ermittelt wurde.

### *3.2.5.2. Quantifizierung der Apoptose durch Verringerung des mitochondrialen*

#### *Membranpotentials ( $\Delta\Psi$ ) mittels dem Farbstoff JC-1*

Eine Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) ist als eine mögliche Reaktion auf Apoptose bekannt (34). Die Messung wurde mit dem JC-1 Assay Kit (Biocarta, Hamburg, Deutschland) mit Hilfe der JC-1 Reagenz durchgeführt.



Mitochondrien mit normalem MMP lagern den Farbstoff JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanineiodide) bedingt durch die Ladungsdifferenz verstärkt in ihrer Membran ein. So werden die gesunden Zellen rot gefärbt. In apoptotischen Zellen wird das mitochondriale Membranpotential verringert, was dazu führt, dass JC-1 nicht mehr von Mitochondrien aufgenommen wird. In diesen Zellen bleibt JC-1 in Zytoplasma in Form eines Monomers, wodurch die Zellen eine grüne Fluoreszenz zeigen.

Für diese Serie von Experimenten wurden HUVEC oder Wildtyp-HeLa-Zellen bzw. Cx43-HeLa-Zellen verwendet. Alle Zelltypen wurden in 24-Well Platten (ca. 80 000 Zellen / Well), mit verschiedenen Substanzen - je nach Versuchsansatz - im Brutschrank inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS<sup>-</sup> wurden die Zellen für 2-3 Minuten mit der Accutase-Lösung inkubiert und durch leichtes Klopfen abgelöst. Die Accutase-Reaktion wurde mit 400 ml Medium gestoppt und die abgelösten Zellen wurden 5 min bei 150 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl 1x JC-1 Reagenz nach dem Herstellerprotokoll resuspendiert und bei 37°C im Inkubator bei einem Wasserdampf-gesättigten Luftgemisch mit 5% CO<sub>2</sub> 15 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben wieder für 5 min bei 150 g abzentrifugiert. Es wurde 2 ml Assay-Puffer zum Pellet gegeben und wieder abzentrifugiert. Anschließend wurde 500 µl Assay-Puffer in jedes Röhrchen zugegeben. Zehntausend Zellen pro Probe wurden mit Hilfe eines Durchflusszytometers analysiert.

### **3.3. Versuchsprotokolle**

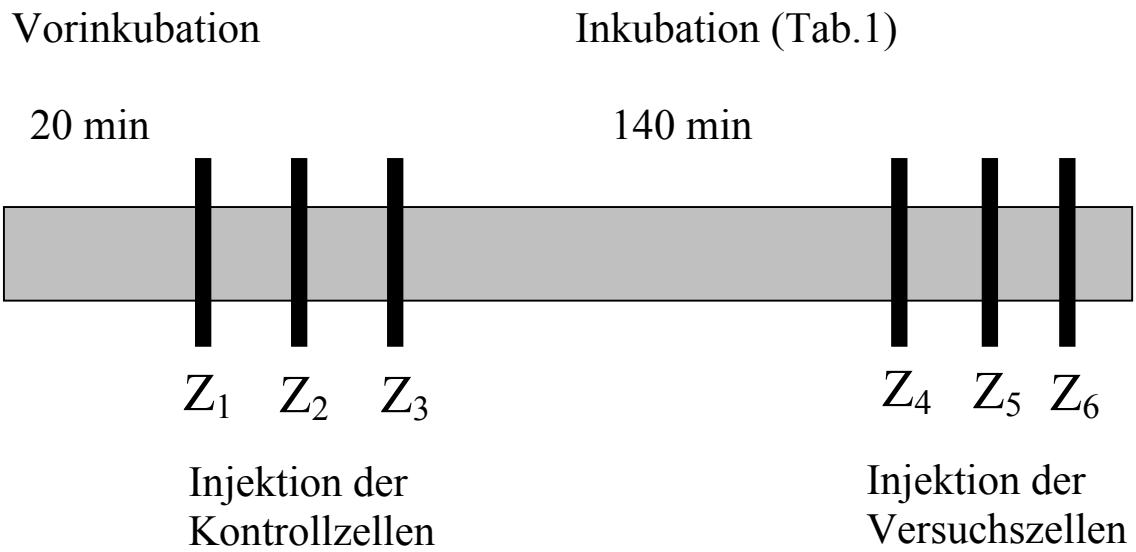
Entsprechend den unter Punkt 2 genannten Zielen wurden folgende Versuchsprotokolle verwendet:

- i) Versuchsprotokoll zur Analyse der Rolle von oxLDL für die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions;
- ii) Versuchsprotokoll zur Analyse der Bedeutung der Zell-Zell-Kommunikation und einzelner Connexine für die Apoptoseinduktion.

#### **3.3.1. Systematische Analyse der Rolle von oxLDL für die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions**

Zur Analyse der interzellulären Kopplung über Gap Junctions wurde jede ausgewählte Substanz in mindestens drei verschiedenen Monolayern untersucht, die aus unterschiedlichen Nabelschnüren gewonnen wurden. Auch für die entsprechenden Zeitkontrollexperimente standen jeweils mindestens zwei verschiedene Monolayer zur Verfügung. Eine Synopsis des experimentellen Protokolls ist in Abbildung 5 wiedergegeben. Der Versuch begann mit einer 20-minütigen Vorinkubation mit L-NA (30  $\mu$ M) und SOD (30 U/ml), die in das Kulturmedium appliziert wurden. Danach wurden die Glasscheiben mit den darauf gewachsenen Monolayern aus den Petrischalen entnommen und in eine spezielle Aluminiumkammer platziert. Das Kulturmedium wurde durch 2 ml HEPES Puffer mit gleichen Konzentrationen von L-NA und SOD ersetzt. Drei verschiedene Kontrollzellen wurden mit dem Farbstoff injiziert und die Ausbreitung des Farbstoffs wie in 3.2.3. beschrieben ausgewertet. Für die weitere Inkubation wurden die Glasscheiben wieder in den Petrischalen platziert und die Zellen wurden mit verschiedenen Substanzen - je nach Versuchsansatz - im Kulturmedium im

Brutschrank für 140 min inkubiert. Anschließend wurden weitere drei Zellen im HEPES Puffer injiziert. Da die Zellen aus verschiedenen Nabelschnüren isoliert wurden und sich dadurch von einander unterscheiden können, wurden die Kontrollversuche und die Versuche mit der jeweiligen Testsubstanz immer im gleichen Monolayer durchgeführt. So wurden in jeder Schale drei Zellen vor der Inkubation (Kontrollzellen) mit drei Zellen nach der Inkubation verglichen. In der Tabelle 1 sind die Versuchsgruppen dargestellt. Alle Testsubstanzen wurden für 140 min auf die Zellen appliziert.



**Abb. 5:** Experimentelles Protokoll zur systematischen Analyse der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions.

**Tabelle 1:** Aufbau der Versuchsgruppen und Applikation der Substanzen nach dem in Abb. 5 vorgestellten Protokoll

Vorinkubation	Injektion der Kontrollzellen	Inkubation	Injektion der Versuchszellen
L-NA (30 $\mu$ M) SOD (30 U/ml)		<b>Sham</b>	
L-NA (30 $\mu$ M) SOD (30 U/ml)		<b>OxLDL</b> (jeweils 2,5, 15, 26, 50 oder 100 $\mu$ g/ml)	
L-NA (30 $\mu$ M) SOD (30 U/ml)		<b>n-LDL</b> (jeweils 2,5, 15, 26, 50 oder 100 $\mu$ g/ml)	
L-NA (30 $\mu$ M) SOD (30 U/ml)		<b>Forskolin (FSK)</b> (jeweils 5, 10 oder 100 $\mu$ M)	

<b>Vorinkubation</b>	<b>Injektion der Kontrollzellen</b>	<b>Inkubation</b>	<b>Injektion der Versuchszellen</b>
L-NA (30 µM) SOD (30 U/ml)		<b>H-89</b> (30 µM)	
L-NA (30 µM) SOD (30 U/ml)		<b>H-89</b> (30 µM) + <b>FSK</b> (10 µM)	
L-NA (30 µM) SOD (30 U/ml)		<b>H-89</b> (30 µM) + <b>OxLDL</b> (26 µg/ml)	
L-NA (30 µM) SOD (30 U/ml)		<b>H-89</b> (30 µM) + <b>n-LDL</b> (26 µg/ml)	
L-NA (30 µM) SOD (30 U/ml)		<b>Lysophosphatidic acid (LPA)</b> (1; 10 µM)	
L-NA (30 µM) SOD (30 U/ml)		<b>N-palmitoyl-L-serine phosphoric acid (L-NASPA)</b> (1 µM)	
L-NA (30 µM) SOD (30 U/ml)		<b>L-NASPA</b> (1 µM) + <b>LPA</b> (1 µM)	
L-NA (30 µM) SOD (30 U/ml)		<b>L-NASPA</b> (1 µM) + <b>OxLDL</b> (26 µg/ml)	
L-NA (30 µM) SOD (30 U/ml)		<b>L-NASPA</b> (1 µM) + <b>n-LDL</b> (26 µg/ml)	
L-NA (30 µM) SOD (30 U/ml)		<b>Indomethacin (Indo)</b> (30 µM)	
L-NA (30 µM) SOD (30 U/ml)		<b>Indo</b> (30 µM) + <b>OxLDL</b> (26 µg/ml)	
L-NA (30 µM) SOD (30 U/ml)		<b>Indo</b> (30 µM) + <b>n-LDL</b> (26 µg/ml)	

### 3.3.2. Einfluss der Zell-Zell-Kommunikation auf die Apoptose

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob die oxLDL-induzierte Erhöhung der Zell-Zell-Kommunikation zu einem verstärkten interzellulären Transport von Apoptosesignalen führt und dadurch die Apoptoserate in Endothelzellen erhöht. Darüber hinaus stellten wir uns die Frage, inwiefern die einzelnen Connexine die Apoptoserate modulieren können.

#### 3.3.2.1. Beteiligung der Connexine an der Apoptose

Die Experimente wurden in HeLa-Zellen durchgeführt. Wildtyp-Zellen, die keine Connexine aufweisen, wurden mit den Zellen verglichen, die selektiv mit einem der Connexine Cx37 (Maus), 40 (Maus) oder 43 (Ratte) transfiziert waren. Alle Zellen wurden mit verschiedenen Apoptoseinduktoren im Medium inkubiert (Tab.2). Die Apoptoserate wurde mit Hilfe der Annexin V - Propidium Iodid Färbung durchflusszytometrisch quantifiziert.

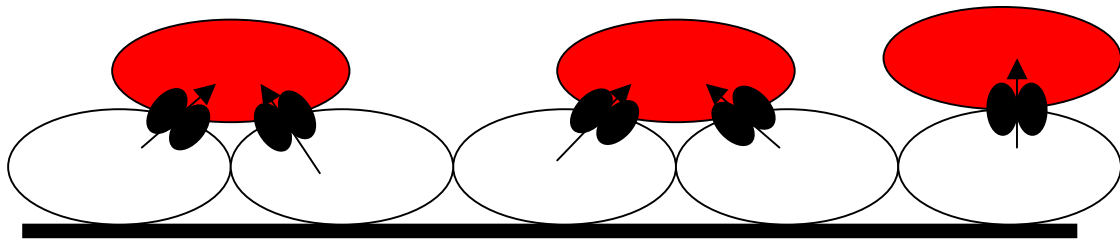
Testsubstanz	Konzentration	Inkubationszeit
oxLDL	jeweils 26 µg/ml oder 100 µg/ml	24 Stunden
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5 mM	15 Minuten*
Streptonigrin	jeweils 1 µM, 10 µM oder 100 µM	3 Stunden

**Tab2:** Experimentelle Bedingungen der Inkubation von HeLa-Zellen mit oxLDL und den Apoptoseinduktoren, \* Messung 3 Stunden nach Ende der Inkubation.

### *3.3.2.2. Die Rolle der Gap Junction-Leitfähigkeit für die Apoptoseinduktion*

#### Protokoll 1





Um die Rolle der Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions bei der Apoptoseinduktion zu untersuchen, wurden Wildtyp-HeLa-Zellen verwendet, die keine Gap Junction-abhängige Leitfähigkeit besitzen sowie Cx43-HeLa-Zellen, die eine hohe Kommunikation über Gap Junctions aufweisen. Cx43-transfizierte Zellen wurden auf 24-Well Platten verteilt und kultiviert, bis sie Konfluenz erreichten. Apoptose wurde durch die Inkubation mit Streptonigrin (100  $\mu$ M, 30 Minuten) induziert. Anschließend wurden die Zellen gründlich mit PBS<sup>+</sup> gewaschen, um die Reste von Streptonigrin zu entfernen, und mit frischem Medium aufgenommen. Parallel wurde die zweite Population von Zellen vorbereitet. Cx43-transfizierte- oder Wildtyp-HeLa-Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff CMTMR (rot) im Medium für 30 Minuten inkubiert (37°C, CO<sub>2</sub> 5%), um eine Trennung zwischen den beiden Zellsubpopulation bei der Durchflusszytometrie zu ermöglichen. Gemäß dem Versuchsprotokoll, wurde in einigen Gruppen (siehe Tab.3), genau wie in der ersten Population von Zellen, eine Apoptose induziert. Nach dem gründlichen Waschen, wurden die Zellen mit Accutase abgelöst und auf konfluenten Monolayern der ersten Population verteilt (Abb. 6). Die Zellkulturplatten wurden vorsichtig zentrifugiert (15 g für 5 Minuten) und für 3 Stunden in den Brutschrank gestellt. Nach der Inkubation wurden die CMTMR-gefärbten Zellen vorsichtig abgenommen. Die prozentuale Menge apoptotischer Zellen wurde nach den oben (3.2.6.) beschriebenen Protokollen durchflusszytometrisch gemessen.



**Abb. 6: Protokoll 1**

Mit CMTMR gefärbte Zellen (rot) wurden auf konfluenten Monolayern verteilt (weiß). Diese Anordnung sollte ermöglichen, dass proapoptotische Signale durch neu gebildete Gap Junctions (schwarz) in CMTMR gefärbte Zellen transportiert werden konnte.

**Tab.3: Protokoll 1. Versuchsaufbau.** Die Zellen der ersten Population sind in weiß und die der zweiten Population-in rot dargestellt

Gruppe	Versuchsaufbau	Zellkopplung
1	 HeLaWt-Zellen HeLaCx43 (Vorinkubiert mit Streptonigrin)	nein
2	 HeLaCx43 HeLaCx43 (Vorinkubiert mit Streptonigrin)	ja
3	 HeLaCx43 (Vorinkubiert mit Streptonigrin) HeLaCx43 (Vorinkubiert mit Streptonigrin)	ja
4	 HeLaCx43 HeLaCx43	ja

### Protokoll 2

Um zu überprüfen, ob Apoptosesignale in den oben beschriebenen Experimenten ausschließlich durch neu gebildete Gap Junctions von einer Zelle zur anderen weitergegeben wurden, und nicht durch einen parakrinen Mechanismus, wurde folgendes Protokoll verwendet:



Cx43-HeLa-Zellen, die in 60 mm Petrischalen kultiviert wurden, bis sie zu einem konfluenten Monolayer gewachsen waren, wurden im Medium mit Streptonigrin (100  $\mu\text{M}$ ) für 30 Minuten inkubiert (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ). Danach wurden die Zellen 3 mal mit  $\text{PBS}^+$  gewaschen. Neues Medium wurde dazu gegeben und die Zellen wurden 3 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Gleichzeitig wurde eine zweite Population von Wildtyp-HeLa-Zellen und Cx43-HeLa Zellen in 24-Well Platten kultiviert. Nach 3 Stunden Inkubation wurde das Medium von apoptotischen Zellen entnommen und auf die Zellen in der 24-Well Platte verteilt. Die Zellen wurden dann weitere 3 Stunden im Brutschrank inkubiert und danach für die Bestimmung der Apoptose, wie in 3.2.6.1. beschrieben, verwendet. Für jede Versuchsgruppe wurden Zeitkontrollen durchgeführt.

### Protokoll 3

Um die Rolle der Zell-Zell-Kommunikation bei der Apoptoseinduktion zu untersuchen, wurden Cx43-HeLa-Zellen mit Accutase abgelöst und im Medium mit verschiedenen Konzentrationen von Streptonigrin (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ ) re-suspendiert. Danach wurden die Zellen auf eine 24-Well Platte verteilt und in den Brutschrank gestellt. Damit die Zellen sich nicht absetzen und miteinander neue Gap Junctions bilden konnten, wurde die Platte ständig langsam auf einem Schüttler geschüttelt. Die Apoptoserate wurde in Zellsuspension in den jeweiligen Versuchsgruppen nach 3, 6, 9, 12 und 36 Stunden Inkubation gemessen.

### **3.4. Statistische Analyse**

Die Ergebnisse zur Messung der Apoptose sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (StAbw) dargestellt. Die Ergebnisse der Analyse der Zell-Zell-Kommunikation sind als Box-Plots präsentiert um die Verteilung der Daten besser darzustellen. Statistische Vergleiche zweier Behandlungen untereinander wurden mittels ungepaartem t-Test durchgeführt. Sofern mehr als zwei Behandlungen in einer Versuchsreihe verwendet wurden, wurden die Daten mittels Varianzanalyse (ANOVA) verglichen. Die p-Werte von Mehrfachvergleichen wurden nach Bonferroni korrigiert. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 5% ( $p < 0,05$ ) wurden Unterschiede als signifikant erachtet.

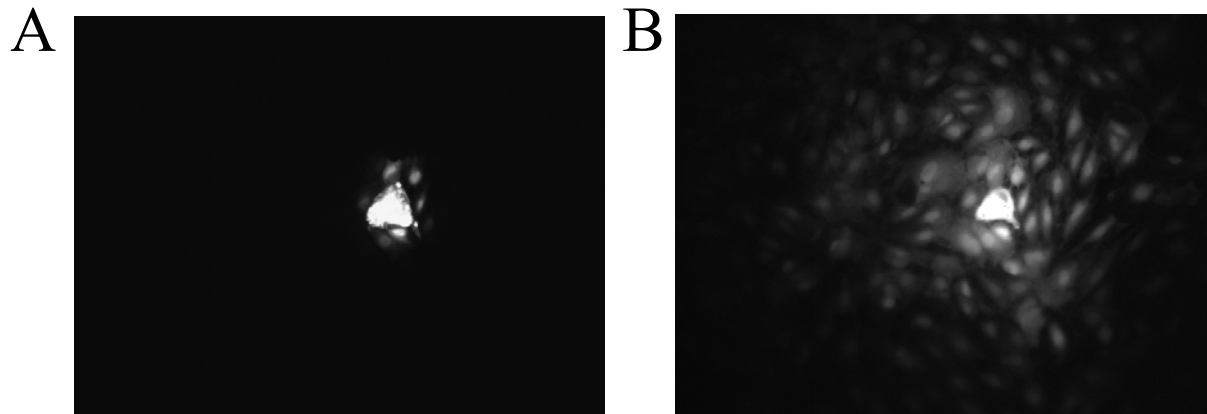
## **4. ERGEBNISSE**

### **4.1. Systematische Analyse der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions**

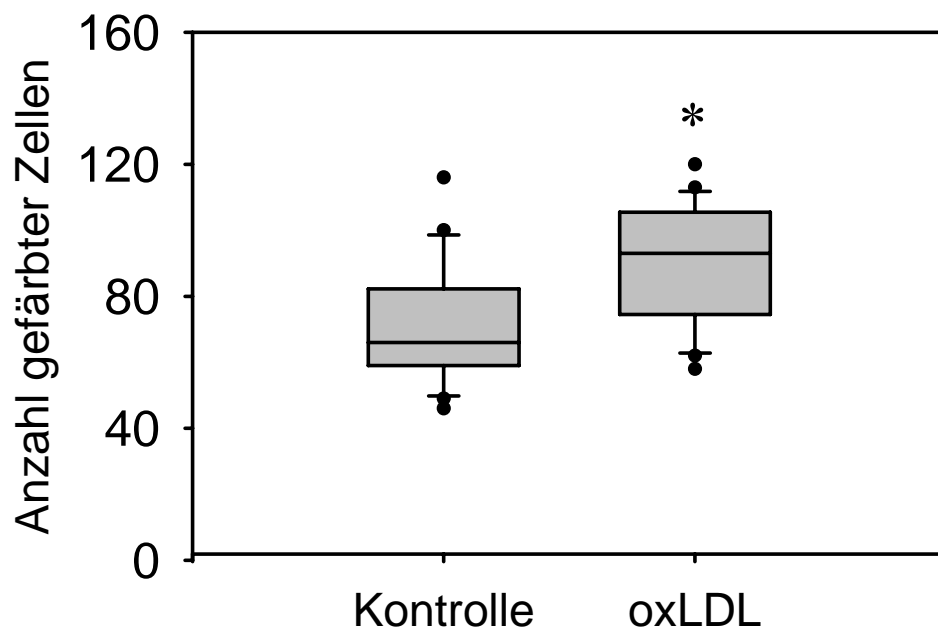
Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse zur systematischen Analyse der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions nach Inkubation der Zellen mit oxLDL sowie deren zugrundeliegende Pathomechanismen dargestellt.

#### **4.1.1. OxLDL erhöht die Zellkopplung in humanen Endothelzellen**

Die Wirkung von oxLDL auf vaskuläres Endothel wurde in HUVEC untersucht. Zwölf min nach Injektion des Fluoreszenzfarbstoffs Alexa Fluor 488 in eine Einzelzelle wurden die durch Farbstoff gefärbten Nachbarzellen ausgezählt (Abb. 7). Nach 140-minütiger Inkubation der Zellen mit oxLDL (26 µg/ml) zeigte sich eine signifikant verstärkte Farbstoffausbreitung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (71±19 gefärbte Zellen unter Kontrollbedingungen vs. 90±19 nach Inkubation mit oxLDL, n=17, Abb. 8).



**Abb. 7:** Ausbreitung von Alexa Fluor 488 nach Injektion in eine Endothelzelle. Die Bilder zeigen die Ausbreitung des Farbstoffes Alexa Fluor 488 nach der Injektion in eine einzelne Endothelzelle. Dargestellt sind mit Alexa 488 beladene Endothelzellen unmittelbar nach der Injektion (A) und 12 Minuten später (B).

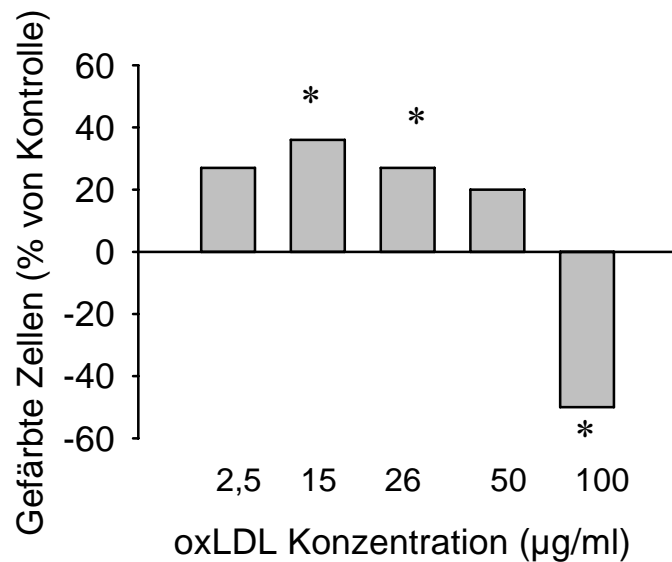


**Abb. 8:** Quantitative Auswertung der Farbstoffausbreitung 12 min nach der Injektion in eine einzelne Zelle. Inkubation mit OxLDL (26  $\mu\text{g/ml}$ ) erhöhte die Zellkommunikation in HUVEC, \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, t-Test,  $n=17$ .

#### **4.1.2. Der Effekt von oxLDL auf die Zell-Zell-Kommunikation ist dosisabhängig**

Da die Konzentration von oxLDL in Blutgefäßen unter (patho-)physiologischen Bedingungen *in vivo* variabel ist, haben wir die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen von oxLDL auf Zellkopplung untersucht. Für jede Dosierung wurden jeweilige Kontroll-Experimente durchgeführt. Da eine große Variabilität der Anzahl gekoppelter Zellen zwischen verschiedenen Monolayern bestand (siehe Tabelle 4), wurden die Kontrollversuche sowie die Versuche mit der jeweiligen Konzentration von oxLDL grundsätzlich im gleichen Monolayer durchgeführt und verglichen.

Eine 140-minütige Inkubation der Zellen mit oxLDL in einer Konzentration von 15 µg/ml bzw. 26 µg/ml führte zu einer signifikanten Erhöhung der Zellkopplung (Abb. 9). Im Gegensatz dazu fand sich nach der Behandlung der Zellen mit einer höheren Dosierung von oxLDL (100 µg/ml) eine signifikante Reduktion der Zellkopplung im Vergleich zu den Kontrollzellen. Darüber hinaus wurden zusätzliche Experimente durchgeführt, in welchen die Vitalität von Zellen nach Behandlung mit oxLDL (100 µg/ml) untersucht wurde. Die Zellfärbung mit Trypan Blau zeigte keinen Anstieg in der Anzahl nekrotischer Zellen nach 140-minütiger Behandlung mit oxLDL. Nach der Inkubation der Zellen mit oxLDL in Konzentrationen von 2,5 µg/ml und 50 µg/ml war die Zellkopplung tendenziell vermehrt, erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau (Tab. 4).



