

Aus dem Physiologischen Institut der Ludwig - Maximilians Universität München

Lehrstuhl für Vegetative Physiologie Vorstand: Prof. Dr. med. U. Pohl

**Einfluß der endothelialen Autakoide NO und PGI₂ auf die Permeabilität
endothelialer Gap Junctions**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Christina Hundhausen

aus Köln

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Pohl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. L. Gerbes
Priv. Doz. Dr. J. M. Davis Ph. D.
Prof. Dr. F. Krombach

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2003

Inhaltsverzeichnis	Seite
<u>I. Einleitung</u>	5
<u>II. Material und Methode</u>	18
II. 1. Isolierung der Endothelzellen aus der Nabelschnur und Zellkultur	18
II. 2. Versuchsaufbau und Durchführung	20
II. 3. Versuchsprotokolle	24
II. 4. Lösungen und Substanzen	30
II. 5. verwendete Computerprogramme	31
II. 6. Datenauswertung, Berechnungen und Statistik	31
<u>III. Ergebnisse</u>	33
III. 1. Farbstoffausbreitung in endothelialen Monolayern	33
III. 2. Einfluß von NO auf die Farbstoffausbreitung	37
III. 2.1. Der NO Effekt ist cGMP unabhängig	42
III. 2.2. Die Wirkung von NO ist nicht Peroxynitrit vermittelt	43
III. 2.3. Hyperpolarisation hat keinen Einfluß auf die Farbstoffausbreitung	45
III. 2.4. Brefeldin A	45
III. 3. Effekt der Änderung des Phosphorylierungsstatus der Aminosäure Tyrosin	46
III. 4. Einfluß von Prostacyclin auf die Farbstoffausbreitung	49
III. 5. Effekt der Aktivierung der Adenylatcyclase	50
III. 6. NO und Prostacyclin heben ihre Wirkung gegenseitig auf	52
<u>IV. Diskussion</u>	54
<u>V. Zusammenfassung</u>	74
<u>VI. Literaturverzeichnis</u>	77
<u>VII. Danksagung</u>	93

Abkürzungsverzeichnis

EDRF:	endothelium-derived relaxing factor
cAMP:	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP:	cyclisches Guanosinmonophosphat
L-NA:	L ^ω -Nitro-L-Arginin
SNP:	Nitroprussid-Natrium
SNAP:	S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Pencillamin
Indo:	Indometacin
Ilo:	Iloprost
NO:	Stickstoffmonoxid
PGI ₂ :	Prostacyclin
PAO:	Phenylarsinoxid
Ortho:	Orthovanadat
Cx:	Connexin
GJP:	Gap Junction Permeabilität
HUVECs:	humane umbilikalvenöse Endothelzellen
PBS:	Phosphat gepufferte Salzlösung

I. Einleitung

Kommunikation spielt eine entscheidende Rolle in einer Gesellschaft von Individuen. Ein Funktionieren und eine stete Weiterentwicklung der Gesellschaft ist nur möglich, wenn Informationen durch eine große Anzahl von Medien in vielen verschiedenen Formen und hoher Geschwindigkeit weitergegeben werden und so unsere täglichen Entscheidungen aktuell beeinflussen können. Doch obwohl wir in Gemeinschaften leben, die eine Zusammenarbeit und Anpassung voraussetzen, bewahrt jeder einzelne seine eigene Individualität.

Analog dazu ist die Funktion multizellulärer Organismen von dem individuellen Aufbau, den speziellen Funktionen und Fähigkeiten der einzelnen Zelltypen oder Gewebearten abhängig. Die zellulären Aktivitäten einer einzelnen Zelle müssen mit denen anderer Zellen koordiniert werden. Dies ist nicht nur für ein normales Zellwachstum und Überleben wichtig [73], sondern auch für die Funktion eines Organs, das ja aus einem Zellverband besteht. Andererseits müssen die verschiedenen Organfunktionen in den Dienst des gesamten Organismus gestellt werden, und somit ist auch hierbei eine Kommunikation notwendig, um erforderliche Änderungen des Funktionszustands eines Organs zu erreichen.

Im Organismus sind verschiedene Strategien entwickelt worden, um diese Ziele zu erreichen. So wird eine Kommunikation über große Entfernungen durch die Weiterleitung von Signalen über Nerven oder endokrine Mechanismen bewerkstelligt, also einerseits durch die schnelle Ausbreitung von Erregung entlang spezialisierter Zellen, andererseits durch die etwas langsamere, aber ubiquitäre Verteilung von Hormonen im Körper mit dem Blutstrom. Auch bei der Überbrückung kurzer Strecken

werden Signalsubstanzen gebildet, die in der unmittelbaren Umgebung ihres Bildungsortes, per diffusionem oder durch Konvektion, die Zielzelle erreichen (Gewebshormone, Autakoide). Außerdem kommunizieren Zellen über solche kurzen Strecken direkt über die interzelluläre Weitergabe von Ionen oder kleinen Molekülen. Diese interzelluläre Kommunikation wird durch Gap Junctions ermöglicht, die von einer großen Anzahl einzelner Kanäle gebildet werden.

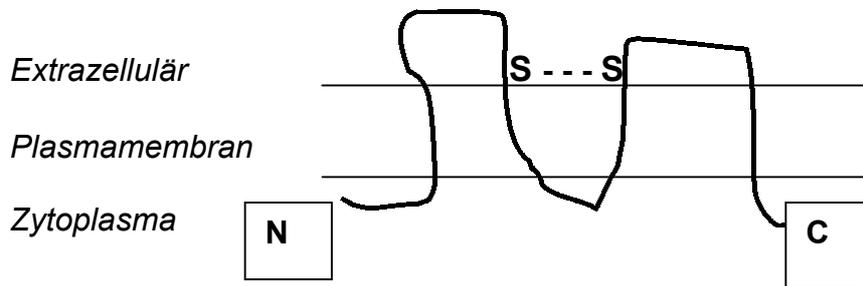
Die Gap Junction (Kontaktzone, Nexus) ist eine häufige Zellverbindung. Man findet Gap Junctions in großer Zahl in vielen verschiedenen Geweben bei allen Tierarten und Strukturäquivalente bei Pflanzen. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen erscheint eine solche Kontaktzone als ein Bereich, in dem die Membranen zweier benachbarter Zellen in einem Abstand von ca. 2-4 nm aneinander liegen. Dieser verbleibende geringe Abstand wird von kanalbildenden Proteinmolekülen, die einen zentralen Kanal aufweisen, überbrückt. So können anorganische Ionen und andere kleine Moleküle vom Zytoplasma der einen Zelle in das der anderen übertreten, ohne mit dem Extrazellulärraum in Berührung zu kommen [4, 5]. Auf diese Weise verbinden diese Kanäle die Zellen, so daß ein Austausch von Ionen, Signalstoffen und Metaboliten bzw. eine elektrische Kopplung ermöglicht wird.

Daß Zellen auf diese Weise untereinander kommunizieren, wurde auf physiologischer Ebene erstmals 1958 gezeigt [40]. Danach dauerte es noch einige Jahre, bis man den Zusammenhang zwischen der physiologischen Kopplung und den im Elektronenmikroskop gefundenen Gap Junctions als deren morphologisches Korrelat verstand.

Die ersten Hinweise auf eine solche Zellkopplung stammten aus elektrophysiologischen Untersuchungen an spezifischen Paaren interagierender Nervenzellen im Rückenmark des Flußkrebse [40]. In diesen frühen Arbeiten hielt man diese neu gefundenen Membranstrukturen, die erst nur in erregbarem Gewebe gefunden wurden, für eine besonders spezialisierte elektrische Synapse. Im Jahre 1964 zeigte Werner Löwenstein aber [75], daß kleine hydrophile Moleküle und Ionen durch Gap Junctions von einer Zelle zur benachbarten übertreten können. In späteren Versuchsreihen wurde sogar den Innendurchmesser der Kanäle bestimmt, indem man verschiedene fluoreszierende Moleküle unterschiedlichen Molekulargewichtes in Zellen mittels einer Mikropipette injizierte und ihren Übertritt in benachbarte Zellen verfolgte [35]. Löwenstein entdeckte, daß alle polaren Moleküle mit einer Masse unter circa 1 kDa und einem Durchmesser von 8-14 Å diese Zell-Zell Kanäle leicht passieren können [74]. Dies bedeutet, daß anorganische Ionen und die meisten Metabolite (zum Beispiel Zucker, Aminosäuren und Nukleotide) durch Gap Junctions von einer Zelle in die benachbarte gelangen können [36, 77, 103].

Diese Kanäle, die die Zellen miteinander verbinden, bestehen aus spezifischen Proteinen, die als Connexine bezeichnet werden. Diese Connexinmoleküle, welche zu den Klasse III Membranproteinen gehören, werden in die Plasmamembran eingebaut und durchspannen die Plasmamembran viermal. So werden zwei extrazelluläre Schleifen gebildet, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Das aminoternale (Schleife 1) und das carboxyterminale Ende (Schleife 2) jedes Connexins ist, wie auch eine intrazelluläre Schleife im Zytoplasma lokalisiert (siehe Abbildung 1).

Abbildung 1:



In Säugetierzellen sind mindestens 12 verschiedene Connexine bekannt, die nach ihrem Molekulargewicht, das im kDa Bereich liegt und durch die Länge des N-terminalen Endes bestimmt wird, benannt werden [116] [117], [60], [8]. In unterschiedlichen Zelltypen und Gewebearten werden verschiedene Connexine exprimiert. In einer Gewebeart finden sich verschiedene Connexine, andererseits ist ein bestimmtes Connexin nicht ausschließlich in einer Gewebeart zu finden, wie Tabelle 1 erläutert.

Table 1: Expression verschiedener Connexine in den unterschiedlichen Geweben.

Nomenklatur	Molekulargewicht	Gewebe
Cx26	26.5	Leber
Cx32	32.0	Leber, Schwann-Zellen, Prostata
Cx33	32.9	Testes
Cx37	37.6	Lunge, Blutgefäße
Cx38	37.8	Embryo
Cx40	40.4	Lunge, Blutgefäße
Cx43	43.0	Herz, Blutgefäße, Astrozyten, Uterus
Cx45	45.7	Herz, Blutgefäße
Cx46	46.0	Augenlinse
Cx50	49.6	Augenlinse

Sechs solcher Connexinmoleküle bilden einen Halbkanal mit einer zentralen Pore, den man als Connexon oder Hemikanal bezeichnet. Zwei Connexone, jeweils ein Hemikanal von jeder Zelle, verbinden sich im Interzellulärraum zu einem funktionstüchtigen Kanal zwischen den Nachbarzellen, die das Zytosol der jeweiligen Zellen miteinander verbinden. Solch ein funktionstüchtiger Kanal kann prinzipiell aus denselben oder unterschiedlichen Connexinmolekülen aufgebaut sein. Besteht ein Connexon nur aus einem Connexinprotein, so wird es als homomer bezeichnet, sind verschiedene Connexinproteine in einem Connexon enthalten, so handelt es sich um ein heteromeres Connexon. Der aus 2 Connexonen gebildete Kanal wird in Analogie dazu benannt: Sind die beiden Connexone aus dem gleichem Connexinprotein aufgebaut, so ist der Kanal homotypisch, andernfalls heterotypisch. Letztendlich ergeben sich also mehrere denkbare Möglichkeiten. Ein homomer/homotypischer

Kanal besteht nur aus einem Connexinprotein, in einem heteromer/homotypischer Kanal lagern sich 2 unterschiedliche Connexone, die aus jeweils dem gleichem Connexinprotein aufgebaut sind, zusammen. Bestehen beide Connexone aus zwei oder mehreren unterschiedlichen Connexinproteinen, so entsteht ein heteromer/heterotypischer Kanal [16]. All diese verschiedenen Möglichkeiten ergeben sich dadurch, daß in einem Zelltyp gleichzeitig mehrere Connexine gebildet werden können. Eine große Anzahl dieser Kanäle werden in der Membran zu Clustern assoziiert und ein solcher Cluster von Connexinkanälen wird als Gap Junction bezeichnet. Tatsächlich werden in einem solchen Gap Junction Plaque verschiedene Connexinproteine gefunden [70]. Weiterhin wurde gezeigt, daß auch Zellen, die heteromere Connexone exprimieren, funktionelle Kanäle ausbilden können [16]. Dies läßt vermuten, daß auch in vivo heteromer/heterotypische Kanäle existieren und eine funktionelle Kopplung hergestellt werden kann.

Gap Junctions entstehen schnell neu, wenn zwei Zellen in Kontakt gebracht werden. Ein einmal gebildeter interzellulärer Kanal kann dann geöffnet oder geschlossen werden. Die Öffnungszeiten betragen Sekunden bis Minuten. Hohe Calciumkonzentrationen und ein niedriger pH-Wert schließen sie [9, 26, 87, 115]. Das Schließen der Gap Junctions durch Calcium und H^+ -Ionen dient dazu, normale Zellen gegen geschädigte oder absterbende Nachbarzellen zu isolieren [105]. Gap Junctions werden außerdem durch das Membranpotential [2], Hormone [23, 107, 120] und den Phosphorylierungsstatus kontrolliert [57, 61, 62, 63, 83, 112]

Neben der Regulation über Öffnung und Schließung bereits in die Membran eingebauter Kanäle spielt der Einbau neuer Connexone und der Abbau vorhandener Gap Junctions eine entscheidende Rolle in der Regulation der interzellulären

Kommunikation. Gap Junctions haben eine begrenzte Halbwertszeit von höchstens 5 Stunden. Am Ende ihrer Lebenszeit werden sie von einer Zelle internalisiert und vollständig abgebaut [64]. Hieraus ergibt sich, daß neu in die Membran eingebaute Connexone vollständig neu synthetisiert werden müssen. Somit kann die interzelluläre Kommunikation auch über einen vermehrten Einbau oder einen gesteigerten Abbau reguliert werden [65].

Die Kopplung von Zellen über Gap Junctions ist für unterschiedlichste Zellfunktionen und das Überleben der Zellen erforderlich. Gap Junctions sind für die Ernährung von Zellen wichtig. Einerseits können sie die Diffusionsstrecke für membranimpermeable Nährstoffe bei Zellen, die aufgrund ihrer Zellstruktur einen langen Diffusionsweg aufweisen, deutlich verkürzen. So sind z. B. die die nervenisolierenden Schwann-Zellen mehrfach um die Axone der Nervenzellen gewickelt. Hieraus ergibt sich, daß Nährstoffe entlang dieser Windungen im Zytoplasma diffundieren müssen. Durch die zwischen den verschiedenen Windungen ausgebildeten Gap Junctions wird die Diffusionsstrecke um ein vielfaches verkürzt. Die Mutation des Connexin 32-Proteins, welches in den Schwann-Zellen exprimiert wird, führt zum Absterben dieser Zellen und zum Funktionsverlust der Nerven (Charcot-Marie-Tooth Erkrankung) [6]. Andererseits sind sie für die Ernährung von Zellen wichtig, die weit von Blutgefäßen entfernt liegen, zum Beispiel in der Augenlinse, die keine Blutgefäße enthält. Durch die Ausbildung von Gap Junctions in den Zellen der Augenlinse wird ein konvektiver Nährstofftransport ermöglicht. Ein Funktionsverlust dieser Gap Junctions führt durch eine Mangelernährung der Linse zur Ausbildung eines Kataraktes [44]. Darüber hinaus spielen kommunizierende Kanäle bei der Weiterentwicklung und Differenzierung von Stammzellen eine entscheidende Rolle, wie bei Untersuchungen in der Embryologie beobachtet wurde.

Eminent wichtig ist die Weitergabe von Signalen über interzelluläre Kanäle für die physiologische Funktion von Zellverbänden. Die Zellen erregbarer Gewebe sind über den raschen Strom von Ionen durch diese Kanäle elektrisch miteinander gekoppelt, was eine schnelle und synchrone Ausbreitung einer Membranpotentialänderung gewährleistet. Dies ist beispielsweise für die koordinierte Kontraktion des Herzmuskels eine notwendige Voraussetzung [97]. Auch in den Muskelzellen des Uterus konnte gezeigt werden, daß kurz vor der Geburt ein sogenanntes Synzytium durch die Heraufregulation der Connexinexpression und die Kopplung der Zellen über Gap Junctions hergestellt wird. Dies ermöglicht auch in diesem Organ eine koordinierte Kontraktion, um die für die Austreibungsphase nötige Kraft zu entwickeln [22],[56]. Auch die Diffusion sekundärer Botenstoffe koordiniert das Verhalten der Zellen in einem funktionellen Verband. So ist die Weitergabe des Inositoltrisphosphats über Gap Junctions in Hepatocyten notwendig, um Glukose aus den Speichern optimal zu mobilisieren [86].

Auch die Blutgefäße bestehen aus Zellverbänden. Dies ist einerseits die Endothelzellschicht, die die Gefäßwände auskleidet und andererseits die glatte Muskulatur der Blutgefäße, die aus einzelnen glatten Muskelzellen besteht und zirkulär angeordnet sind. Die Kommunikation der einzelnen Zellen und auch die Kommunikation dieser beiden Zellverbände untereinander ist für die Regulation der Organdurchblutung und des systemischen arteriellen Blutdruckes durch die Koordination des Verhaltens der Arterien und kleinen Arteriolen eine wichtige Voraussetzung. Die Anpassung der Organdurchblutung an eine erhöhte Bedarfssituation erfordert die Senkung des Widerstandes im gesamten zuführenden Gefäßbaum. Eine Senkung des Widerstandes in den direkt im Gewebe liegenden kleinen distalen Arteriolen erfolgt durch eine über Metabolite ausgelöste

Gefäßweiterung. Da diese Widerstandsreduktion alleine nur zu einer verhältnismäßig geringen Zunahme der Durchblutung führt, ist es notwendig, daß auch in den vorgeschalteten Arteriolen und Arterien in koordinierter Weise eine Dilatation induziert wird. Obwohl auch andere Koordinationsmöglichkeiten eine Rolle zu spielen scheinen [32], wäre eine weitere Möglichkeit der Koordination innerhalb des Gefäßbaums die Ausbreitung von Membranpotentialänderungen entlang der Arteriolen über interzelluläre Verbindungen, in ähnlicher Weise wie es oben für den Herzmuskel oder den Uterus erläutert wurde. Denn Zellkopplung über Gap Junctions wurde auch im Gefäßsystem aufgezeigt, sowohl innerhalb der glatten Muskelzellschicht und des Endothelzelllayers als auch zwischen Endothel- und Muskelzellen [10, 70, 71].

Tatsächlich gibt es Hinweise, daß in den Blutgefäßen eine Koordination über Gap Junctions stattfindet. Zum Beispiel führt die lokale Gabe von Acetylcholin zu einer Dilatation nicht nur an der Applikationsstelle, sondern auch entlang der Arteriole und zwar über eine längere Strecke, die im Millimeterbereich liegt [114]. Dies zeigt, daß diese lokale Antwort der Arteriole nicht auf die Applikationsstelle begrenzt bleibt, sondern in einem großen Bereich stromauf- und abwärts von der Applikationsstelle weitergeleitet wird [99, 101]. Die geringe zeitliche Verzögerung, mit der die Gefäßantworten an den entfernten Stellen auftreten, legt nahe, daß es sich um die elektrotonische Ausbreitung einer Membranpotentialänderung handelt. Tatsächlich konnte eine Änderung des Membranpotentials an entfernter Stelle gemessen werden [102]. Neben dieser schnellen elektrotonischen Signalausbreitung sind auch langsamere Signalausbreitungsmechanismen identifiziert worden. So breitet sich eine lokal induzierte Erhöhung des intrazellulären Calciums in Lungenkapillaren

wellenförmig aus, wodurch die lokalen Antworten vasoaktiver Agonisten möglicherweise moduliert werden [52, 119].

Die Gap Junctions, die solche Prozesse in den glatten Muskelzellen und Endothelzellen der Blutgefäße ermöglichen, bestehen aus den Connexinen 37, 40, 43 und 45 [67, 110]. Obwohl, wie oben bereits erläutert wurde, Gap Junction abhängige Antworten in den Gefäßen offensichtlich eine Rolle spielen, ist überraschenderweise bisher wenig über die Regulation der Permeabilität von Gap Junctions in vaskulären Zellen bekannt. Mögliche Faktoren, die an einer Regulation beteiligt sein könnten, sind vom Endothel selbst gebildete Substanzen, insbesondere die lokalen Gewebshormone (Autakoide).

Seine zentrale Rolle bei der Regulation des Gefäßdurchmessers nimmt das Endothel durch die Freisetzung unterschiedlicher solcher Autakoide wahr, die eine Relaxation oder Konstriktion des benachbart liegenden Gefäßmuskels induzieren. Denn neben den seit längerer Zeit bekannten Funktionen des Endothels, wie dem Abbau von zirkulierenden biogenen Aminen und Bradykinin, der Aktivierung von Angiotensin I zu Angiotensin II, ist das Endothel in der Lage, eine Reihe vasoaktiver Substanzen zu synthetisieren (Übersichten bei Pohl et al. [92] und Furchgott et al. [38]). Diese Autakoide vermitteln nicht nur die endothel-abhängige Vasodilatation, sondern hemmen auch die Thrombozytenaggregation. Aus dieser Gruppe der Gewebshormone sind aus heutiger Sicht die Cyclooxygenaseprodukte, besonders das Prostacyclin (PGI_2) [81], und der „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) am bedeutsamsten. Nach der Erstbeschreibung des EDRF durch Furchgott und Zawadzki [39] konnte von mehreren Autoren gezeigt werden, daß der EDRF mit Stickstoffmonoxid (NO) identisch ist [37, 54, 89]. Die Bildung und Freisetzung des

endothelialen NO kann durch verschiedene Mechanismen stimuliert werden. Einerseits kann die NO-Bildung durch eine Reihe humoraler vasoaktiver Substanzen, wie z. B. Acetylcholin, Serotonin, Histamin, ATP, Bradykinin und Substanz P stimuliert werden [39, 92], andererseits induzieren verschiedene rezeptorunabhängige Stimuli, wie die Einwirkung von Schubspannung [58, 96], der pulsatile Charakter des Blutflusses [93] oder Hypoxie [91] eine Freisetzung von NO. Diese NO-Bildung ist vermittelt über einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in den Endothelzellen und die sich hieraus ergebende Aktivierung der calcium-/calmodulinabhängigen konstitutiven NO-Synthase. Sie synthetisiert aus L-Arginin unter Bildung von Citrullin Stickstoffmonoxid [15, 19, 53, 79, 88, 90]. Neben der calcium-abhängigen Aktivierung der NO-Synthase ist in jüngster Zeit auch eine calcium-unabhängige Stimulation dieses Enzyms aufgezeigt worden [34]. Das entstandene NO diffundiert unter anderem in die glatten Muskelzellen und aktiviert dort intrazellulär die lösliche Guanylatcyclase [85], die Guanosintriphosphat zu cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) umsetzt. Ein Anstieg des cGMP-Spiegels in der Muskelzelle hemmt die Aktivität der Phospholipase C und aktiviert ATP-abhängige Calciumpumpen, wodurch das intrazelluläre Calcium sinkt und eine Dilatation resultiert [98]. Andererseits ist NO auch in der Lage, durch eine Desensitivierung des kontraktilen Apparats ohne eine Änderung des Calciumspiegels eine Relaxation des glatten Gefäßmuskels zu bewirken [13]. Das endotheliale NO hat wegen seiner kontinuierlichen Freisetzung [43] für die Aufrechterhaltung einer adäquaten Organdurchblutung [45], für die Regulation des peripheren Gefäßwiderstandes und hierdurch des systemischen Blutdruckes eine große Bedeutung. Dementsprechend führt die Hemmung der NO-Bildung durch spezifische Hemmstoffe der NO-Synthase, wie z.B. N^o-nitro-L-Arginin (L-NA), zu einer Vasokonstriktion und einem Blutdruckanstieg [94].

Die besondere Wertigkeit des Endothels bei der Regulation des Gefäßtonus und die Ausprägung, mit der diese Zellen untereinander gekoppelt sind, läßt erwarten, daß diese Zellschicht eine besondere Rolle auch bei der Koordination des Gefäßverhaltens einnimmt. Dies wird weiterhin durch die Beobachtung akzentuiert, daß auch Signale aus den Kapillaren, die keine glatten Muskelzellen aufweisen, in den vorgeschalteten Arteriolen zur Änderung des Gefäßdurchmessers führen [28, 104].

Deshalb wurde in dieser Arbeit in kultivierten humanen umbilikalvenösen Endothelzellen die Zellkopplung über Gap Junctions und deren Regulation durch Autakoide untersucht. Dazu wurde die Ausbreitung der anionischen Farbstoffe 5- (und 6-) Carboxyfluorescein mit einer Molekülgröße von 373 Dalton und Calcein mit einer Molekülgröße von 622 Dalton nach Injektion in eine einzelne Endothelzelle eines konfluenten Monolayers beobachtet. Weiterhin wurde studiert, inwieweit die Permeabilität der Gap Junctions durch NO und Prostacyclin moduliert wird. Eine Rolle von NO in der Regulation der Zellkopplung über Gap Junctions wurde bereits in Astrozytenkulturen, die von Ratten gewonnen wurden, nachgewiesen. In diesen Versuchen wurde gezeigt, daß NO die Kopplung der Astrozyten signifikant auf 63,3% des Ausgangswertes, gemessen an der Anzahl fluoreszierender Zellen nach der Scrape loading Technik, reduzierte. Weiterhin wurde in diesen Versuchen gezeigt, daß die durch NO hervorgerufene Reduktion der Zellkopplung über die Bildung von Peroxynitrit und dessen Wirkung vermittelt wird.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Ausbreitung der Farbstoffe in An- und Abwesenheit von NO untersucht, und es wurde versucht, mögliche Mediatoren eines putativen NO-Effekts, zu identifizieren. Da von anderen Zelltypen bekannt ist, daß

der Phosphorylierungsstatus der Connexine deren Permeabilität beeinflusst, wurde außerdem der Effekt von Änderungen der Tyrosin- Phosphorylierung in weiteren Versuchen untersucht. Neben der Rolle von NO wurde in einer weiteren Versuchsreihe der Einfluß von Prostacyclin auf die Ausbreitung des Farbstoffes Carboxyfluorescein untersucht.

In einer Reihe unterschiedlicher Zellen konnte bereits gezeigt werden, daß Prostacyclin einen Einfluß auf die Zellkopplung über Gap Junctions ausübt [18], [23]. Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, ob die Wirkung von Prostacyclin durch die Aktivierung der Adenylatcyclase und die daraus resultierende Bildung seines sekundären Botenstoffs, cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), vermittelt wird. Da sowohl NO als auch Prostacyclin simultan als potente endogene Vasodilatoren kontinuierlich vom Endothel gebildet werden, wurde auch die potentielle Interaktion dieser endothelialen Autakoide auf die Zellkopplung über Gap Junctions in Endothelzellen getestet.

II. Material und Methode

Die Versuche wurden vom Mai 1997 bis Juli 1999 am Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Johannes Gutenberg Universität in Mainz und am Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians Universität in München durchgeführt. Die Nabelschnüre wurden in den Horst Schmidt Kliniken GmbH in Wiesbaden bzw. in der Universitätsfrauenklinik Maistraße München gesammelt und zur Isolierung der Endothelzellen zur Verfügung gestellt. Die Nabelschnurgefäße wurden spätestens nach 24 Stunden weiterverarbeitet.

II.1. Isolierung der Endothelzellen aus der Nabelschnur und Zellkultur

Die hier beschriebene Methode zur Gewinnung und Kultivierung von humanen umbilikalvenösen Endothelzellen (HUVECs) geht auf das ursprünglich von Jaffe und seinen Mitarbeitern angewandte Verfahren zurück [55].

Die abgeschnittenen Venenenden wurden aus der Warthonschen Sulze der Nabelschnüre freipräpariert und mit Knopfsonden kanüliert. Anschließend wurde die Vena umbilicalis mit Hilfe eines aufgesetzten Dreiwegehahnes und einer 50 ml Spritze (Braun) mit 100 ml eines Mg^{2+} - und Ca^{2+} - freien Phosphatpuffers (PBS) durchgespült. Dann wurde das freie Venenende mit einem Kunststoffclip verschlossen und die Venen mit dieser Pufferlösung gefüllt, der zusätzlich Dispase (2.4 U/mL) (Boehringer/Mannheim) zugesetzt wurde. Die so behandelten Nabelschnurvenen wurden 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Um die Ausbeute an Endothelzellen zu erhöhen, ohne sie gleichzeitig mit glatten Muskelzellen zu kontaminieren, wurden die Endothelzellen mechanisch abgelöst,

indem die Nabelschnüre am Ende der Inkubationszeit sanft massiert wurden. Dann wurde das verschlossene Venenende abgeschnitten und die ausfließende Zellsuspension in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Anschließend wurden die Endothelzellen aus der gewonnenen Suspension durch eine Zentrifugation bei 500 g für eine Dauer von 5 Minuten sedimentiert. Nachdem der Überstand abgenommen und verworfen wurde, wurden die im Pellet enthaltenen Zellen in 20 ml Zellmedium wieder aufgenommen (Promocell, Medium 199 1:1 vermischt mit Earles Salzen und mit 10 % Kälberserum supplementiert). Die Suspension wurde erneut zentrifugiert und die Zellen anschließend in 10 ml Nabelschnurmedium mit 20 µg/ml Endothelzellwachstumszusatz (ECGS) und 15 Einheiten Heparin aufgenommen. Nun wurden die so gewonnenen Endothelzellen einer Nabelschnurvene in einer 24 Loch-Kulturschale (Greiner) ausgesät. Nach 72 h wurden die Zellen in Medium 199 (ph 7.4; Sigma Deisenhofen), welches 20 % Kälber Serum, 50 U/L Penicillin und 50 mg/L Streptomycin enthielt, mit Trypsin abgelöst, subkultiviert und schließlich auf autoklavierten, unbeschichteten Glasscheiben mit einem Durchmesser von 30 mm ausgesät. Die Glasscheiben wurden in Petrischalen plaziert, die mit dem o.g. Nabelschnurmedium gefüllt wurden. Für die Untersuchungen wurden Zellen der Passagen 2-5 verwendet.

Die Endothelzellen wurden untersucht, sobald sie zu einem konfluenten Monolayer gewachsen waren. Dies dauerte etwa 3 bis 4 Tage. Die Kultur dieser Zellen erfolgte in einem auf 37°C beheizten Brutschrank, der mit 5% CO₂ und Raumluft begast wurde.

II.2. Versuchsaufbau und Durchführung

Die Glasscheiben mit den darauf gewachsenen endothelialen Monolayern wurden mit einer Pinzette aus den Petrischalen entnommen und auf einen thermostatisierbaren Objektisch eines konfokalen Mikroskopes (LSM 410, Zeiss, Germany) in einer speziellen Aluminiumkammer, die in der Werkstatt des Physiologischen Instituts der Universität Mainz hergestellt worden war, plziert. Die Kammer war aus Aluminium gefertigt, einem Material mit einer hohen Temperaturleitfähigkeit, so daß mit Hilfe des beheizbaren Objektisches die Temperatur in dem die Zellen umgebenden Medium während des gesamten Versuchs auf 37°C gehalten werden konnten. Das Kulturmedium wurde entfernt und in der Kammer durch 2 ml HEPES gepuffertes (15mmol/L) Medium (pH 7.4) ersetzt, welches 20 % Kälberserum, 50 U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, 2 mmol/L Glutamin und 15 mmol/L Pyridoxim enthielt.

Die Mikropipetten zur Zellinjektion wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Hilgenberg, Deutschland) mit einem Außendurchmesser von 1 mm und einem Innendurchmesser von 0.54 mm in drei Zügen mit einem Pipettenpuller (P-97 Flaming-Brown Micropipette Puller, Sutter Instruments Co., USA) gezogen. Die Pipetten wiesen dann eine Spitzenlänge von etwa 4 mm und einen Spitzendurchmesser von 3 µm auf. Die Pipetten wurden entweder mit Carboxyfluorescein- oder Calceinlösung von hinten mit Hilfe einer 2 ml Spritze (Braun) und einer ausgezogenen Pipettenspitze (Eppendorf) gefüllt. Die Spitze der Mikropipette wurde mit Hilfe eines hydraulischen Mikromanipulators (Zeiss) direkt über der zu punktierenden Zelle im konfluenten Monolayer plziert, wobei die Position mittels Durchlichtmikroskopie kontrolliert wurde, und mittels einer Abwärtsbewegung eingestochen (siehe Abbildung 2). In

dieser Position wurde die Pipettenspitze für eine Dauer von 10 Minuten bei einem konstanten Pipettendruck von 30 hPa belassen (siehe Abbildung 2). Innerhalb dieser Zeitspanne konnte der entsprechende fluoreszierende Farbstoff in die penetrierte Zelle einströmen und sich von dieser Zelle ausgehend über die Gap Junctions in die benachbarten Endothelzellen ausbreiten. In jedem Monolayer wurden höchstens drei Zellen injiziert, die sich in einem relativ großen Abstand voneinander befanden, so daß die von den injizierten Zellen ausgehende Farbstoffausbreitung nicht mit der vorherigen Farbstoffausbreitung interferieren konnte.

Abbildung 2:

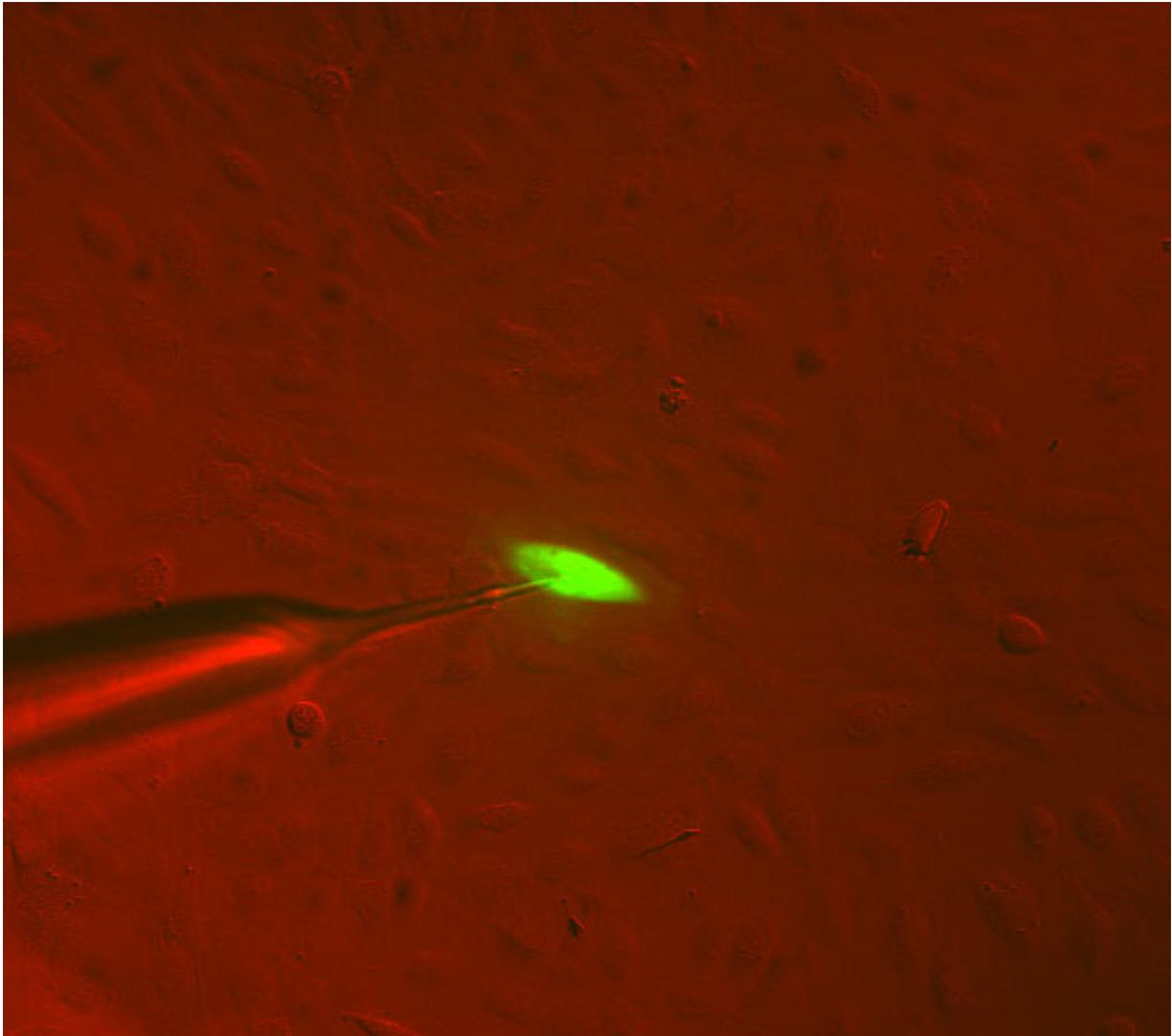


Abb. 2 Technik der Zellinjektion:

Die Abbildung zeigt die Injektion einer einzelnen Endothelzelle eines konfluenten Endothelzellmonolayers. Der injizierte Farbstoff Carboxyfluorescein ist deutlich zu erkennen, da auf der Abbildung sowohl das Transmissionsbild, als auch die emmitierte Fluoreszenz bei 488 nm zu erkennen ist.

Die Farbstoffausbreitung wurde mittels eines konfokalen Mikroskopes (LSM 410, Zeiss), über ein Objektiv mit 20 facher Vergrößerung (Zeiss Fluor), bei einer endgültigen 2000-fachen Vergrößerung auf einem Bildschirm mit einer

Bildschirmgröße von 19 Zoll sichtbar gemacht. Die Farbstoffe Carboxyfluorescein und Calcein wurden bei 488 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 515 nm aufgenommen.

Der Farbstoff wurde direkt nach Injektion und nach weiteren 3, 5 und 10 Minuten angeregt und das entstandene Bild mit der emittierten Fluoreszenz für die spätere Auswertung auf der Festplatte eines Pentium-Computers gespeichert. Zusätzlich wurde bei 633 nm ein konventionelles Transmissionsbild im Durchlichtverfahren aufgenommen, um die einzelnen Zellen besser identifizieren zu können und von möglichem umherschwimmenden Zelldetritus zu unterscheiden. In der späteren Auswertung wurde sowohl die Fläche, die der sich ausbreitende Farbstoff einnahm, als auch die Anzahl der fluoreszierenden Zellen mit Hilfe der zugehörigen Software (Zeiss) von den gespeicherten Bildern bestimmt und die Zahl der fluoreszierenden Zellen für die spätere statistische Datenanalyse protokolliert.