**Abb. 9: Zell-Zell-Kommunikation in Abhängigkeit von der Konzentration von oxLDL.** Die Ergebnisse sind als Anteil [%] der gefärbten Zellen 12 min nach der Injektion von Alexa 488 in die mit oxLDL behandelten Zellen von der Anzahl gefärbter Zellen in der jeweiligen Kontrollgruppe dargestellt. In geringen Konzentrationen aktivierte oxLDL die Zellkopplung in HUVEC, während es in der Konzentration 100 µg/ml eine Reduktion der Zellkommunikation bewirkte. Inkubationszeit 140 min, \*  $p < 0,05$  vs. jeweilige Kontrollgruppe, t-Test,  $n = 4-17$ .

Gruppen			
Konzentration von oxLDL (µg/ml)	Kontrolle	oxLDL	n
<b>Anzahl gefärbter Zellen (MW±StAb)</b>			
2,5	177 ± 67	225 ± 54	4
15	174 ± 30	236 ± 43*	6
26	71 ± 19	90 ± 19*	17
50	156 ± 17	187 ± 39	4
100	192 ± 81	94 ± 67*	9

**Tabelle. 4:** Anzahl der gefärbten HUVEC nach der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von oxLDL, MW±StAb, \*  $p < 0,05$  vs. jeweilige Kontrollgruppe.

### 4.1.3. Nicht oxidiertes LDL (n-LDL) hat keinen Effekt auf die endotheliale Zell-Zell-Kommunikation

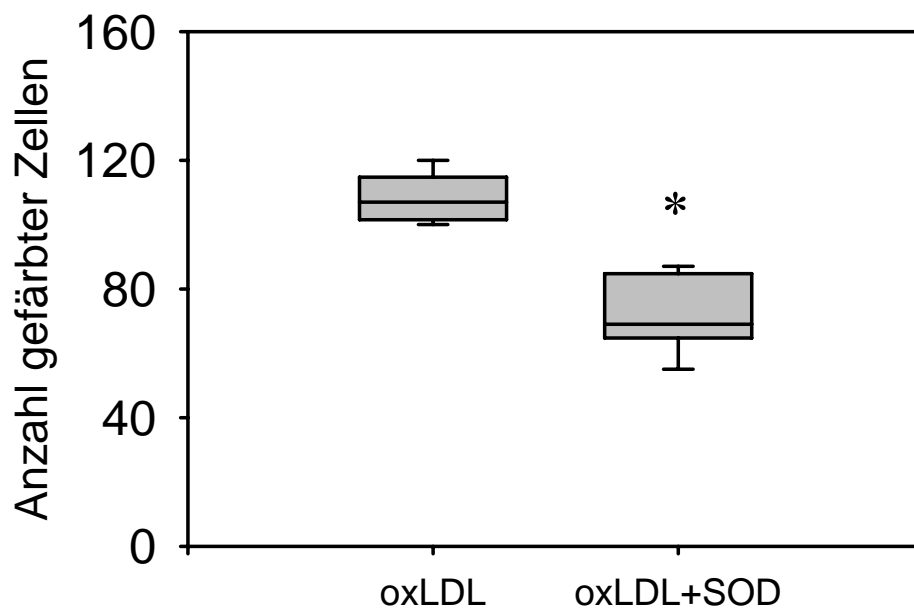
In dieser Versuchserie wurde der Einfluss von n-LDL auf die endotheliale Zell-Zell-Kommunikation analysiert. Hierbei fand sich keine signifikante Differenz in der Zellkopplung zwischen allen getesteten n-LDL-Konzentrationen (Tab. 5).

Gruppen			
Konzentration von n-LDL ( $\mu\text{g/ml}$ )	Kontrolle	n-LDL	n
<b>Anzahl gefärbter Zellen (MW<math>\pm</math>StAb)</b>			
<b>2,5</b>	135 $\pm$ 54	159 $\pm$ 29	4
<b>15</b>	218 $\pm$ 4	212 $\pm$ 9	2
<b>50</b>	218 $\pm$ 11	207 $\pm$ 19	2
<b>100</b>	205 $\pm$ 63	237 $\pm$ 39	5

*Tabelle. 5: Einfluss von n-LDL auf Zell-Zell-Kommunikation. Die Ergebnisse sind als Anzahl gefärbter Zellen 12 min nach Injektion von Alexa 488 in eine Einzelzelle und Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von n-LDL dargestellt. MW $\pm$ StAb.*

#### 4.1.4. Superoxiddismutase (SOD) hemmt die Zellkopplung in HUVEC

Da oxLDL die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies stimulieren kann (52), haben wir in allen Experimenten dieser Studie das antioxidative Enzym SOD zu den zu untersuchenden Zellen gegeben. Um einen möglichen Einfluss von  $O_2^-$  auf die Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions zu untersuchen, wurden HUVEC mit oxLDL (26 $\mu$ g/ml), jeweils mit und ohne Zugabe von SOD (30 U/ml) für 140 min inkubiert. Die Analyse der Farbstoffausbreitung nach der Injektion in eine einzelne Zelle zeigte, dass die mit oxLDL (26 $\mu$ g/ml) und SOD (30 U/ml) inkubierten Zellen eine signifikant geringere Zellkopplung im Vergleich zu den Zellen ohne SOD aufweisen (78 $\pm$ 13 vs. 107 $\pm$ 8) (Abb. 10). Im Gegensatz dazu wurden in Zeitkontrollversuchen ohne SOD keine deutlichen Veränderungen in der Zellkopplung festgestellt (Daten nicht gezeigt).

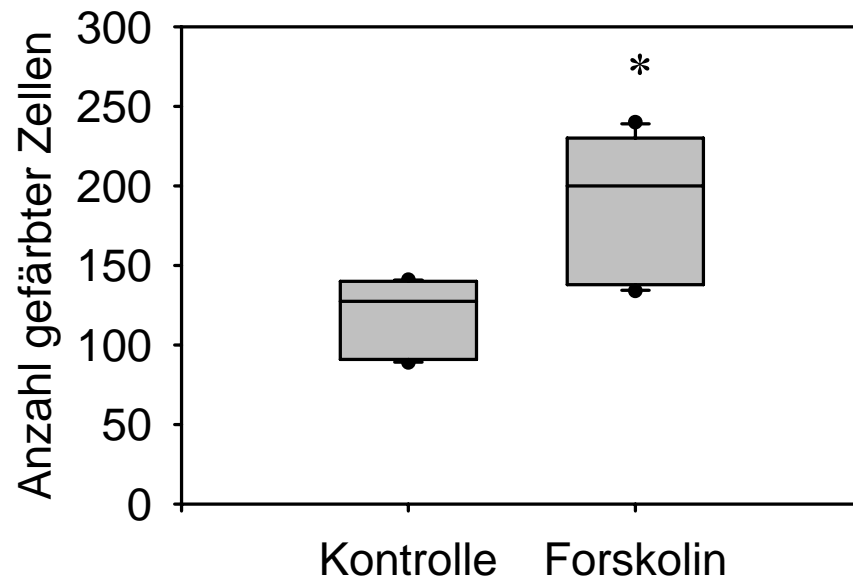


**Abb. 10: Einfluss von SOD auf Zell-Zell-Kommunikation.** Inkubation der HUVEC mit OxLDL (26  $\mu$ g/ml) in Anwesenheit von SOD (30 U/ml) zeigt eine geringere Zellkopplung als oxLDL (26 $\mu$ g/ml) allein, \*  $p < 0,05$  vs. oxLDL,  $t$ -Test,  $n=5$ .

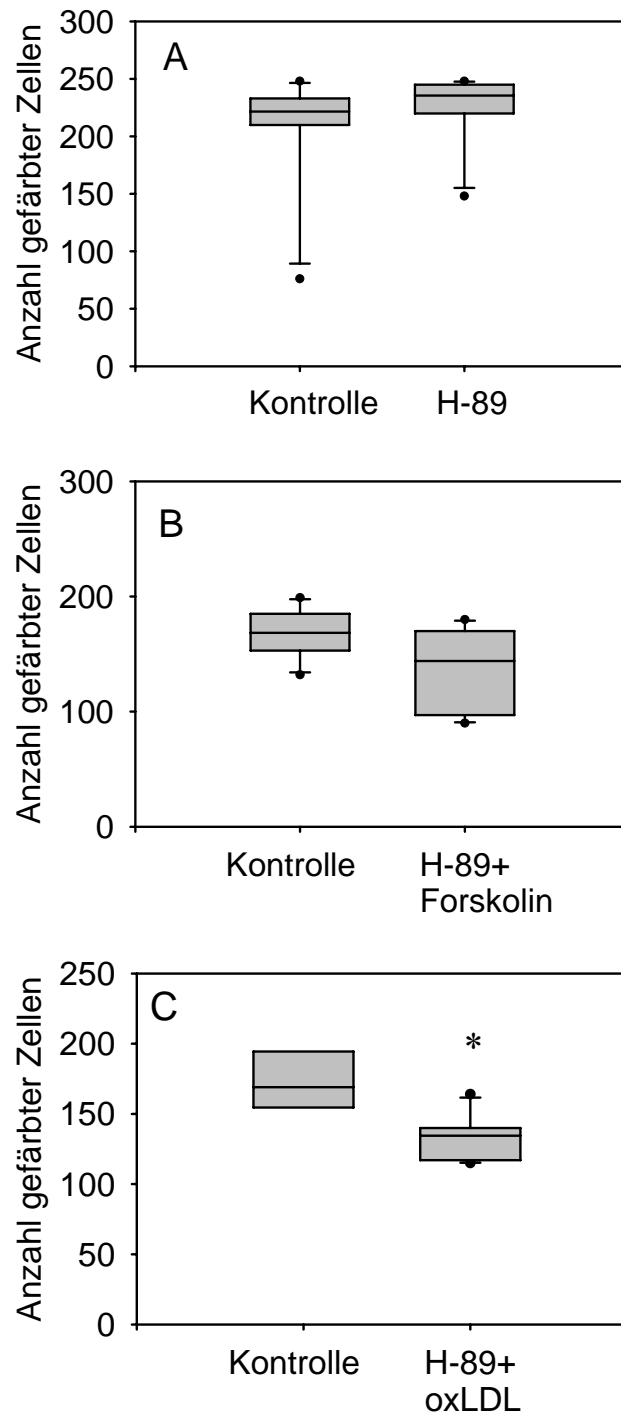


#### **4.1.5. Die OxLDL-induzierte Erhöhung in der Zellkommunikation ist cAMP/PKA abhängig**

Es wurde bereits gezeigt, dass die Regulation der Zell-Zell-Kopplung in verschiedenen Zellen wie z.B. Novikov-Hepatomazellen oder humanen fetalen neuronalen Zellen u.a. durch den sekundären Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) vermittelt werden könnte (39; 113; 138; 152; 165). Um zu untersuchen, ob die Erhöhung von cAMP in HUVEC ebenfalls zu einer verstärkten Zell-Zell-Kommunikation führt, wurden die HUVEC mit Forskolin (10  $\mu$ M) für 140 Minuten inkubiert. Forskolin ist ein potenter Aktivator der Adenylatcyclase, der den intrazellulären Gehalt von cAMP erhöht (5; 100). Eine 140-minütige Inkubation der Zellen mit Forskolin (10  $\mu$ M) führte, ähnlich wie die Inkubation mit oxLDL (26  $\mu$ g/ml), zu einer signifikanten Steigerung der Zellkopplung (Kontrolle:  $119 \pm 24$  vs. Forskolin:  $190 \pm 46$  gefärbte Zellen, Abb. 11). Im Gegensatz dazu war der beobachtete Effekt von Forskolin bzw. oxLDL auf die Zellkommunikation nach einer zusätzlichen Vorinkubation der Zellen mit dem PKA Inhibitor H-89 (30  $\mu$ M) komplett aufgehoben (Abb. 12).



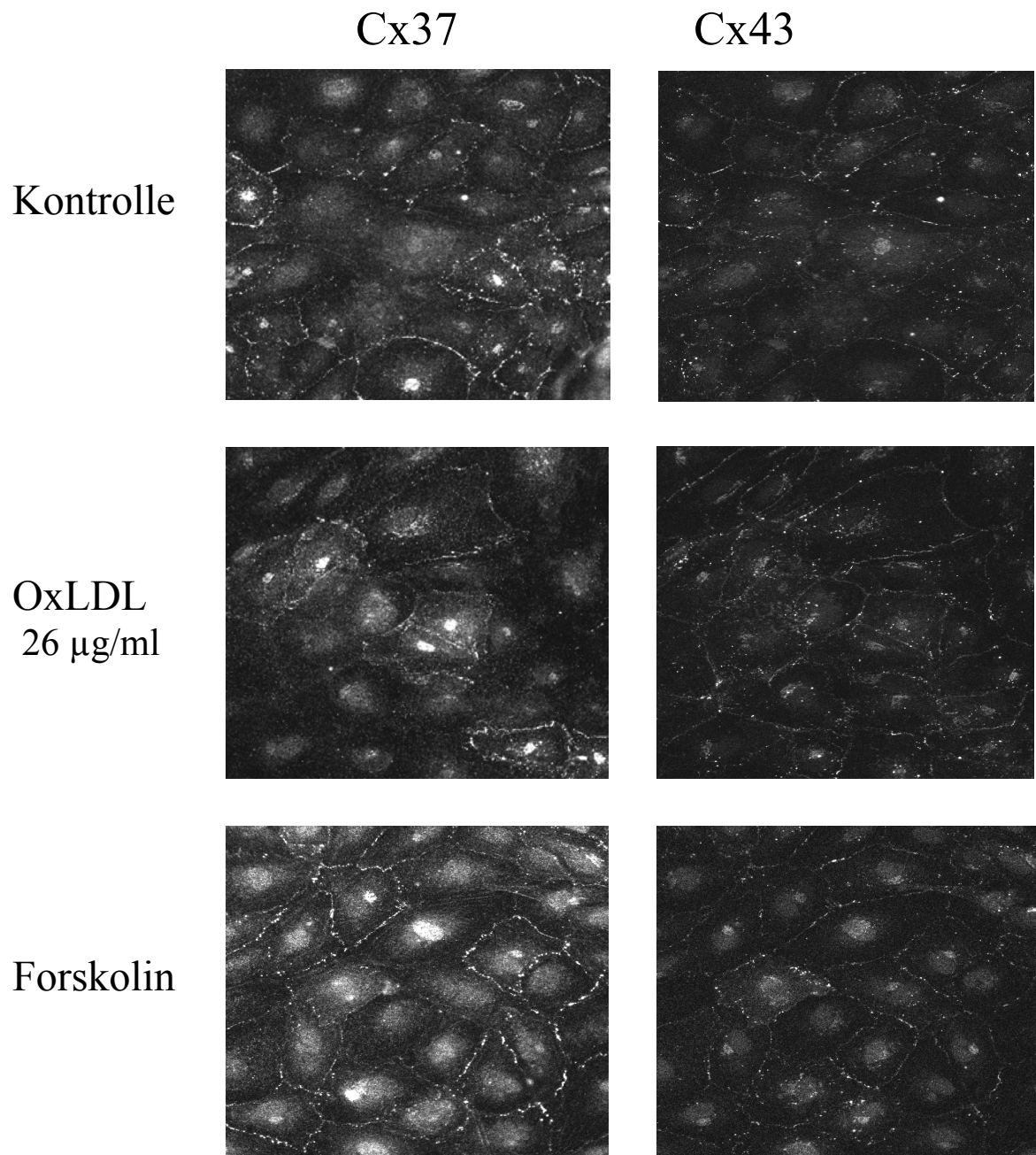
*Abb. 11: Zell-Zell-Kommunikation nach der Aktivierung von Adenylatcyclase. Die Ergebnisse sind als Anzahl gefärbter Zellen 12 min nach Injektion von Alexa 488 in eine Einzelzelle dargestellt. Der Aktivator von Adenylatcyclase, Forskolin (10  $\mu$ M), verstärkte die Zellkommunikation in HUVEC, \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, t-Test,  $n = 6$ .*



**Abb. 12: Zell-Zell-Kommunikation nach der PKA-Blockade.** Die Ergebnisse sind als Anzahl gefärbter Zellen 12 min nach Injektion von Alexa 488 in eine Einzelzelle dargestellt. Der PKA Inhibitor H-89 (30  $\mu$ M) hob den steigenden Effekt von Forskolin (10  $\mu$ M)(B) und oxLDL (26  $\mu$ g/ml)(C) auf die Zellkommunikation auf. H-89 (30  $\mu$ M) allein zeigte keine Wirkung auf die interzelluläre Kommunikation (A), \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle,  $t$ -Test,  $n=6$  je Gruppe.

#### **4.1.6. OxLDL (26 µg/ml) und Forskolin haben keinen sichtbaren Einfluss auf die Membranexpression von Connexinen 37 und 43 in HUVEC**

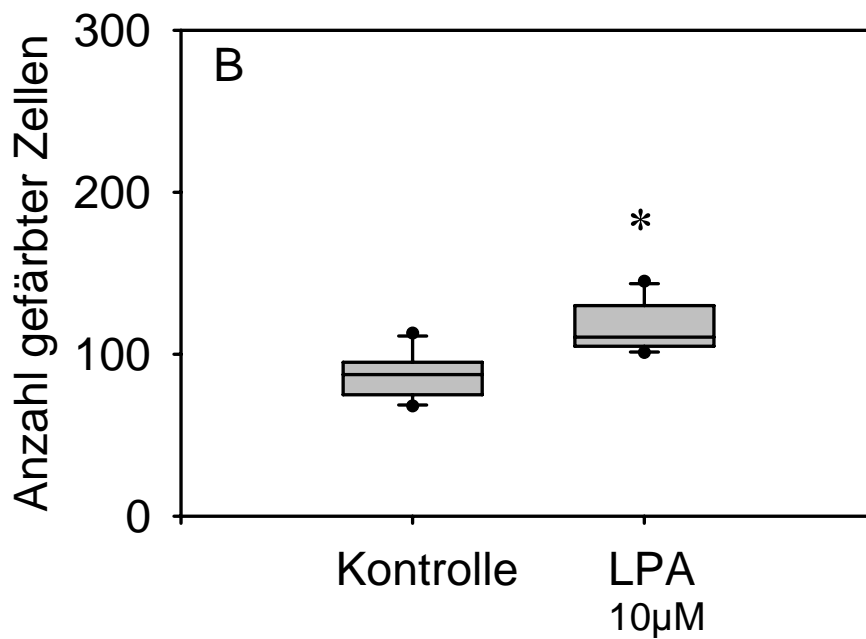
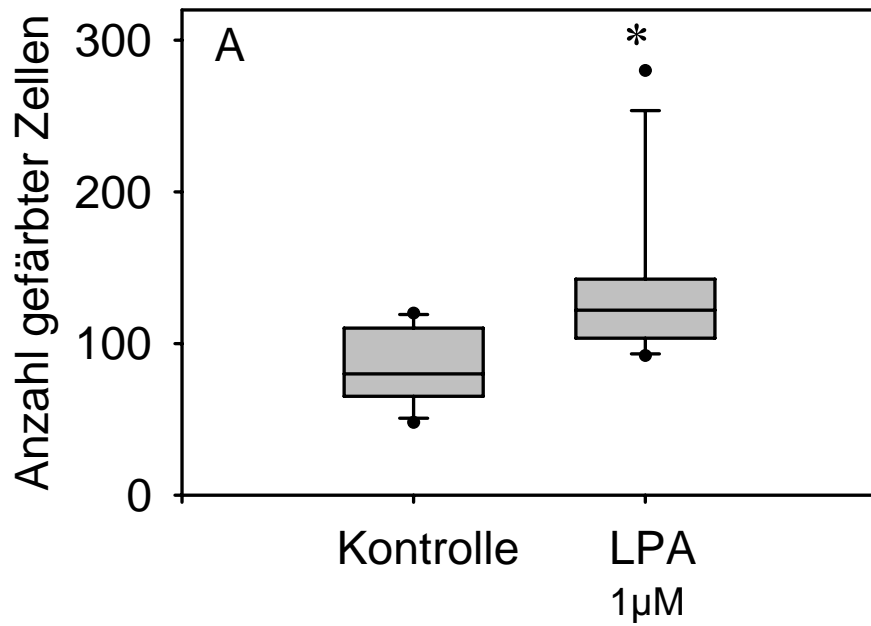
Die immunzytochemische Färbung von HUVEC für Cx37 bzw. Cx43 zeigte, dass alle Zellen sowohl Cx37 als auch Cx43 exprimierten (Abb. 13). Cx wurden sowohl im Inneren der Zelle nachgewiesen als auch in der Membran (Membranexpression = funktionell aktive Form). Nach 140-minütiger Inkubation der Zellen mit oxLDL (26 µg/ml) wurden keine deutlichen Veränderungen der in der Membran lokalisierten Cx37 als auch Cx43 beobachtet. Ebenfalls konnten keine sichtbaren Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Forskolin-behandelten Zellen hinsichtlich der Cx37- und Cx43-Membranexpression festgestellt werden.



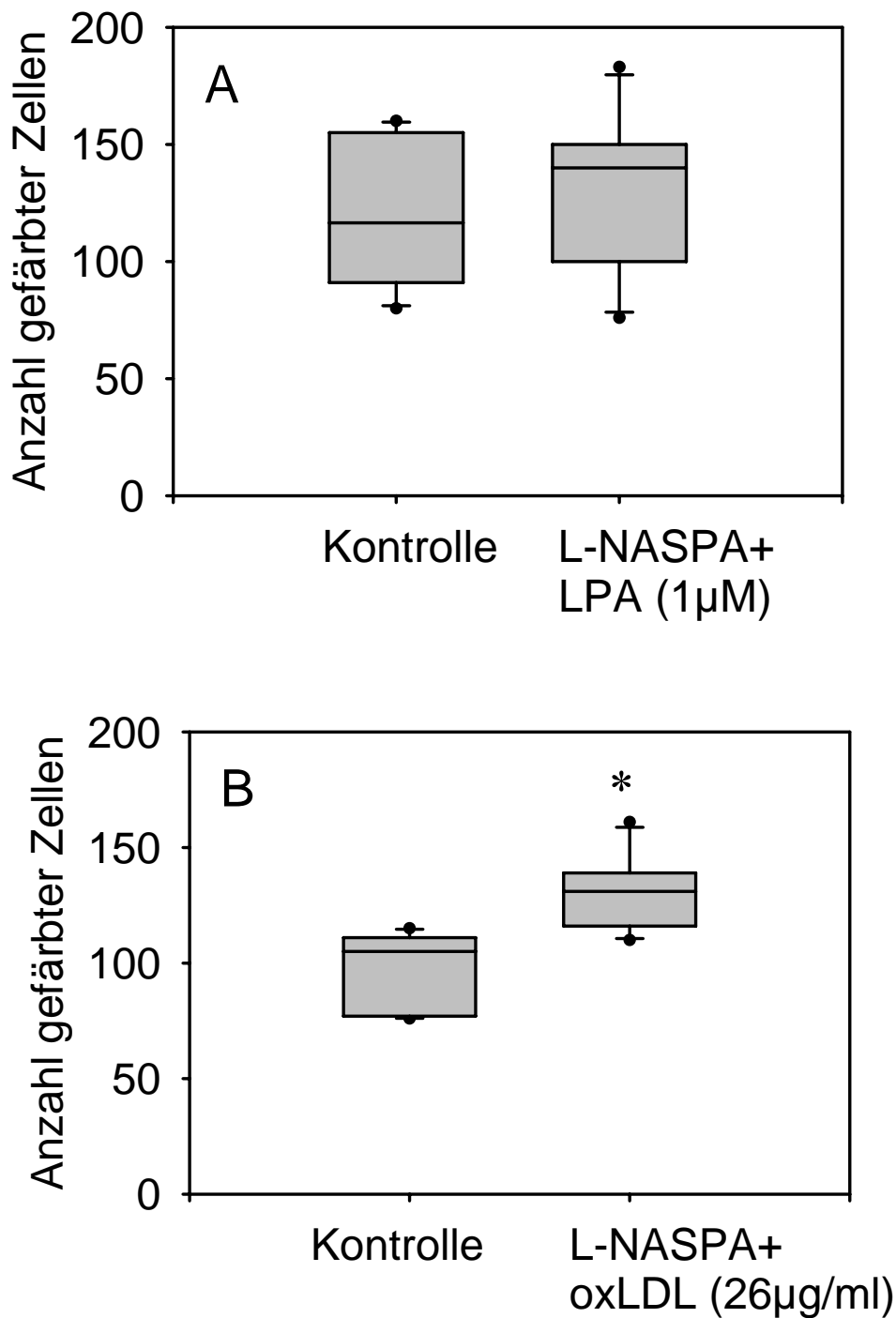
**Abb. 13: Immunzytochemische Färbungen, welche die Membranexpression der Cx37 bzw. Cx43 in HUVEC zeigen. OxLDL (26 µg/ml) bzw. Forskolin (10 µM) haben keinen sichtbaren Effekt auf die Membranexpression von Cx37 und Cx43 nach 140 -minütiger Inkubation.**

#### **4.1.7. OxLDL aktiviert die Zellkommunikation nicht durch einen LPA-Rezeptor**

Um zu überprüfen, ob der Effekt von oxLDL (26 µg/ml), welches als einen funktionell wichtigen Bestandteil Lysophosphatidsäure (LPA) enthält, durch einen LPA-Rezeptor vermittelt wird, wurden Endothelzellen mit LPA in den Konzentrationen 1 µM bzw. 10 µM für 140 Minuten inkubiert. Es wurde festgestellt, dass beide LPA-Konzentrationen einen erheblichen Anstieg der Zellkopplung induzierten (Kontrolle: 85±27 vs. 141±64 gefärbter Zellen nach Inkubation mit 1 µM LPA bzw. 88±16 vs. 117±17 Zellen nach Inkubation mit 10 µM LPA, Abb. 14). Die Vorbehandlung der Zellen mit dem LPA-Blocker L-NASPA (1 µM) beseitigte den verstärkenden Effekt von LPA auf die Zell-Zell-Kommunikation nahezu vollständig. Im Gegensatz dazu zeigte L-NASPA keine Wirkung auf den oxLDL-induzierten Anstieg der Zellkopplung (Abb. 15).