II.3. Versuchsprotokolle

Der Versuchsablauf wurde vor Beginn jedes Versuchs festgelegt und protokolliert. Die Wirkung jeder zu testenden Substanz wurde mindestens in drei verschiedenen Monolayern getestet, die aus zwei unterschiedlichen Nabelschnüren gewonnen wurden. Auch für die entsprechenden Kontrollexperimente standen jeweils mindestens drei verschiedene Monolayer zur Verfügung. Dabei wurden die zu testenden Substanzen dem Kulturmedium in der Aluminiumkammer 15 Minuten vor der ersten Zellinjektion direkt zugegeben, oder die Substanzen wurden bei längeren Inkubationszeiten bereits in das Kulturmedium in den Petrischalen im Brutschrank appliziert.

Um zu prüfen, ob die verwendeten Farbstoffe ausschließlich durch die Mikroinjektion in die Zellen gelangten bzw. nur über Zellverbindungen von einer zur nächsten Zelle weitergegeben wurden und nicht durch die intakte Plasmamembran in die Zelle aufgenommen wurden, wurden einige endotheliale Monolayer für eine Dauer von 30 Minuten mit den Farbstoffen in entsprechender Konzentration im Kulturmedium inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch frisches, farbstofffreies Medium ersetzt. Weiterhin wurden Zellen 3 Stunden vor der ersten Injektion mit einem Peptid (SRPTEKTVFTV) inkubiert (50 $\mu\text{mol/L}$), das sich aufgrund seiner Molekülstruktur komplementär an die erste extrazelluläre Schleife des Connexinproteins legt und so die funktionelle Kopplung der Connexone benachbarter Endothelzellen verhindert.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Ausbreitung des injizierten Farbstoffes Carboxyfluorescein in unbehandelten Zellen mit derjenigen in Zellen verglichen, die

mit dem spezifischen Hemmstoff der NO-Synthase N^ω-nitro-L-arginin (L-NA, 30 μmol/L, 30 Minuten) behandelt waren. Alle weiteren Experimente wurden in Zellen durchgeführt, die mit L-NA behandelt worden waren. Nach Inkubation mit L-NA (30 μmol, 30 Minuten) wurde der Effekt von NO durch die Zugabe der NO-Donoren S-nitroso-N-acetyl-D,L-pencillamin (SNAP, 1 μmol/L) oder Natrium-Nitroprussid (SNP, 1 μmol/L) untersucht. Diese Zugabe der NO-Donoren zum Zellmedium erfolgte 15 Minuten vor der ersten Injektion. Um die Reversibilität der Wirkung von NO zu prüfen, wurde die Ausbreitung des Farbstoffes 15 Minuten nach dem Auswaschen des jeweiligen NO-Donors untersucht. Hierbei wurden die Zellen, wie in den vorherigen Versuchen auch, für eine Zeitdauer von 30 Minuten mit L-NA und im Anschluß daran für 15 Minuten mit SNAP oder SNP behandelt. In einem zweiten Versuchsansatz wurde die Reversibilität überprüft, indem das Substrat der NO-Synthase, L-Arginin (3 mmol/L) für eine Dauer von 15 Minuten vor der Injektion zugesetzt wurde.

In weiteren Versuchen wurde potentielle Effekt bekannter Mediatoren der NO Wirkung, cGMP und ONOO⁻ analysiert. Da ONOO⁻ bei der Interaktion von NO mit dem Radikal O₂⁻ entsteht, wurde die Wirkung des Radikalfängers Tiron (10 mmol/L, 15 Minuten) oder der Superoxiddismutase (SOD 500 U/mL, 15 Minuten) untersucht. Dabei wurde die Ausbreitung des injizierten Farbstoffes in Zellen, die nur mit L-NA vorbehandelt worden waren, verglichen mit der Ausbreitung in Zellen, welche vor Zugabe der NO-Donoren mit SOD oder Tiron behandelt worden waren. Außerdem wurde die Wirkung des NO in Anwesenheit des Hemmstoffes der löslichen Guanylatcyclase 1-H-[1,2,4]-oxadiazole-[4,3-a]-quinoxalin-1-one (ODQ, 10 μmol/L, 30 Minuten), die unter Einwirkung von NO vermehrt cGMP bildet, untersucht. Bei diesem Versuch wurde die Farbstoffausbreitung in L-NA behandelten Zellen, mit der

Ausbreitung in Zellen verglichen, die vor der Applikation von SNAP zusätzlich mit dem Hemmstoff der löslichen Guanylatcyclase ODQ inkubiert worden waren.

Um zu prüfen, inwieweit eine mögliche Wirkung von NO durch einen Einfluß auf den Transport der Connexinproteine vom endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran bedingt war, wurden Zellen untersucht, die mit Brefeldin A (90 mg/mL) für 90 Minuten behandelt worden waren. Diese Substanz, die den Golgi-Apparat zerstört, blockiert somit den Neueinbau von Connexinproteinen in die Plasmamembran.

In weiteren Versuchen wurde untersucht, inwieweit der Effekt von NO über eine Wirkung auf den Phosphorylierungsstatus der Connexine vermittelt wird. Dazu wurde die Ausbreitung des injizierten Farbstoffes in L-NA vorbehandelten Zellen mit der Farbstoffausbreitung in Zellen verglichen, die nach der Inhibition der NO-Synthase zusätzlich mit den Hemmstoffen von Tyrosin-Phosphatasen, Orthovanadat (10 µmol/L) oder Phenylarsinoxid (PAO, 1 µmol/L) für 30 Minuten behandelt wurden. Um die Wirkung von NO unter diesen Bedingungen zu untersuchen, wurden andere Zellen nach Hemmung der NO-Synthase und Tyrosin-Phosphatase beobachtet, nachdem diese Zellen zusätzlich mit dem NO-Donor SNAP inkubiert wurden. Umgekehrt wurde auch der Einfluß der Hemmung von Tyrosin-Kinasen (Genistein 100 µmol/L, 15 Minuten) auf die durch NO hervorgerufene Wirkung bezüglich der endothelialen Kopplung untersucht. Die Farbstoffausbreitung nach Inkubation mit Genistein wurde mit derjenigen verglichen, die nach zusätzlicher Applikation von SNAP (1µmol, 15 Minuten) beobachtet werden konnte.

Weiterhin wurde die Wirkung einer Hyperpolarisation der Endothelzellen induziert durch den Aktivator von K^+_{ATP} - Kanälen HOE234 (1 μ mol/L, 15 Minuten) auf die endotheliale Zellkopplung untersucht. Dabei wurde die Ausbreitung des injizierten Farbstoffes in unbehandelten Zellen mit derjenigen verglichen, die in Zellen nach Applikation von HOE234 festgestellt wurde.

Tabelle 2: Applikation der Testsubstanzen in den unterschiedlichen Versuchsgruppen.

Versuchsziel	Kontrolle	Behandlung 1	Behandlung 2
Basal produz. NO	Unbehandelt	L-NA (30)	+ L-Arginin (3000)
Freigesetztes NO	L-NA (30)	+ SNAP (1)	Auswaschen
	L-NA (30)	+ SNP (1)	
Mediator cGMP	L-NA (30)	+ ODQ (10) + SNAP (1)	
Mediator Peroxynitrit	L-NA (30)	+ TIRON (10000) + SNAP (1)	
	L-NA (30)	+ SOD (500 U/mL) + SNAP (1)	
Connexineinbau	L-NA (30) + Brefeldin A (90 mg/mL)	+ SNAP (1)	
Hyperpolarisation	Unbehandelt	HOE234 (1)	
Tyrosinphosphorylierung	L-NA (30)	+ Orthovanadat (10)	+ SNAP (1)
	L-NA (30)	+ PAO (1)	+ SNAP (1)
Tyrosinphosphorylierung	L-NA (30)	+ Genistein (100)	

Die Tabelle gibt die unterschiedlichen Versuchsgruppen an. Alle Konzentrationsangaben in Klammern sind, soweit nicht anders angegeben, in $\mu\text{mol/L}$. Weitere Erläuterungen siehe Text.

In der zweiten Versuchsreihe wurde der Einfluß von Prostacyclin auf die Kopplung der Endothelzellen untersucht. Dazu wurden die Monolayer mit dem Hemmstoff der Cyclooxygenase Indometacin (30 µmol, 30 Minuten) inkubiert. Die Ausbreitung des Farbstoffes Carboxyfluorescein in diesen Zellen wurde mit der Farbstoffausbreitung in Zellen verglichen, denen das Prostacyclin Analogon Iloprost (1 µmol/L, 15 Minuten), oder der Aktivator der Adenylatcyclase Forskolin (60 µmol/L, 15 Minuten) zugesetzt wurde. In der letzten Versuchsreihe wurde schließlich untersucht, welchen Einfluß die gemeinsame Applikation von NO und Prostacyclin auf die Kopplung der Endothelzellen hervorruft. Dazu wurden die zu untersuchenden Monolayer sowohl mit L-NA (30 µmol/l, 30 Minuten) als auch mit Indometacin (30 µmol/l, 30 Minuten) vorbehandelt. Diese Zellen wurden mit Zellen verglichen, denen zusätzlich Iloprost (1 µmol/L) oder Iloprost (1 µmol/l, 15 Minuten) und zugleich SNAP (1µmol/L, 15 Minuten) zugegeben wurde.

Da es nicht möglich war, den Einfluß der unterschiedlichen Testsubstanzen in dem selben endothelialen Monolayer zu untersuchen, wurden die Kontrollversuche und die Versuche mit der jeweiligen Testsubstanz am gleichen Versuchstag durchgeführt. Dazu wurden Monolayer verwendet, die aus derselben Nabelschnur kultiviert wurden und unter Kontrollbedingungen die gleiche Anzahl gekoppelter Zellen aufwiesen. Der Einfluß der verschiedenen Testsubstanzen wurde mindestens in zwei unabhängigen d. h. aus unterschiedlichen Nabelschnüren gewonnenen Zellkulturen, untersucht.

II.4. Lösungen und Substanzen

Der verwendete HEPES Puffer war wie folgt zusammengesetzt (Konzentrationen in mmol/L): HEPES (2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonic acid) 10, NaCl 144, KCl 4, CaCl₂ 1.6, MgCl₂ 1, NaH₂PO₄ 0.4 und Glukose 10. Der pH-Wert wurde durch Titration mit 1mol/L NaOH auf 7.4 eingestellt. Der verwendete Phosphatpuffer (PBS) enthielt 150 mM Natriumphosphat; NaCl 150 mM, ph Wert 7.2±0.1 bei 25°C. Alle Testsubstanzen und Lösungen wurden mit Ausnahme von HOE 234 (Hoechst, Frankfurt, Deutschland), Carboxyfluorescein und Calcein (Molecular Probes, USA) und SRPTEKTVFTV (synthetisiert im Biochemischen Institut der Universität Mainz, Leitung Prof. Dr. med. Müller-Esterl) von SIGMA (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. SNAP (10mmol/L) wurde in PBS gelöst, während ODQ (10 mmol/L), PAO (10 mmol/L) und Genistein (100 mmol/L) in DMSO gelöst wurden. Die Stammlösungen dieser Substanzen wurden bei - 20 °C bis zum Gebrauch eingefroren und mit HEPES Puffer verdünnt. L-NA, L-Arginin, SNP, HOE234 und SRPTEKTVFTV wurden am Tag des Versuchs frisch gelöst. L-NA wurde durch Erhitzen bei einer konstanten Temperatur von 60°C für die Dauer von 30 Minuten in HEPES-Puffer in Lösung gebracht und SNP (10mmol/L) in 1 mmol/L Natriumacetat gelöst. Während des Versuchs wurden SNP und SNAP in abgedunkelten Behältern aufbewahrt, da diese Substanzen unter Lichteinfluß schnell zerfallen. HOE234 (1 mmol/L) wurde in Ethanol gelöst, L-Arginin und SRPTEKTVFTV in PBS .

Alle Lösungen und Substanzen wurden vor jedem Versuch frisch angesetzt bzw. auf ihre Endkonzentrationen verdünnt und bei 4°C aufbewahrt. Die Kontrollgruppen wurden mit dem jeweiligen Lösungsmittel in entsprechender Konzentration behandelt.

II.5. Verwendete Computerprogramme

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Computerprogramm STATA[®] (Stata Corporation, College Station, Texas, USA). Die gezeigten Graphen wurden mit dem Programm SigmaPlot[®] (SPSS Science, Chicago, Illinois, USA) erstellt. Zur Textverarbeitung wurde Microsoft Word[®] (Microsoft GmbH, Frankfurt) verwendet. Die Literaturdatenbank wurde mit Hilfe des Reference Manager[®] (Research Information Systems, Berkeley, California, USA) erstellt. Zur Auswertung nach der Injektion wurde die Zeiss[®] Software verwendet.

II.6. Berechnungen und Statistik

Mit Ausnahme der 0, 3, 5 und 10 Minuten Werte unter SNP (Abbildung 5), wurde jeweils die Anzahl der fluoreszierenden Zellen 10 Minuten nach Injektion ausgewertet.

Vergleiche zwischen den Gruppen wurden unter Verwendung des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis Tests für ungepaarte Werte durchgeführt, da die erhobenen Daten nicht in allen Gruppen normal verteilt waren. Außerdem variierte die Anzahl der fluoreszierenden Zellen in Kulturen, die aus unterschiedlichen Nabelschnüren kultiviert wurden, unter Kontrollbedingungen um den Faktor 3. Unterschiede wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 5 % ($p < 0.05$) als signifikant betrachtet.

Obwohl der nicht-parametrische Kruskal-Wallis Test angewendet wurde, werden alle Werte als Mittelwerte \pm S.E.M. angegeben. Der Buchstabe n steht für die Anzahl der Injektionen, außerdem angegeben ist die Anzahl der verwendeten endothelialen Monolayer.

III. Ergebnisse

III. 1. Farbstoffausbreitung in den endothelialen Monolayern

Es wurden insgesamt 484 Injektionen in 190 Monolayern durchgeführt. Hiervon führten 132 Injektionen in 42 Monolayern zu Zellschäden, so daß die Ergebnisse nicht zur Auswertung herangezogen werden konnten. Ausgewertet werden konnten so 352 Injektionen in 148 endothelialen Monolayern, bei denen der Farbstoff Carboxyfluorescein zur Mikroinjektion verwendet wurde. In einer weiteren Versuchsserie mit einem anderen Farbstoff (Calcein) wurden 24 Zellinjektionen in 12 endothelialen Monolayern durchgeführt.

Die Abbildung 3 zeigt ein repräsentatives Beispiel für die Farbstoffausbreitung von Carboxyfluorescein in einem konfluenten endothelialen Monolayer. Der Farbstoff wurde in eine einzelne Endothelzelle injiziert. In den folgenden 10 Minuten breitete sich der Farbstoff in die benachbarten Zellen aus.

Abbildung 3:

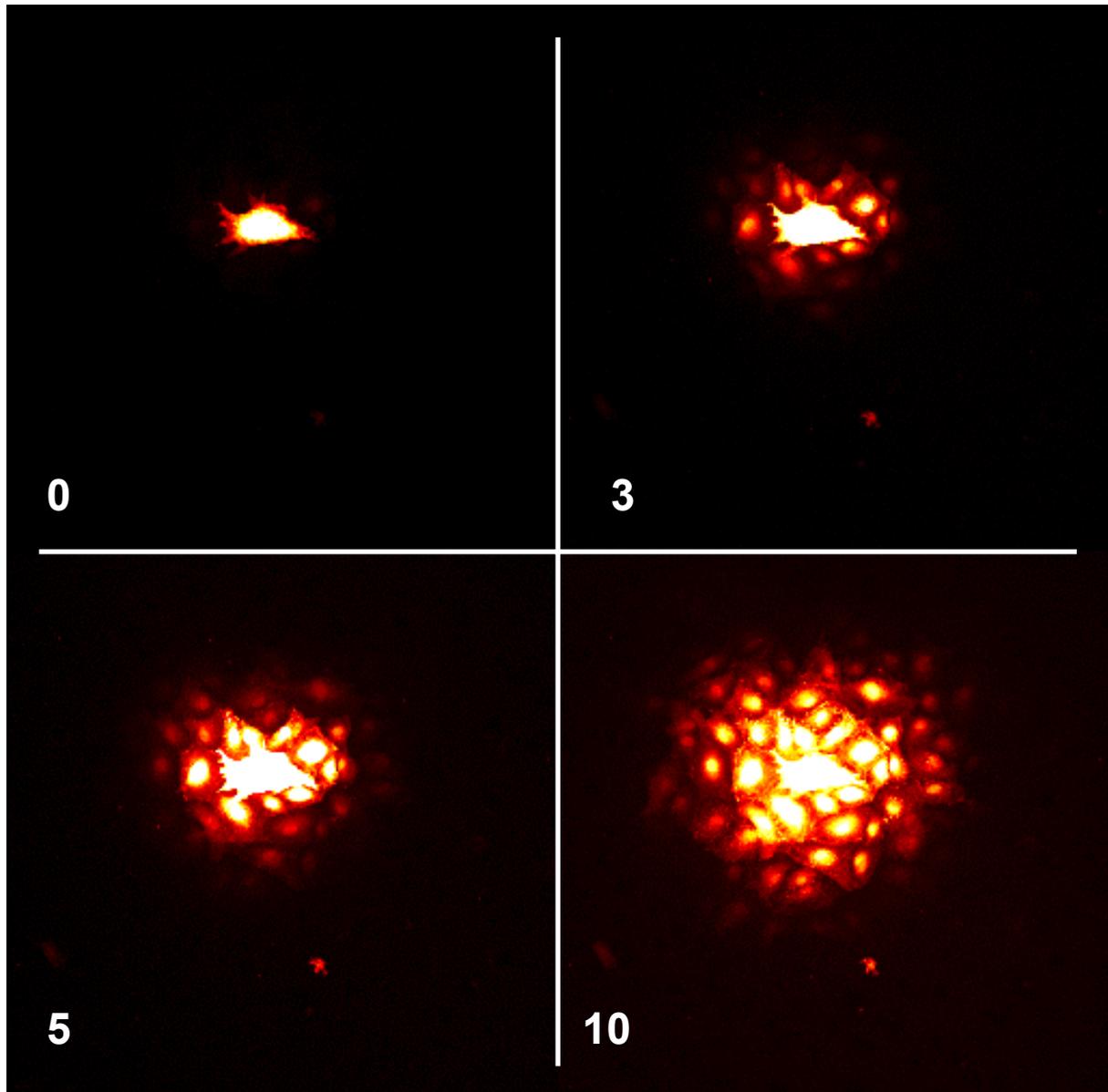


Abb. 3: Ausbreitung von Carboxyfluorescein in einem endothelialen Monolayer

Die Bilder zeigen die Ausbreitung des Farbstoffes Carboxyfluorescein, der in eine einzelne Endothelzelle injiziert wurde. Der Farbstoff breitete sich in die benachbarten Endothelzellen aus. Dargestellt sind jeweils die fluoreszierenden Zellen kurz nach der Injektion (0) und nach 3, 5 bzw. 10 Minuten.

Die Ausbreitung des Farbstoffes war proportional zur abgewarteten Zeit, nur gegen Ende der Beobachtungszeit flachte diese Kurve leicht ab (Abbildung 5). Die Zahl der fluoreszierenden Zellen 10 Minuten nach Injektion lag in allen Versuchen mit Carboxyfluorescein bei einem Mittelwert von 52 ± 3.1 Zellen. Wurde statt Carboxyfluorescein ein anderer Farbstoff (Calcein) verwendet, so waren nach 10 Minuten 65 ± 2.6 Zellen mit diesem Farbstoff angefärbt.

Um zu prüfen, ob der Farbstoff auch direkt über die intakte Plasmamembran in die Endothelzellen aufgenommen wird, wurde Carboxyfluorescein oder Calcein in der gleichen Konzentration, wie es für die Injektionen verwendet wurde, direkt in das die Zellen umgebene Medium gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Nach Austausch des Mediums nach dieser Inkubationszeit konnten weder bei Carboxyfluorescein noch bei Calcein fluoreszierende Zellen gefunden werden.

In einem anderen Versuchsansatz wurde geprüft, ob die Weitergabe des Farbstoffes abhängig ist von der Zellkopplung über Gap Junctions. Hierzu wurden die Monolayer für 180 Minuten mit einem Peptid der Sequenz SRPTEKTVFTV in einer Konzentration von $50 \mu\text{mol/L}$ inkubiert. Dieses Peptid lagert sich aufgrund seiner Aminosäurestruktur komplementär in die zweite extrazelluläre Schleife des Connexins ein und verhindert so die Kopplung neu gebildeter Connexone benachbarter Endothelzellen [21, 113]. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Kopplung in diesen Zellen untersucht. In der verwendeten Konzentration (ED50) reduzierte das Peptid die Anzahl der fluoreszierenden Zellen um $37 \pm 2 \%$ ($n=12$ in 8 Monolayern, Abbildung 4).

Abbildung 4:

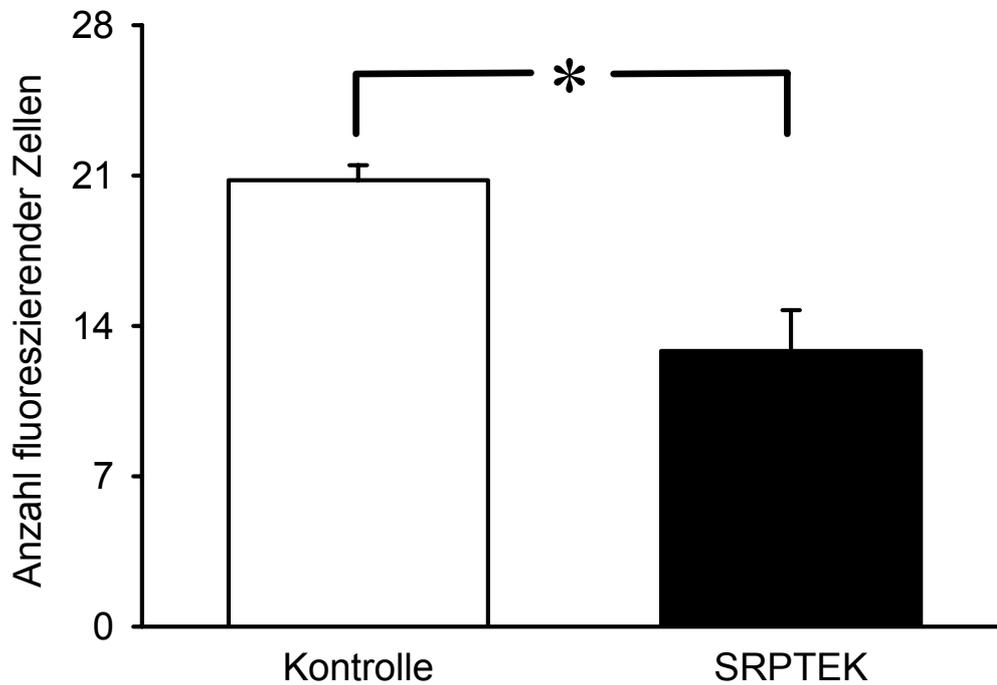


Abb. 4: Hemmung der Kopplung via Gap Junctions

In unbehandelten Kontrollzellen konnten 10 Minuten nach Injektion des Farbstoffes Carboxyfluorescein in eine einzelne Endothelzelle 21 ± 0.7 fluoreszierende Zellen nachgewiesen werden. Das Peptid SRPTEKTVFTV führte zu einer signifikanten Reduktion dieser Farbstoffausbreitung nach einer Inkubationszeit von 180 Minuten. Es senkte die Anzahl der fluoreszierenden Zellen signifikant um 38%, $p < 0.05$ vs. Kontrolle.

III.2. Einfluß von NO auf die Farbstoffausbreitung

Um den Einfluß des endogen gebildeten NO auf die Zellkopplung zu untersuchen, wurden Endothelzellen mit dem spezifischen Hemmstoff der NO-Synthase L-NA (30 $\mu\text{mol/L}$) für 30 Minuten inkubiert. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe fand sich nach Hemmung der NO-Synthase eine deutliche Zunahme der Farbstoffausbreitung. Dieser Anstieg der Farbstoffausbreitung war bereits 3 Minuten nach der Injektion der einzelnen Zelle zu beobachten und blieb während des gesamten untersuchten Zeitraums bestehen (Abb. 5). Die erneute exogene Zufuhr von NO zu solchen mit L-NA vorbehandelten Zellen durch die Zugabe des NO-Donor SNP (1 $\mu\text{mol/L}$) führte zu einer signifikanten Reduktion der Farbstoffausbreitung (Abb. 5). Hierbei reduzierte diese verwendete Konzentration von SNP die Anzahl der fluoreszierenden Zellen unter das Ausgangsniveau der Kontrolle (Abb. 5).

In einer anderen Versuchsgruppe wurde ein anderer NO-Donor, SNAP, in der Konzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ verwendet. Auch in dieser Serie führte die Hemmung der endogenen NO-Bildung mit L-NA zu einer Zunahme der Farbstoffausbreitung um 14% wie in der mit SNP behandelten Gruppe. Ebenso wie SNP verminderte SNAP die Zahl der fluoreszierenden Zellen um 40% und somit unter das Niveau, das in den hierzu untersuchten Kontrollzellen gefunden wurde siehe Abbildung 6.

Um zu prüfen, ob dieser NO Effekt auf den Farbstoff Carboxyfluorescein beschränkt war, wurde die NO-Wirkung auf die Zellkopplung mit einem anderen Farbstoff, Calcein, geprüft. Auch die Ausbreitung des Farbstoffes Calcein in den Endothelzellen, die mit L-NA vorbehandelt worden waren, wurde durch SNAP in

ähnlicher Weise (von 78.9 ± 2.7 auf 57.8 ± 3.9 Zellen, $p < 0.05$; $n=8$ in 4 Monolayern pro Gruppe) reduziert.

Schließlich sollte geklärt werden, ob der NO Effekt reversibel ist. Dazu wurde die Farbstoffausbreitung in mit L-NA vorbehandelten Zellen vor und 15 Minuten nach dem Auswaschen von SNAP miteinander verglichen. Dabei war die Farbstoffausbreitung von Carboxyfluorescein vor der Zugabe von SNAP nicht signifikant unterschiedlich zu der Ausbreitung nach dem Auswaschen von SNAP (55.5 ± 1.0 vergl. 57.8 ± 1.6 gefärbte Zellen, $p=0.32$, $n= 8$ in 3 Monolayern pro Gruppe), siehe Abbildung 7.

Da die exogene Zufuhr von NO durch die verwendeten NO-Donoren die Zellkopplung nachweislich reduzierte, sollte geklärt werden, ob die Wiederherstellung der endogenen NO-Produktion einen ähnlichen Effekt hat. Hierzu wurde nach der Hemmung der endogenen NO-Synthese durch L-NA das Substrat der NO-Synthase, L-Arginin, im Überschuß (3 mmol/L) hinzugegeben. Diese Zugabe von L-Arginin verminderte genau wie die exogene Zufuhr von NO die Ausbreitung des Farbstoffes Carboxyfluorescein signifikant: Kontrolle 24.8 ± 1.1 , L-NA 31.2 ± 0.9 , L-NA + L-Arginin 21.6 ± 0.8 , $n=4$ in 6 Monolayern $p < 0.05$.

Abbildung 5:

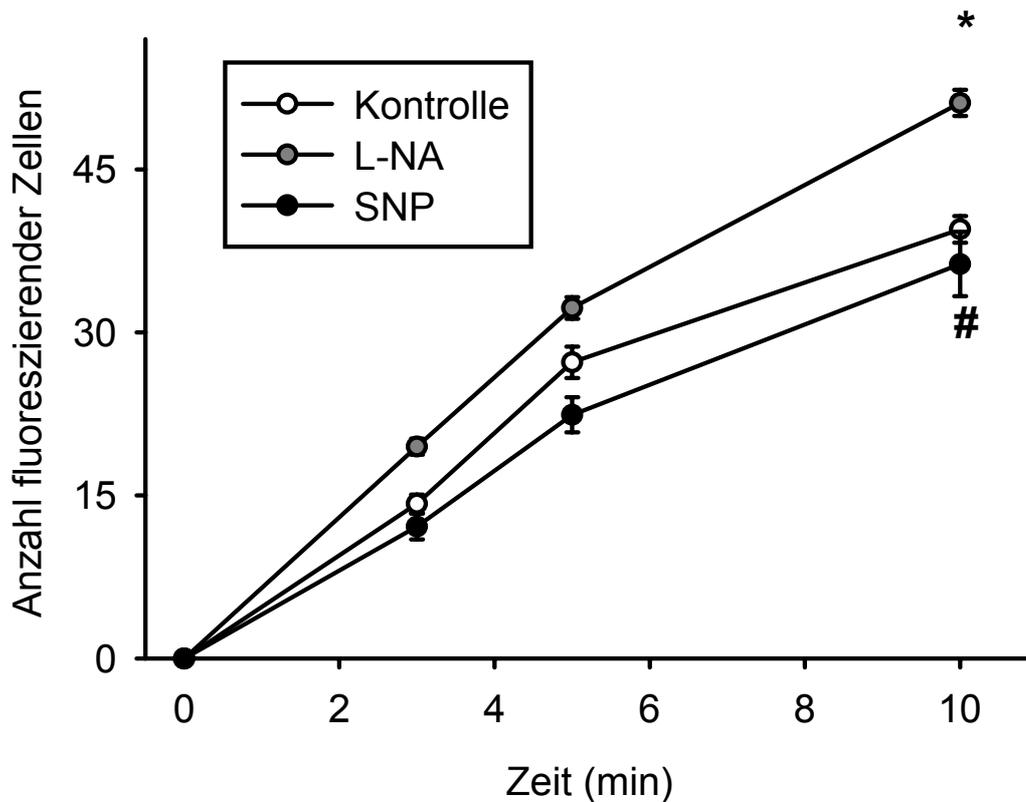


Abb. 5: Endogenes und exogenes NO reduziert die endotheliale Zellkopplung

Die Zahl der fluoreszierenden Zellen stieg linear mit der Zeitdauer bis zu einer Zeit von 5 Minuten nach Injektion einer einzelnen Endothelzelle. Im Zeitraum zwischen 5 –10 Minuten flachte der Anstieg der Kurve etwas ab. Die Ausbreitung des Farbstoffes war nach Hemmung der endotheliale NO-Synthase durch L-NA zu allen Zeitpunkten signifikant gesteigert. Wurde nun NO substituiert (SNP), verminderte sich die Farbstoffausbreitung wieder. Jede Behandlungsgruppe repräsentiert die Ergebnisse von 8 Zellinjektionen in 3 verschiedenen endothelialen Monolayern. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. * $p < 0.05$ vs. Kontrolle. # $p < 0.05$ vs. L-NA.

Abbildung 6:

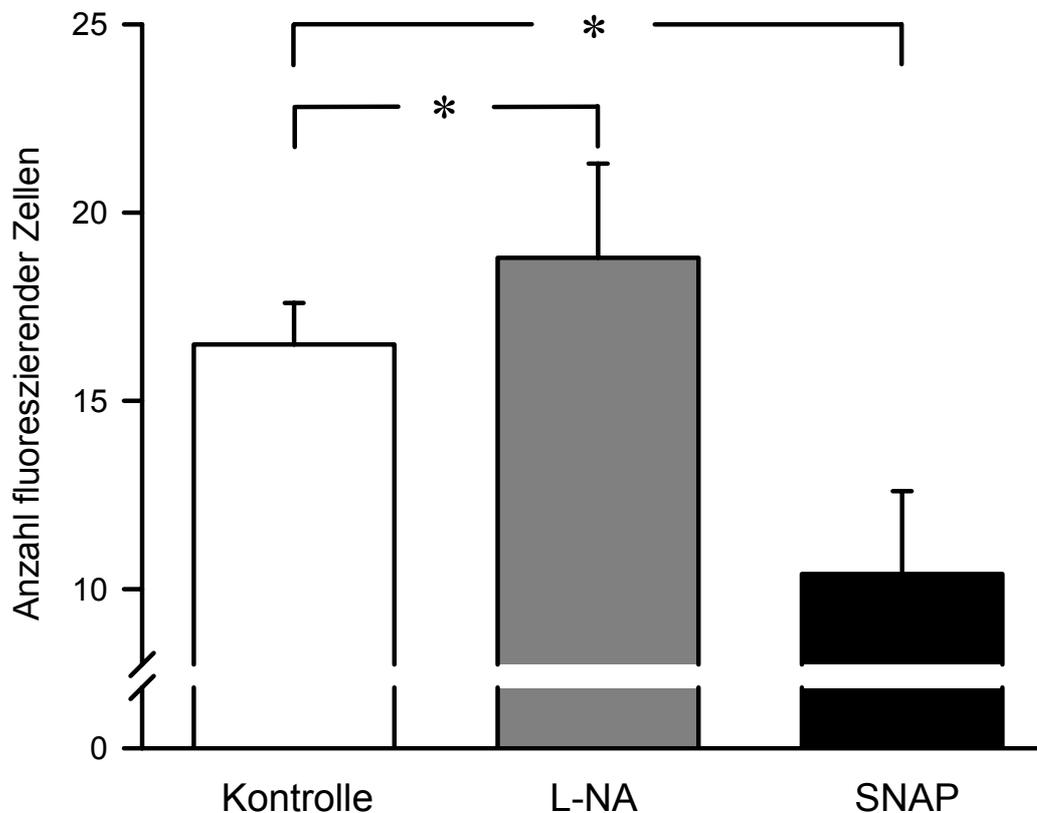


Abb. 6 Auch die Zugabe des NO-Donors SNAP reduzierte die Farbstoffausbreitung

*Die Ausbreitung des Farbstoffes Carboxyfluorescein stieg in den Zellen, die mit L-NA behandelt worden waren, 10 Minuten nach Injektion im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen signifikant an. Erneute Zugabe von NO, in diesem Versuch durch den NO Donor SNAP, reduzierte die Farbstoffausbreitung unter das Ausgangsniveau der Kontrollzellen, * $p < 0.05$ vs. Kontrolle.*

Abbildung 7:

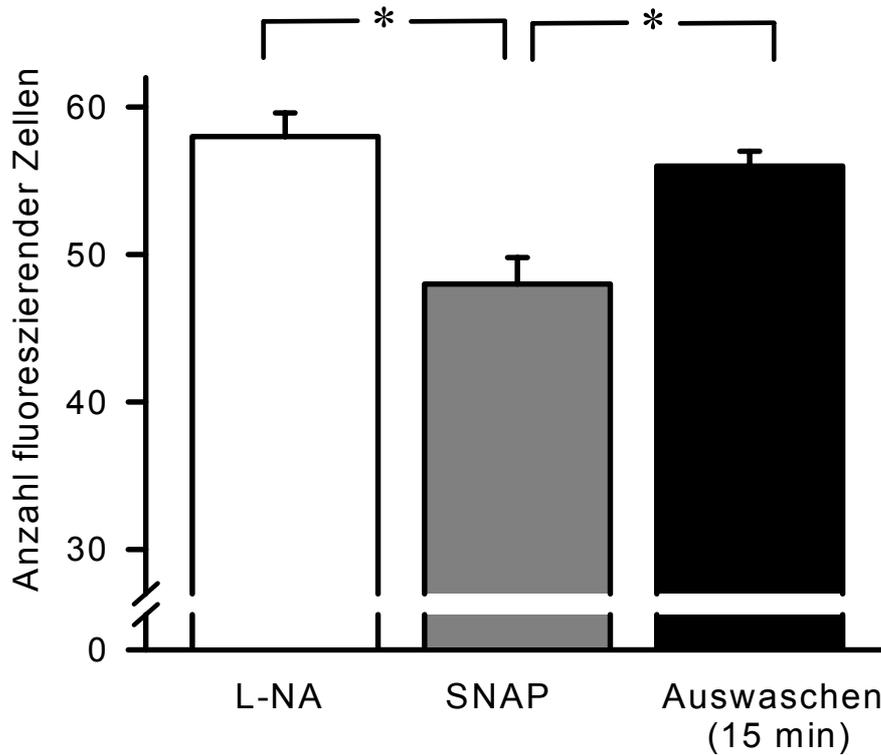


Abb. 7: Die Wirkung von NO ist reversibel

Die Farbstoffausbreitung in mit L-NA vorbehandelten Zellen wurde vor und 15 Minuten nach dem Auswaschen von SNAP miteinander verglichen. Dabei war die Farbstoffausbreitung von Carboxyfluorescein vor der Zugabe von SNAP nicht signifikant unterschiedlich zu der Ausbreitung nach dem Auswaschen von SNAP (55.5 ± 1.0 vergl. 57.8 ± 1.6 gefärbte Zellen, $p=0.32$, $n= 8$ in 3 Monolayern pro Gruppe).

III.2.1. Der NO Effekt ist cGMP- unabhängig

Um zu untersuchen, ob die von NO induzierte Wirkung durch den sekundären Botenstoff cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) vermittelt wird, wurden die mit L-NA vorbehandelten Zellen zusätzlich mit dem Hemmstoff der löslichen Guanylatcyclase ODQ in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$ für 30 Minuten inkubiert. Diese Konzentration hemmt die cGMP Bildung effektiv [41, 48]. Auch in Anwesenheit von ODQ reduzierte SNAP die Anzahl der fluoreszierenden Zellen in einem ähnlichem Ausmaß (ohne ODQ 29.6 %, mit ODQ 29.8%, siehe Abbildung 8).