**Abb. 14: Einfluss von LPA auf die Zell-Zell-Kommunikation.** Die Ergebnisse sind als Anzahl gefärbter Zellen 12 min nach der Injektion von Alexa 488 in eine einzelne Zelle dargestellt. LPA in der Konzentration 1 μM (A) bzw. 10 μM (B) induzierte eine signifikante Steigerung in der Zellkommunikation in HUVEC, \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, *t*-Test,  $n=6$  für jede Konzentration.

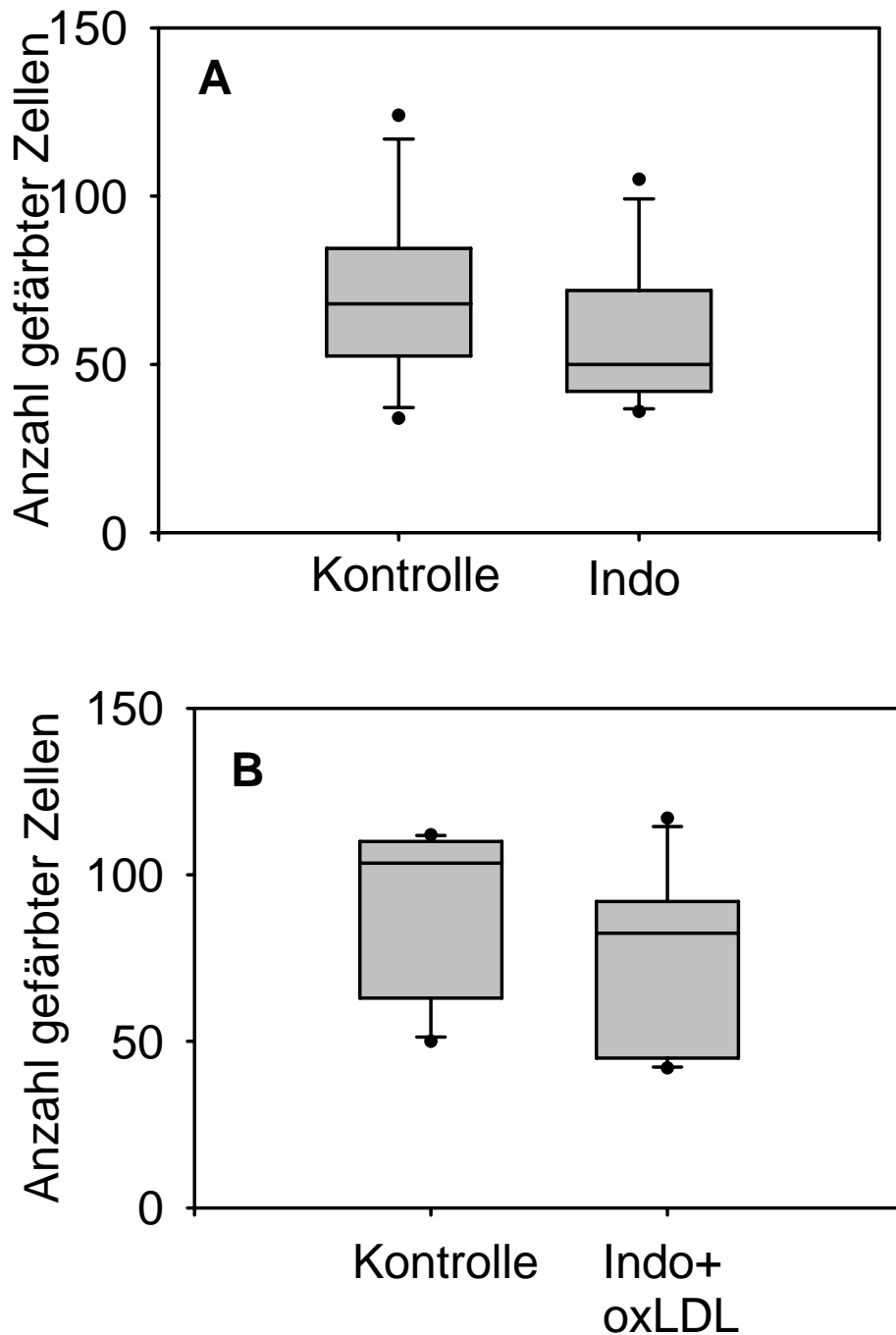


**Abb. 15: Einfluss der LPA-Blockade auf die Zell-Zell-Kommunikation.** Die Ergebnisse sind als Anzahl gefärbter Zellen 12 min nach Injektion von Alexa 488 in eine einzelne Zelle dargestellt. Der LPA-Blocker L-NASPA (1 µM) hob den Effekt von LPA (A) auf, zeigte jedoch keine Wirkung auf die oxLDL-induzierte Steigerung in der Zellkopplung (B), \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, *t*-Test,  $n = 6$  je Gruppe.



#### **4.1.8. Der Effekt von oxLDL auf die Zellkopplung ist Prostaglandin abhängig**

Als nächstes wurde die potentielle Rolle von Cyclooxygenaseprodukten für die oxLDL-induzierte Steigerung der Zellkopplung untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit oxLDL (26µg/ml) in der Kombination mit Indometacin, dem Hemmstoff der Cyclooxygenase in der Konzentration 30 µM inkubiert. Wie in der Abb. 16 dargestellt ist, hob eine 140-minütige Inkubation mit Indometacin den aktivierenden Effekt von oxLDL auf die Zell-Zell-Kommunikation vollständig auf (Kontrolle: 90±27 gefärbter Zellen vs. 77±29 gefärbter Zellen nach Inkubation mit oxLDL und Indometacin), während Indometacin alleine keinen Effekt auf die Zellkopplung hatte.



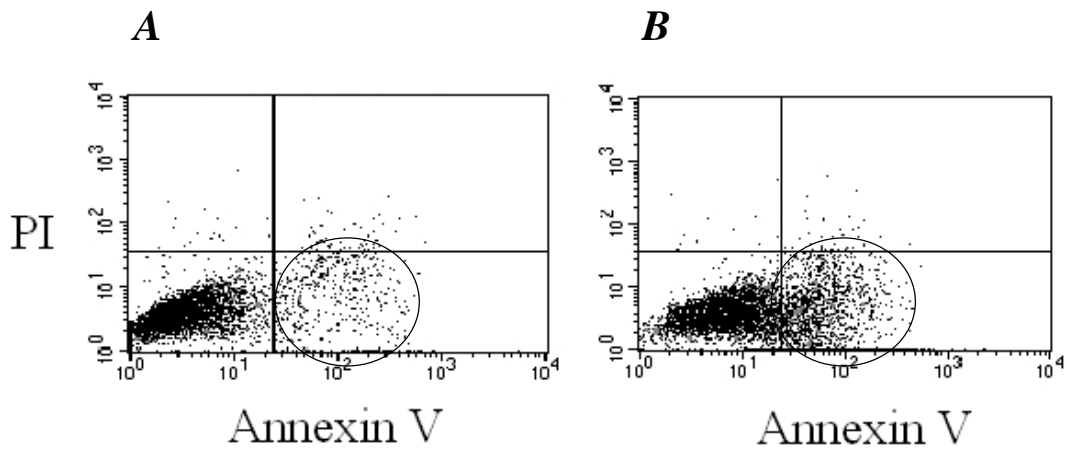
*Abb. 16: Einfluss der Cyclooxygenase auf die Zell-Zell-Kommunikation. Die Ergebnisse sind als Anzahl gefärbter Zellen 12 min nach Injektion von Alexa 488 in eine einzelne Zelle dargestellt. Der Hemmstoff der Cyclooxygenase, Indometacin (30  $\mu$ M), zeigt allein keine signifikante Wirkung auf die interzelluläre Kommunikation (A) ( $n=7$ ), hebt aber den steigenden Effekt von oxLDL (26  $\mu$ g/ml) auf die Zellkopplung auf (B) ( $n=6$ ).*

## **4.2. Bedeutung der Zell-Zell-Kommunikation für die Apoptose-induktion**

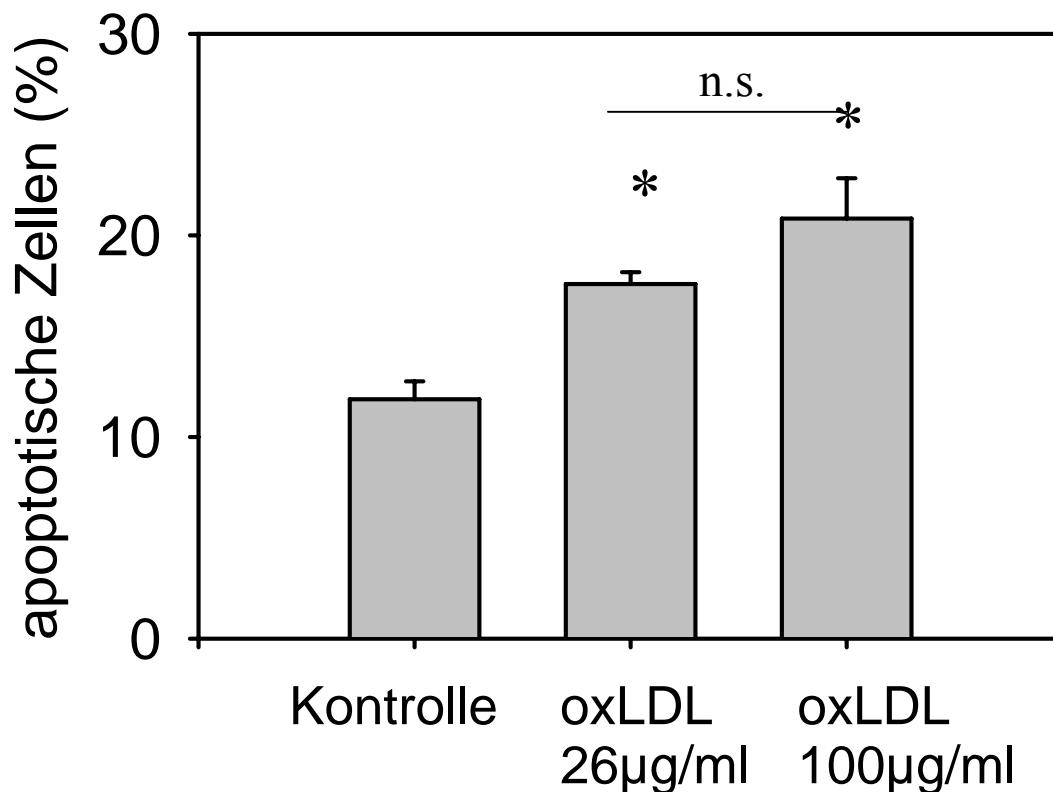
Im zweiten Abschnitt der Studie wurde die potentielle Rolle der Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions sowie die Bedeutung von einzelnen Connexinen für die Apoptoseinduktion analysiert.

### **4.2.1. OxLDL induziert Apoptose in HUVEC**

Wie im ersten Abschnitt (4.1) der Arbeit gezeigt wurde, induziert oxLDL in geringen Konzentrationen eine verstärkte Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions. Interessant ist jedoch, welche funktionellen Konsequenzen dies hat. Da oxLDL die Apoptose von Endothelzellen erhöht, stellte sich die Frage, ob eine erhöhte Zell-Zell-Kommunikation dabei eine Rolle spielt. Um die Wirkung von oxLDL auf die Apoptoseinduktion in unserem Modell zu bestätigen, wurden HUVEC mit oxLDL in Konzentrationen von 26 µg/ml und 100 µg/ml für 24 Stunden inkubiert. Apoptotische Zellen wurden mittels Annexin-V-Bindungsassay durchflusszytometrisch detektiert (Abb. 17). In der Kontrollgruppe betrug der Anteil apoptotischer Zellen  $13\pm 2\%$ . Nach 24 Stunden Inkubation mit oxLDL in den Konzentrationen 26 µg/ml bzw. 100 µg/ml fand sich ein signifikanter Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe ( $18\pm 1\%$  bzw.  $21\pm 2\%$ , Abb. 18).



*Abb. 17: Repräsentative durchflusszytometrische Diagramme der Annexin V-Propidium Iodid - Färbung in HUVEC. Apoptotische Zellen (rechter unterer Quadrant) wurden in der Kontrollgruppe (A) sowie bei oxLDL-behandelten Zellen (100 µg/ml) (B) detektiert.*

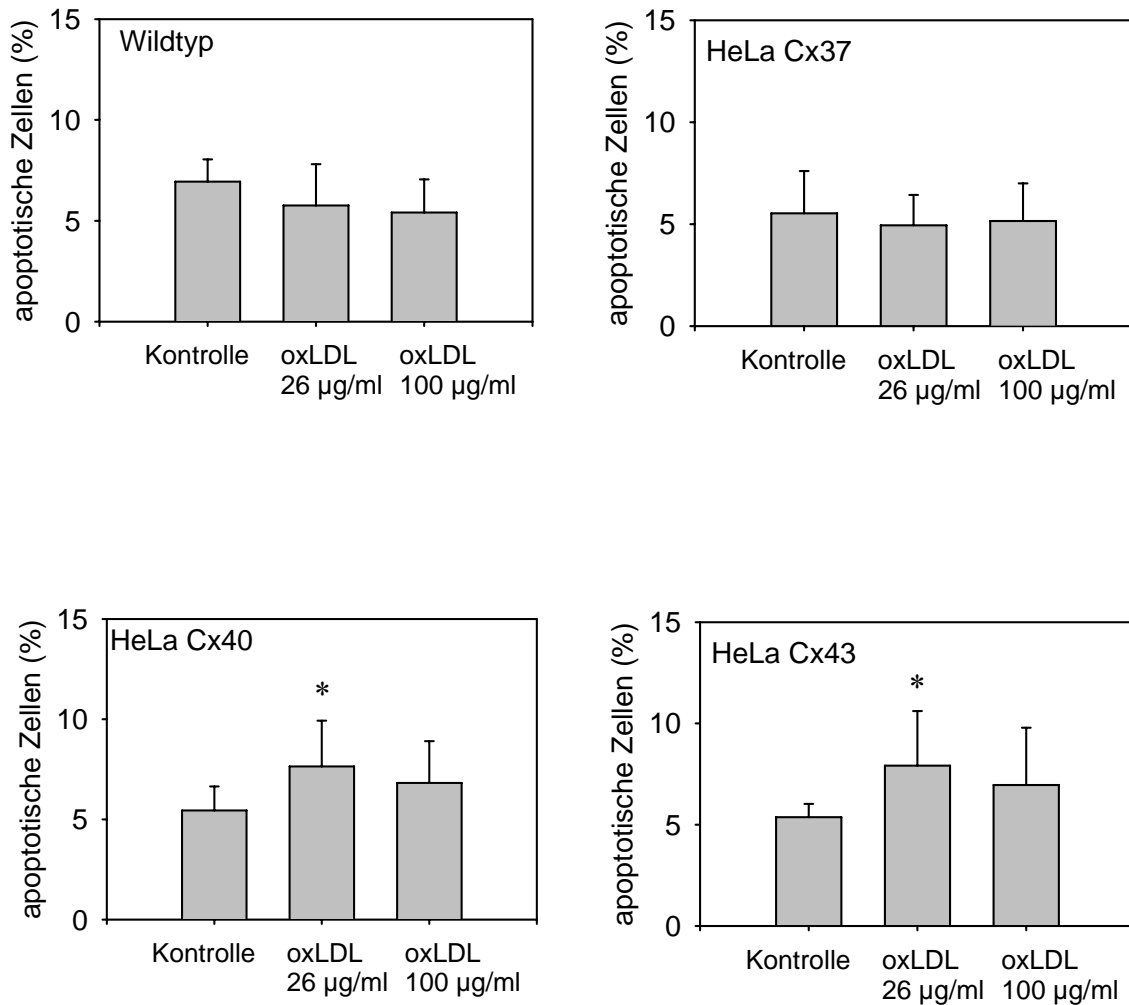


**Abb. 18: Einfluss von oxLDL auf die Apoptoseinduktion in HUVEC.** Apoptotische Zellen wurden nach der Annexin-V Färbung durchflusszytometrisch detektiert und deren Anteil [%] von allen Zellen berechnet. Inkubation der HUVEC mit oxLDL in Konzentrationen von 26 µg/ml bzw. 100 µg/ml für 24 Stunden induzierte einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle,  $MW \pm StAb$ , \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, One Way Anova mit Bonferroni Korrektur,  $n=6$  je Gruppe.

#### **4.2.2. OxLDL induziert Apoptose in Cx40- und Cx43-HeLa-Zellen jedoch nicht in Cx37- oder Wildtyp-HeLa-Zellen**

Es stellte sich die Frage, ob und in welchem Umfang Connexine bei der oxLDL-induzierten Apoptose eine Rolle spielen. Da HUVEC alle drei vaskulären Connexine exprimieren, wurden für diese Versuche HeLa-Zellen verwendet: entweder Wildtyp-Zellen, die keine Connexine aufweisen, oder Zellen, die mit jeweils Cx37, Cx40 oder Cx43-transfiziert wurden. Alle Zelltypen wurden mit oxLDL in den Konzentrationen 26

$\mu\text{g/ml}$  und  $100 \mu\text{g/ml}$  für 24 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zuerst mit Propidium Iodid, dann mit Annexin V gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass oxLDL sowohl in Wildtyp-HeLa-Zellen als auch in Cx37-positiven HeLa-Zellen keine Apoptose auslöste. Im Gegensatz dazu erhöhte oxLDL in Cx40- und Cx43-transfizierten HeLa-Zellen das Ausmaß der Apoptose signifikant im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen (Abb. 19). Allerdings wurde eine erhöhte Apoptoserate nicht bei einer Konzentration von  $100\mu\text{g/ml}$ , sondern bei  $26\mu\text{g/ml}$  registriert. Bemerkenswert ist, dass gerade diese Konzentration ( $26\mu\text{g/ml}$ ) in HUVEC eine Steigerung der Zellkopplung auslöst.

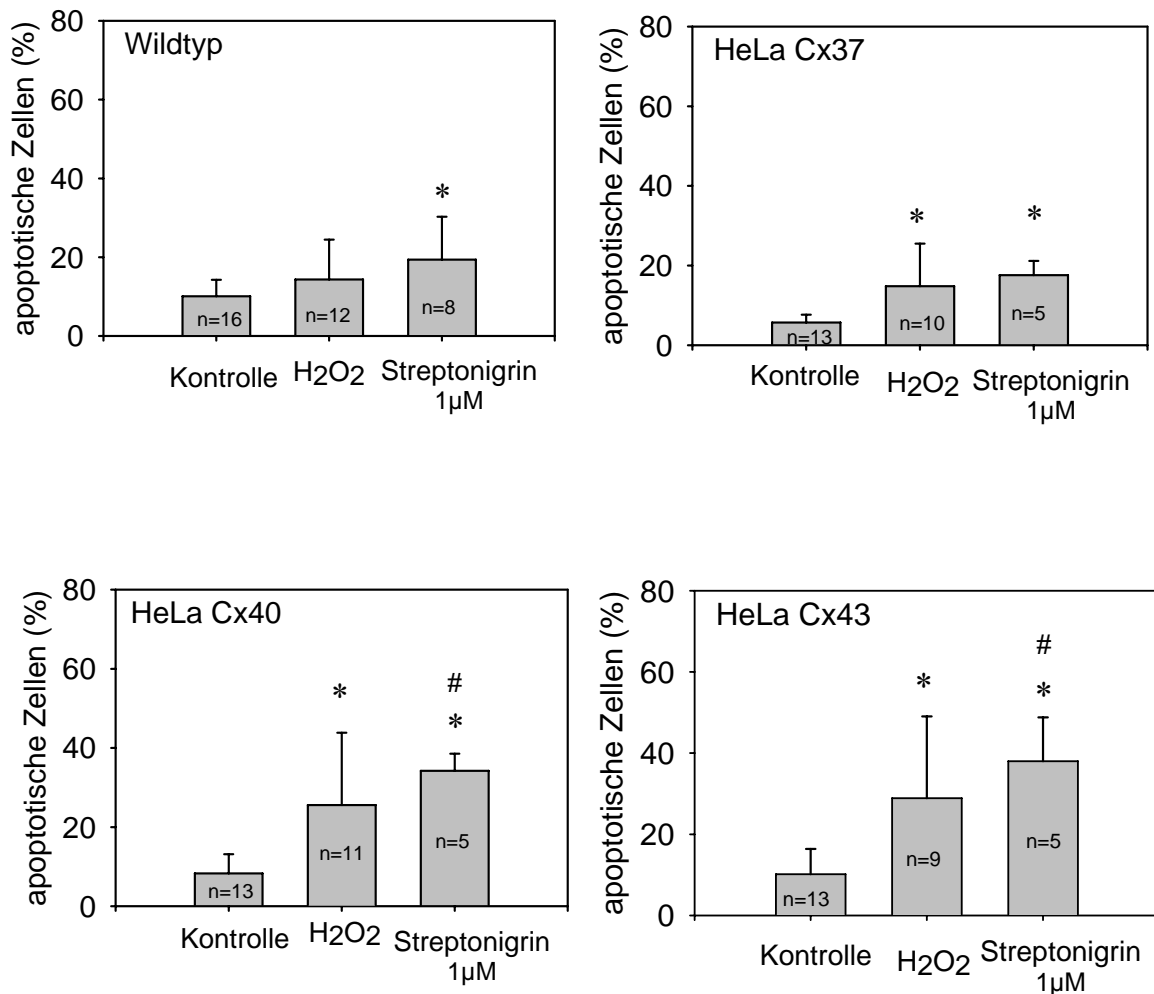


**Abb. 19: Einfluss von Connexinen Cx37, Cx40 und Cx43 auf die oxLDL-induzierte Apoptose.** Apoptotische Zellen wurden nach der Annexin-V Färbung durchflusszytometrisch detektiert und deren Anteil [%] von allen Zellen berechnet. Inkubation der HeLa-Zellen mit oxLDL in den Konzentrationen 26 µg/ml bzw. 100 µg/ml erhöhte die Apoptoserate in Cx40- und Cx43-transfizierten HeLa-Zellen, jedoch nicht in Wildtyp- und Cx37-HeLa-Zellen,  $MW \pm StAb$ , \*  $p < 0,05$  vs. jeweilige Kontrollgruppe, *t*-Test,  $n=8$  je Gruppe.

### **4.2.3. Das Ausmaß der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und Streptonigrin-induzierten Apoptose ist ebenfalls Connexin-abhängig**

Um die differentielle Bedeutung von einzelnen Connexinen für die Apoptose zu untersuchen, wurden sowohl Connexin-defiziente Wildtyp-HeLa-Zellen als auch Cx37, Cx40- und Cx43-exprimierende HeLa-Zellen mit den potenten Apoptoseinduktoren Streptonigrin (1 µM, 3 h) bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM, Inkubationszeit 15 min, Messung nach 3 Stunden) inkubiert. Sowohl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als auch Streptonigrin induzierten eine massive Apoptose in den Cx40- bzw. Cx43-positiven HeLa-Zellen. Im Gegensatz dazu zeigten HeLa Cx37-transfizierte Zellen nur einen geringeren Anstieg der Apoptoserate. In Connexin-defizienten Wildtyp-HeLa-Zellen wurde nach der Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> keine Erhöhung der Apoptose beobachtet, während die Inkubation mit Streptonigrin zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate führte (Abb. 20).



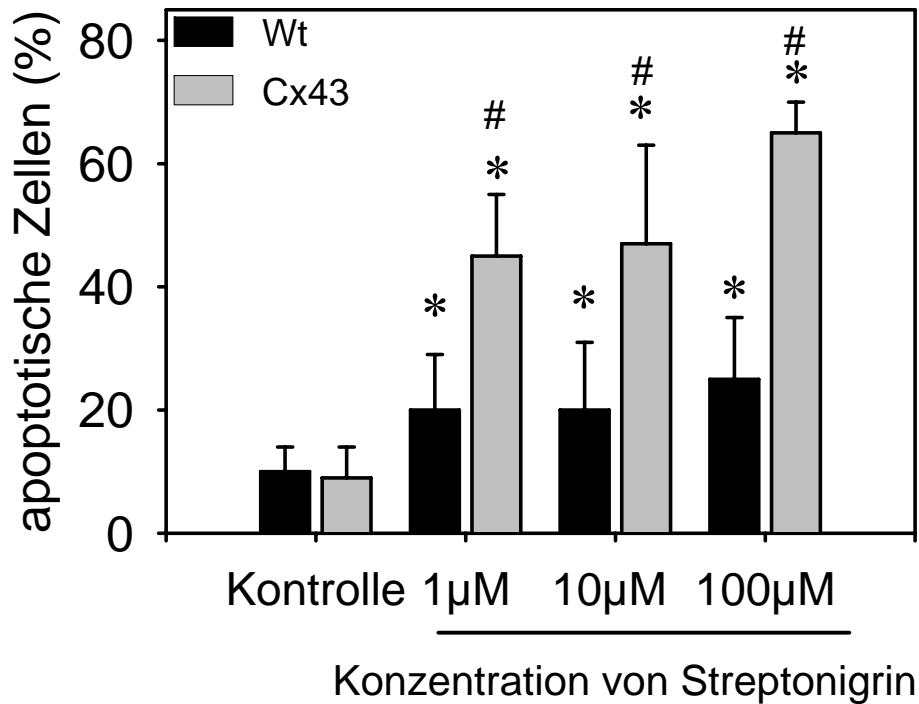


**Abb. 20: Die Bedeutung von Connexinen für die Apoptoseinduktion nach der Stimulation von Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Streptonigrin.** Apoptische Zellen wurden nach der Annexin-V Färbung durchflusszytometrisch detektiert und deren Anteil [%] von allen Zellen berechnet. Inkubation der HeLa-Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM) für 15 min induzierte einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate in Cx37-, Cx40- und Cx43-transfizierten HeLa-Zellen, zeigte jedoch keine Wirkung auf Wildtyp-HeLa-Zellen. Streptonigrin (1 µM) erhöht die Apoptose in allen Zelltypen. MW±StAb, One Way Anova mit Bonferroni Korrektur, \* p<0,05 vs. jeweilige Kontrollgruppe, # p<0,05 vs. Streptonigrin Cx37 und Wildtyp-Zellen, n=5-16 je Gruppe.