Abbildung 8

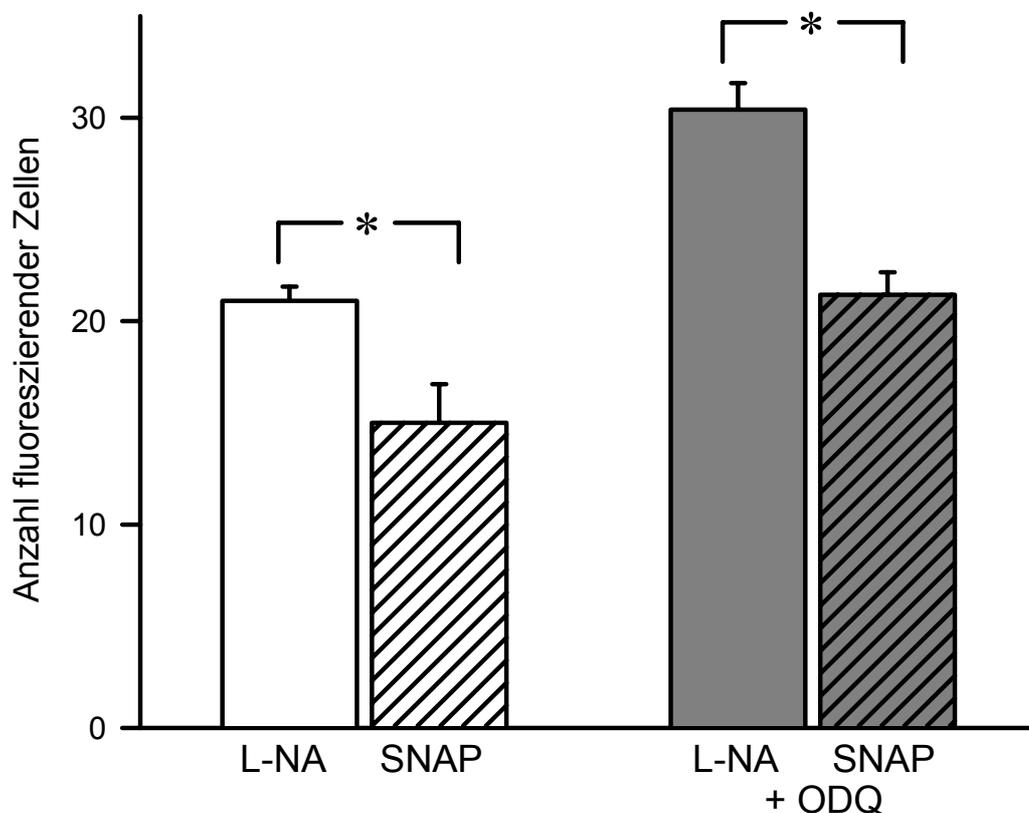


Abb. 8: Die Anwesenheit von ODQ hat keinen Einfluß auf die Wirkung von SNAP

*Der NO-Donor SNAP reduzierte in L-NA vorbehandelten Zellen die Ausbreitung des Farbstoffes Carboxyfluorescein in den endothelialen Monolayern sowohl in Abwesenheit (links), als auch in Anwesenheit des Hemmstoffes der löslichen Guanylatcyclase (ODQ). Obwohl in den jeweiligen mit L-NA behandelten Zellen das Ausmaß der Zellkopplung unterschiedlich war, blieb das Ausmaß der Hemmung unbeeinflusst (n=14 in 4 Monolayern in jeder Gruppe, * p<0.05 vs. L-NA).*

III. 2.2. Die Wirkung von NO ist nicht über die Bildung von Peroxynitrit vermittelt

NO kann mit Superoxidanionen reagieren. Hierbei entsteht Peroxynitrit, welches die Wirkung von NO auf die Permeabilität der Gap Junctions vermitteln könnte. Um die Bildung von Peroxynitrit zu minimieren, wurde der intrazelluläre Radikalfänger Tiron in einer Konzentration von 10 mmol/L 15 Minuten vor der Zugabe von SNAP appliziert. Obwohl dieser Radikalfänger in ausreichender Konzentration vorhanden war, führte die Zugabe von NO weiterhin zu einer signifikanten Reduktion der Farbstoffausbreitung um 33 % (Abb. 9). In gleicher Weise hatte die Zugabe von Superoxiddismutase (500 U/ml), die extrazelluläre Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid umsetzt, keinen Einfluß auf die durch SNAP hervorgerufene Reduktion der endothelialen Kopplung. SNAP verminderte die Farbstoffausbreitung auch bei dieser zusätzlichen Behandlung um 29.8% (Abb. 9).

Abbildung 9:

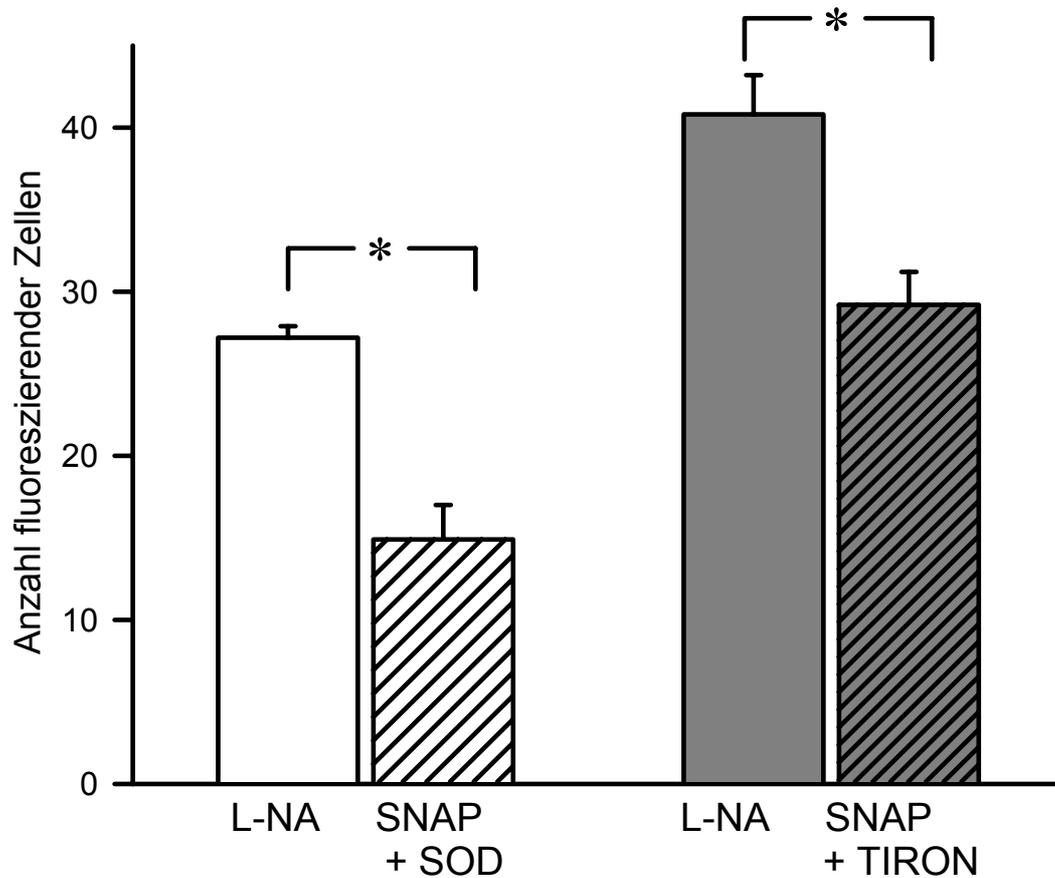


Abb. 9: Radikalfänger haben keinen Einfluß auf die durch SNAP induzierte Hemmung der endothelialen Kopplung

Weder die Behandlung mit der Superoxiddismutase (500 U/mL, n=13 in 5 Monolayern) links, noch die Anwesenheit von Tiron (10 mmol/L, n=6 in 3 Monolayern) rechts beeinflusste die Hemmung der Kopplung via Gap Junctions durch SNAP. * $p < 0.05$ vs Kontrolle. Alle Versuche wurden in L-NA (30 $\mu\text{mol/L}$) behandelten Zellen durchgeführt.

III. 2.3. Hyperpolarisation hat keinen Einfluß auf die Farbstoffausbreitung

Es ist bekannt, daß NO durch eine direkte Aktivierung von Kalium-Kanälen eine Hyperpolarisation hervorrufen kann [12]. Weiterhin ist in Endothelzellen gezeigt worden, daß eine Hyperpolarisation, die durch Bradykinin hervorgerufen werden kann, in Endothelzellen die Farbstoffausbreitung, als Parameter der endothelialen Zellkopplung, reduziert [9]. Deshalb wurde untersucht, ob die Farbstoffausbreitung durch eine Hyperpolarisation der Endothelzellen beeinflusst wird. Dazu wurden Zellen untersucht, die mit dem K^+_{ATP} -Kanal Aktivators HOE234 (1 $\mu\text{mol/L}$) behandelt wurden, welcher eine signifikante Hyperpolarisation hervorruft [66], die in humanen Endothelzellen unter identischen Kulturbedingungen 13.5 ± 3.6 mV betrug {Keller nichtveröffentlichte Daten}. Dennoch ließ dieselbe Konzentration von HOE234, mit der die Zellen für 30 Minuten inkubiert wurden, die Kopplung der Endothelzellen nach Vorbehandlung mit L-NA unbeeinflusst. In ausschließlich mit L-NA behandelten Zellen waren 10 Minuten nach Injektion 54.0 ± 2.6 Zellen angefärbt und in zusätzlich mit HOE234 behandelten Monolayern 55.3 ± 1.5 Zellen ($n= 11$ in 5 Monolayern, $p= 0.36$).

III. 2.4. Brefeldin A

Es wurde diskutiert, daß NO möglicherweise die SH Gruppen abhängige Prozessierung der Connexinproteine im Golgi Apparat [65] und / oder den Transport der Connexine zur Zellmembran beeinflusst. Deshalb wurden die hemmenden Einflüsse von SNAP auf die endotheliale Kopplung untersucht, nachdem die Zellen mit Brefeldin A (90 $\mu\text{g/ml}$, 90 Minuten) vorbehandelt worden waren, welches den

Golgi Apparat reversibel inaktiviert [69]. Unter diesen Bedingungen reduzierte SNAP immer noch die Anzahl der fluoreszierenden Zellen von 31.2 ± 1.6 auf 23.4 ± 2.1 Zellen ($n=8$ in 4 Monolayern pro Gruppe, $p<0.05$). Dies weist daraufhin, daß der NO Effekt nicht auf einen verminderten Einbau der Connexine in die Membran zurückzuführen ist oder eine Änderung der posttranslationalen Modifikation hervorruft.

III. 3. Effekt der Änderung des Phosphorylierungsstatus der Aminosäure Tyrosin

Da die Leitfähigkeit von Connexin-Kanälen u. a. durch die Phosphorylierung der Aminosäure Tyrosin beeinflusst wird, wurde die Modulation des Phosphorylierungsstatus durch Inkubation mit Hemmstoffen der Tyrosinkinase bzw. -phosphatase und dessen Effekt auf die Zellkopplung untersucht. Alle diese Versuche wurden in Anwesenheit des Hemmstoffes der NO-Synthase L-NA durchgeführt. Die Inkubation der Zellen mit dem Hemmstoff der Tyrosinkinase Genistein in einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/L}$ für eine Dauer von 30 Minuten reduzierte die Anzahl der fluoreszierenden Zellen 10 Minuten nach Injektion signifikant (von 61.1 ± 1.5 auf 52.4 ± 2.4 ; $n=12$ in 7 Monolayern, siehe Abbildung 11). Der hemmende Effekt durch Genistein lag in einer ähnlichen Größenordnung wie derjenige nach exogener Zufuhr von NO. Die Zugabe des Tyrosinphosphatase Hemmstoffes Orthovanadat ($100 \mu\text{mol/L}$) konnte die Wirkung von NO vollständig aufheben, siehe Abbildung 10. Phenylarsinoxid, ein anderer, chemisch differenter Tyrosinphosphatase-Hemmstoff ($1 \mu\text{mol/L}$), verhinderte ebenfalls die durch NO hervorgerufene Wirkung auf die endotheliale Kopplung (Abb. 10). Beide Substanzen hatten, wenn sie lediglich auf mit

L-NA behandelten Zellen gegeben wurden, keinen Einfluß auf die Farbstoffausbreitung von Carboxyfluorescein.

Abbildung 10:

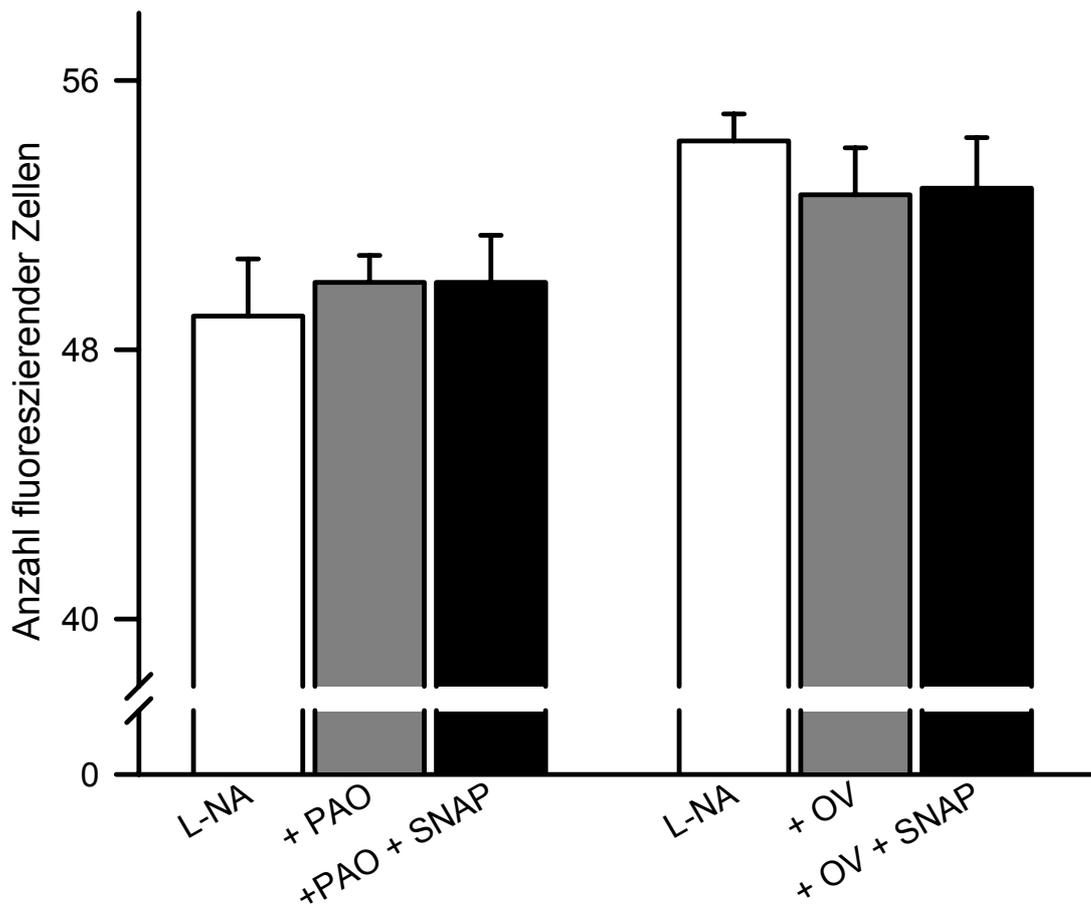


Abb. 10: Hemmstoffe der Tyrosinphosphatase blockieren den Effekt von SNAP auf die Zellkopplung.

SNAP hat keinen Einfluß auf die endotheliale Kopplung via Gap Junctions, nachdem die Zellen entweder mit dem Inhibitor der Tyrosinphosphatase Phenylarsinoxid (PAO) oder einem anderen solchen Hemmstoff, Orthovanadat (OV), behandelt wurden. Die Mittelwerte \pm S.E.M. (Anzahl fluoreszierender Zellen) der einzelnen Behandlungsgruppen repräsentieren die Ergebnisse von mindestens 8 Injektionen in

3 endothelialen Monolayern. Die Anzahl der fluoreszierenden Zellen in den Monolayern, die nur mit L-NA (Kontrolle) behandelt wurden, war von den Zellen, die weitere Behandlungen erhielten, nicht signifikant verschieden.

Abbildung 11:

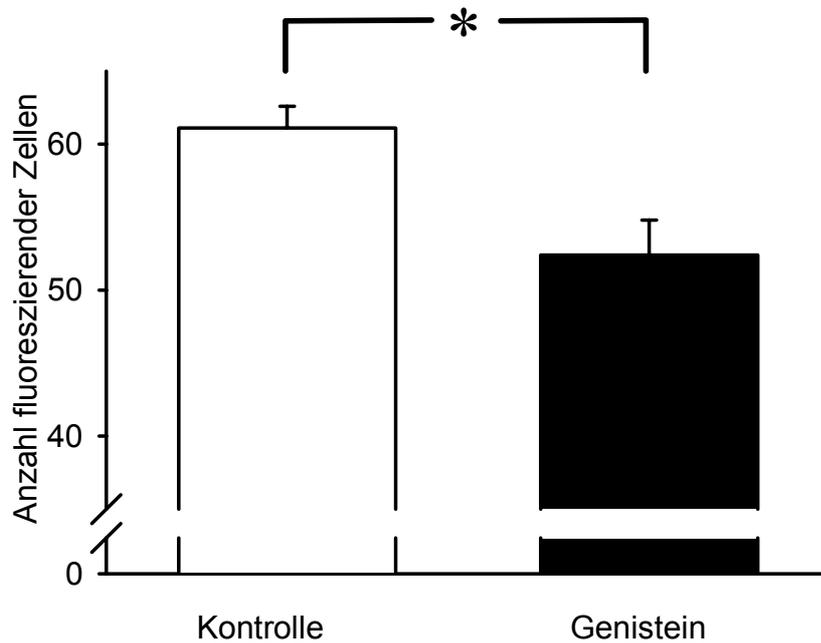


Abb.11 Der Tyrosinkinase Hemmstoff Genistein reduzierte die endotheliale Kopplung.

Genistein (100 $\mu\text{mol/L}$, 30 Minuten) reduzierte die endotheliale Kopplung in einem ähnlichen Ausmaß wie NO (1 $\mu\text{mol/L}$ SNAP, 15 Minuten) in L-NA vorbehandelten Zellen (30 $\mu\text{mol/L}$, 30 Minuten) (17.4%).

II. 4. Einfluß von Prostacyclin auf die Farbstoffausbreitung

Das Endothel bildet neben NO weitere Autakoide, u. a. Prostaglandine. Nach Umwandlung der Arachidonsäure in die Intermediärprodukte Prostaglandin G₂ bzw. Prostaglandin H₂ durch die Cyclooxygenase werden über verschiedene Enzyme unterschiedliche vasoaktive Prostaglandine gebildet [81]. In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit die Kopplung der Endothelzellen durch Prostacyclin beeinflusst wird. Prostacyclin ist ein Prostaglandin, welches eine Vasodilatation hervorruft. Hierzu wurden die Zellen mit dem Hemmstoff der Cyclooxygenase Indometacin in einer Konzentration von 30 µmol/L für eine Dauer von 30 Minuten vorinkubiert, um die endogene Prostaglandinbildung zu blockieren. Die Farbstoffausbreitung in diesen Zellen wurde mit der Ausbreitung des Farbstoffes Carboxyfluorescein in Zellen verglichen, die für 15 Minuten mit dem Prostacyclin Analogon Iloprost (1µmol/L) inkubiert wurden. Die Abbildung 12 zeigt, daß die Inkubation mit Prostacyclin zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl der fluoreszierenden Zellen führte (19.4%, von 32.0 ± 1.9 auf 38.2 ± 0.8 , n=5, p<0.05).

III. 5. Effekt der Aktivierung der Adenylatcyclase

Da viele Wirkungen von Prostacyclin über die Bildung des cyclischen Adenosinmonophosphates (cAMP) vermittelt werden, wurde geprüft, ob dieser fördernde Effekt auf die Zellkopplung auch über cAMP vermittelt wird. Hierzu wurden die Zellen wiederum mit Indometacin vorbehandelt. Um den sekundären Botenstoff intrazellulär zu erhöhen, wurden die Zellen mit dem Aktivator der Adenylatcyclase Forskolin in einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/L}$ für 15 Minuten inkubiert. Im Vergleich zu nur mit Indometacin behandelten Zellen war die Farbstoffausbreitung in mit Forskolin inkubierten Zellen signifikant erhöht (Abb. 12). Das Ausmaß der Steigerung der Zellkopplung (20.5%) war vergleichbar mit derjenigen, die auch durch Iloprost erreicht wurde (19.4%).

Abbildung 12:

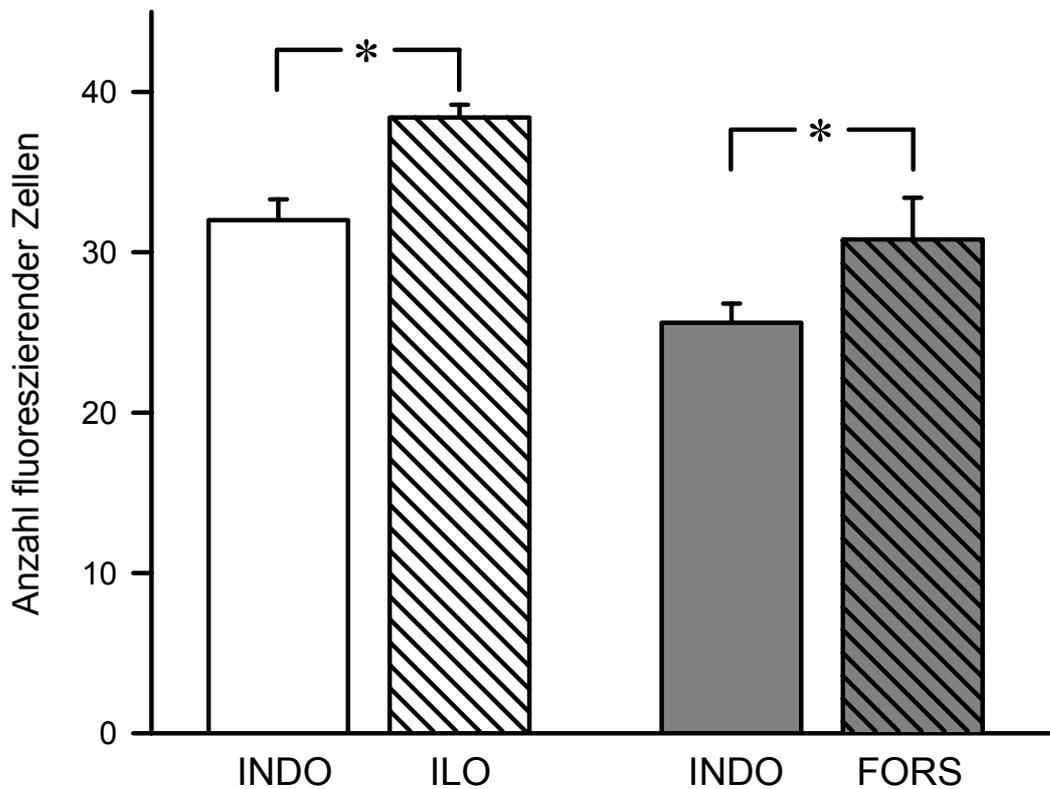


Abb. 12: Prostacyclin verbessert die endotheliale Kopplung.

Sowohl die Zugabe des Prostacyclin Analogon Iloprost ($1 \mu\text{mol/L}$, $n=5$, in 8 Monolayern) als auch die Applikation von Forskolin ($30 \mu\text{mol/L}$, $n=10$ in 18 Monolayern) erhöhte signifikant die Anzahl der fluoreszierenden Zellen nach Injektion in eine einzelne Zelle und 10-minütiger Wartezeit im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen. $*p<0.05$ vs. Indo.

III. 6. NO und Prostacyclin heben ihre Wirkung gegenseitig auf:

Die vorher dargestellten Befunde zeigten die gegensätzlichen Wirkung der beiden endothelialen Autakoide, NO und Prostacyclin, auf die Zellkopplung in vitro auf. In vivo werden aber beide Mediatoren simultan sowohl kontinuierlich, als auch auf exogene Stimuli freigesetzt. Daher wurde im folgenden untersucht, wie diese beiden Substanzen, wenn sie von exogen appliziert werden, interagieren.

Hierzu wurden die Zellen sowohl mit L-NA als auch mit Indometacin vorbehandelt, um die endogene Autakoidbildung zu hemmen. Die Inkubation mit Iloprost führte wie in den vorher dargestellten Befunden wiederum zu einer signifikanten Steigerung der endothelialen Zellkopplung (von 52.3 ± 1.5 auf 61.5 ± 1.7 , $n=7$, $p<0.05$). Wurde nun aber zusätzlich zu Iloprost auch der NO-Donor SNAP zugegeben, so war die Zellkopplung im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert (Abb. 13). Andererseits hatte SNAP in Anwesenheit von Iloprost auch keine hemmende Wirkung mehr.

Abbildung 13:

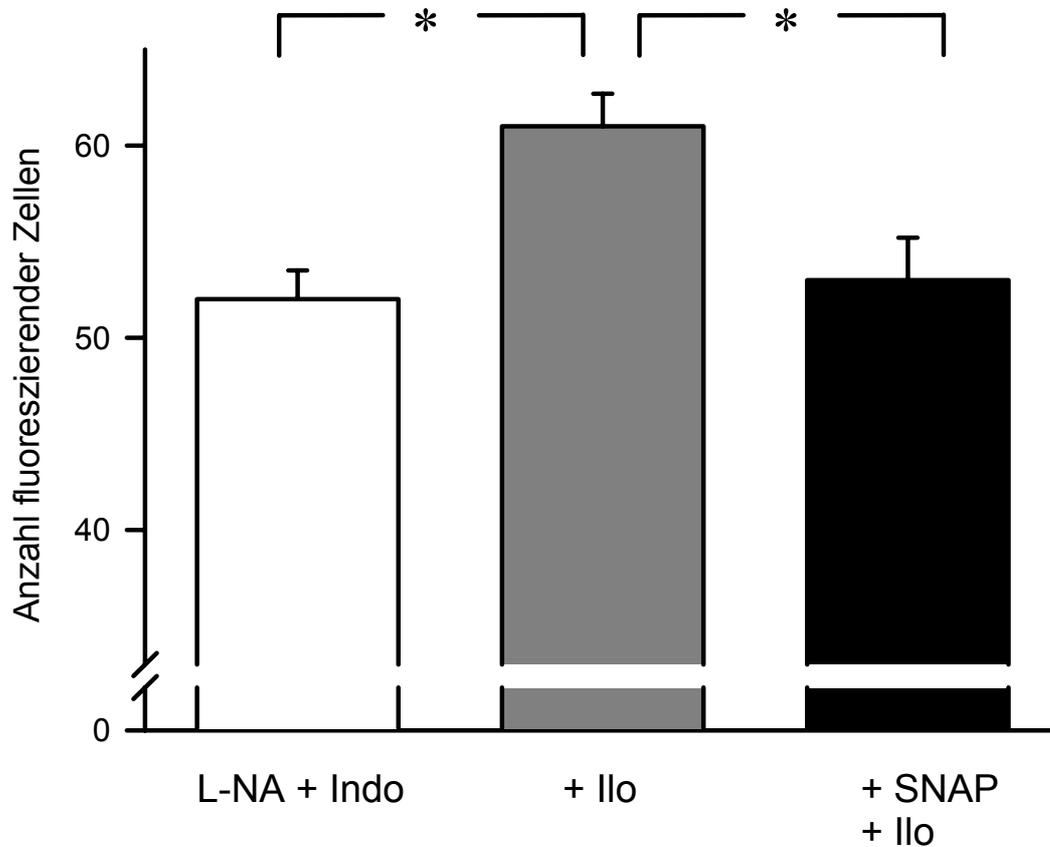


Abb.13: NO und Prostacyclin beeinflussen die Kopplung gegensätzlich.

Der Anstieg der Farbstoffausbreitung durch Iloprost, im Vergleich zu der Ausbreitung in den mit L-NA und Indometacin vorbehandelten Zellen, konnte bei gleichzeitiger Applikation von SNAP nicht mehr nachgewiesen werden. Jeweils n=7 pro Gruppe in insgesamt 28 Monolayern.

IV. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die potentiellen Einflüsse endothelialer Autakoide auf die Kopplung von kultivierten Endothelzellen des humanen Nabelschnurvenenendothels untersucht. Als Maß für die Kopplung über Gap Junctions bzw. deren Permeabilität wurde die Ausbreitung von Fluoreszenzfarbstoffen mittels konfokaler Mikroskopie nachgewiesen und nach Injektion in eine einzelne Zelle erfaßt. Die hier untersuchten kultivierten Endothelzellen zeigten eine funktionelle Kopplung über Gap Junctions, da sich der membranimpermeable Farbstoff in die benachbarten Zellen ausbreitete. Die Permeabilität der Gap Junctions wurde durch die beiden endothelialen Autakoide, NO und Prostacyclin, moduliert, wobei NO die Kopplung reduzierte, während Prostacyclin im Gegensatz dazu die Kopplung steigerte. Meines Wissens ist dies die erste Studie, die den Einfluß der beiden vom Endothel gebildeten Autakoide NO und Prostacyclin auf die Regulation der Permeabilität der Gap Junctions in humanen Endothelzellen untersucht.

Der in dieser Untersuchung dargestellte Farbstofftransfer von einer Zelle zu den benachbarten Zellen ist ausschließlich auf Zellkopplung über Gap Junctions zurückzuführen. Wurde nämlich Carboxyfluorescein oder Calcein in derselben Konzentration, die bei den Mikroinjektionen verwendet wurde, in den Überstand gegeben und für 30 Minuten inkubiert, so konnte nach dem Auswaschen der Farbstoffe aus dem Zellmedium keine Fluoreszenz in den Zellen nachgewiesen werden. Diese Versuche belegen, daß die beiden verwendeten anionischen Farbstoffe weder passiv noch aktiv von den Zellen aufgenommen werden. Das stimmt mit Befunden an anderen Zellen überein [23], [59], [68]. Somit läßt sich ausschließen, daß der in die einzelne Zelle injizierte Farbstoff von dieser in das

umgebene Medium abgegeben wurde oder diese passiv verlassen hatte, um dann von den benachbarten Zellen aufgenommen zu werden. Der Farbstoff, der nach Injektion in den benachbarten Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 3), muß also über direkte Zellverbindungen von einer Zelle in die nächste gelangt sein.

Um weitere Evidenz dafür zu erhalten, daß die Farbstoffausbreitung über Gap Junctions erfolgte, wurden die Zellen mit einem Peptid inkubiert, welches das Aneinanderdocken der Connexone gegenüberliegender Zellen verhindert. Dieses Peptid lagert sich aufgrund seiner komplementären Aminosäurestruktur an eine der extrazellulären Schleifen des Connexons an [21, 113]. Tatsächlich führte dieses Peptid zu einer deutlichen Reduktion der Farbstoffausbreitung innerhalb der endothelialen Monolayer, was zusätzlich zeigt, daß Endothelzellen über Gap Junctions miteinander gekoppelt sind. Auch von anderen Arbeitsgruppen wurde schon gezeigt, daß die Ausbreitung solcher Farbstoffe (Carboxyfluorescein und Calcein) innerhalb eines Zellverbandes nur möglich ist, wenn die Zellen (z. B. Hepatozyten) über Gap Junctions miteinander gekoppelt sind [23, 59, 68, 71]. In Anwesenheit dieses Peptids konnte in den vorliegenden Untersuchungen zwar nur eine Reduktion um 38% erreicht werden, doch die eingesetzte Konzentration war auch nur im Bereich der halbmaximalen effektiven Konzentration, wie sie in Herzmuskelzellen von Hühnern bestimmt wurde [113]. Weitere Versuche mit höheren Konzentrationen konnten nicht durchgeführt werden, da das verwendete Peptid nur in sehr geringen Mengen verfügbar war und über eine schlechte Löslichkeit verfügt.

Die Ausbreitung von Farbstoffen über Gap Junctions ist kein Phänomen, welches nur in vitro in der Zellkultur zu finden ist. Auch in isolierten Gefäßen wird eine Kopplung der Endothelzellen gefunden [71]. Ebenso wie in den Monolayern breitet sich der

Farbstoff Lucifer Yellow, auch entlang von Arteriolen in vivo in der Endothelzellschicht aus, wenn er in eine einzelne Endothelzelle injiziert wurde [100, 102]. Allerdings ist in diesen Studien keine Quantifizierung der Farbstoffausbreitung vorgenommen worden. Somit ist zur Zeit auch kein Vergleich der Permeabilität der Gap Junctions bei der Farbstoffausbreitung in vivo mit den hier vorgestellten in vitro Befunden möglich.

Da die Endothelzellen miteinander gekoppelt sind und diese Kopplung, wie hier gezeigt, Farbstoffen mit einer Molekulargröße von 373 bzw. 622 Dalton einen Übertritt von einer Zelle in eine benachbarte Zelle erlaubt, stellt sich die Frage, ob und inwieweit die Permeabilität der Gap Junctions für solche Farbstoffe und damit auch potentielle zelluläre Botenstoffen reguliert wird. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß der vom Endothel selbst gebildete Mediator NO die Kopplung reduziert. Dies ließ sich sowohl für die basale kontinuierliche endogene NO-Bildung nachweisen, da die Blockade der NO-Synthase eine Steigerung der Kopplung zur Folge hatte, als auch für die exogene Zugabe von NO zeigen, wozu zwei verschiedene NO-Donoren verwendet wurden, deren Anwendung zu gleichen Ergebnissen führte (Abb. 5 und Abb. 6).

Eine modulatorische Wirkung von NO auf die Kopplung von Gap Junctions ist auch in Astrozyten [11] und in den Hybridzellen der Netzhaut [76] beschrieben worden. In den Zellkulturen der Astrozyten, die aus Ratten gewonnen wurden, wurde die NO-Synthase durch Inkubation mit LPS induziert und die veränderte Permeabilität mit Hilfe der Scrape Loading Technik untersucht, bei der als Marker wiederum der Farbstoff Lucifer Yellow verwendet wurde. Die Reduktion der Permeabilität war in

diesen Versuchen dosisabhängig und betrug bei einer Dosis von 0.05 µg/mL LPS bis zu 63.3 % nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden.

Eine Reihe der Wirkungen des NO, wie die induzierte Vasodilatation und Plättchenaggregation, sind durch den sekundären Botenstoff cGMP vermittelt, der von NO als Folge einer Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase vermehrt gebildet wird. In Horizontalzellen der Netzhaut war die durch NO hervorgerufene Hemmung der Zellkopplung durch die Bildung des sekundären Botenstoffes cGMP vermittelt. Tatsächlich wurde berichtet, daß die Connexinproteine, aus denen Connexone, die die Gap Junctions bilden, aufgebaut sind, durch einen Proteinkinase G abhängigen Mechanismus phosphoryliert werden können und eine verminderte Leitfähigkeit der Gap Junctions zur Folge hatte [63]. Somit könnte der modulatorische Effekt des NO in diesen Zellen durch die Aktivierung der Guanylatcyclase, die Bildung von cGMP und die durch diesen sekundären Botenstoff aktivierte Proteinkinase G vermittelt worden sein. In der vorliegenden Arbeit in Endothelzellen war die Reduktion der Permeabilität der Gap Junctions durch NO allerdings nicht über cGMP vermittelt, denn der Hemmstoff der löslichen Guanylatcyclase ODQ, der die Bildung von cGMP verhindert [41, 48], schwächte den von NO hervorgerufenen Effekt nicht ab. Der oben dargestellte Signaltransduktionsweg ist auch deswegen unwahrscheinlich, weil die cGMP abhängige Proteinkinase G in frisch isolierten und kultivierten Endothelzellen aus Nabelschnurvenen nicht nachgewiesen werden konnte [30]. Daher wurde in weiteren Versuchen der Frage nachgegangen, über welche anderen Mediatoren dieser NO Effekt potentiell vermittelt sein könnte.

Neben dem cGMP-Signaltransduktionsweg, könnten die im folgenden erläuterten anderen Mediatoren an den hier beschriebenen Wirkungen des NO beteiligt sein. So

reagiert das Radikal NO mit Superoxidanionen mit einer sehr hohen Reaktionsgeschwindigkeit, die lediglich diffusionslimitiert ist [3, 47]. Für das Produkt dieser Reaktion, das Peroxynitrit, sind verschiedene Mediatorwirkungen beschrieben worden [3, 47]. Es könnte daher den gefundenen Effekt von NO auf die Zellkopplung ausgelöst haben. Um dies zu prüfen, wurden in der vorliegenden Untersuchung die Radikalfänger Superoxiddismutase und Tiron den Zellen zugegeben, um die Bildung von Superoxidionen zu minimieren bzw. deren Menge deutlich herabzusetzen. Dies beeinflusste die durch NO gezeigte Wirkung aber nicht, denn die Zellkopplung wurde durch NO in dem gleichen Ausmaß vermindert, wie in den vorherigen Untersuchungen. In einem anderen Zelltyp, nämlich Astrozyten, war jedoch Peroxynitrit, das Reaktionsprodukt von NO und Superoxidanionen, sehr wohl als Vermittler der von NO in diesen Zellen reduzierten Zellkopplung identifiziert worden [11]. Somit scheinen in unterschiedlichen Zellen trotz ähnlicher Wirkung des NO auf die Zellkopplung verschiedene Mediatoren beteiligt zu sein. Dies könnte bedingt sein durch eine unterschiedliche Expression von Connexinen in den verschiedenen Zelltypen. So bestehen die Gap Junctions in Astrozyten hauptsächlich aus dem Connexin43, während in Endothelzellen neben diesem Connexin auch das Connexin40 und das Connexin37 gefunden werden.

Die von diesen verschiedenen Connexinen gebildeten Kanäle weisen durchaus unterschiedliche Permeabilitäten auf und sind für so verschiedene Moleküle, wie cAMP, Ca^{2+} , cGMP und IP_3 , unterschiedlich durchgängig [7]. Daraus ergibt sich, daß bestimmte Zellgruppen selektiv über die Permeabilität der Gap Junctions dieser sekundären Botenstoffe oder Metabolite regulieren könnten [17, 106]. Dieses eröffnet die Möglichkeit für den Zellverband spezifisch bestimmte sekundäre Botenstoffe auszutauschen und andere von diesen Vorgängen auszuschließen. Ein noch

komplizierteres Modell ergibt sich aufgrund der Tatsache, daß nicht nur homomer/homotypische Gap Junctions entstehen können, sondern auch heteromer/heterotypische Kanäle möglich sind. Ob diese verschiedenen Kanäle differenziert reguliert werden, ist zur Zeit nicht absehbar, birgt aber ein ganz erhebliches Potential für die Zelle, spezifisch bestimmte Prozesse zu steuern.

Da NO in hohen Konzentrationen calciumabhängige Kaliumkanäle direkt aktivieren kann [12], wurde überprüft, ob die Modulation der Zellkopplung durch eine Hyperpolarisation induziert wird. NO führte in der verwendeten Konzentration in den verwendeten HUVECs ebenso zu einer Hyperpolarisation {Keller nicht publiziert}. Obwohl die Connexine, die im Endothel exprimiert werden (Cx43, Cx40 und Cx37) [67, 110], prinzipiell spannungssensitiv sind [2], führte eine Hyperpolarisation der Endothelzellen durch die Aktivierung von ATP-abhängigen K^+ Kanälen (nach Zugabe von HOE234) nicht zu einer Hemmung der endothelialen Kopplung. Somit ist die Modulation der Gap Junctions, wahrscheinlich nicht durch die begleitende NO-induzierte Hyperpolarisation bedingt.

Zusammenfassend sind als Mediatoren der NO-Wirkung die bekannten Signaltransduktionswege des NO, also ein Anstieg des sekundären Botenstoffs cGMP, die Bildung von Peroxynitrit sowie die Induktion einer Hyperpolarisation ausgeschlossen worden. Daher ist die hier beschriebene Wirkung auf die Permeabilitätsänderung der Gap Junctions möglicherweise ein direkter Effekt von NO an den beteiligten Connexinen. Andererseits könnte seine Wirkung auch über einen noch nicht charakterisierten Transduktionsweg vermittelt sein. Wie später noch eingehend dargestellt wird, sind hierbei anscheinend Phosphorylierungsvorgänge vermittelnd beteiligt.