#### **4.2.4. Cx43-transfizierte HeLa-Zellen zeigen eine höhere Apoptoserate als**

##### **Wildtyp-HeLa-Zellen**

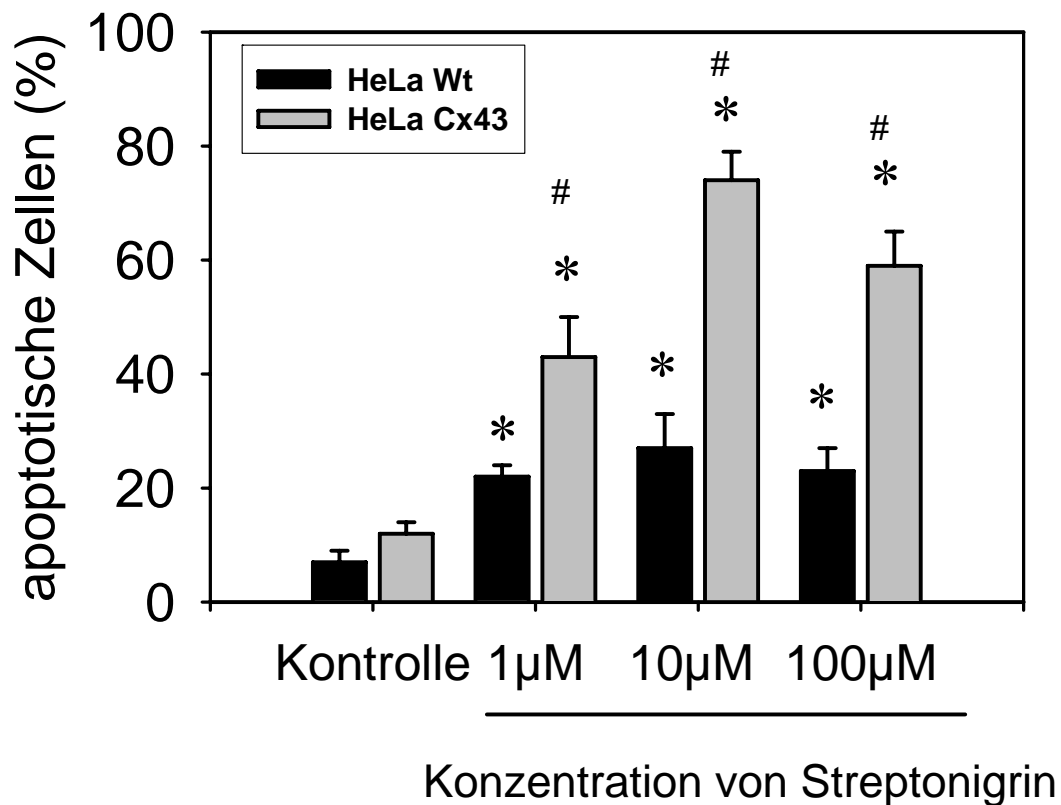
Da die Connexin-exprimierenden Zellen eine höhere Apoptoserate aufweisen, wurde als nächstes untersucht, ob eine aktive Verbindung zu den Nachbarzellen über Gap Junctions eine Voraussetzung für die Steigerung der Apoptose darstellt. Hierfür wurden in weiteren Experimenten zwei Zelltypen genauer untersucht: i) Cx43-transfizierte HeLa-Zellen, die eine hohe Zell-Zell-Kommunikation zeigten, und ii) HeLa-Wildtyp-Zellen, die keine Connexine exprimieren und somit keine interzelluläre Verbindungen über Gap Junctions haben. Beide Zelltypen wurden mit Streptonigrin in drei verschiedenen Konzentrationen (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ ) für je 3 Stunden inkubiert. Der Einfluss von Streptonigrin auf die Induktion der Apoptose in HeLa-Zellen wurde gleich nach Ende der Inkubation mittels der Annexin V – Propidium Iodid Färbung (Abb. 21, Tab. 6) und des Mitochondrien-Membranpotential-Assays (Abb. 22, 23; Tab. 7) quantifiziert. Die Ergebnisse zeigten, dass Streptonigrin in beiden Zelltypen eine signifikante Steigerung der Apoptose dosisabhängig induziert. In Cx43-transfizierten Zellen war die Apoptoserate allerdings erheblich höher als in den unter gleichen Bedingungen behandelten Wildtyp-HeLa-Zellen.



**Abb. 21: Rolle von Cx43 für die Streptonigrin-induzierte Apoptose.** Apoptotische Zellen wurden nach der Annexin-V Färbung durchflusszytometrisch detektiert und deren Anteil [%] von allen Zellen berechnet. Inkubation der HeLa-Wildtyp (schwarze Säulen) und HeLa-Cx43- Zellen (graue Säulen) mit Streptonigrin in den Konzentrationen 1 μM, 10 μM und 100 μM führte zu einer signifikanten Steigerung der Apoptose in beiden Zelltypen. In Cx43-transfizierten Zellen war die Apoptoserate allerdings erheblich höher als in den unter gleichen Bedingungen behandelten Wildtyp-HeLa-Zellen.  $MW \pm StAb$ , One Way Anova mit Bonferroni Korrektur, \*  $p < 0,05$  vs. jeweilige Kontrolle, #  $p < 0,05$  vs. gleiche Gruppe HeLa-Wildtyp,  $n = 8-25$  je Gruppe.

Gruppen	Wildtyp-HeLa	Cx43-HeLa
<b>apoptotische Zellen (%)</b>		
<b>Kontrolle</b>	10 ± 4 (n=25)	9 ± 5 (n=25)
<b>Streptonigrin 1 µM</b>	20 ± 9* (n=15)	45 ± 10*# (n=15)
<b>Streptonigrin 10 µM</b>	20 ± 11* (n=8)	47 ± 16*# (n=8)
<b>Streptonigrin 100 µM</b>	25 ± 10* (n=8)	65 ± 5*# (n=8)

**Tab. 6: Rolle von Cx43 für die Streptonigrin-induzierte Apoptose.** Apoptotische Zellen wurden nach der Annexin-V Färbung durchflusszytometrisch detektiert und deren Anteil [%] von allen Zellen berechnet.  $MW \pm StAb$ , One Way Anova mit Bonferroni Korrektur, \*  $p < 0,05$  vs. individuelle Kontrolle, #  $p < 0,05$  vs. gleiche Gruppe HeLa-Wildtyp.

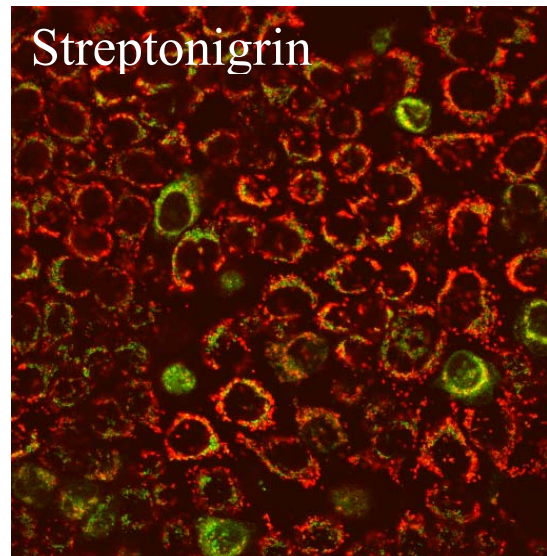
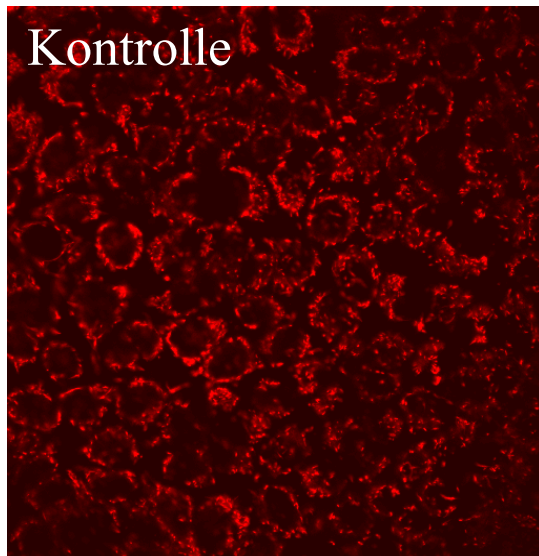


**Abb. 22: Rolle von Cx43 für die Streptonigrin-induzierte Apoptose: Messung des mitochondrialen Membranpotentials.** Inkubation der HeLa-Wildtyp- (schwarze Säulen) und HeLa-Cx43-Zellen (graue Säulen) mit Streptonigrin in den Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  induzierte eine signifikante dosisabhängige Steigerung der Apoptose in beiden Zelltypen.  $MW \pm \text{StAb}$ , One Way Anova mit Bonferroni Korrektur, \*  $p < 0,05$  vs. individuelle Kontrolle, #  $p < 0,05$  vs. gleiche Gruppe HeLa Wildtyp,  $n=5$  je Gruppe.

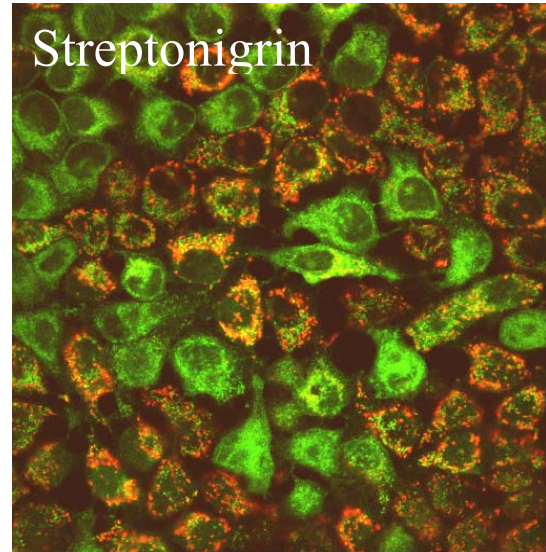
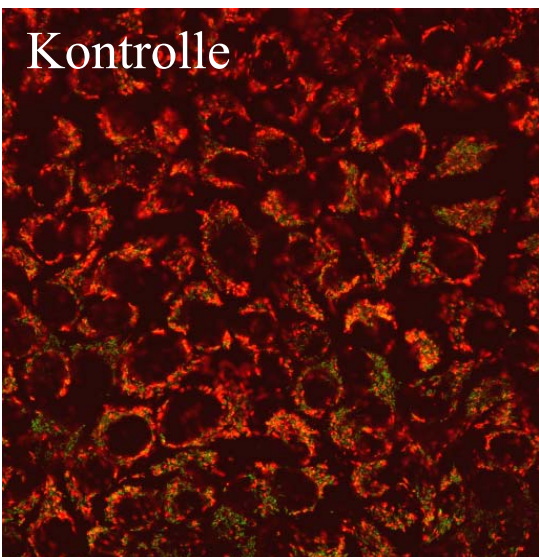
Gruppen	Wildtyp-HeLa	Cx43-HeLa
<b>apoptotische Zellen (%)</b>		
<b>Kontrolle</b>	7 ± 2 (n=5)	12 ± 2 (n=5)
<b>Streptonigrin 1 µM</b>	22 ± 2* (n=5)	43 ± 7*# (n=5)
<b>Streptonigrin 10 µM</b>	27 ± 6* (n=5)	74 ± 5*# (n=5)
<b>Streptonigrin 100 µM</b>	23 ± 4* (n=5)	59 ± 6*# (n=5)

*Tab. 7: Rolle von Cx43 für die Streptonigrin-induzierte Apoptose: Messung des mitochondrialen Membranpotentials. Anzahl apoptotischer HeLa-Wildtyp- und HeLa-Cx43-Zellen nach der Inkubation mit Streptonigrin in den Konzentrationen 1 µM, 10 µM und 100 µM. MW±StAb, One Way Anova mit Bonferroni Korrektur, \* p<0,05 vs. jeweilige Kontrolle, #p<0,05 vs. gleiche Gruppe HeLaWildtyp.*

## **A** Wildtyp-HeLa-Zellen



## **B** HeLa-Cx43-Zellen



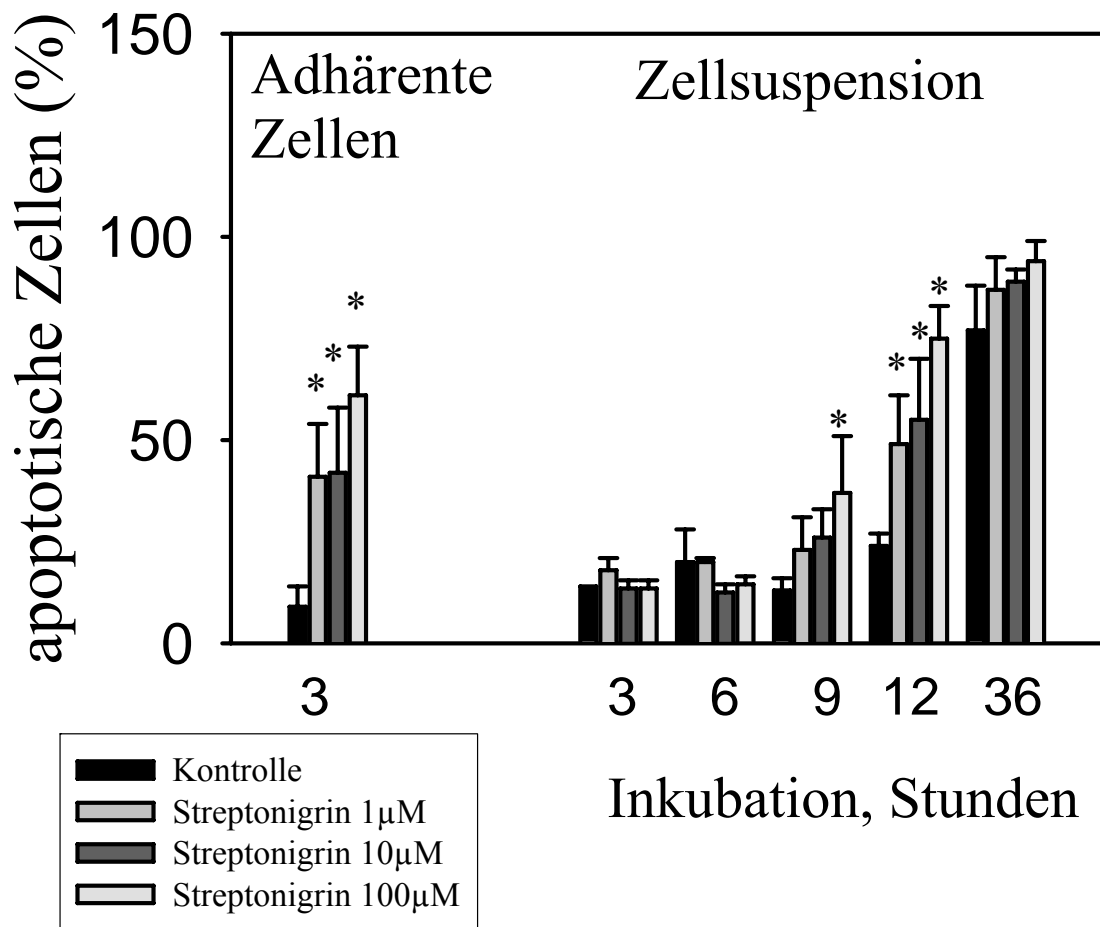
**Abb. 23: Detektierung der Apoptose mit der JC-1-Färbung in Wildtyp (A) und Cx43-transfizierten HeLa-Zellen (B).** Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass eine Inkubation der Zellen mit Streptonigrin ( $100 \mu\text{M}$ ) für 3 Stunden Apoptose in beiden Zelltypen induziert. Apoptotische Zellen sind Grün gefärbt. In der Kultur von Cx43-transfizierten Zellen war die Anzahl apoptotischer Zellen höher als in Wildtyp-HeLa-Zellen.

#### **4.2.5. Cx43-transfizierte HeLa-Zellen zeigen in Zellsuspension weniger Apoptose als adhärenente Cx43-HeLa-Zellen**

Um die Rolle von Zell-Zell Kontakten für die Apoptoseinduktion zu analysieren, wurden HeLa-Cx43-Zellen abgelöst und im Medium mit verschiedenen Konzentrationen von Streptonigrin resuspendiert. Damit die Zellen sich nicht absetzen und miteinander keine Gap Junctions bilden konnten, wurde die Zellkulturplatte ständig geschüttelt. Die Apoptose wurde in Zellsuspension unmittelbar nach 3, 6, 9, 12 und 36 Stunden Inkubation mittels der Annexin V - Propidium Iodid Färbung durchflusszytometrisch quantifiziert. Als Vergleich wurden adhärenente Cx43-HeLa-Zellen verwendet, die mit gleichen Konzentrationen von Streptonigrin für 3 Stunden vorbehandelt wurden.

Nach 3, 6 und sogar 9 Stunden Inkubation mit Streptonigrin, zeigten die Zellen in der Zellsuspension nahezu keine Veränderung der Apoptoserate. Eine signifikante dosisabhängige Steigerung der Apoptose in der Zellsuspension wurde erst nach 12 Stunden Inkubation mit Streptonigrin festgestellt. Nur zu diesem Zeitpunkt erreichte die Anzahl apoptotischer Zellen in Zellsuspension das Niveau, welches in adhärenenten Cx43-HeLa-Zellen bereits nach einer 3-stündigen Inkubation beobachtet wurde (Abb. 24, Tab. 8). Nach einer 36-stündigen Inkubation waren nahezu alle Zellen in beiden Populationen apoptotisch.





**Abb. 24: Vergleich der Streptonigrin-induzierten Apoptose zwischen Zellen in Suspension und adhärennten Zellen.** Apoptotische HeLa-Cx43-Zellen wurden nach der Annexin-V Färbung durchflusszytometrisch detektiert und deren Anteil [%] von allen Zellen berechnet. Inkubation der Zellen mit Streptonigrin in den Konzentrationen 1 μM, 10 μM und 100 μM erhöhte signifikant die Apoptose in adhärennten Zellen nach 3 Stunden. In Zellsuspension wurde das gleiche Apoptoseniveau erst nach 12 Stunden Inkubation mit gleichen Konzentrationen Streptonigrin erreicht. MW±StAb, One Way Anova mit Bonferroni Korrektur, \*  $p < 0,05$  vs. individuelle Kontrolle,  $n = 3-25$  je Gruppe.

**A****HeLa-Cx43-Zellen in Suspension**

<b>Gruppen</b>	<b>3 Stunden</b>	<b>6 Stunden</b>	<b>9 Stunden</b>	<b>12 Stunden</b>	<b>36 Stunden</b>
<b>apoptotische Zellen (%)</b>					
<b>Kontrolle</b>	14±0 (n=3)	20±8 (n=3)	13±3 (n=5)	24±3 (n=5)	77±11(n=4)
<b>Streptonigrin 1 µM</b>	18±3 (n=3)	20±1 (n=3)	23±8 (n=5)	49±12*(n=5)	87±8(n=4)
<b>Streptonigrin 10 µM</b>	13±2 (n=3)	12±2 (n=3)	26±7 (n=5)	55±15*(n=5)	89±3(n=4)
<b>Streptonigrin 100 µM</b>	13±2 (n=3)	14±2 (n=3)	37±14*(n=5)	75±8*(n=5)	94±5(n=4)

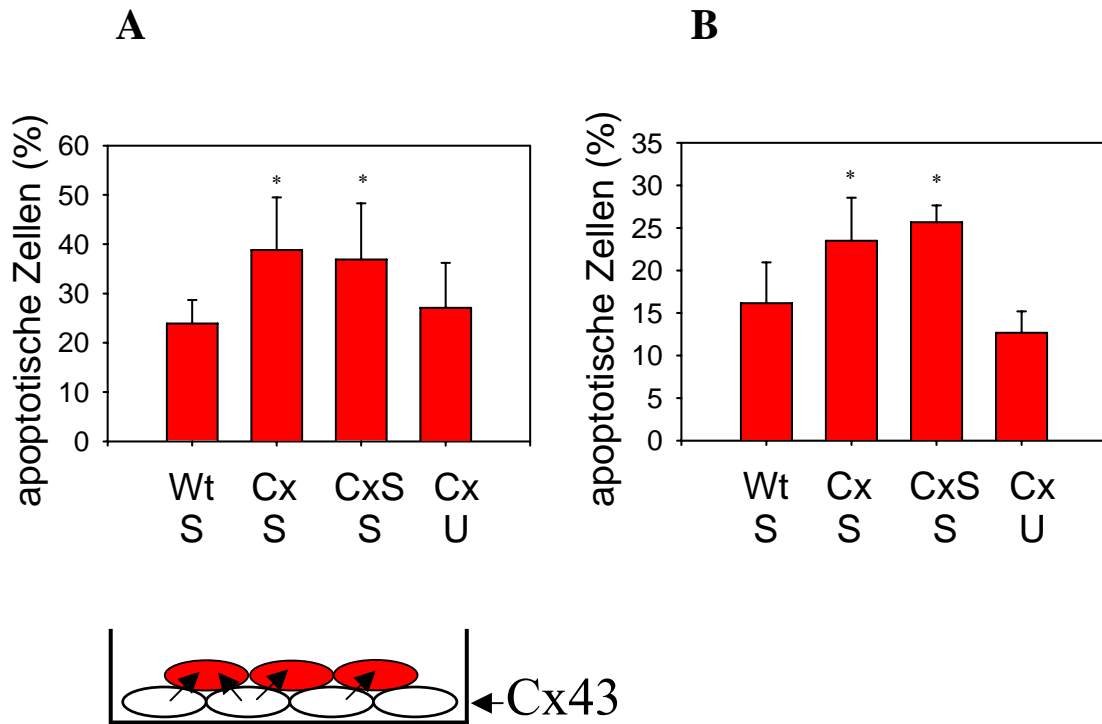
**B****Adhärente HeLa-Cx43-Zellen**

<b>Gruppen</b>	<b>3 Stunden</b>
<b>apoptotische Zellen (%)</b>	
<b>Kontrolle</b>	9 ± 5 (n=25)
<b>Streptonigrin 1 µM</b>	45 ± 10* (n=15)
<b>Streptonigrin 10 µM</b>	47 ± 16* (n=8)
<b>Streptonigrin 100 µM</b>	65 ± 5* (n=8)

*Tab. 8: Vergleich der Streptonigrin-induzierten Apoptose zwischen Zellen in Suspension und adhärenen Zellen. Prozent apoptotischer HeLa-Cx43-Zellen in Suspension (A) und in einer Kultur aus adhärenen Zellen (B) nach der Inkubation mit Streptonigrin in den Konzentrationen 1 µM, 10 µM und 100 µM. MW±StAb, One Way Anova mit Bonferroni Korrektur, \* p<0,05 vs. jeweilige Kontrollgruppe.*

#### **4.2.6. Einfluss von neu gebildeten Gap Junctions auf die Apoptoserate**

Im nächsten Teil der Studie wurde die Rolle von Gap Junctions in der Apoptoseinduktion nach dem unter 3.3.2.2 beschriebenen Protokoll 1 untersucht. Hierfür wurden Cx43-transfizierte HeLa-Zellen im konfluenten Monolayer mit Streptonigrin für die Apoptoseinduktion inkubiert (Population 1 ( $P_1$ )). Die zweite Population ( $P_2$ ) von HeLa-Zellen wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff CMTMR markiert und auf den konfluenten Monolayer der Streptonigrin-vorbehandelten Zellen aufgebracht. Die beiden Populationen wurden anschließend für 3 Stunden miteinander inkubiert. Unmittelbar nach der Inkubation wurde das Medium mit markierten Zellen der  $P_2$  abgenommen und eine Apoptose wurde mit Hilfe der Annexin-V Färbung oder durch Messung des mitochondrialen Membranpotentials durchflusszytometrisch erfasst. Wie in der Abb. 25 zu sehen ist, war in der zweiten Zellpopulation die Apoptose am stärksten in Cx43-exprimierenden Zellen ausgeprägt. In dieser Gruppe erreichte die Apoptoserate das Niveau der Positivkontrolle, in der beide Zellpopulationen mit Streptonigrin vorbehandelt wurden. Als Negativkontrollen wurden sowohl Streptonigrin-vorbehandelte Cx43-HeLa-Zellen ( $P_1$ ) in der Kombination mit Connexin-defizienten Wildtyp-HeLa-Zellen ( $P_2$ ) als auch nicht behandelte (ohne Gabe von Streptonigrin) Cx43-HeLa-Zellen in beiden Zellpopulationen ( $P_1$ ,  $P_2$ ) verwendet.

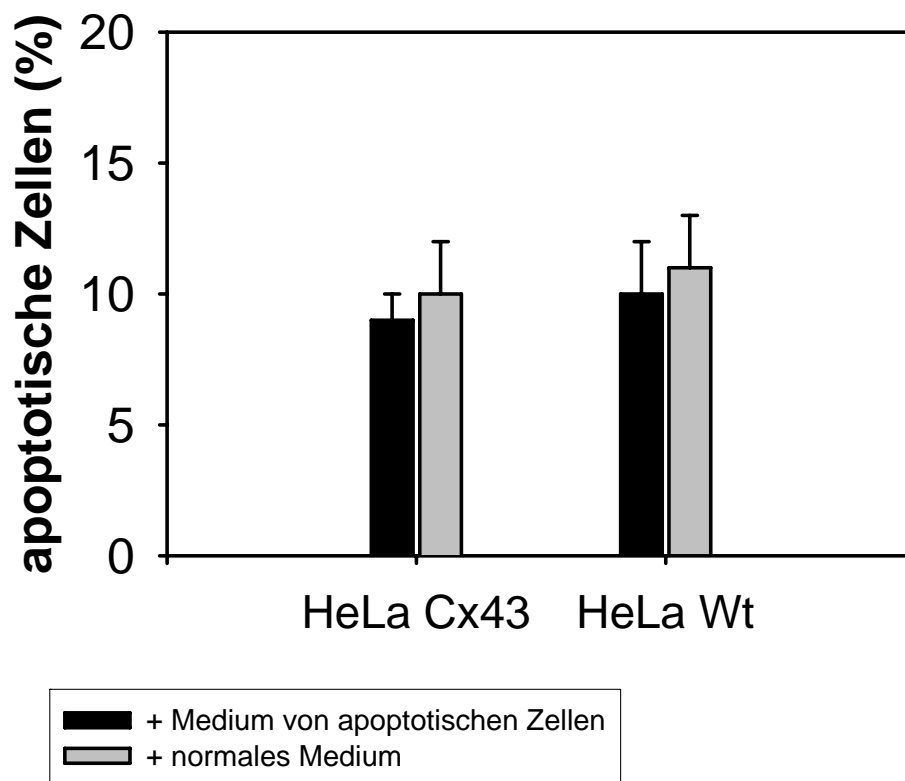


**Abb. 25: Bedeutung von Zell-Zell-Kommunikation für den interzellulären Transport von proapoptischen Signalen.** Apoptose wurde in CMTMR-markierten Zellen (rot) mittels der Annexin-V Färbung (A) ( $n=10$ ) und Messung des mitochondrialen Membranpotentials (B) ( $n=6$ ) durchflusszytometrisch analysiert. In Cx43-HeLa-Zellen, die mit Streptonigrin-vorbehandelten Zellen (weiß) Gap Junctions bilden können, ist die Apoptoserate vergleichbar mit der Positivkontrolle, wo Cx43-HeLa-Zellen in beiden Populationen (weiß und rot) mit Streptonigrin vorbehandelt wurden. In den beiden Gruppen war die Apoptoserate der CMTMR-markierten Zellen signifikant höher als in den Kontrollgruppen (vorbehandelte Cx43-HeLa-Zellen in Kombination mit Wildtyp-HeLa-Zellen sowie unbehandelte Cx43-HeLa-Zellen mit unbehandelten Cx43-HeLa-Zellen).  $MW \pm StAb$ , \*  $p < 0,05$  vs. WT/S bzw. Cx/U.

#### **4.2.7. Proapoptische Signale werden nicht durch Connexone (Halbkanäle) transportiert**

Um zu untersuchen, ob die Apoptosesignale ausschließlich durch neu gebildete Gap Junctions und nicht durch Connexone transportiert werden, wurden zusätzliche Experimente nach dem unter Punkt 3.3.2.2 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Wildtyp-HeLa-Zellen und HeLa-Cx43-Zellen wurden mit dem Medium von apoptotischen Zellen für 3 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Apoptose mittels der Annexin V - Propidium Iodid Färbung durchflusszytometrisch quantifiziert. Parallel wurden Kontrollen für jede Gruppe durchgeführt, wo die Zellen mit dem normalen Medium für 3 Stunden inkubiert wurden. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-HeLa-Zellen und Cx43-HeLa-Zellen nach der Inkubation mit Medium von apoptotischen Zellen festgestellt. Außerdem wurden keine Unterschiede zwischen experimentellen Gruppen und Kontrollen beobachtet (Abb. 26).



**Abb. 26: Die Rolle von Connexonen für den interzellulären Transport von proapoptischen Signalen.** Wildtyp- und Cx43-HeLa-Zellen, die mit dem Medium von apoptotischen Zellen inkubiert wurden, zeigten keine Unterschiede in der Apoptoserate miteinander und mit Kontrollen.  $MW \pm StAb$ ,  $n=7$  je Gruppe.

## **5. DISKUSSION**

### **5.1. Fragestellung und Hauptbefunde**

Vaskuläre Erkrankungen sind als Ursache für Mortalität und Morbidität führend in westlichen Industrieländern (77; 110). Koronare Herzerkrankung und Myokardinfarkt, zerebrale Ischämie und Apoplex, Hypertonie und vaskulär bedingte Nierenerkrankungen haben ihre Ursache in entzündlichen, degenerativen und proliferativen Veränderungen des Gefäßsystems. Jedes Jahr sterben ca. 170.000 Menschen akut an Herzinfarkt und Schlaganfall - Folgen der Atherosklerose. Es sind progressive Erkrankungen, die sich oft bereits im jungen Alter mit endothelialer Dysfunktion, Insulinresistenz und ersten Anzeichen einer Atherosklerose etablieren. Allein in Deutschland leiden zur Zeit etwa 10 Mio. Menschen an einer atherosklerotischen Gefäßerkrankung. Für das Auftreten der Atherosklerose und weiterer Herz-Kreislaufkrankungen sind mehrere Risikofaktoren verantwortlich. Eine zentrale Bedeutung wird den Störungen des Lipidmetabolismus (LDL-Cholesterin >150 mg/dl, HDL-Cholesterin < 40 mg/dl, Ratio LDL/HDL-Cholesterin > 3) zugeschrieben, was zum Teil durch die hohe Prävalenz von Hyperlipidämie (betroffen: ca. 20 Mio. Menschen in Deutschland), jedoch vor allem durch die vielseitige Beteiligung von bestimmten Lipidkomponenten in pathophysiologischen Vorgängen während der Atherosklerose erklärt wird. Es gibt derzeit wenig Zweifel daran, dass oxLDL, eine Fraktion von Lipoproteinen mit niedriger Dichte, eine herausragende Rolle bei der Induktion bzw. Progression der Atherosklerose einnimmt. Die Mechanismen, über welche oxLDL an der Atheroskleroseinduktion bzw. -progression beteiligt ist, stellen den Gegenstand der Diskussion in der aktuellen Literatur und einen der Schwerpunkte sowohl in der Grundlagen- als auch therapeutischen Forschung in der Kardiologie dar.

Bisherige Befunde belegten bereits, dass im Blut zirkulierendes oxLDL potentiell zytotoxisch auf das vaskuläre Endothel wirkt, wobei eine ganze Reihe von Prozessen initiiert wird, was in der endothelialen Dysfunktion resultiert (49; 85). Dazu gehört auch die Störung der Endothelzellfunktion und die Inaktivierung von NO durch oxLDL-induzierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (16; 160). Diese Arbeit hatte zum Ziel, einen neuen Aspekt, die potentielle Wirkung von oxLDL auf die endotheliale Zellkopplung über Gap Junctions, zu untersuchen. Gap junctions bzw. die Gap Junction-bildende Proteine, die Connexine, scheinen eine wichtige Rolle bei der Progression der Atherosklerose zu spielen. Im ersten Teil dieser Studie wurde daher untersucht, ob und über welche Mechanismen oxLDL einen Einfluss auf die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions in Endothelzellen ausübt. Im zweiten Teil der Arbeit wurde auf die funktionellen Konsequenzen einer oxLDL-Stimulation in Endothelzellen fokussiert. Es wurde die Bedeutung der Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions bzw. der einzelnen Connexine bei der Induktion der endothelialen Apoptose untersucht, da Zell-Zell-Kommunikation eine wesentliche Rolle bei der Atheroskleroseprogression spielt und von oxLDL beeinflusst wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass: i) oxLDL eine signifikante Steigerung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions in HUVEC induziert; ii) dieser Effekt dosisabhängig ist; iii) die Wirkung von oxLDL auf die Endothelzellkommunikation durch einen cAMP/PKA-abhängigen Mechanismus und, möglicherweise, durch Prostacyclinfreisetzung vermittelt wird; iv) oxLDL keinen detektierbaren Einfluss auf die Expression der Connexine 37 und 43 in der Zellmembran hat; v) oxLDL Apoptose in Endothelzellen induziert, die nach unseren,



parallel in HeLa-Zellen durchgeführten Experimenten durch die Zellkopplung über Gap Junctions entscheidend moduliert wird.

## **5.2. Diskussion der Methoden**

### **5.2.1. Zellkultur**

Die Versuche zur Analyse des Einflusses von oxLDL auf die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions wurden an HUVEC durchgeführt. Wir haben uns für diese Zellen entschieden, weil sie eine gut charakterisierte und relativ leicht zugängliche Population von humanen Endothelzellen darstellen. Um den physiologischen Bedingungen möglichst nahe zu kommen, wurden HUVEC für unsere Versuche erst nach Erreichen der Konfluenz verwendet. Darüber hinaus besitzen HUVEC eine für unsere Studie sehr wichtige Eigenschaft: sie exprimieren die Connexine Cx40, Cx43 sowie Cx37, die für humanes vaskuläres Endothel auch *in situ* charakteristisch sind (194; 195).

Im Studienabschnitt zur Rolle der einzelnen Connexine bei der Apoptoseinduktion haben wir HeLa-Zellen verwendet. HeLa-Zellen gehören zu einer epithelartigen Zelllinie. Die wurden Anfang der 50-er Jahre aus einem Zervixkarzinom einer Patientin isoliert und stellen die ersten menschlichen Zellen dar, von denen eine permanente Zellkultur etabliert wurde. Die Bezeichnung der Zellen geht auf den Namen der Patientin, Henrietta Lacks, zurück. Eine Besonderheit von HeLa-Zellen ist, dass sie keine Connexine exprimieren. Werden die Zellen mit einem der drei Connexine Cx37, 40 oder 43 transfiziert, ergibt sich die Möglichkeit, die selektive Bedeutung einzelner Connexine zu untersuchen. Wie immunhistochemisch bestätigt wurde, zeigte sich in

unseren Versuchen in transfizierten HeLa-Zellen eine stabile Expression von Cx43, Cx37 bzw. Cx40.

### **5.2.2. Farbstofftransfer**

Als Parameter der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions bzw. deren Permeabilität wurde die Ausbreitung des Fluoreszenzfarbstoffs Alexa Fluor 488 zwischen benachbarten Zellen nach einer Injektion in eine einzelne Zelle quantitativ untersucht. Diese Methode ist in der Literatur gut etabliert und wird in unserem Labor routinemäßig verwendet (68; 79; 80). Wie bereits in der Literatur beschrieben ist, wird der Transfer des intrazellulär-applizierten Farbstoffs in die Nachbarzellen ausschließlich via Gap Junctions gewährleistet (79; 98; 108). Wurde Alexa Fluor 488 in der selben Konzentration, wie bei der Mikroinjektion, zum Zellüberstand gegeben und für 30 Minuten inkubiert, so konnte nach dem Auswaschen des Farbstoffs aus dem Zellmedium keine Fluoreszenz in den Zellen nachgewiesen werden. Dies bestätigt, dass dieser Fluoreszenzfarbstoff nur durch Gap Junctions von einer Zelle zur anderen gelangen kann und nicht einfach die Zellmembran durchdringt. Darüber hinaus war kein Farbstofftransfer zwischen benachbarten Zellen möglich, wenn Alexa Fluor 488 in einer Kultur aus Connexin-defizienten Wildtyp-HeLa-Zellen injiziert wurde. Übereinstimmend mit diesen Befunden war auch die Ausbreitung der Fluoreszenzfarbstoffe Carboxyfluorescein und Calcein innerhalb eines Zellverbandes nur dann möglich, wenn die Zellen über Gap Junctions miteinander gekoppelt waren (27; 108). Da für die Versuche die Zellen aus verschiedenen Nabelschnurpräparationen verwendet wurden und möglicherweise auch die Widerstände der Injektionspipetten eine gewisse Variabilität aufwiesen, bestand eine erhebliche Variation in der Anzahl

gefärbter Zellen nach der Farbstoffinjektion. Das betrifft vor allem die Versuche mit variablen oxLDL - Konzentrationen. Dabei waren bei der Konzentration 26 µg/ml oxLDL signifikant weniger Zellen gefärbt als bei allen anderen oxLDL Konzentrationen (2,5; 15; 50 und 100µg/ml). Es wurde bereits in früheren Arbeiten aus unserem Labor eine relative große Variation beschrieben (80), was die absolute Anzahl gefärbter Zellen nach Farbstoffinjektion betrifft. Trotz der unterschiedlich starken Kopplung war jedoch der Effekt der Behandlung (z.B. NO Hemmung von Connexin 37) in der genannten Untersuchung prozentual jeweils gleich stark, was dafür spricht dass, wie oben bereits angeführt, auch die jeweils verwendeten Pipetten und damit die durch Druck injizierte Farbstoffmenge einen Einfluss gehabt haben könnte. Um in meinen Versuchen verschiedene Gruppen trotzdem miteinander vergleichen zu können, wurden die Versuche mit der jeweiligen Testsubstanz und die zugehörigen Kontrollversuche im gleichen Monolayer bzw. der gleichen Nabelschnurpräparation durchgeführt. So wurden in jeder Schale drei Injektionen vor der Inkubation (Kontrollen) mit drei Injektionen nach der Inkubation verglichen. Alle Versuche wurden außerdem grundsätzlich an verschiedenen Nabelschnurpräparationen wiederholt. Es mag zusätzlich eine Rolle gespielt haben dass die Versuche mit 26µg/ml oxLDL im wesentlichen in einer frühen Phase der Studien durchgeführt wurden, während die Versuche mit variablen oxLDL-Konzentrationen (2,5; 15; 50 und 100µg/ml) bis zu einem Jahr später erfolgten. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass meine Technik der Zellinjektion sich in dieser Zeit verbessert hat und auch so eine höhere absolute Zahl gefärbter Zellen zustande kam.

Erwähnenswert ist, dass die Ausbreitung von Farbstoffen über endotheliale Gap Junctions auch in isolierten Gefäßen beschrieben wurde (108). Ebenso wie in den Monolayern breitet sich der Farbstoff Lucifer Yellow nach einer intrazellulären

Injektion auch entlang von Arteriolen in der Endothelzellschicht aus (175; 176). Im Gegensatz zu dem von uns gewählten *In Vitro*-Verfahren ist es bei den *In Vivo*-Ansätzen nur schwer möglich, eine quantitative Analyse der Zell-Zell-Kommunikation durchzuführen. Das bedeutet jedoch, dass es zur Zeit keinen Vergleich der Permeabilität der Gap Junctions bei der Farbstoffausbreitung *in vivo* mit den hier vorgestellten *in vitro* Befunden gibt. Der in der Arbeit verwendete Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 verfügt über eine Molekulargröße von 570 Da und eine negative Ladung (-1). Das entspricht der Größe von potentiellen zellulären Botenstoffen, wie cAMP, cGMP oder IP<sub>3</sub>, die über ein vergleichbares Molekulargewicht verfügen. Das schließt jedoch nicht aus, dass auch andere Moleküle durch Gap Junctions passieren können, weil Gap Junctions potentiell für Moleküle bis zu einer Molekulargröße von etwa 1,8 kDa durchlässig sind (197; 198).

### **5.2.3. Detektion der Apoptose**

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Methoden zur Apoptosedetektion etabliert, die auf Änderungen der Zellmorphologie, der Zusammensetzung und Transportfunktion der Plasmamembran, der Organellenfunktion, der DNA-Stabilität gegenüber Denaturierung oder der endonukleolytischen Fragmentierung basieren. Nicht bei jedem Zelltyp und jedem bekannten Apoptose-Stimulus sind sämtliche beschriebenen Apoptose-Marker nachweisbar. Darüber hinaus werden bei einigen Apoptoseassays zum Teil auch nekrotische Zellen erfasst. Aus diesem Grund müssen zur Apoptosemessung in der Regel mehrere, auf dem Nachweis unterschiedlicher Apoptosekriterien beruhende Verfahren parallel eingesetzt und miteinander verglichen werden (32).

*Phosphatidylserintranslokation.* Neue Erkenntnisse über den apoptotischen Prozess führten gleichzeitig zu neuen Parametern für die Detektion und Quantifizierung apoptotischer Zellen. Einer dieser Parameter ist der Nachweis von Phosphatidylserin (PS), welches nach Strukturveränderungen der Plasmamembran von der inneren zur äußeren Membranseite verlagert wird (207). Die exakten Mechanismen für diese Phospholipid-Asymmetrie sind noch nicht geklärt. Allerdings werden Adenosintriphosphat sowie Magnesium-abhängige Membranproteine beschrieben, welche die Umverteilung der negativ geladenen Phospholipide als Folge diverser Signale (z. B. Aktivierung von Flippasen, Deaktivierung von Translokasen) vermitteln (36). Eine durchflusszytometrische Darstellung des nach außen verlegten PS wird durch die Anlagerung des Fluoreszeinisothiozyanat-gekoppelten Antikoagulans Annexin V ermöglicht (89; 199). Da auch bei nekrotischen Zellen die Membran permeabilisiert, kann Annexin V in die Zelle diffundieren, wodurch ebenfalls ein positives Signal erscheint. Um dieses Problem zu umgehen, werden durch Ausschlussfärbung mit Propidium Iodid nekrotische von apoptotischen Zellen differenziert.

Allerdings wurden die adhärennten Zellen zuerst mit Propidium Iodid (PI) gefärbt. Eine Annexinfärbung erfolgte erst nach Ablösung der Zellen. Bei diesem Verfahren wurden zwar nekrotische Zellen in der ursprünglichen Zellkultur bei der Messung berücksichtigt, jedoch wurden diejenigen Zellen nicht erfasst, in denen PI evtl. ausgewaschen wurde bzw. die durch Ablösung mit Accutase möglicherweise zusätzlich geschädigt wurden. Diese Zellen würden in diesem Verfahren zusätzlich als „apoptotische Zellen“ interpretiert. Es ist möglich, dass auf Grund dieses Protokolls eine falsch hohe basale Apoptoserate (die in unseren unbehandelten Zellen bei diesem Verfahren mit  $13\pm 2\%$  ermittelt wurde) bestimmt wurde. Allerdings wurde mit Accutase

ein sehr schonendes Verfahren zur Ablösung der Zellen gewählt, um genau diesen Effekt möglichst zu vermeiden. Trotz dieses möglichen Fehlers bei der Bestimmung der basalen Apoptoserate erscheinen die vorgelegten Versuche aussagekräftig, weil erstens in allen Versuchsgruppen das gleiche Protokoll verwendet wurde und zweitens die in dieser Studie verwendete alternative Methode zur Bestimmung der Apoptose (Messung des mitochondrialen Membranpotentials mittels des Farbstoffs JC-1, siehe unten) vergleichbare Ergebnisse erbrachte.

*Verlust des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta\Psi$ ).* Als ein bedeutendes Kennzeichen des apoptotischen Zelltodes wurde der Verlust des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta\Psi$ ) identifiziert (90; 146). Während der Apoptose kann dies, einhergehend mit erhöhter Sauerstoffradikalproduktion und vermehrter Kalziumfreisetzung [ $\text{Ca}^{2+}$ ], dem Auflösen des Zellkerns vorangehen (111). Diese Prozesse führen zu der Aktivierung von Caspasen, einer Familie von cysteinabhängigen, aspartatspezifischen Proteasen, die durch Autoproteolyse oder andere Caspasen aus den inaktiven Procaspasen hervorgehen (42; 186). Vorausgegangene Studien zeigten mittels Durchflusszytometrie, dass sich das Mitochondrienmembranpotential ( $\Delta\Psi$ ) mit fluoreszierenden Farbstoffen darstellen lässt (140; 211). In der vorgelegten Arbeit wurde die Messung von  $\Delta\Psi$  mit dem fluoreszierenden Farbstoff 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanineiodide (JC-1) als ein weiterer Apoptosemarker verwendet. In apoptotischen Zellen wird  $\Delta\Psi$  verringert, was dazu führt, dass JC-1 nicht mehr von Mitochondrien aufgenommen wird. In diesen Zellen bleibt JC-1 im Zytoplasma in Form eines Monomers, wodurch die Zellen eine grüne Fluoreszenz zeigen und somit die apoptotischen Zellen für die FACS-Analyse zugänglich machen.

Wir verwendeten die zwei genannten Methoden, um apoptotische Zellen nachzuweisen und zu quantifizieren. Der Unterschied zwischen den beiden Methoden besteht darin, dass die Annexin V-Färbung eine initiale Apoptose erfasst, weil die Verlagerung von Phosphatidylserin bereits in den frühen Stadien der Apoptose stattfindet, wenn sonst noch keine bzw. nur sehr feine Abweichungen von der normalen Zellmorphologie zu erkennen sind (112; 192; 193; 199).

### **5.3. Diskussion der Ergebnisse**

#### **5.3.1. OxLDL erhöht die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions in Endothelzellen**

Das Endothel kleidet als einzellige Schicht das vaskuläre System, inklusive dem Endokard, luminal aus und kann als das größte endokrine Organ angesehen werden (185). Es ist in der Lage, Veränderungen der Schubspannung oder aus dem Blut stammende Signale zu erkennen und darauf durch Synthese oder Freisetzung von verschiedenen Signalmolekülen zu reagieren (22). Um den normalen funktionellen Zustand des Endothels aufrechtzuerhalten, müssen die Aktivitäten bzw. Funktionen einer einzelnen Endothelzelle mit denen anderer Zellen koordiniert werden. Diese interzelluläre Kommunikation im Endothel kommt u. a. durch Gap Junctions zustande. Gap Junctions stellen eine Membranstruktur an den Kontaktstellen zwischen benachbarten Zellen dar, die das Zytoplasma zweier Nachbarzellen verbinden und für Ionen sowie für Moleküle bis zu einer molekularen Masse von etwa 1,8 kD durchlässig sind. Gap Junctions sind aus gleichwertigen Untereinheiten, den Connexinen aufgebaut. Es ist bekannt, dass Endothelzellen Cx40, 43 und 37 besitzen, während glatte Muskelzellen über Cx40, Cx43 oder Cx45 gekoppelt sind. Endothel- bzw. glatte

Muskelzellen sind über Gap Junctions untereinander sowie, zumindest in kleinen Gefäßen, myoendothelial gekoppelt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene vasoaktive Substanzen die Kommunikation über Gap Junctions beeinflussen können. Kürzlich wurde von unserer Arbeitsgruppe berichtet, dass die Cx37-abhängige Zellkopplung in HUVEC durch Stickstoffmonoxid (NO) gehemmt werden kann (80). Gleichzeitig kommt es zu einer erhöhten Neubildung von Gap Junctions, die mit einer verstärkten Phosphorylierung von Cx40 assoziiert ist. Dabei wird der hemmende Effekt von NO auf die Zell-Zell-Kommunikation via bereits existierende Gap Junctions nicht beeinflusst (68).

Die kardiovaskulären Erkrankungen, wie Hypertonie oder Atherosklerose sind mit einer Veränderung der Expression einzelner Connexine im Gefäßsystem assoziiert. Polymorphismen des humanen Cx37-Proteins sind mit der Entwicklung von atherosklerotischen Plaques assoziiert (12). Es wurde gezeigt, dass während der frühen Stadien der Atherosklerose eine erhöhte Cx43-Expression in atherosklerotischen Schaumzellen auftritt, die allerdings im Laufe der Zeit abnimmt (97; 145). Die Hypercholesterämie-induzierte Atherosklerose ist mit einer erhöhten Expression von Cx43 in Makrophagen assoziiert, während die Connexinexpression in glatten Muskelzellen reduziert ist (97). Aktuelle Studien zeigten, dass oxLDL eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose zukommt (69; 85). Daher stellten wir die Hypothese auf, dass oxLDL die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions beeinflusst, was entsprechend den oben dargestellten Befunden möglicherweise eine pathophysiologische Bedeutung für die Progression der Atherosklerose haben kann. In der Tat konnten wir zeigen, dass oxLDL die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions in Endothelzellen signifikant



verstärkte. In Übereinstimmung mit unseren Befunden wurde eine aktivierende Wirkung von oxLDL auf die Zellkopplung auch in Novikov-Hepatomazellen beobachtet (118; 119; 138). Im Vergleich zu diesen Studien geben unsere Untersuchungen jedoch neue Informationen, da wir den Effekt von oxLDL erstmals in humanen Endothelzellen beschrieben haben. Darüber hinaus ist erwähnenswert, dass Novikov-Hepatomazellen nur Cx43 exprimieren, während HUVEC alle drei vaskulären Connexine Cx43, Cx40 und Cx37 besitzen.