Wie in der Einleitung bereits dargelegt wurde, sind prinzipiell zwei verschiedene Regulationsmechanismen der Permeabilität der interzellulären Kanäle denkbar. Einerseits kann in relativ kurzen Zeiträumen die Öffnung und Schließung der Gap Junctions beeinflusst werden, andererseits könnte der Einbau von Connexonen in die Plasmamembran moduliert werden und damit die Anzahl der vorhandenen Gap Junctions manipuliert werden. Diese Möglichkeit der Regulation der Permeabilität ist bedingt durch die kurze Halbwertszeit von maximal 5 Stunden der sich in der Membran befindlichen Connexinproteine [33, 64, 65]. Connexine unterliegen daher einem ständigem Ein- und Ausbaubyklus. Um zu untersuchen, ob ein Anteil der Wirkung des NO durch einen verminderten Einbau neuer Connexine hervorgerufen ist, wurde Brefeldin A verwendet. Diese Substanz inaktiviert den Golgi Apparat reversibel und verhindert damit den Transport von neu gebildeten und prozessierten Connexinen aus dem Golgi Apparat und die Integration dieser Proteine in die Plasmamembran [69]. Dieses Vorgehen der Inaktivierung des Golgi Apparates ist effektiv, da Connexine zu den wenigen transmembranären Proteinen gehören, die erst nach Verlassen des Endoplasmatischen Retikulums ihre Quartärstruktur annehmen [84] und somit auch erst nach Verlassen des Golgi Apparats ihre endgültige Funktionalität erreichen. Auch unter diesen Bedingungen, nach Inkubation der Zellen mit Brefeldin A für 90 Minuten, konnte NO die Kopplung der Endothelzellen durch Gap Junctions signifikant reduzieren. In einigen Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) hatte auch die Inkubation von unbehandelten Zellen mit Brefeldin A keinen signifikanten Einfluß auf die Kopplung der Endothelzellen. Ähnliche Befunde wurden auch in einer Zelllinie (COS 7), die die Connexine 26 und 43 exprimiert unter ähnlichen Inkubationsbedingungen von anderen Untersuchern erhoben [42]. Dies läßt den Schluß zu, daß NO die Zellkopplung nicht durch eine Reduktion des Neueinbaus der Connexinproteine in die Zellmembran vermindert.

Weiterhin sind die erhobenen Befunde ein Hinweis darauf, daß eine akute Hemmung des Neueinbaus von Gap Junctions in die Membran innerhalb dieses Zeitfensters die Ausbreitung des Farbstoffes nicht erkennbar beeinflußt. Es ist möglich, daß zwar die Zahl der Gap Junctions in der Membran tatsächlich reduziert wurde, dies aber durch eine gesteigerte Permeabilität der in der Membran verbleibenden Gap Junctions kompensiert wurde. Ob ein derartiger Mechanismus tatsächlich eine Rolle spielte, kann auf Grund der vorliegenden Untersuchungen nicht beurteilt werden.

Ein Mechanismus, der eine kurzfristige Regulation der Permeabilität bestehender Gap Junctions bewerkstelligen kann, ist die Phosphorylierung der Connexinproteine, aus denen die Gap Junctions bestehen. Die verschiedenen Connexine besitzen Tyrosin- und Serinreste, die einer Phosphorylierung zugänglich sind. Die meisten Daten zu dieser Hypothese liegen zum relativ gut untersuchten und untersuchbaren Connexin43 vor, welches mindestens eine Tyrosinphosphorylierungsstelle hat [72]. In Fibroblasten führten Hemmstoffe von Tyrosinphosphatasen, zu einer gesteigerten Tyrosinphosphorylierung dieses Connexins [80]. Dies zeigt, daß zumindest in Fibroblasten, diese dephosphorylierenden Enzyme eine konstitutive Aktivität besitzen. In einer Reihe von Untersuchungen in verschiedenen Zellen ist gezeigt worden, daß die elektrische Leitfähigkeit von Gap Junctions und ihre Permeabilität für Farbstoffe durch den Phosphorylierungsstatus der Connexinproteine moduliert wird. So wurde in Endothelzellen nach Phosphorylierung des Connexin43 eine Entkopplung, im Sinne eines verminderten Farbstoffübertritts, aufgezeigt [118]. Solch eine Phosphorylierung des Connexin43 konnte z.B. durch den aus Plättchen stammenden Wachstumsfaktor (PDGF) induziert werden. Hierbei war jedoch nicht die vorher erwähnte Tyrosinphosphatase, sondern eine Tyrosinkinase beteiligt. Allerdings wurde in dieser Untersuchung ebenfalls aufgezeigt, daß bei der

gefundenen Entkopplung dieser Zellen die durch die Tyrosinkinase phosphorylierten Connexine aus der Membran ausgebaut und abgebaut werden [51]. Deshalb ist es unwahrscheinlich, daß diese Entkopplung auf eine Änderung der Öffnungswahrscheinlichkeit bestehender Gap Junctions zurückzuführen ist. Bei dieser Degradation war zusätzlich zu der Wirkung einer Tyrosinkinase auch die Aktivierung der Proteinkinase C und der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase) notwendig [50], es handelt sich also um eine ganze Kette von nacheinander ablaufenden Phosphorylierungsvorgängen. In rekonstituierten Liposomen, die Gap Junctions enthielten, die aus dem Connexin43 aufgebaut waren, wurde in Analogie zu den oben geschilderten Befunden eine inverse Beziehung zwischen dem Farbstofftransfer und dem Phosphorylierungsstatus des Connexins gefunden. Die Behandlung mit Phosphatasen (also die Dephosphorylierung von Proteinen) führte zur vermehrten, die Aktivierung von MAP-Kinasen (also die Phosphorylierung von Proteinen) zu einer verminderten Kommunikation [57]. Dagegen konnte in Embryonalzellen des Hamsters kein Zusammenhang zwischen dem Phosphorylierungsstatus des Connexin43 und der Kopplung festgestellt werden [24]. Neben den Tyrosin sind auch Serinreste des Connexin43 ein potentielles Ziel von Kinasen. Die mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinase) phosphorylieren Connexin43 an drei unterschiedlichen Serinresten. Die Phosphorylierung zweier dieser Serinreste führte zur Reduktion der Kommunikation [112]. Zusammenfassend zeigt dieser Überblick, daß die Phosphorylierung des Connexin43 an Tyrosin- oder Serinresten in verschiedenen untersuchten Systemen die Kopplung von Zellen über Gap Junctions vermindert. Ein Mechanismus hierbei ist die Degradation der interzellulären Kanäle. Untersuchungen zu anderen Connexinen, die auch in Endothelzellen exprimiert werden, liegen nicht in dieser Ausführlichkeit vor. Für das

Connexin37 wurde allerdings gezeigt, daß es hauptsächlich an Serinresten phosphoryliert wird [108].

In der vorgelegten Arbeit führte die Inkubation mit zwei unterschiedliche Substanzen, welche Tyrosinphosphatasen hemmen (Phenylarsinoxid und Orthovanadat), zu einer vollständigen Aufhebung der durch NO hervorgerufenen Hemmung der Permeabilität endothelialer Gap Junctions. Nach Hemmung der Tyrosinphosphatasen breitete sich der Farbstoff in Zellen, die mit NO stimuliert wurden, in dem gleichen Maße aus wie in Zellen, denen kein NO-Donor zugesetzt wurde. Dies legt nahe, daß für die hemmende Wirkung des NO die Aktivierung einer Tyrosinphosphatase notwendig ist. Die Tyrosinphosphatase dephosphoryliert möglicherweise ein Connexin, was eine gesteigerte Permeabilität der Gap Junctions zur Folge hatte (siehe Abbildung 14, Schema 1). Eine Dephosphorylierung verbunden mit einer verminderten Permeabilität steht zwar im Widerspruch zu den im vorhergehenden Absatz geschilderten Befunden, allerdings muß betont werden, daß diese Daten fast ausschließlich am Connexin43 erhoben wurden. Es wurde jedoch auch gezeigt, daß eine verminderte Phosphorylierung der Connexine eine Hemmung der Kopplung bewirken kann [82], da Connexine ohne diese Phosphorylierung zwar in die Membran eingebaut werden, aber keine funktionellen Gap Junctions bilden und so kein Transfer von Substanzen möglich ist.

Alternativ zu erwägen ist, daß ein im Signaltransduktionsweg eingeschaltetes Protein dephosphoryliert wurde, das dann seinerseits einen Effekt auf Connexine bzw. die Gap Junctions ausübt. Dieses in der Signaltransduktionskette liegende Protein bzw. Enzym könnte beispielsweise die MAP-Kinase sein, die durch Phosphorylierung von Tyrosinresten aktiviert [95] bzw. umgekehrt durch die Dephosphorylierung gehemmt

wird. Somit ergibt sich die Möglichkeit, daß die verminderte Aktivität der MAP-Kinase, induziert durch die NO-vermittelte Anschaltung der Tyrosinphosphatasen, zu einer reduzierten Phosphorylierung der Connexine führt, was dann die reduzierte Permeabilität hervorruft (siehe Abbildung 14, Schema 2). Die Antwort auf die Frage, ob in den untersuchten Endothelzellen nach Zugabe von NO eine veränderte Tyrosinphosphorylierung vorliegt, kann dazu beitragen, zu entscheiden, ob Tyrosinphosphatasen direkt oder indirekt an den Connexinen ihren Effekt nach Stimulation mit NO ausüben. In dieser Arbeit wurde dieser Frage jedoch nicht durch den direkten Nachweis des Phosphorylierungsstatus der Connexine nachgegangen, sondern indem die Wirkung weiterer Substanzen, die den Phosphorylierungsstatus der Tyrosinreste verändern und gleichzeitig die Permeabilität der Gap Junctions in diesem Modell beeinflussen.

Die Tyrosinphosphatase-Inhibitoren hatten keinen Einfluß auf die Permeabilität der Gap Junctions in Zellen, die kein endogenes NO mehr bildeten (L-NA behandelt). Dies würde mit der Ansicht übereinstimmen, daß die beteiligte Phosphatase in Abwesenheit von NO nicht aktiv ist oder nur eine so geringfügige Aktivität in Bezug auf die Permeabilität der Gap Junctions hat, daß die Wirkung der Hemmstoffe zu klein ist, um in der beobachteten kurzen Zeitspanne von 10 Minuten als Modulation des Farbstoffsübertritts in diesem Assay detektiert zu werden. Unter Bedingungen mit gesteigerter Aktivität der Tyrosinphosphatasen, wie sie durch NO hervorgerufen wurden, hatten die Hemmstoffe einen deutlichen Effekt. Das NO Tyrosinphosphatasen tatsächlich aktivieren kann, ist auch in humanen Endothelzellen aus Nabelschnüren [49] und auch anderen Zellen gezeigt worden [27].

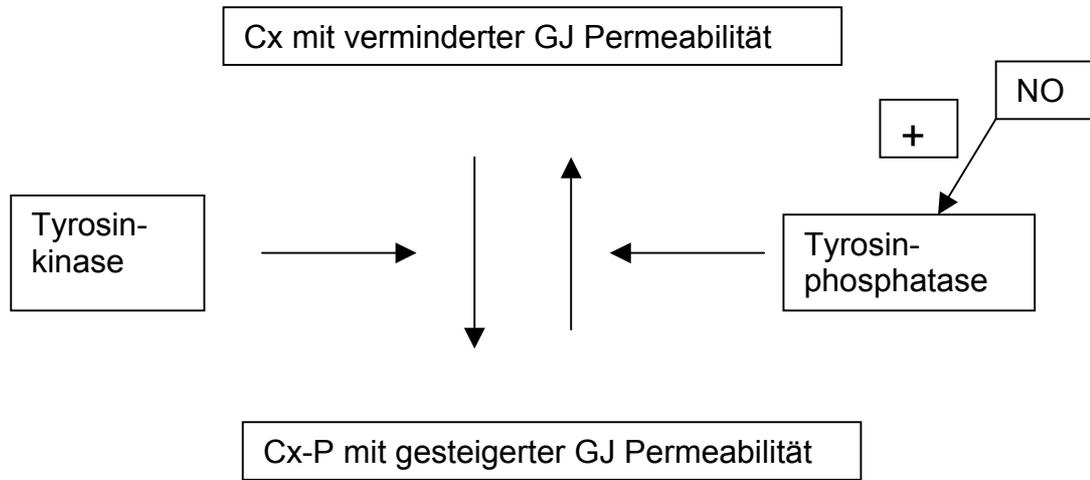
Die Hypothese, daß der Tyrosinphosphorylierungsstatus eine entscheidende Rolle bei der Modulation der Zellkopplung über Gap Junctions hat, konnte weiterhin durch den Effekt der Behandlung mit einem Hemmstoff der Tyrosinkinase belegt werden. Genistein, welches Tyrosinkinasen in Endothelzellen in der verwendeten Konzentration effektiv blockiert [1], führte zu einer Reduktion der Kopplung in den untersuchten endothelialen Monolayern. Unter der Voraussetzung, daß bestimmte Tyrosinkinasen konstitutiv aktiv sind, sollte deren Hemmung zu einer verminderten Tyrosinphosphorylierung der jeweiligen Zielproteine führen. Solch eine verminderte Tyrosinphosphorylierung ist ebenso unter den vorher geschilderten Bedingungen, nämlich der Aktivierung der Tyrosinphosphatasen durch NO, zu erwarten. Die Tatsache, daß sowohl die Hemmung der Tyrosinkinasen als auch die Aktivierung der Tyrosinphosphatasen (induziert durch die exogene Zufuhr von NO) eine reduzierende Wirkung auf die Zellkopplung hatte, macht deutlich, daß durch beide experimentelle Manipulationen ein für die Zellkopplung wesentliches Protein reguliert wird. Liegt dieses Protein oder Enzym vermehrt in dephosphoryliertem Zustand vor, so wird die Zellkopplung reduziert. Ob dieses Protein ein Connexin (direkte Regulation, Abbildung 14 Schema 1) oder ein anderes Enzym ist, welches seinerseits nun wiederum Connexine beeinflusst (indirekte Regulation, Abbildung 14 Schema 2), läßt sich durch die vorliegenden Daten nicht endgültig entscheiden. In der schon diskutierten Literatur ist hinsichtlich dieses Aspektes vor allem das Connexin43 untersucht worden. Die an diesem Connexin erhobenen Befunde würden eher für eine indirekte Regulation sprechen.

Auch andere Kinasen beeinflussen die Farbstoffausbreitung, also die Permeabilität, und die elektrische Kopplung, also die Leitfähigkeit der Gap Junctions, durchaus differentiell [61], wobei ein verminderter Farbstofftransfer mit einer verminderten

Leitfähigkeit der Gap Junctions einhergeht. Dies könnte bedingt sein durch eine unterschiedliche Wirkung auf verschiedene homomere/homotypische Gap Junctions, d.h. Kanäle, die jeweils aus verschiedenen Connexinen aufgebaut sind. Weiterhin muß berücksichtigt werden, daß diese Regulationsvorgänge noch komplexerer Natur sein können: Werden nämlich heteromere Kanäle gebildet, die differenziert reguliert werden, so entsteht einerseits ein äußerst effektives, sehr spezifisches Regulationssystem, andererseits ein noch wesentlich komplizierteres Bild. Zusammenfassend zeigen die vorgestellten Befunde aber, daß Tyrosinphosphorylierung einen wesentlichen Einfluß auf die Zellkopplung hat. Hierbei ist die Reduktion der Farbstoffausbreitung durch NO vermittelt über die Aktivierung einer Tyrosinphosphatase. Die Abbildung 14 stellt die beiden, sich aus den in dieser Arbeit vorgelegten Befunden ergebenden Signalwege, über die die Zellkopplung moduliert werden kann, nochmals gegenüber.

Abbildung 14:

Schema 1:



Schema 2:

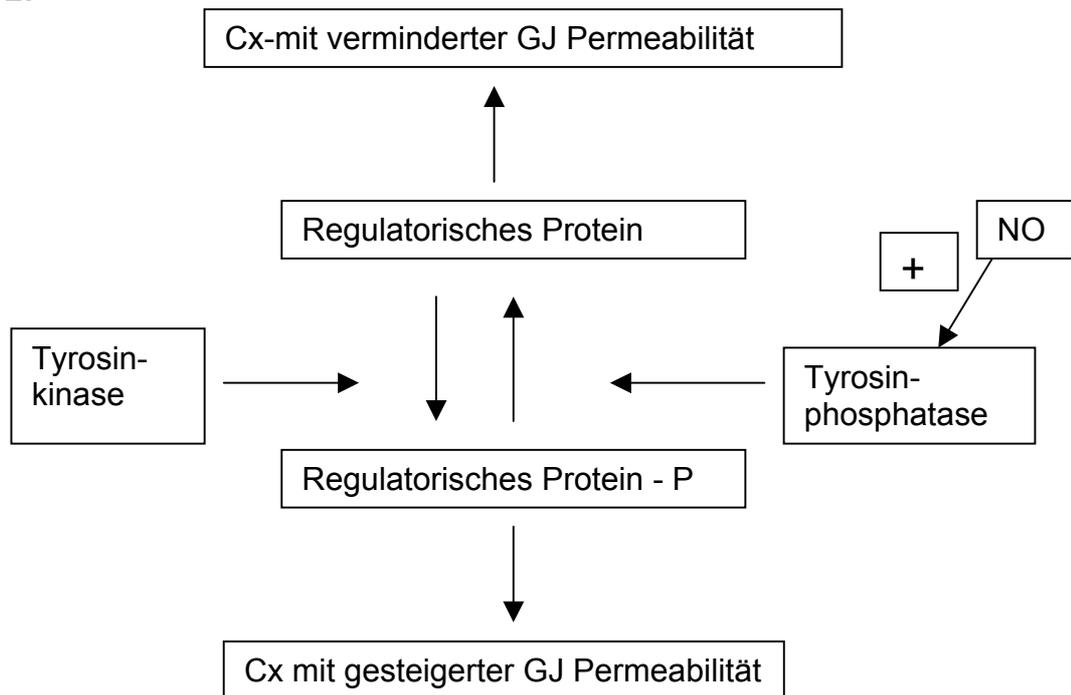


Abb. 14: Die Permeabilität von Gap Junctions wird reguliert durch den Phosphorylierungsstatus von Tyrosinresten.

Änderungen des Tyrosinphosphorylierungsstatus modulieren die Zellkopplung. Die hierbei beteiligten Tyrosinkinasen und -phosphatasen wirken entweder direkt auf die Connexinproteine und verändern die Permeabilität der von ihnen gebildeten Gap Junctions (Schema 1). Alternativ wäre eine indirekte Regulation, vermittelt über ein Protein, welches an einem seiner Tyrosinreste phosphoryliert oder dephosphoryliert wird, zu erwägen. Dieses Protein würde hierdurch in seiner Aktivität moduliert und hätte dann seinerseits eine Wirkung auf die Connexinproteine (Schema 2). Die Wirkung von NO ist in beiden denkbaren Schemata vermittelt durch die Aktivierung einer Tyrosinphosphatase.