Der Einfluss von oxLDL auf die Zellkopplung war dosiabhängig. Eine signifikante Steigerung der Zell-Zell-Kommunikation zeigte sich nur bei den Konzentrationen von 15 bzw. 26  $\mu\text{g/ml}$ , während eine höhere oxLDL-Konzentration (100 $\mu\text{g/ml}$ ) zu einer signifikanten Abnahme der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions führte. Es wäre somit denkbar, dass es sich hier um zwei unterschiedliche oxLDL-abhängige Mechanismen handelt, welche die Zell-Zell-Kommunikation auf verschiedene Weise steuern. Denkbar wäre ein Hemmeffekt von freien Radikalen bei einer höheren oxLDL Konzentration. Es wurde bereits gezeigt, dass oxLDL die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) stimuliert (52). Aufgrund der Angaben in der Literatur, die eine ROS-induzierte Hemmung der Zellkopplung in Epithelzellen beschrieben (107), wäre es denkbar, dass die verwendete Standardmenge von SOD bei der Erhöhung der oxLDL-Konzentration bis 100 $\mu\text{g/ml}$  nicht mehr ausreicht und keine effiziente antioxidative Wirkung hat. Eine damit assoziierte Erhöhung der ROS-Freisetzung würde die Zellkopplung hemmen. Wir konnten jedoch zeigen, dass, im Gegensatz zu den Befunden an Epithelzellen, die antioxidative Behandlung der Zellen mit SOD deren Kommunikation nicht verstärkt, sondern sogar hemmt. Diese Beobachtung deutet auf einen aktivierenden Effekt freier Sauerstoffradikale bei der Zell-Zell-Kommunikation

im Endothel hin und kann daher den überraschenden Effekt der höheren oxLDL-Konzentration nicht erklären. Im Rahmen dieser Studie haben wir uns auf die aktivierende Wirkung von geringeren und vermutlich „physiologischen“ Konzentration von oxLDL (26µg/ml) auf die Zellkommunikation fokussiert.

### **5.3.2. Mechanismen der oxLDL-induzierten Erhöhung der Zellkopplung**

Um aufzuklären, welche Mechanismen der oxLDL-induzierten Verstärkung der interzellulären Kommunikation von Endothelzellen zugrunde liegen bzw. welche Signalwege diesen Effekt triggern, wurde der Einfluss von oxLDL auf die zellulären Signalkaskaden untersucht. Es wurde bereits demonstriert, dass die Erhöhung des sekundären Botenstoffs cAMP zu einer Aktivierung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions führen kann (82; 101; 164; 183). Diesen Befund konnten wir bestätigen, da in unseren Experimenten die Adenylatcyclase mit Forskolin aktiviert war. Das Enzym Adenylatcyclase katalysiert in der Zelle die Bildung von cAMP aus ATP. Ausgehend von diesen Befunden stellten wir uns die Frage, ob es sich bei der oxLDL-induzierten Erhöhung in der Endothelzellkopplung ebenfalls um einen cAMP-abhängigen Mechanismus handelte. Ähnlich wie Forskolin zeigte die Behandlung von HUVEC mit oxLDL einen klaren aktivierenden Effekt auf die Zell-Zell-Kommunikation. Die Gabe des PKA-Inhibitor H89 zu den Endothelzellen hob sowohl den aktivierenden Effekt von Forskolin als auch den von oxLDL auf die Zellkopplung auf. Dieses Ergebnis stützt die eingangs formulierte Hypothese, dass die oxLDL-induzierte Erhöhung der Zell-Zell-Kommunikation von Endothelzellen über einen cAMP/PKA-abhängigen Signaltransduktionsweg moduliert wird. Das stimmt mit den Befunden von *Paulson et al* überein, die eine bedeutende Rolle des cAMP/PKA-

abhängigen Mechanismus bei der LDL-getriggerten Zell-Zell-Kommunikation in Novikov–Hepatomazellen zeigten (138).

Nun stellte sich die Frage, über welche Mechanismen cAMP eine Aktivierung der Zell-Zell-Kommunikation vermittelt. Es sind mehrere Mechanismen denkbar, die zum Anstieg der Zellkommunikation über Gap Junctions führen könnten. Eine Möglichkeit ist, dass die Anzahl der Kanäle in der Zellmembran durch oxLDL erhöht wird. Einige Arbeiten aus der Literatur haben bereits über eine Verbindung zwischen der Aktivierung von cAMP, einer vermehrten Cx43-Expression und der erhöhten interzellulären Kommunikation in verschiedenen Zellen berichtet (31; 116; 171). Im Gegensatz dazu konnten wir immunhistochemisch keine deutlichen Unterschiede in der Cx37- und Cx43-Membranexpression zwischen Forskolin- bzw. oxLDL-behandelten HUVEC im Vergleich zu jeweiligen Kontrollen feststellen. Dieser Befund sollte jedoch lediglich als ein Hinweis interpretiert werden, da die immunhistochemische Färbung nur wesentliche Veränderungen des Expressionsmusters zuverlässig erfasst und eventuelle feine Unterschiede nicht zeigt. Unsere Ergebnisse wurden durch Befunde von anderen Arbeitsgruppen unterstützt, die eine cAMP-induzierte Aktivierung der Zellkopplung, jedoch keine damit assoziierte Erhöhung in der Cx43 Expression in der Zellmembran nachgewiesen haben (3; 115). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die oxLDL-induzierte Aktivierung der Zellkopplung offensichtlich nicht durch die Erhöhung der Anzahl von den aus Connexinen 37 und 43 gebildeten Kanälen in der Zellmembran vermittelt wird. Es ist eher wahrscheinlich, dass die Modifizierung der Connexine infolge von Phosphorylierung durch Proteinkinasen die Aktivität der Gap Junctions beeinflusst. Unsere Arbeitsgruppe hat bereits berichtet, dass die durch NO aktivierte Zellkommunikation in HUVEC mit einer verstärkten Phosphorylierung von Cx40

assoziiert ist. Dieser Prozess ist cAMP/PKA abhängig und führt zu einer erhöhten Neubildung von Gap Junctions (68). Die posttranslationale Phosphorylierung scheint sowohl für die Aggregation der Connexinmoleküle zu einem Proteinkanal, für die Kanalpermeabilität als auch für die Stabilität des Connexinmoleküls von Bedeutung zu sein (121; 122). Es konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der posttranslationalen Modifizierung Cx43 an mindestens zwei Stellen und Cx37 an einer Stelle phosphoryliert werden kann (190). So wurde an diversen Zellpopulationen bereits demonstriert, dass PKA bei der Phosphorylierung der Connexine eine Rolle spielt, wodurch die Zellkommunikation beeinflusst wird. Basierend auf diesen Berichten wäre es denkbar, dass der cAMP/PKA-abhängige Effekt von oxLDL auf die Zellkommunikation in HUVEC durch die Phosphorylierung von vaskulären Connexinen zustande kommt.

Um zu überprüfen, ob der Effekt von oxLDL (26 µg/ml), durch seinen funktionell wichtigen Bestandteil Lysophosphatidsäure (LPA) ausgelöst wurde, wurden Endothelzellen mit LPA in den Konzentrationen 1 µM bzw. 10 µM inkubiert. Es wurde festgestellt, dass beide LPA-Konzentrationen einen erheblichen Anstieg der Zellkopplung induzierten. Die Wirkungen von oxLDL scheinen dennoch nicht auf LPA zurück zu führen zu sein, da die Vorbehandlung der Zellen mit dem LPA-Blocker L-NASPA zwar den verstärkenden Effekt von LPA auf die Zell-Zell-Kommunikation nahezu vollständig beseitigte, aber keine Wirkung auf den oxLDL-induzierten Anstieg der Zellkopplung zeigte. Überraschenderweise zeigte die größere Konzentration von LPA (10 µM) eine schwächere Reaktion auf die Zell-Zell-Kommunikation im Vergleich zu der kleineren Konzentration (1 µM). Eine statistische Analyse zeigte aber keinen signifikanten Unterschied zwischen der Reaktion der Zellen auf 1 µM LPA und 10 µM

LPA. Der in der Abbildung 14 erkennbare Unterschied der Mediane zwischen diesen Gruppen ist durch zwei „Extremwerte“ in der 1µM-Gruppe bedingt.

Um die Frage zu beantworten, über welche zellulären Signalkaskaden oxLDL cAMP erhöht, haben wir die Hypothese aufgestellt, dass es hier um einen durch **Cyclooxygenase (COX)** gesteuerten Prozess handelt. Cyclooxygenase (Prostaglandin-H-Synthase) ist das Schlüsselenzym, welches die Synthese von Prostaglandinen reguliert (137; 196). Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), das Hauptprodukt der COX im Endothel übt vielfältige Wirkungen im vaskulären System, wie z.B. die Regulation des Gefäßtonus, Beteiligung an der Thrombozytenhemmung und die Induktion der Entzündungsreaktion aus (182; 196). Einige Publikationen aus der Literatur demonstrierten, dass oxLDL zu einem signifikanten Anstieg in der PGI<sub>2</sub> Produktion führt (123; 181), was durch die Hemmung der COX aufgehoben werden kann. Im Gegensatz dazu zeigten andere Studien, dass oxLDL in der Lage ist, die Produktion von PGI<sub>2</sub> zu hemmen (123). Allerdings handelte es sich dabei meistens um die längeren Inkubationszeiten (48-72 Stunden). Um die Rolle der COX bei der oxLDL-induzierten Erhöhung der Zellkommunikation über Gap Junctions zu überprüfen wurden die Zellen mit oxLDL in der Kombination mit Indometacin, dem Hemmstoff der COX inkubiert. Tatsächlich wurde durch die Behandlung mit Indometacin die aktivierende Wirkung von oxLDL auf die Zell-Zell-Kommunikation vollständig aufgehoben.

In der Literatur wird diskutiert, dass die gesteigerte Bildung von PGI<sub>2</sub> in glatten Gefäßmuskelzellen gefolgt von der Aktivierung von Prostaglandin-Rezeptoren zur Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels sowie zur Aktivierung des cAMP/PKA-vermittelten Signaltransduktionsweges führen kann (6; 150). Prostacyclin (172) übt seine physiologische Wirkung über spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

(GPCR, die IP-Rezeptoren) aus, die in der Plasmamembran lokalisiert sind. Im vaskulären System kommt es nach der Bindung an den IP-Rezeptor zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase. Diese setzt ATP zu cAMP um und erhöht so die intrazelluläre cAMP-Konzentration (135). Anschließend kommt es zu einer Aktivierung des PKA-Signaltransduktionsweges, was zu einer Erhöhung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions potentiell führen könnte. Obwohl diese Ergebnisse die Beteiligung der COX in der oxLDL-induzierten Erhöhung der Zell-Zell-Kommunikation demonstrierten, haben wir eine damit assoziierte Freisetzung von Prostacyclin bzw. eine Erhöhung der cAMP-Konzentration nicht direkt gezeigt. Es ist also nicht möglich anhand dieser Daten auszuschließen, dass auch andere COX-Produkte in diesen Prozess involviert sein können.

Der erste Teil dieser Arbeit lässt sich wie folgt zusammenfassen: 1) oxLDL induziert eine signifikante Steigerung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions in HUVEC; 2) Dieser Effekt ist dosisabhängig und zeigt sich nur bei Konzentrationen von 15µg/ml und 26µg/ml; 3) Die Wirkung von oxLDL auf die Endothelzellkommunikation wird durch einen cAMP/PKA-abhängigen Mechanismus und möglicherweise durch Protacyclinfreisetzung vermittelt; 4) Die oxLDL-induzierte Erhöhung der Zellkommunikation scheint keinen ausgeprägten Einfluss auf die Expression von Connexin 37 und 43 in der Zellmembran zu haben;

Diese Ergebnisse ließen jedoch die Frage offen, welche funktionellen Konsequenzen die oxLDL-induzierte Erhöhung der Zell-Zell-Kommunikation im Endothel haben könnte. In Hinsicht auf die prominente Rolle von oxLDL sowohl bei der Manifestation bzw. Progression der Atherosklerose als auch bei der Induktion der Apoptose in atherosklerotischen Plaques (1; 96; 127; 166) haben wir die Hypothese aufgestellt, dass

proapoptotische Signale nach der oxLDL-Stimulation durch erhöhte Zell-Zell-Kommunikation von bereits apoptotischen Zellen in intakte Zellen gelangen können und so zu verstärkter endothelialer Apoptose führen könnten.

### **5.3.3. OxLDL induziert Apoptose in HUVEC**

In dieser Versuchsreihe wurde die Zellinkubationszeit mit oxLDL auf 24 Stunden beschränkt. Damit handelte es sich nicht mehr um ausgesprochene Kurzeffekte, aber es ist offensichtlich, dass chronische Effekte auf diese Weise noch nicht erfasst werden können. Nach der Inkubation der HUVEC sowohl mit 26 µg/ml als auch mit 100 µg/ml oxLDL wurde ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate beobachtet. In der Konzentration 100 µg/ml induzierte oxLDL eine höhere Apoptoserate als in der Konzentration 26 µg/ml. Dieses Ergebnis hat eine gewisse Korrelation mit klinischen Befunden, die zeigen, dass höhere Cholesterinkonzentrationen im Blut größere atherosklerotische Veränderungen in der Gefäßwand verursachen (43). Ein kontroverser Befund ist, dass die Erhöhung der oxLDL-Konzentration bis 100 µg/ml zwar die Apoptoserate erhöhte, jedoch die Zell-Zell-Kommunikation bei der hohen Konzentration im Endothel nicht steigerte, sondern hemmte. Als Erklärung denkbar wären zwei unterschiedliche oxLDL-abhängige Signalwege der Apoptoseinduktion in Endothelzellen, die eine unterschiedliche Dosisabhängigkeit zeigen. Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass in Connexin-transfizierten HeLa-Zellen eine erhöhte Apoptoserate nicht bei einer Konzentration von 100 µg/ml, sondern nur bei 26 µg/ml registriert wurde. Darüber hinaus löst gerade diese Konzentration (26µg/ml) eine Steigerung der Zellkopplung in HUVEC aus. Diese Divergenz zwischen Befunden in HUVEC und HeLa-Zellen könnte sowohl durch die bereits oben im Detail beschriebene

unterschiedliche Ausstattung mit Connexinen in den beiden Zelltypen als auch durch mögliche funktionelle Unterschiede zwischen Endothelzellen (HUVEC) und Tumorzellen (HeLa) erklärt werden.

Mechanismen über die oxLDL endotheliale Apoptose induziert bleiben noch unzureichend geklärt. Bislang wurde gezeigt, dass oxLDL eine toxische Wirkung auf Zellen ausübt und dadurch die Apoptose in verschiedenen Zelltypen auslöst (9; 37; 46; 117; 148). Die toxischen Effekte von oxLDL werden in der Literatur auf die Wirkung der oxidierten Lipide, Bestandteilen von oxLDL, wie z. B. Aldehyde, Oxysterole, Lipidperoxide zurückgeführt (67; 130). Die individuelle Rolle von diesen Komponenten in der oxLDL-induzierten Toxizität ist jedoch unklar. Nach dem initialen Kontakt mit den Zellen aktiviert oxLDL eine ganze Reihe von Signalmechanismen, die potentiell in die Apoptoseinduktion involviert sein können. Es wurde bereits gezeigt, dass dabei die Caspasenaktivierung (64; 128; 200; 208), Veränderungen der Kalzium-Homeostase (46; 129), die Akkumulation von Ceramid (45; 64), die Deaktivierung von NF-kappaB (15), und schließlich eine Erhöhung der p53-Expression (84; 114; 201) eine Rolle spielen. Darüber hinaus wurde berichtet, dass einige Proteinkinasen, wie Tyrosinkinase, Proteinkinase A und Proteinkinase C durch oxLDL aktiviert werden können (59; 105) und dass die Hemmung dieser Proteinkinasen in der Lage ist, das Ausmaß der Apoptose zu vermindern (41; 81; 105; 170). Einige Studien deuten darauf hin, dass der Fas-Rezeptor, der durch den entsprechenden Liganden, Fas-Ligand, aktiviert wird, ebenfalls bei der oxLDL-induzierten Apoptose eine Rolle spielt (167; 168). Dabei kommt es zu einer sowohl Fas- als auch Fas-Ligand-Überexpression (105; 128). Im Gegensatz dazu reduzierte eine Blockade des Fas-Liganden die oxLDL-induzierte Apoptose (103). In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass die Zell-Zell-Kommunikation über Gap



Junctions eine Rolle bei der Apoptoseinduktion spielt. Es wäre denkbar, dass eine Apoptose in intakten Zellen durch Transfer von proapoptotischen Signalmolekülen von bereits apoptotischen Zellen via funktionelle Gap Junctions getriggert werden kann.

#### **5.3.4. Das Ausmaß der Apoptose in HeLa-Zellen ist Connexin-abhängig**

Wie im ersten Teil der Arbeit bereits beschrieben, erhöht die Stimulation mit oxLDL die Zell-Zell-Kommunikation in Endothelzellen. Im Zusammenhang mit den Befunden, dass eine oxLDL-Stimulation zur Apoptose in Endothelzellen führt, ergibt sich die Frage ob die zelluläre Kopplung über Gap Junctions, bzw. die Präsenz von Connexinen in die Pathomechanismen der oxLDL-getriggerten endothelialen Apoptose involviert sind. Um die Rolle von einzelnen vaskulären Connexinen bei der Apoptoseinduktion zu analysieren, wurden mit Cx37, Cx40 bzw. Cx43 transfizierte HeLa-Zellen verwendet (44). Die Zellen wurden jeweils mit oxLDL sowie zwei etablierten Apoptoseinduktoren, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Streptonigrin vorbehandelt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Apoptose in den Cx43-positiven Zellen am stärksten ausgeprägt war, gefolgt von den Cx40-positiven Zellen. Im Gegensatz dazu war das Ausmaß der Apoptose in den Cx37-exprimierenden Zellen signifikant geringer als in den Cx43 bzw. Cx40-positiven Zellen. Nahezu keine Apoptosezeichen wurden in der Abwesenheit von Connexinen in Wildtyp-HeLa-Zellen unter den gleichen experimentellen Bedingungen registriert. Diese Befunde weisen auf eine potentielle Rolle von Connexinen bei der Apoptose hin. Es wäre denkbar, dass alleinige Transfektion von Connexinen zur Erhöhung der Apoptoserate führen kann. Diese Möglichkeit konnte jedoch ausgeschlossen werden, da wir bereits zwischen Cx37-, Cx40- und Cx43-transfizierten Zellen signifikante Unterschiede in der Apoptoserate festgestellt haben. Dies ließ vermuten, dass nicht die Transfektion,

sondern die Anwesenheit von bestimmten Connexinen bei der Apoptoseinduktion eine Rolle spielt. Darüber hinaus haben wir auf Puromycin, ein bei der Kultivierung transfizierter HeLa-Zellen verwendetes Selektionsmittel in unseren Versuchen verzichtet. Für alle HeLa-Zellen wurde Wildtyp-Medium verwendet, um eine mögliche proapoptotische Wirkung von Puromycin auf transfizierte Zellen zu vermeiden und die gleichen experimentellen Bedingungen in allen Versuchsgruppen zu gewährleisten. Interessant ist auch unsere Beobachtung, dass diese Connexin-Abhängigkeit der Apoptoseentwicklung in HeLa-Zellen mit deren Fähigkeit zur interzellulären Kommunikation über Gap Junctions korreliert. In der Tat demonstrieren die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe sowie die Daten aus der Literatur, dass HeLa-Zellen, ähnlich wie HUVEC, die Fähigkeit zur interzellulären Kommunikation über Gap Junctions besitzen. Sowohl Cx37-, Cx40- als auch Cx43-positive HeLa-Zellen sind für die Fluoreszenzfarbstoffe durchlässig. Interessant, dass auch in diesen Experimenten das Ausmaß der Kopplung zwischen Cx43-, Cx40 bzw. C37-positiven Zellen unterschiedlich ausgeprägt war. Die Cx43-transfizierten HeLa-Zellen zeigen den höchsten Kommunikationsgrad, während die Kopplung von Cx40-transfizierten Zellen geringer war (30; 189). Übereinstimmend mit unseren Daten zur Apoptoseinduktion wiesen Cx37- HeLa-Zellen nur einen minimalen Farbstofftransfer über Gap Junctions auf (80). Eine potentielle Erklärung könnten die Ergebnisse von *Harris et al* liefern, die berichteten, dass der Porendurchmesser bei homotypischen Gap Junction-Kanälen die folgende Reihenfolge aufweist: Connexin43 > Connexin40 > Connexin37 (65).

Da die in unserer Studie verwendeten proapoptotischen Substanzen zu einem leichten Anstieg der Apoptose führten, wurde im nächsten Abschnitt überprüft, ob diese Effekte auch nach einer stärkeren Simulation (die auch pathophysiologisch vorkommt)

reproduzierbar sind. Hierfür wurden die Zellen mit einer höheren Konzentration von Streptonigrin stimuliert. Da sich die maximale Zell-Zell-Kommunikation bei den Cx43-transfizierten HeLa-Zellen zeigte (30; 65; 189) und Cx43 eine besonders wichtige Rolle bei der atherosklerotischen Entwicklung in der Gefäßwand spielt (11; 143), wurden in dieser Versuchsserie nur Cx43-transfizierte HeLa-Zellen untersucht. Die Behandlung der Zellen mit Streptonigrin in verschiedenen Konzentrationen (1µM, 10µM, 100µM) führte zu einem klaren Unterschied in der Apoptoserate zwischen den Cx43- und Wildtyp-HeLa-Zellen. Die Cx43-transfizierten Zellen wiesen signifikant mehr Apoptose auf als die Connexin-defizienten Wildtyp-Zellen, was die oben beschriebenen Befunde bestätigt. Auch in Granulosa-Zellen wurde beobachtet, dass sowohl die erhöhte Cx43-Expression als auch eine verstärkte interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions zu einem vermehrten Zelltod durch Apoptose führt und dass die Apoptoseinduktion durch eine Blockade der Zellkommunikation vermindert wird (93). Erwähnenswert ist, dass eine Steigerung der Apoptose in Cx43-HeLa-Zellen wahrscheinlich durch Dephosphorylierung des Cx43-Proteins zustande kommt (72). Daraus lässt sich schließen, dass die Induktion der Apoptose in HeLa-Zellen connexinabhängig ist und durch die Connexine 43, 40 und 37 in unterschiedlichem Ausmaß unterstützt wird (Cx43 > Cx40 > Cx37). Nun stellt sich die Frage, ob die Apoptose allein durch Anwesenheit bzw. Expression der Connexine getriggert wird oder auch die Kopplung mit Nachbarzellen dabei eine Rolle spielt.

### **5.3.5. Die Rolle der Zell-Zell Kommunikation für die Apoptoseinduktion**

Um die Bedeutung der Zell-Zell-Kommunikation für die Apoptoseinduktion zu untersuchen, wurden mit Cx43-transfizierte HeLa-Zellen verwendet. Hierbei wurde ein

anderes experimentelles Setup gewählt, in dem Connexin-exprimierende Zellen daran gehindert wurden, Zellkontakte miteinander zu bilden. Dieser Versuchsaufbau sollte es ermöglichen, den Effekt der Connexine von dem der Zell-Zell-Kommunikation über funktionelle Gap Junctions zu trennen. Cx43-transfizierte HeLa-Zellen wurden in die Zellsuspension gebracht und ständig langsam geschüttelt. In Suspension haben die Zellen keinen ständigen unmittelbaren Kontakt zu den Nachbarzellen und dabei auch keine Kopplung über Gap Junctions. Um Apoptose zu induzieren, wurde die Suspension aus Cx43-HeLa-Zellen für jeweils 3, 6, 9, 12 und 36 Stunden mit Streptonigrin inkubiert. Zur Kontrolle wurden adhärenente Kulturen von Cx43-HeLa-Zellen für 3 Stunden nach dem gleichen Protokoll behandelt. Überraschenderweise konnten wir feststellen, dass die adhärenenten Zellen eine deutlich schnellere Manifestation der Apoptose im Vergleich zu den Zellen in der Suspension aufweisen. So erreichten die Zellen in der Suspension erst nach 12 Stunden das Apoptoseniveau, welches in adhärenenten Zellen bereits 3 Stunden nach der Inkubation detektiert wurde.

Sowohl adhärenente Zellen als auch die Zellen in Suspension exprimierten Connexin43. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Zellpopulationen bestand also darin, dass adhärenente Zellen Kontakte mit Nachbarzellen besaßen, während die Zellen in der Suspension voneinander getrennt waren. Dieses Ergebnis zeigt, dass den Zell-Zell-Kontakten über Gap Junctions eine wichtige modelierende Rolle bei der Apoptoseinduktion zukommt. Hervorzuheben ist, dass auch ohne Zellkopplung – wenn auch verspätet - eine Apoptose auftritt. Die Zellkopplung beschleunigt und verstärkt die Apoptose, ist aber keine unabdingbare Voraussetzung. Es lässt sich vermuten, dass die Zell-Zell-Verbindungen über Gap Junctions einen Transfer von proapoptotischen

Signalen ermöglichen, die von bereits apoptotischen Zellen in intakte Zellen gelangen und dabei die Apoptoserate erhöhen.

Einige Studien aus der Literatur berichteten, dass Zellen in einem Zellcluster deutlich empfindlicher für die Apoptoseinduktion im Vergleich zu Einzelzellen sind (28; 92). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Blockade von Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions in der Lage ist, die Apoptose zu reduzieren (93; 133; 191). Der Gesichtspunkt, dass Gap Junctions eine wichtige Rolle bei der Leitung von proapoptotischen Signalen spielen, konnten wir in einer zusätzlichen Versuchsserie bestätigen. Hierfür wurde im konfluenten Monolayer von Cx43-transfizierten Zellen Apoptose induziert. Auf diese Schicht mit apoptotischen Zellen wurden jeweils Cx43 bzw. Wildtyp-HeLa-Zellen aufgetragen. Die aufgetragenen Zellen wurden nach 3 Stunden apoptotisch, wenn sie Cx43-positiv waren und somit die Fähigkeit besaßen, funktionelle Gap Junctions *de novo* zu bilden. Die Funktionsfähigkeit der neugebildeten Gap Junctions wurde unter den selben experimentellen Bedingungen von *Hoffmann et al* in unserem Labor mittels der Dye-Transfer-Methode bereits nachgewiesen (68). Die aufgetragenen Connexin-defizienten Zellen können jedoch keine neuen Gap Junctions mit der apoptotischen Zellpopulation bilden und wiesen, als Folge, eine geringere Apoptoserate auf. Dieses Ergebnis deutet wiederum auf die potentielle Fähigkeit von Gap Junctions, proapoptotische Signale interzellulär zu vermitteln. Um zu untersuchen, ob die Apoptosesignale ausschließlich durch neugebildete Gap Junctions und nicht durch Halbkanäle (Connexone) transportiert werden, wurden zusätzliche Experimente durchgeführt. Wildtyp-HeLa-Zellen und HeLa-Cx43-Zellen wurden mit dem Medium von apoptotischen Zellen inkubiert. Sollten proapoptotische Signalmoleküle durch offene Halbkanäle gehen, könnten diese von apoptotischen Zellen in das Medium

freigesetzt werden. Durch den selben Weg könnten gesunde Zellen diese Signale dann aus dem Medium von apoptotischen Zellen empfangen. Nach 3 Stunden Inkubation konnten wir jedoch keine Unterschiede in der Apoptoserate zwischen sowohl Wildtyp-HeLa-Zellen als auch Cx43-HeLa-Zellen im Vergleich zu jeweiligen Kontrollen feststellen. Daraus kann man schließen, dass proapoptotische Signalmoleküle ausschließlich über Gap Junctions in Nachbarzellen gelangen und nicht durch Connexone auf dem Umweg über den Extrazellulärraum.

Es bleibt noch weitgehend unklar, welche proapoptotischen Signale über Gap Junctions weitergeleitet werden können. Die bereits definierte Größe der Kanäle stellt jedoch ein Limit dar, weil nur bis 1,8 kD große Moleküle durch Gap Junctions weitergeleitet werden können. Die bekannten Apoptoseinduktoren wie z.B. Caspasen oder Zytocrom C können jedoch wegen ihrer Molekülgröße die Gap Junctions nicht durchdringen. In Frage kämen solche Moleküle wie z.B. cAMP, cGMP, IP3 oder Kalzium; die Kenntnisse darüber sind jedoch bislang sehr gering. Sicherlich werden Untersuchungen zu den über Gap Junctions transportierten Signalmolekülen bzw. von diesen getriggerte Apoptosekaskaden ein spannendes Feld für nachfolgende Studien darstellen.

Erwähnenswert ist auch eine derzeit intensiv diskutierte Hypothese, dass cAMP, welches, wie oben beschrieben, die oxLDL-induzierte Erhöhung der Zell-Zell-Kommunikation mediiert, auch in die Apoptoseinduktion involviert ist (106; 109; 203). Diese Möglichkeit bleibt jedoch umstritten. Einige Studien berichten, dass cAMP eine antiapoptotische und somit protektive Wirkung in verschiedenen Zelltypen ausübt (124; 188).

Um die Rolle der oxLDL-induzierten Erhöhung der Zell-Zell-Kommunikation für die Induktion der Apoptose nachzuweisen, wurde in unserer Studie folgender

Versuchsansatz unternommen. Durch oxLDL wurde in Endothelzellen Apoptose induziert, nachdem diese bereits mit einem Gap Junction-Blocker vorbehandelt waren. Wir konnten zwar Gap Junctions mittels der etablierten Gap Junction-Blocker  $\alpha$ -GA (Glycyrrhethinic acid) und Heptanol blockieren, jedoch induzierten diese Inhibitoren selbst eine hohe Apoptoserate in Endothelzellen nach 24h, was eine Differenzierung zwischen den Effekten von Gap Junction-Blockade auf Apoptose und proapoptotischer Wirkung der Blocker praktisch unmöglich machte (die Daten sind nicht gezeigt).

Die von uns beobachtete initiiierende Wirkung einiger Connexine auf die Apoptose wird von Untersuchungen in anderen Zellsystemen bestätigt (93; 133; 191). Allerdings muss betont werden, dass auch über eine Connexin-assoziierte Hemmung der Apoptose in verschiedenen Zelltypen berichtet wurde (125; 126; 134; 144). Diese Divergenz der Befunde könnte durch Unterschiede zwischen verwendeten Zellen bzw. Spezies, zwischen Apoptoseinduktoren sowie durch eine jeweils unterschiedliche Connexinexpression erklärt werden. Jedenfalls deutet es darauf hin, dass der Zusammenhang zwischen Zellkommunikation über Gap Junctions und Verstärkung der Apoptose kein generelles Prinzip ist und daher eine Übertragung von Befunden an HeLa-Zellen auf Endothelzellen in unseren Experimenten nicht direkt möglich ist. Der zweite Abschnitt der Studie lässt sich daher wie folgt zusammenfassen: 1) oxLDL induziert Apoptose in HUVEC; 2) Die Induktion der Apoptose bzw. deren Zeitverlauf in HeLa-Zellen ist Connexin-abhängig und wird von Connexinen 43, 40 und 37 im unterschiedlichen Ausmaß ( $Cx43 > Cx40 > Cx37$ ) beeinflusst; 3) Die Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions spielt eine wichtige modulierende Rolle bei der Apoptoseinduktion; 4) Dieser Prozess wird möglicherweise durch Transfer von

proapoptischen Signalmolekülen via funktionelle Gap Junctions von bereits apoptotischen Zellen in intakte Zellen getriggert.



## 6. SCHLUSSFOLGERUNG

Seit Jahrzehnten steht die Atherosklerose als ein relevantes klinisches Problem im Mittelpunkt der medizinischen Forschung. Es gilt derzeit als bewiesen, dass eine lokale und chronische Entzündung der arteriellen Gefäßwand ein zentraler pathogenetischer Aspekt der Atherosklerose ist. Trotz der in den letzten Jahren erreichten signifikanten Fortschritte in diesem Forschungsbereich, bleiben viele Fragen nach wie vor offen. Eine davon stellt den Zusammenhang zwischen der Hyperlipoproteinämie und der Integrität bzw. der Kommunikation von Endothelzellen dar, deren Dysbalance unausweichlich zum Fortschreiten der Atherosklerose führt. Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf der Analyse des Einflusses von oxLDL auf die endotheliale Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions sowie auf den Untersuchungen zur Rolle der Zellkopplung, insbesondere einzelner Connexine, bei der Induktion der Apoptose. Wir konnten zeigen, dass oxLDL die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions in Endothelzellen signifikant erhöht und dass dieser Effekt durch einen cAMP/PKA-abhängigen Mechanismus vermittelt wird. Darüber hinaus ist es uns erstmals gelungen, die Bedeutung der Gap Junction-vermittelten Zell-Zell-Kommunikation auf die oxLDL-induzierte Apoptose zu beziehen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl die Progression als auch das Ausmaß der Apoptose vom funktionellen Zustand der Zell-Zell-Kontakte und deren Ausstattung mit Connexinen entscheidend beeinflusst wird. Die Studie öffnet jedoch eine ganze Reihe von spannenden Fragen, die Ausgangspunkt für die weiterhin geplanten Experimente darstellen. Insbesondere ist interessant, welche proapoptischen Moleküle bzw. Signale über Gap Junctions weitergeleitet werden und welche Mechanismen der Konzentrationsabhängigkeit des oxLDL-Effekts auf die Zell-Zell-Kommunikation (niedrige Konzentrationen wirken stimulierend, höhere hemmend)

zugrunde liegen. Darüber hinaus ist interessant zu überprüfen, ob und inwiefern die Rolle der einzelnen Connexine bei der Induktion der Apoptose redundant ist. Ein weiteres Ziel wäre es, in tierexperimentellen Modellen die Atherosklerose zu analysieren, inwiefern die in dieser Arbeit beschriebenen Mechanismen auch unter den *In-Vivo*-Bedingungen bei den oxLDL-assoziierten Gefäß/Endothelschäden eine Rolle spielen.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Vaskuläre Erkrankungen sind als Ursache für Mortalität und Morbidität führend in westlichen Industrieländern. Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass oxLDL eine herausragende Rolle bei der Atheroskleroseinduktion bzw. -progression zukommt. Die initiale Wirkung von im Blut zirkulierendem oxLDL findet auf der Ebene der Interaktion mit dem vaskulären Endothel statt und resultiert in der endothelialen Dysfunktion. Da die Zellfunktion durch die Integrität der Endothelzellschicht bzw. deren interzelluläre Kommunikation mitbestimmt ist, wäre es denkbar, dass für die oxLDL-induzierten Veränderungen im Endothel u. a. die Beeinflussung der Zell-Zell-Kommunikation via Gap Junctions eine Rolle spielt. Bislang war jedoch wenig darüber bekannt, welchen Einfluss oxLDL auf die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions in Endothelzellen ausübt. Außerdem war es nicht geklärt, inwiefern diese Veränderungen in der Zell-Zell-Kommunikation die Induktion und den Schweregrad der oxLDL-induzierten Apoptose beeinflussen. Ziele der Studie waren daher i) zu analysieren, ob und über welche Mechanismen oxLDL einen Einfluss auf die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions in Endothelzellen ausübt, ii) zu untersuchen, welche Bedeutung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions bzw. einzelnen Connexinen bei der Induktion der Apoptose zukommt. Mittels der Dye-Transfer-Methode nach Farbstoffinjektion in eine einzelne Zelle konnten wir zeigen, dass oxLDL eine signifikante Steigerung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions in HUVEC induziert. Dieser Effekt ist dosisabhängig: er zeigte sich nur bei geringen oxLDL-Konzentrationen (15 bzw. 26 µg/ml) und wurde bei weiterer Erhöhung der Konzentration bis auf 100 µg/ml wiederum aufgehoben. Die durch oxLDL verstärkte Zell-Zell-Kommunikation wurde in Endothelzellen durch einen cAMP/PKA-

abhängigen Mechanismus vermittelt, wobei die cAMP-Freisetzung durch ein Cyclooxygenaseprodukt, wahrscheinlich Prostacyclin, getriggert wurde. Mittels immunhistochemischer Färbungen für Cx37 und Cx43 konnten wir nicht bestätigen, dass die oxLDL-induzierte Verstärkung der Zell-Zell-Kommunikation infolge einer Hochregulation der Connexin-Expression auftritt. Im zweiten Teil der Studie wurde der Einfluss von oxLDL auf die Apoptoseinduktion analysiert. Die Apoptose wurde mittels der Annexin V - Propidium Iodid Färbung bzw. durch Nachweis des Mitochondrienmembranpotentials durchflusszytometrisch erfasst. OxLDL verursachte einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate in HUVEC. Zur Aufklärung der Rolle bestimmter Connexine wurden weitere Experimenten in Cx-transfizierten HeLa-Zellen durchgeführt. In diesen Zellen erhöhen einzelne Connexine die Apoptoserate in unterschiedlichem Ausmaß: Cx43 > Cx40 > Cx37. Um zu prüfen, ob die bloße Anwesenheit der Connexine dafür von Bedeutung war oder ob von Connexinen gebildete Gap Junctions dafür von Bedeutung waren, wurden weitere Experimente durchgeführt. Dafür wurden in einem neuen Versuchsansatz Zellen in Suspension (keine Zell-Zell-Kontakte) sowie adhärenente Zellen im Monolayer (bestehende Zell-Zell-Kontakte) einer proapoptotischen Stimulation durch Streptonigrin unterzogen. Die Zellen in Suspension wiesen erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt apoptotische Veränderungen auf. Das deutet auf eine Beteiligung der Gap Junctions bei der Apoptoseinduktion hin. Diese Interpretation wurde durch Befunde einer weiteren Versuchsreihe bestätigt. Bei Inkubation von apoptotischen Cx43-positiven Zellen mit intakten Zellen wurde die Apoptoserate der Letzteren nur dann signifikant erhöht, wenn diese ebenfalls Connexin 43 exprimierten und funktionelle Gap Junctions mit den bereits apoptotischen Zellen *de novo* bilden konnten. Somit demonstriert diese Arbeit,

dass Gap Junctions eine wichtige Rolle bei der Apoptoseinduktion spielen. In nachfolgenden Studien soll in Atherosklerose-Modellen überprüft werden, ob und inwiefern die hier beschriebenen Mechanismen auch unter den *In-Vivo*-Bedingungen bei den oxLDL-assoziierten Gefäß/Endothelschäden eine Rolle spielen.

## 8. ABKÜRZUNGEN

μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CMTMR	(5-(and-6)-(((4-chloromethyl) benzoyl) amino) tetramethylrhodamine)
Cx	Connexin
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZ	Endothelzellen
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum
FSK	Forskolin
g	Gramm
GJP	Gap Junction Permeabilität
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H-89	N-[2-p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide·2HCl
HUVEC	humane Nabelschnurendothelzellen
IBMX	3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthine
Indo	Indomethacin

kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LDL	“low density lipoprotein“=Lipoprotein niedriger Dichte
L-NA	N <sup>0</sup> -nitro- <i>L</i> -arginin
L-NASPA	N-palmitoyl- <i>L</i> -serine phosphoric acid
LPA	“lysophosphatidic acid“=Lysophosphatidsäure
LSM	<i>laser scanning microscope</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Mitochondrialen Membranpotential
MW	Mittelwert
NBCS	Kälberserum
nLDL	Nicht oxidiertes LDL
NO	Stickstoffmonoxyd
oxLDL	oxidiertes LDL
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin
PKA	Protein kinase A
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde

SOD	Superoxid dismutase
StAb	Standardabweichung
U	Einheiten
$\alpha$ -GA	18 $\alpha$ -glycyrrhetic acid



## 9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Akishima Y, Akasaka Y, Ishikawa Y, Lijun Z, Kiguchi H, Ito K, Itabe H, Ishii T. Role of macrophage and smooth muscle cell apoptosis in association with oxidized low-density lipoprotein in the atherosclerotic development. *Mod Pathol* 2005;18:365-373.
2. Ardlie NG, Selley ML, Simons LA. Platelet activation by oxidatively modified low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 1989;76:117-124.
3. Atkinson MM, Lampe PD, Lin HH, Kollander R, Li XR, Kiang DT. Cyclic AMP modifies the cellular distribution of connexin43 and induces a persistent increase in the junctional permeability of mouse mammary tumor cells. *J Cell Sci* 1995;108:3079-3090.
4. Auge N, Andrieu N, Negre-Salvayre A, Thiers JC, Levade T, Salvayre R. The sphingomyelin-ceramide signaling pathway is involved in oxidized low density lipoprotein-induced cell proliferation. *J Biol Chem* 1996;271:19251-19255.
5. Barber R, Goka TJ. Adenylate cyclase activity as a function of forskolin concentration. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res* 1985;10:23-29.
6. Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 2000;102:840-845.
7. Bennett MR, Gibson DF, Schwartz SM, Tait JF. Binding and phagocytosis of apoptotic vascular smooth muscle cells is mediated in part by exposure of phosphatidylserine. *Circ Res* 1995;77:1136-1142.
8. Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. Connexin family of gap junction proteins. *J Membr Biol* 1990;116:187-194.
9. Bjorkerud B, Bjorkerud S. Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle cells, macrophages, and fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:416-424.
10. Bjorkerud S, Bjorkerud B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol* 1996;149:367-380.
11. Blackburn JP, Peters NS, Yeh HI, Rothery S, Green CR, Severs NJ. Upregulation of connexin43 gap junctions during early stages of human coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1219-1228.

12. Boerma M, Forsberg L, Van Zeijl L, Morgenstern R, De Faire U, Lemne C, Erlinge D, Thulin T, Hong Y, Cotgreave IA. A genetic polymorphism in connexin 37 as a prognostic marker for atherosclerotic plaque development. *J Intern Med* 1999;246:211-218.
13. Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 1997;89:2429-2442.
14. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood* 1999;93:3831-3838.
15. Brand K, Eisele T, Kreusel U, Page M, Page S, Haas M, Gerling A, Kaltschmidt C, Neumann FJ, Mackman N, Baeurele PA, Walli AK, Neumeier D. Dysregulation of monocytic nuclear factor-kappa B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1901-1909.
16. Brovkovich V, Dobrucki LW, Brovkovich S, Dobrucki I, Do Nascimento CA, Burewicz A, Malinski T. Nitric oxide release from normal and dysfunctional endothelium. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:575-586.
17. Brown MS, Basu SK, Falck JR, Ho YK, Goldstein JL. The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages. *J Supramol Struct* 1980;13:67-81.
18. Brown MS, Dana SE, Goldstein JL. Receptor-dependent hydrolysis of cholesteryl esters contained in plasma low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:2925-2929.
19. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983;52:223-61.:223-261.
20. Brown MS, Ho YK, Goldstein JL. The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *J Biol Chem* 1980;255:9344-9352.
21. Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 1996;238:1-27.
22. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol* 1997;30:325-333.
23. Chai YC, Howe PH, DiCorleto PE, Chisolm GM. Oxidized low density lipoprotein and lysophosphatidylcholine stimulate cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. Evidence for release of fibroblast growth factor-2. *J Biol Chem* 1996;271:17791-17797.
24. Chatterjee S, Ghosh N. Oxidized low density lipoprotein stimulates aortic smooth muscle cell proliferation. *Glycobiology* 1996;6:303-311.

25. Chen J, Mehta JL, Haider N, Zhang X, Narula J, Li D. Role of caspases in Ox-LDL-induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells. *Circ Res* 2004;94:370-376.
26. Choy JC, Granville DJ, Hunt DW, McManus BM. Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1673-1690.
27. Ciray HN, Fu X, Olovsson M, Ahlsen G, Shuman C, Lindblom B, Ulmsten U. Presence and localization of connexins 43 and 26 in cell cultures derived from myometrial tissues from nonpregnant and pregnant women and from leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:926-930.
28. Cotrina ML, Kang J, Lin JH, Bueno E, Hansen TW, He L, Liu Y, Nedergaard M. Astrocytic gap junctions remain open during ischemic conditions. *J Neurosci* 1998;18:2520-2537.
29. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:5134-5138.
30. Czyz J, Irmer U, Schulz G, Mindermann A, Hulser DF. Gap-junctional coupling measured by flow cytometry. *Exp Cell Res* 2000;255:40-46.
31. Darrow BJ, Fast VG, Kleber AG, Beyer EC, Saffitz JE. Functional and structural assessment of intercellular communication. Increased conduction velocity and enhanced connexin expression in dibutyryl cAMP-treated cultured cardiac myocytes. *Circ Res* 1996;79:174-183.
32. Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 1997;27:1-20.
33. de Wit C, Roos F, Bolz SS, Kirchhoff S, Kruger O, Willecke K, Pohl U. Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice. *Circ Res* 2000;86:649-655.
34. Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 1999;144:891-901.
35. Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 1998;392:505-509.
36. Diaz C, Schroit AJ. Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry. *J Membr Biol* 1996;151:1-9.

37. Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis. *Circulation* 1997;95:1760-1763.
38. Dimmeler S, Haendeler J, Zeiher AM. Regulation of endothelial cell apoptosis in atherothrombosis. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:531-536.
39. Dowling-Warriner CV, Trosko JE. Induction of gap junctional intercellular communication, connexin43 expression, and subsequent differentiation in human fetal neuronal cells by stimulation of the cyclic AMP pathway. *Neuroscience* 2000;95:859-868.
40. Drake TA, Hannani K, Fei HH, Lavi S, Berliner JA. Minimally oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am J Pathol* 1991;138:601-607.
41. Du C, Zhao Q, Araki S, Zhang S, Miao J. Apoptosis mediated by phosphatidylcholine-specific phospholipase C is associated with cAMP, p53 level, and cell-cycle distribution in vascular endothelial cells. *Endothelium* 2003;10:141-147.
42. Earnshaw WC. Apoptosis. A cellular poison cupboard. *Nature* 1999;397:387, 389.
43. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, Komatsu R, Matsuo T, Itabe H, Takano T, Tsukamoto Y, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J, Becker AE. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;103:1955-1960.
44. Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hulser DF, Willecke K. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 1995;129:805-817.
45. Escargueil-Blanc I, Andrieu-Abadie N, Caspar-Bauguil S, Brossmer R, Levade T, Negre-Salvayre A, Salvayre R. Apoptosis and activation of the sphingomyelin-ceramide pathway induced by oxidized low density lipoproteins are not causally related in ECV-304 endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:27389-27395.
46. Escargueil-Blanc I, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Necrosis and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins occur through two calcium-dependent pathways in lymphoblastoid cells. *FASEB J* 1994;8:1075-1080.
47. Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, Henson PM. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or

- the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 1992;149:4029-4035.
48. Frame MD, Sarelius IH. Regulation of capillary perfusion by small arterioles is spatially organized. *Circ Res* 1993;73:155-163.
  49. Galle J, Hansen-Hagge T, Wanner C, Seibold S. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis* 2006;185:219-226.
  50. Galle J, Heermeier K, Wanner C. Atherogenic lipoproteins, oxidative stress, and cell death. *Kidney Int Suppl* 1999;71:S62-5.:S62-S65.
  51. Galle J, Heinloth A, Wanner C, Heermeier K. Dual effect of oxidized LDL on cell cycle in human endothelial cells through oxidative stress. *Kidney Int Suppl* 2001;78:S120-3.:S120-S123.
  52. Galle J, Lehmann-Bodem C, Hubner U, Heinloth A, Wanner C. CyA and OxLDL cause endothelial dysfunction in isolated arteries through endothelin-mediated stimulation of O(2)(-) formation. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:339-346.
  53. Galle J, Wanner C. Oxidized LDL and Lp(a). Preparation, modification, and analysis. *Methods Mol Biol* 1998;108:119-30.:119-130.
  54. Geng YJ, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *Am J Pathol* 1995;147:251-266.
  55. Goodenough DA. Lens gap junctions: a structural hypothesis for nonregulated low-resistance intercellular pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979;18:1104-1122.
  56. Goodenough DA. The crystalline lens. A system networked by gap junctional intercellular communication. *Semin Cell Biol* 1992;3:49-58.
  57. Gramsch B, Gabriel HD, Wiemann M, Grummer R, Winterhager E, Bingmann D, Schirmacher K. Enhancement of connexin 43 expression increases proliferation and differentiation of an osteoblast-like cell line. *Exp Cell Res* 2001;264:397-407.
  58. Gros DB, Jongsma HJ. Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* 1996;18:719-730.
  59. Ha H, Roh DD, Kirschenbaum MA, Kamanna VS. Atherogenic lipoproteins enhance mesangial cell expression of platelet-derived growth factor: role of protein tyrosine kinase and cyclic AMP-dependent protein kinase A. *J Lab Clin Med* 1998;131:456-465.
  60. Haefliger JA, Meda P. Chronic hypertension alters the expression of Cx43 in cardiovascular muscle cells. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:431-438.

61. Haefliger JA, Nicod P, Meda P. Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovasc Res* 2004;62:345-356.
62. Hall SE, Savill JS, Henson PM, Haslett C. Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. *J Immunol* 1994;153:3218-3227.
63. Han DK, Haudenschild CC, Hong MK, Tinkle BT, Leon MB, Liao G. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol* 1995;147:267-277.
64. Harada-Shiba M, Kinoshita M, Kamido H, Shimokado K. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms. *J Biol Chem* 1998;273:9681-9687.
65. Harris AL. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q Rev Biophys* 2001;34:325-472.
66. Hegyi L, Skepper JN, Cary NR, Mitchinson MJ. Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis. *J Pathol* 1996;180:423-429.
67. Hessler JR, Morel DW, Lewis LJ, Chisolm GM. Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. *Arteriosclerosis* 1983;3:215-222.
68. Hoffmann A, Gloe T, Pohl U, Zahler S. Nitric oxide enhances de novo formation of endothelial gap junctions. *Cardiovasc Res* 2003;60:421-430.
69. Holvoet P. Oxidized LDL and coronary heart disease. *Acta Cardiol* 2004;59:479-484.
70. Hu J, Cotgreave IA. Differential regulation of gap junctions by proinflammatory mediators in vitro. *J Clin Invest* 1997;99:2312-2316.
71. Hulthe J, Fagerberg B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1162-1167.
72. Hur KC, Shim JE, Johnson RG. A potential role for cx43-hemichannels in staurosporin-induced apoptosis. *Cell Commun Adhes* 2003;10:271-277.
73. Hutcheson IR, Chaytor AT, Evans WH, Griffith TM. Nitric oxide-independent relaxations to acetylcholine and A23187 involve different routes of heterocellular communication. Role of Gap junctions and phospholipase A2. *Circ Res* 1999;84:53-63.
74. Itoh G, Tamura J, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Koike M, Nomura M, Jie T, Ito K. DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the

- nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *Am J Pathol* 1995;146:1325-1331.
75. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973;52:2745-2756.
  76. Jang MK, Kim JY, Jeoung NH, Kang MA, Choi MS, Oh GT, Nam KT, Lee WH, Park YB. Oxidized low-density lipoproteins may induce expression of monocyte chemoattractant protein-1 in atherosclerotic plaques. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323:898-905.
  77. Jousilahti P, Vartiainen E, Tuomilehto J, Puska P. Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease: a prospective follow-up study of 14 786 middle-aged men and women in Finland. *Circulation* 1999;99:1165-1172.
  78. Jovinge S, Crisby M, Thyberg J, Nilsson J. DNA fragmentation and ultrastructural changes of degenerating cells in atherosclerotic lesions and smooth muscle cells exposed to oxidized LDL in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2225-2231.
  79. Kameritsch P, Hoffmann A, Pohl U. Opposing effects of nitric oxide on different connexins expressed in the vascular system. *Cell Commun Adhes* 2003;10:305-309.
  80. Kameritsch P, Khandoga N, Nagel W, Hundhausen C, Lidington D, Pohl U. Nitric oxide specifically reduces the permeability of Cx37-containing gap junctions to small molecules. *J Cell Physiol* 2005;203:233-242.
  81. Kapiotis S, Hermann M, Held I, Muhl A, Gmeiner B. Tyrosine: an inhibitor of LDL oxidation and endothelial cell cytotoxicity initiated by superoxide/nitric oxide radicals. *FEBS Lett* 1997;409:223-226.
  82. Kawasaki Y, Tsuchida A, Sasaki T, Yamasaki S, Kuwada Y, Murakami M, Chayama K. Irsogladine malate up-regulates gap junctional intercellular communication between pancreatic cancer cells via PKA pathway. *Pancreas* 2002;25:373-377.
  83. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
  84. Kinscherf R, Claus R, Wagner M, Gehrke C, Kamencic H, Hou D, Nauen O, Schmiedt W, Kovacs G, Pill J, Metz J, Deigner HP. Apoptosis caused by oxidized LDL is manganese superoxide dismutase and p53 dependent. *FASEB J* 1998;12:461-467.
  85. Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, Moriwaki H, Kataoka H, Nishi E, Horiuchi H, Arai H, Yokode M. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001;947:199-205.

86. Kockx MM, De Meyer GR, Buysens N, Knaapen MW, Bult H, Herman AG. Cell composition, replication, and apoptosis in atherosclerotic plaques after 6 months of cholesterol withdrawal. *Circ Res* 1998;83:378-387.
87. Kockx MM, Herman AG. Apoptosis in atherogenesis: implications for plaque destabilization. *Eur Heart J* 1998;19 Suppl G:G23-8.:G23-G28.
88. Koo SK, Kim DY, Park SD, Kang KW, Joe CO. PKC phosphorylation disrupts gap junctional communication at G0/S phase in clone 9 cells. *Mol Cell Biochem* 1997;167:41-49.
89. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994;84:1415-1420.
90. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997;18:44-51.
91. Kruger O, Plum A, Kim JS, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, Kirchhoff S, Traub O, Lamers WH, Willecke K. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development* 2000;127:4179-4193.
92. Krutovskikh VA, Piccoli C, Yamasaki H. Gap junction intercellular communication propagates cell death in cancerous cells. *Oncogene* 2002;21:1989-1999.
93. Krysko DV, Mussche S, Leybaert L, D'Herde K. Gap junctional communication and connexin43 expression in relation to apoptotic cell death and survival of granulosa cells. *J Histochem Cytochem* 2004;52:1199-1207.
94. Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell* 1996;84:381-388.
95. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 1992;90:1138-1144.
96. Kume N, Kita T. Apoptosis of vascular cells by oxidized LDL: involvement of caspases and LOX-1 and its implication in atherosclerotic plaque rupture. *Circ Res* 2004;94:269-270.
97. Kwak BR, Mulhaupt F, Veillard N, Gros DB, Mach F. Altered pattern of vascular connexin expression in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:225-230.
98. Larson DM, Kam EY, Sheridan JD. Junctional transfer in cultured vascular endothelium: I. Electrical coupling. *J Membr Biol* 1983;74:103-113.



99. Laufs U, Fata VL, Liao JK. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1997;272:31725-31729.
100. Laurenza A, Sutkowski EM, Seamon KB. Forskolin: a specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with multiple sites of action? *Trends Pharmacol Sci* 1989;10:442-447.
101. Lee SM, Clemens MG. Glucagon increases gap junctional intercellular communication via cAMP in the isolated perfused rat liver. *Shock* 2004;22:82-87.
102. Lee SW, Tomasetto C, Sager R. Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:2825-2829.
103. Lee T, Chau L. Fas/Fas ligand-mediated death pathway is involved in oxLDL-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C709-C718.
104. Lehr HA, Becker M, Marklund SL, Hubner C, Arfors KE, Kohlschutter A, Messmer K. Superoxide-dependent stimulation of leukocyte adhesion by oxidatively modified LDL in vivo. *Arterioscler Thromb* 1992;12:824-829.
105. Li D, Yang B, Mehta JL. Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas. *Am J Physiol* 1998;275:H568-H576.
106. Lim G, Wang S, Lim JA, Mao J. Activity of adenylyl cyclase and protein kinase A contributes to morphine-induced spinal apoptosis. *Neurosci Lett* 2005;389:104-108.
107. Lin D, Takemoto DJ. Oxidative activation of protein kinase Cgamma through the C1 domain. Effects on gap junctions. *J Biol Chem* 2005;280:13682-13693.
108. Little TL, Xia J, Duling BR. Dye tracers define differential endothelial and smooth muscle coupling patterns within the arteriolar wall. *Circ Res* 1995;76:498-504.
109. Liu J, Li XD, Ora A, Heikkila P, Vaheri A, Voutilainen R. cAMP-dependent protein kinase activation inhibits proliferation and enhances apoptotic effect of tumor necrosis factor-alpha in NCI-H295R adrenocortical cells. *J Mol Endocrinol* 2004;33:511-522.
110. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-241.
111. Macho A, Hirsch T, Marzo I, Marchetti P, Dallaporta B, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis. *J Immunol* 1997;158:4612-4619.

112. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995;182:1545-1556.
113. Matesic DF, Hayashi T, Trosko JE, Germak JA. Upregulation of gap junctional intercellular communication in immortalized gonadotropin-releasing hormone neurons by stimulation of the cyclic AMP pathway. *Neuroendocrinology* 1996;64:286-297.
114. Maziere C, Meignotte A, Dantin F, Conte MA, Maziere JC. Oxidized LDL induces an oxidative stress and activates the tumor suppressor p53 in MRC5 human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:718-723.
115. Mehta PP, Lokeshwar BL, Schiller PC, Bendix MV, Ostenson RC, Howard GA, Roos BA. Gap-junctional communication in normal and neoplastic prostate epithelial cells and its regulation by cAMP. *Mol Carcinog* 1996;15:18-32.
116. Mehta PP, Yamamoto M, Rose B. Transcription of the gene for the gap junctional protein connexin43 and expression of functional cell-to-cell channels are regulated by cAMP. *Mol Biol Cell* 1992;3:839-850.
117. Meilhac O, Escargueil-Blanc I, Thiers JC, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Bcl-2 alters the balance between apoptosis and necrosis, but does not prevent cell death induced by oxidized low density lipoproteins. *FASEB J* 1999;13:485-494.
118. Meyer R, Malewicz B, Baumann WJ, Johnson RG. Increased gap junction assembly between cultured cells upon cholesterol supplementation. *J Cell Sci* 1990;96:231-238.
119. Meyer RA, Lampe PD, Malewicz B, Baumann WJ, Johnson RG. Enhanced gap junction formation with LDL and apolipoprotein B. *Exp Cell Res* 1991;196:72-81.
120. Musil LS, Cunningham BA, Edelman GM, Goodenough DA. Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J Cell Biol* 1990;111:2077-2088.
121. Musil LS, Goodenough DA. Gap junctional intercellular communication and the regulation of connexin expression and function. *Curr Opin Cell Biol* 1990;2:875-880.
122. Musil LS, Goodenough DA. Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol* 1991;115:1357-1374.
123. Myers DE, Huang WN, Larkins RG. Lipoprotein-induced prostacyclin production in endothelial cells and effects of lipoprotein modification. *Am J Physiol* 1996;271:C1504-C1511.

124. Naderi S, Wang JY, Chen TT, Gutzkow KB, Blomhoff HK. cAMP-mediated inhibition of DNA replication and S phase progression: involvement of Rb, p21Cip1, and PCNA. *Mol Biol Cell* 2005;16:1527-1542.
125. Nakase T, Fushiki S, Sohl G, Theis M, Willecke K, Naus CC. Neuroprotective role of astrocytic gap junctions in ischemic stroke. *Cell Commun Adhes* 2003;10:413-417.
126. Nakase T, Sohl G, Theis M, Willecke K, Naus CC. Increased apoptosis and inflammation after focal brain ischemia in mice lacking connexin43 in astrocytes. *Am J Pathol* 2004;164:2067-2075.
127. Napoli C. Oxidation of LDL, atherogenesis, and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:698-709.:698-709.
128. Napoli C, Quehenberger O, De Nigris F, Abete P, Glass CK, Palinski W. Mildly oxidized low density lipoprotein activates multiple apoptotic signaling pathways in human coronary cells. *FASEB J* 2000;14:1996-2007.
129. Negre-Salvayre A, Fitoussi G, Reaud V, Pieraggi MT, Thiers JC, Salvayre R. A delayed and sustained rise of cytosolic calcium is elicited by oxidized LDL in cultured bovine aortic endothelial cells. *FEBS Lett* 1992;299:60-65.
130. Negre-Salvayre A, Lopez M, Levade T, Pieraggi MT, Dousset N, Douste-Blazy L, Salvayre R. Ultraviolet-treated lipoproteins as a model system for the study of the biological effects of lipid peroxides on cultured cells. II. Uptake and cytotoxicity of ultraviolet-treated LDL on lymphoid cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1990;1045:224-232.
131. Ngezahayo A, Kolb HA. Regulation of gap junctional coupling in isolated pancreatic acinar cell pairs by cholecystinin-octapeptide, vasoactive intestinal peptide (VIP) and a VIP-antagonist. *J Membr Biol* 1994;139:127-136.
132. Nishi K, Itabe H, Uno M, Kitazato KT, Horiguchi H, Shinno K, Nagahiro S. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1649-1654.
133. Nodin C, Nilsson M, Blomstrand F. Gap junction blockage limits intercellular spreading of astrocytic apoptosis induced by metabolic depression. *J Neurochem* 2005;94:1111-1123.
134. Oguro K, Jover T, Tanaka H, Lin Y, Kojima T, Oguro N, Grooms SY, Bennett MV, Zukin RS. Global ischemia-induced increases in the gap junctional proteins connexin 32 (Cx32) and Cx36 in hippocampus and enhanced vulnerability of Cx32 knock-out mice. *J Neurosci* 2001;21:7534-7542.
135. Oka M, Negishi M, Nishigaki N, Ichikawa A. Two types of prostacyclin receptor coupling to stimulation of adenylate cyclase and phosphatidylinositol hydrolysis in a cultured mast cell line, BNu-2cl3 cells. *Cell Signal* 1993;5:643-650.

136. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997;336:1131-1141.
137. Otto JC, Smith WL. Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1995;12:139-156.
138. Paulson AF, Lampe PD, Meyer RA, TenBroek E, Atkinson MM, Walseth TF, Johnson RG. Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. *J Cell Sci* 2000;113:3037-3049.
139. Pepper MS, Meda P. Basic fibroblast growth factor increases junctional communication and connexin 43 expression in microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 1992;153:196-205.
140. Petit PX, Lecoecur H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* 1995;130:157-167.
141. Pina-Benabou MH, Szostak V, Kyrozis A, Rempe D, Uziel D, Urban-Maldonado M, Benabou S, Spray DC, Federoff HJ, Stanton PK, Rozental R. Blockade of gap junctions in vivo provides neuroprotection after perinatal global ischemia. *Stroke* 2005;36:2232-2237.
142. Pinkney JH, Downs L, Hopton M, Mackness MI, Bolton CH. Endothelial dysfunction in Type 1 diabetes mellitus: relationship with LDL oxidation and the effects of vitamin E. *Diabet Med* 1999;16:993-999.
143. Plenz G, Ko YS, Yeh HI, Eschert H, Sindermann JR, Dorszewski A, Hofnagel O, Robenek H, Breithardt G, Severs NJ. Upregulation of connexin43 gap junctions between neointimal smooth muscle cells. *Eur J Cell Biol* 2004;83:521-530.
144. Plotkin LI, Bellido T. Bisphosphonate-induced, hemichannel-mediated, anti-apoptosis through the Src/ERK pathway: a gap junction-independent action of connexin43. *Cell Commun Adhes* 2001;8:377-382.
145. Polacek D, Bech F, McKinsey JF, Davies PF. Connexin43 gene expression in the rabbit arterial wall: effects of hypercholesterolemia, balloon injury and their combination. *J Vasc Res* 1997;34:19-30.
146. Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature* 1998;396:119-122.
147. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990;344:254-257.

148. Reid VC, Mitchinson MJ, Skepper JN. Cytotoxicity of oxidized low-density lipoprotein to mouse peritoneal macrophages: an ultrastructural study. *J Pathol* 1993;171:321-328.
149. Relou IA, Hackeng CM, Akkerman JW, Malle E. Low-density lipoprotein and its effect on human blood platelets. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:961-971.
150. Rimarachin JA, Jacobson JA, Szabo P, Maclouf J, Creminon C, Weksler BB. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1021-1031.
151. Roh CR, Heo JH, Yang SH, Bae DS. Regulation of connexin 43 by nitric oxide in primary uterine myocytes from term pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:434-440.
152. Romanello M, Moro L, Pirulli D, Crovella S, D'Andrea P. Effects of cAMP on intercellular coupling and osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:1138-1144.
153. Rosenfeld ME, Palinski W, Yla-Herttuala S, Butler S, Witztum JL. Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity from WHHL rabbits. *Arteriosclerosis* 1990;10:336-349.
154. Ross R. Atherosclerosis: the role of endothelial injury, smooth muscle proliferation and platelet factors. *Triangle* 1976;15:45-51.
155. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med* 1986;314:488-500.
156. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809.
157. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 1995;57:791-804.:791-804.
158. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
159. Rossig L, Dimmeler S, Zeiher AM. Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 2001;96:11-22.
160. Rubbo H, Trostchansky A, Botti H, Batthyany C. Interactions of nitric oxide and peroxynitrite with low-density lipoprotein. *Biol Chem* 2002;383:547-552.
161. Ruch RJ, Porter S, Koffler LD, Dwyer-Nield LD, Malkinson AM. Defective gap junctional intercellular communication in lung cancer: loss of an important mediator of tissue homeostasis and phenotypic regulation. *Exp Lung Res* 2001;27:231-243.

162. Rummery NM, Hickey H, McGurk G, Hill CE. Connexin37 is the major connexin expressed in the media of caudal artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1427-1432.
163. Saez JC, Nairn AC, Czernik AJ, Spray DC, Hertzberg EL, Greengard P, Bennett MV. Phosphorylation of connexin 32, a hepatocyte gap-junction protein, by cAMP-dependent protein kinase, protein kinase C and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur J Biochem* 1990;192:263-273.
164. Saffitz JE, Kleber AG. Effects of mechanical forces and mediators of hypertrophy on remodeling of gap junctions in the heart. *Circ Res* 2004;94:585-591.
165. Salameh A, Polontchouk L, Dhein S, Hagedorff A, Pfeiffer D. Chronic regulation of the expression of the gap junction protein connexin 43 in transfected HeLa cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003;368:33-40.
166. Salvayre R, Auge N, Benoist H, Negre-Salvayre A. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002;1585:213-221.
167. Sata M, Walsh K. Endothelial cell apoptosis induced by oxidized LDL is associated with the down-regulation of the cellular caspase inhibitor FLIP. *J Biol Chem* 1998;273:33103-33106.
168. Sata M, Walsh K. Oxidized LDL activates fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 1998;102:1682-1689.
169. Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 1990;343:170-173.
170. Schildberg FA, Schulz S, Dombrowski F, Minor T. Cyclic AMP alleviates endoplasmic stress and programmed cell death induced by lipopolysaccharides in human endothelial cells. *Cell Tissue Res* 2005;320:91-98.
171. Schiller PC, Mehta PP, Roos BA, Howard GA. Hormonal regulation of intercellular communication: parathyroid hormone increases connexin 43 gene expression and gap-junctional communication in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol* 1992;6:1433-1440.
172. Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1999;155:1281-1291.
173. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 1982;2:229-59.
174. Segal SS. Cell-to-cell communication coordinates blood flow control. *Hypertension* 1994;23:1113-1120.

175. Segal SS, Beny JL. Intracellular recording and dye transfer in arterioles during blood flow control. *Am J Physiol* 1992;263:H1-H7.
176. Segal SS, Welsh DG, Kurjiaka DT. Spread of vasodilatation and vasoconstriction along feed arteries and arterioles of hamster skeletal muscle. *J Physiol* 1999;516:283-291.
177. Seki K, Komuro T. Immunocytochemical demonstration of the gap junction proteins connexin 43 and connexin 45 in the musculature of the rat small intestine. *Cell Tissue Res* 2001;306:417-422.
178. Seul KH, Kang KY, Lee KS, Kim SH, Beyer EC. Adenoviral delivery of human connexin37 induces endothelial cell death through apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:1144-1151.
179. Severs NJ, Rothery S, Dupont E, Coppin SR, Yeh HI, Ko YS, Matsushita T, Kaba R, Halliday D. Immunocytochemical analysis of connexin expression in the healthy and diseased cardiovascular system. *Microsc Res Tech* 2001;52:301-322.
180. Shashkin P, Dragulev B, Ley K. Macrophage differentiation to foam cells. *Curr Pharm Des* 2005;11:3061-3072.
181. Smith LH, Boutaud O, Breyer M, Morrow JD, Oates JA, Vaughan DE. Cyclooxygenase-2-dependent prostacyclin formation is regulated by low density lipoprotein cholesterol in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:983-988.
182. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000;69:145-82.:145-182.
183. Somekawa S, Fukuhara S, Nakaoka Y, Fujita H, Saito Y, Mochizuki N. Enhanced functional gap junction neofunction by protein kinase A-dependent and Epac-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes. *Circ Res* 2005;97:655-662.
184. Steinbrecher UP, Witztum JL, Parthasarathy S, Steinberg D. Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. Correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Arteriosclerosis* 1987;7:135-143.
185. Stevens T, Garcia JG, Shasby DM, Bhattacharya J, Malik AB. Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L419-L422.
186. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM, Kroemer G. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 1999;189:381-394.

187. Svensjo E, Boschcov P, Ketelhuth DF, Jancar S, Gidlund M. Increased microvascular permeability in the hamster cheek pouch induced by oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and some fragmented apolipoprotein B proteins. *Inflamm Res* 2003;52:215-220.
188. Tatsukawa Y, Bowolaksono A, Nishimura R, Komiyama J, Acosta TJ, Okuda K. Possible Roles of Intracellular Cyclic AMP, Protein Kinase C and Calcium Ion in the Apoptotic Signaling Pathway in Bovine Luteal Cells. *J Reprod Dev* 2006;..
189. Traub O, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, Elfgang C, Bastide B, Scheidtmann KH, Hulser DF, Willecke K. Immunochemical and electrophysiological characterization of murine connexin40 and -43 in mouse tissues and transfected human cells. *Eur J Cell Biol* 1994;64:101-112.
190. Traub O, Hertlein B, Kasper M, Eckert R, Krisciukaitis A, Hulser D, Willecke K. Characterization of the gap junction protein connexin37 in murine endothelium, respiratory epithelium, and after transfection in human HeLa cells. *Eur J Cell Biol* 1998;77:313-322.
191. Udawatte C, Ripps H. The spread of apoptosis through gap-junctional channels in BHK cells transfected with Cx32. *Apoptosis* 2005;10:1019-1029.
192. van den Eijnde SM, Luijsterburg AJ, Boshart L, De Zeeuw CI, van Dierendonck JH, Reutelingsperger CP, Vermeij-Keers C. In situ detection of apoptosis during embryogenesis with annexin V: from whole mount to ultrastructure. *Cytometry* 1997;29:313-320.
193. van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998;31:1-9.
194. van Kempen MJ, Jongsma HJ. Distribution of connexin37, connexin40 and connexin43 in the aorta and coronary artery of several mammals. *Histochem Cell Biol* 1999;112:479-486.
195. Van Rijen H, van Kempen MJ, Analbers LJ, Rook MB, van Ginneken AC, Gros D, Jongsma HJ. Gap junctions in human umbilical cord endothelial cells contain multiple connexins. *Am J Physiol* 1997;272:C117-C130.
196. Vane JR, Botting RM. Pharmacodynamic profile of prostacyclin. *Am J Cardiol* 1995;75:3A-10A.
197. Veenstra RD, Wang HZ, Beblo DA, Chilton MG, Harris AL, Beyer EC, Brink PR. Selectivity of connexin-specific gap junctions does not correlate with channel conductance. *Circ Res* 1995;77:1156-1165.
198. Veenstra RD, Wang HZ, Beyer EC, Ramanan SV, Brink PR. Connexin37 forms high conductance gap junction channels with subconductance state activity and selective dye and ionic permeabilities. *Biophys J* 1994;66:1915-1928.



199. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.
200. Vicca S, Hennequin C, Nguyen-Khoa T, Massy ZA, Descamps-Latscha B, Drueke TB, Lacour B. Caspase-dependent apoptosis in THP-1 cells exposed to oxidized low-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:948-954.
201. Vieira O, Escargueil-Blanc I, Jurgens G, Borner C, Almeida L, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis. *FASEB J* 2000;14:532-542.
202. Wada H, Kaneko T, Wakita Y, Minamikawa K, Nagaya S, Tamaki S, Deguchi K, Shirakawa S. Effect of lipoproteins on tissue factor activity and PAI-II antigen in human monocytes and macrophages. *Int J Cardiol* 1994;47:S21-S25.
203. Wang HM, Zheng NG, Wu JL, Gong CC, Wang YL. Dual effects of 8-Br-cAMP on differentiation and apoptosis of human esophageal cancer cell line Eca-109. *World J Gastroenterol* 2005;11:6538-6542.
204. Wang HP, Feng XJ, Gou BD, Zhang TL, Xu SJ, Wang K. Effects of LDL, cholesterol, and their oxidized forms on the precipitation kinetics of calcium phosphates. *Clin Chem* 2003;49:2027-2036.
205. White TW, Bruzzone R, Paul DL. The connexin family of intercellular channel forming proteins. *Kidney Int* 1995;48:1148-1157.
206. Willecke K, Hennemann H, Dahl E, Jungbluth S, Heynkes R. The diversity of connexin genes encoding gap junctional proteins. *Eur J Cell Biol* 1991;56:1-7.
207. Williamson P, Schlegel RA. Hide and seek: the secret identity of the phosphatidylserine receptor. *J Biol* 2004;3:14.
208. Wintergerst ES, Jelk J, Rahner C, Asmis R. Apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein in human monocyte-derived macrophages involves CD36 and activation of caspase-3. *Eur J Biochem* 2000;267:6050-6059.
209. Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989;84:1086-1095.
210. Yoshida H, Quehenberger O, Kondratenko N, Green S, Steinberg D. Minimally oxidized low-density lipoprotein increases expression of scavenger receptor A, CD36, and macrosialin in resident mouse peritoneal macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:794-802.

211. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B, Kroemer G. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 1995;182:367-377.

## **10. DANKSAGUNG**

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl, Direktor des Physiologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München. Durch die freundliche Aufnahme in sein Institut ermöglichte er mir die Durchführung der Experimente in einer kooperativen und professionellen Atmosphäre und unterstützte meine Arbeit wissenschaftlich und persönlich. Durch seine väterliche Ausstrahlung und seinen persönlichen Einsatz bei dieser Arbeit war er für mich ein motivierender und vorbildlicher Lehrer. Seine fachliche Kompetenz und seine herausragenden menschlichen Qualitäten haben mich tief beeindruckt.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Petra Kameritsch für die ausführliche und professionelle methodische Ausbildung. Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts, die ich im Laufe der Zeit sowohl fachlich als auch menschlich zu schätzen gelernt habe, für ihre stete Hilfsbereitschaft und die nette Arbeitsatmosphäre während der Durchführung dieser Arbeit. Besonders möchte ich mich bedanken bei Kasia Stefanofski und Dorothea Gössel für die Präparation der Nabelschnüre und Kultur der Endothelzellen und die angenehme Art ihrer Zusammenarbeit.

Herrn Prof. J. Galle (Universität Würzburg) danke ich für die freundliche Bereitstellung von nativen und oxidierten Lipoproteinen.

Einen besonderen Dank gilt meinem Ehemann Andrej, der mit mir einige Höhen und Tiefen durchgestanden hat und durch seine liebevolle Unterstützung einen wesentlichen Teil zur dieser Arbeit beigetragen hat. Meiner Tochter Dascha möchte ich besonders für ihr großes Verständnis für meine Arbeit danken.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern für ihren Beistand in allen Bereichen meines Lebens. Ohne sie wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Arbeit durchzuführen.

## 11. LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE DATEN:

Name: **Natalia Khandoga**  
Geburtsdatum: 23.09.1974  
Geburtsort: Minsk/Weißrussland  
Familienstand: verheiratet, 1 Kind.  
Adresse: Appenzellerstr 107, 81475 München

### AUSBILDUNG:

**Schule:**  
09/1981-07/1991 in Grodno/Weißrussland, Abitur

**Universität:**  
09/1991 – 08/1997 Humanmedizin an der Medizinischen Universität  
Grodno/Weißrussland mit Auszeichnung

**Praktika:**  
7/1993-9/1993 Famulatur am Klinikum der Universität Frankfurt/Main  
7/1995-8/1995 Famulatur an der Frankenwaldklinik Kronach

### BERUFLICHER WERDEGANG:

8/1997-8/1999 Assistenzärztin an der Klinik für Gynäkologie und  
Geburtshilfe der Medizinischen Universität Grodno

01.08.1999 Facharztprüfung

8/1999 – 3/2000 Stationsärztin an der Klinik für Gynäkologie und  
Geburtshilfe der Medizinischen Universität Grodno

3/2002-3/2006 Doktorandin am Physiologischen Institut der LMU  
München

4/2006-5/2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Physiologischen  
Institut der LMU München

6/2006-12/2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Assistenzärztin am  
Institut und Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin

Seit 1/2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institutes für  
Medizinische Psychologie, Humanwissenschaftliches  
Zentrum der LMU München (Arbeitsgruppe PD Dr.  
Ursula Härtel)