Endothelzellen sind die Hauptproduktionsstätte von NO und produzieren kontinuierlich einen basalen Spiegel dieses Autakoids. Für eine basale Produktion spricht, daß die Farbstoffausbreitung nach Hemmung der endothelialen NO-Synthase durch L-NA signifikant zunahm. Auch in Arteriolen in vivo gibt es eine basale NO-Produktion, welche daher ohne besondere Stimulation die interzelluläre Diffusion von Signalmolekülen durch endotheliale Gap Junctions regulieren kann. Falls NO auch auf die elektrische Kopplung eine ähnliche Wirkung hat als auf die Farbstoffausbreitung, könnte es auch mechanische Längskonstanten bei der elektrotonischen Signalausbreitung im Endothel beeinflussen. Wird lokal eine Arteriole mit einer Substanz, die das Membranpotential der arteriolären Endothelzellen ändert, stimuliert, tritt auch eine Potentialänderung an relativ weit entfernten Stellen dieses Gefäßes auf [102]. Diese Potentialänderung hat eine Durchmesseränderung zur Folge [114]. Werden die Längskonstanten aufgrund einer verbesserten Kopplung nach Einschränkung der endothelialen NO-Bildung

vergrößert, erscheint es denkbar, daß sich solche lokal entstandenen Potentialänderungen in größere Entfernungen ausbreiten und so die Rolle der Zellkopplung bei der Regulation des Gefäßtonus unter diesen Bedingungen akzentuiert wird. Ob tatsächlich eine gesteigerte elektrische Zellkopplung bei verminderter NO-Bildung in den Gefäßen eine Rolle spielt, muß mit anderen Methoden erst noch geklärt werden. Eine reduzierte Permeabilität für Moleküle (Carboxyfluorescein und Calcein) muß nicht unbedingt mit einer reduzierten elektrischen Kopplung einhergehen [62]. Inwieweit die Permeabilität dieser interzellulären Kanäle und damit der Transfer von sekundären Botenstoffen eine Bedeutung bei der Regulation des Gefäßtonus in vivo hat, ist zur Zeit auch noch unklar. Die Weitergabe von Nukleotiden, Inositoltrisphosphat und Ca^{2+} über Gap Junctions und die Regulation wäre jedoch durchaus möglich, da die Größe der cyclischen Nukleotide der Molekülgröße der verwendeten Farbstoffe entspricht. Weiterhin zeigen nicht alle Zellen das gleiche Enzymverteilungsmuster, so daß z.B. die Weitergabe von cyclischem Guanosinmonophosphat innerhalb eines Zellverbandes für eine koordinierte Gefäßantwort auf einen cGMP-erhöhenden Vasodilatator notwendig sein könnte.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß neben der Wirkung des endothelialen NO auch Prostaglandine eine modulatorische Wirkung auf die Permeabilität haben. Das wichtigste vom Endothel gebildete Prostaglandin, das Prostazyklin (PGI_2), führte nach exogener Zugabe zu einer Steigerung der Farbstoffausbreitung in den Endothelzellen. Da PGI_2 eine Vielzahl seiner Wirkungen im Kreislaufsystem über den sekundären Botenstoff cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ausübt, wurde in dieser Arbeit geprüft, ob die Permeabilität der Gap Junctions auch durch diesen sekundären Botenstoff mediiert wird. Hierzu wurde der Effekt einer Substanz

untersucht, die das cAMP bildende Enzym, die Adenylatzyklase, direkt stimuliert [78]. Diese Untersuchungen zeigten, daß auch diese Substanz (Forskolin), genau wie PGI₂, zu einer gesteigerten Permeabilität der Gap Junctions führte. Diese gleichsinnigen Wirkungen von PGI₂ und Forskolin legen nahe, daß auch der steigernde Effekt des PGI₂ auf die Permeabilität der Gap Junctions über den sekundären Botenstoff cAMP vermittelt wurde.

Modulatorische Wirkungen des cAMP auf die Kopplung via Gap Junctions wurde schon in einer Reihe unterschiedlicher Zellen (Hepatozyten, Granulosazellen, Myometriumzellen) nachgewiesen [18, 23, 29, 43]. In allen diesen Untersuchungen wurde festgestellt, daß cyclisches Adenosinmonophosphat die Kopplung der jeweiligen Zellen signifikant verbessert. In den genannten Studien wurde einerseits die Permeabilität der Gap Junctions mittels der Ausbreitung von Farbstoffen in ähnlicher Weise wie in der vorliegenden Arbeit untersucht. So konnte für die Farbstoffausbreitung eine signifikante Zunahme der Kopplung innerhalb von 3 Minuten gefunden werden, also ein rasch einsetzender Effekt, wie er auch in den hier untersuchten Endothelzellen gefunden wurde. In der genannten Studie war diese Wirkung auf die Zellkopplung nicht nur ein transienter Effekt, sondern eine vermehrte Zellkopplung konnte bis zu 24 Stunden nachgewiesen werden. Weiterhin wurde eine vermehrte Expression für das Connexin43 in Osteoblasten gefunden, was ein Hinweis darauf ist, daß die verbesserte Kopplung über lange Zeit möglicherweise zusätzlich auf einen vermehrten Einbau dieses Connexins in die Plasmamembran zurückzuführen war [18, 23, 29, 109]. Andererseits wurde nicht nur die Permeabilität, sondern auch die elektrische Leitfähigkeit der Gap Junctions untersucht [111]. Auch in diesen Untersuchungen, die an Endothelzellen durchgeführt wurden, hatte cAMP eine steigernde Wirkung. Somit haben Prostaglandine eine gleichsinnige Wirkung auf

die Zunahme der Permeabilität und die elektrische Leitfähigkeit. Wie oben erläutert wurde, ist bei einer Zunahme der elektrischen Leitfähigkeit der Zellkontakte eine Steigerung der Längskonstante, mit der sich elektrotonisch ausbreitende Änderungen des Membranpotentials entlang eines Zellayers fortpflanzen können, zu erwarten. Dies könnte eine wichtige Rolle bei der Koordination des Gefäßverhaltens haben.

Die Interaktion der beiden endothelialen Autakoide ist von Interesse, weil beide Mediatoren auf viele Stimuli gleichzeitig freigesetzt werden aber gegensätzliche Wirkung auf die Permeabilität der Gap Junctions in den Endothelzellen haben. Nach vorheriger Zugabe von PGI_2 behielt NO seine Wirkung, allerdings ausgehend von dem erhöhten Niveau, welches durch die Zugabe von PGI_2 induziert worden war. Dies zeigt, daß sowohl PGI_2 als auch NO wirksam bleiben, zumindest wenn sie zeitlich nacheinander appliziert werden. Somit üben diese Autakoide ihre modulierende Effekte zwar mit umgekehrten Vorzeichen, aber nahezu additiv aus. Keine der beiden Substanzen verhinderte den Effekt des jeweils anderen endothelialen Autakoids. Dies könnte bedingt sein durch einen auf eine gemeinsame Endstrecke konvergierenden Weg in der Signaltransduktionskette, bei dem entweder der Phosphorylierungsstatus der Connexine oder eines die Connexine direkt beeinflussenden Enzyms verändert wird.

Mit der gewählten Methode wurde die Zellkopplung über Gap Junctions, durch die Weitergabe von Molekülen einer bestimmten Größe, untersucht. Allerdings ist bisher noch völlig unklar, welche physiologische Funktion die Ausbreitung dieser Botenstoffe in dem Endothelzellayer in Gefäßen hat. In anderen Geweben, wie beispielsweise der Leber, ist die Übertragung von sekundären Botenstoffen (IP_3) von

einer Zelle, in der seine Bildung stimuliert wird, zu den benachbarten Zellen für eine adäquate Funktion dieses Organs bezüglich der Mobilisierung von Glucose unabdingbar. Ebenso könnte eine Ausbreitung einer lokal stimulierten Bildung dieser sekundären Botenstoffe im Endothel physiologisch relevant sein. Neben den genannten Botenstoffen wird auch das freie Calcium, welches als sekundärer Botenstoff in Endothelzellen fungiert, über Gap Junctions weitergegeben. Diese langsame wellenförmige Ausbreitung eines lokal generierten Calciumsignals ist für die adäquate Dilatation nach Stimulation mit Substanzen, die zu einer endothelvermittelten Gefäßerweiterung führen (Acetylcholin), von Bedeutung. Die lokale Ausbreitung konnte durch NO beschränkt werden. Hierbei könnte die lokale endotheliale NO-Bildung eine wesentliche Kontrollfunktion übernehmen. Wird in einer Zelle wenig oder kein NO gebildet, führt dies zu einer gesteigerten Permeabilität der Gap Junctions. Dieses hätte dann seinerseits eine vermehrte Diffusion des sekundären Botenstoffs Calcium von einer stimulierten Zelle zu den benachbarten Zellen zur Folge. So würden Inhomogenitäten von Calcium-Signalen in verschiedenen Zellen geglättet werden. Dies würde dann die nachgeschalteten Prozesse, wie es die Calcium-abhängige NO-Bildung ist, ebenfalls homogenisieren können und zu einer Zunahme der NO-Bildung auch in diesen primär nicht stimulierten Zellen führen. Damit ergibt sich eine Koordination der Endothelzellen dergestalt, daß eine effektivere Bildung von NO in allen Endothelzellen gewährleistet wird. Da eine Erhöhung der Calciumkonzentration nicht nur zu einer vermehrten NO-Bildung führt, sondern ebenso durch die Bildung anderer Autakoide (z.B. des endothelialen hyperpolarisierenden Faktors, EDHF) stimuliert wird [14], könnte dies ein Mechanismus sein, um neben der Koordination durch das Membranpotential, eine weitere 'Gleichschaltung' der Funktion des Endothels zu erreichen. Gleichzeitig

könnte NO regulieren, wohin sich Signale z.B. elektrisch ausbreiten, innerhalb des Endothelzellmonolayers aber auch zwischen Endothel-und Muskelschicht.

Welche physiologischen oder auch pathophysiologischen Konsequenzen diese Ergebnisse letztendlich in vivo haben, kann in diesem vorliegenden Versuchsansatz nicht gezeigt werden, da diese Untersuchungen in der Zellkultur durchgeführt wurden. Es bleibt jedoch zu bedenken, daß diese Regulationsmöglichkeiten einen wesentlichen Einfluß im Gesamtorganismus haben könnten. Insbesondere deshalb, da Hemmstoffe der Cyclooxygenase 1 und 2 in der Schmerztherapie weit verbreitet sind und nachweislich Nebenwirkungen haben, wie z. B. die Kontraktionshemmung des Uterus. Wie wichtig die Funktionalität der Gap Junctions für die Regulation der Durchblutung und die Regulation des Blutdruckes ist wurde jedoch auch bereits in vivo Untersuchungen gezeigt [25]. Außerdem wurde in Ratten gezeigt, daß die Expression des Connexin43 in hypertensiven Ratten in Teilen des Gefäßbaumes signifikant ansteigt [46].

Inwieweit diese gesteigerte Expression eine Kompensation im Rahmen der durch Bluthochdruck-bedingten Veränderungen der Gefäßregulation darstellt, muß weiter untersucht werden. Insgesamt dürften diese Untersuchungen jedoch zeigen, daß Gap Junctions dynamische Strukturen darstellen, deren Leitfähigkeit einer raschen Modulation durch endotheliale Autakoide unterliegt. In dem Maße in dem künftige Untersuchungen eine wichtige Rolle von Gap Junctions bei der Gefäßregulation bestätigen, dürften die hier vorgestellten Befunde einen neuen Ansatz für eine medikamentöse Therapie oder eine Gentherapie z. B. bei Hochdruckerkrankungen bieten.

Zusammenfassung

Die Anpassung der Gewebsdurchblutung an die unterschiedlichen Bedarfssituationen, setzt ein koordiniertes Verhalten der Gefäße im mikrovaskulären Gefäßnetz voraus. Diese Koordination der vasomotorischen Reaktionen im mikrovaskulären Gefäßsystem, ist möglicherweise auf die interzelluläre Kommunikation der Endothelzellen angewiesen. Die Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Blutgefäße sind über Gap Junctions gekoppelt, auch eine myoendotheliale Kopplung wird diskutiert. Dadurch können Signale in Form von Ionen (und damit Änderungen des Membranpotentials) oder kleinen Moleküle über solche interzellulären Kanäle entlang der Endothelzellschicht weitergegeben werden. Völlig unbekannt ist aber, ob die Permeabilität dieser endothelialen Gap Junctions reguliert wird. Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob vom Endothel gebildete lokal wirksame Gewebshormone (Autakoide, wie NO und Prostacyclin) die Durchlässigkeit der Gap Junctions beeinflussen.

Hierzu wurde in konfluenten Kulturen von humanen umbilikalvenösen Endothelzellen (n=190) die Ausbreitung der Farbstoffe Carboxyfluorescein und Calcein nach Injektion in eine einzelne Endothelzelle in die benachbarten Endothelzellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß der injizierte Farbstoff tatsächlich nur über interzelluläre Kanäle von einer Zelle zur nächsten gelangt. Diese Kanäle werden von Connexinen gebildet, denn ein Peptid, das das Aneinanderdocken der Connexine verhindert, reduzierte die Ausbreitung des fluoreszierenden Farbstoffs. Daher kann mit dieser Methode tatsächlich die Kopplung der Zellen über Gap Junctions untersucht werden. Die erhobenen Daten zeigen, daß die Anzahl der fluoreszierenden Zellen nach Hemmung der NO-Synthase mit N^ω-nitro-L-Arginin (L-NA, 30µmol/L) um bis zu 29%

zunahm, während die anschließende erneute Freisetzung von NO durch zwei differente NO-Donoren (SNAP bzw. SNP, 1 $\mu\text{mol/L}$) die Zahl der fluoreszierenden Zellen wieder auf den Ausgangswert reduzierte oder sogar unterhalb den, der unbehandelten Kontrollzellen senkte. Diese durch NO hervorgerufene Wirkung blieb in Anwesenheit des Hemmstoffes der löslichen Guanylatcyclase ODQ (10 $\mu\text{mol/L}$) oder der Radikalfänger Tiron und Superoxiddismutase unverändert. Dies weist daraufhin, daß es sich bei dieser durch NO hervorgerufenen Hemmung um einen direkten Effekt von NO handelt, der weder über die Bildung von cGMP noch über eine gesteigerte Peroxynitritproduktion vermittelt wird. Auch eine Hyperpolarisation der Endothelzellen durch den Aktivator von K_{ATP} -Kanälen HOE234 (1 $\mu\text{mol/L}$) hatte keinen Einfluß auf die Kopplung der Zellen. Im Gegensatz dazu hatte NO in Anwesenheit der Hemmstoffe der Tyrosinphosphatase Orthovanadat (100 $\mu\text{mol/L}$) und Phenylarsinoxid (1 $\mu\text{mol/L}$) keinen Einfluß mehr auf die endotheliale Kommunikation via Gap Junctions. Dagegen führte die Behandlung der Zellen mit dem Tyrosinkinase Inhibitor Genistein (100 $\mu\text{mol/L}$) zu einer deutlichen Reduktion der endothelialen Kopplung (-14%), die mit der Wirkung von NO vergleichbar war. Daraus läßt sich schließen, daß die durch NO hervorgerufene Wirkung auf die interzelluläre Kommunikation über eine Verminderung der Tyrosinphosphorylierung vermittelt zu werden scheint.

Außerdem zeigen diese Daten, daß Prostacyclin die endotheliale Kopplung signifikant steigert, und das diese Wirkung über das gebildete cAMP vermittelt wird. Denn nicht nur das Prostacyclin Analogon Iloprost (1 $\mu\text{mol/L}$), sondern auch der Aktivator der Adenylatcyclase Forskolin (30 $\mu\text{mol/L}$), verbesserte die Ausbreitung des Farbstoffes signifikant .

Schließlich zeigen die Ergebnisse auch, daß die beiden vom Endothel gebildeten Substanzen sich gegenseitig in ihrer Wirkung auf die endothelialen Gap Junctions beeinflussen können. Die erhobenen Daten zeigen erstmals eine Rolle von NO und Prostacyclin in der Regulation der Permeabilität endothelialer Gap Junctions.

Diese Regulationsmöglichkeit und die Auswirkungen einer vermehrten oder verminderten Kopplung der Endothelzellen wirft zahlreiche neue Fragestellungen auf z. B. hinsichtlich der Pathophysiologie der coronaren Herzkrankheit oder auch des arteriellen Hypertonus und bietet damit auch die Möglichkeit zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten[20],[31],[25],[46].

VI. Literaturverzeichnis

1. Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., et al: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine protein kinases. *J.Biol.Chem.* 262: 5592-5595, 1987
2. Beblo D. A., Wang H. Z., Beyer E. C., Westphale E. M., Veenstra R. D.: Unique conductance, gating, and selective permeability properties of gap junction channels formed by connexin40. *Circ.Res.* 77: 813-822, 1995
3. Beckman J. S., Koppenol W. H.: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am.J.Physiol.* 271: C1424-C1437 1996
4. Bennett M. V. L.: Physiology of electrotonic junctions. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 137: 509-539, 1966
5. Bennett M. V. L., Trinkaus J. P.: Electrical coupling between embryonic cells by the way of extracellular space and specialized junctions. *J.Cell Biol.* 44: 592-607, 1970
6. Bergoffen J., Scherer S. S., Wang S., et al: Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262: 2039-2042, 1993
7. Bevans C. G., Kordel M., Rhee S. K., Harris A. L.: Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *J.Biol.Chem.* 273: 2808-2816, 1998
8. Beyer E. C., Paul D. L., Goodenough D. A.: Connexin family of gap junction proteins. *J.Membr.Biol.* 116: 187-194, 1990

9. Bény J. L.: Endothelial and smooth muscle cells hyperpolarized by bradykinin are not dye coupled. *Am.J.Physiol.* 258: H836-H8411990
10. Bény J. L., Pacicca C.: Bidirectional electrical communication between smooth muscle and endothelial cells in the pig coronary artery. *Am.J.Physiol.* 266: H1465-H14721994
11. Bolanos J. P., Medina J. M.: Induction of nitric oxide synthase inhibits gap junction permeability in cultured rat astrocytes. *J.Neurochem.* 66: 2091-2099, 1996
12. Bolotina V. M., Najibi S., Palacino J. J., Pagano P. J., Cohen R. A.: Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368: 850-853, 1994
13. Bolz S. S., de Wit C., Pohl U.: Endothelium-derived hyperpolarizing factor but not NO reduces smooth muscle Ca²⁺ during acetylcholine-induced dilation of microvessels. *Br.J.Pharmacol.* 128: 124-134, 1999
14. Bolz S. S., Fisslthaler B., Pieperhoff S., et al: Antisense oligonucleotides against cytochrome P450 2C8 attenuate EDHF mediated Ca(2+) changes and dilation in isolated resistance arteries. *FASEB J.* 14: 255-260, 2000
15. Bredt D. S., Snyder S. H.: Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87: 682-685, 1990
16. Brink P. R., Cronin K., Banach K., et al: Evidence for heteromeric gap junction channels formed from rat connexin43 and human connexin37. *Am.J.Physiol.* 273: C1386-C13961997

17. Brisette J. L., Kumar N. M., Gilula N. B., Hall J. E., Dotto G. P.: Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91: 6453-6457, 1994
18. Burghardt R. C., Barhoumi R., Sewall T. C., Bowen J. A.: Cyclic AMP induces rapid increases in gap junction permeability and changes in the cellular distribution of connexin43. *J.Membr.Biol.* 148: 243-253, 1995
19. Busse R., Mülsch A.: Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett.* 265: 133-136, 1990
20. Cai W. J., Koltai S., Kocsis E., Scholz D., Schaper W., Schaper J.: Connexin37, not Cx40 and Cx43, is induced in vascular smooth muscle cells during coronary arteriogenesis. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 33:(5): 957-967, 2001
21. Chaytor A. T., Evans W. H., Griffith T. M.: Peptides homologous to extracellular loop motifs of connexin 43 reversibly abolish rhythmic contractile activity in rabbit arteries. *J.Physiol.Lond.* 503: 99-110, 1997
22. Ciray H.N., Fu X., Olovsson M., et al: Presence and localization of connexins43 and 26 in cell cultures derived from myometrial tissues from nonpregnant and pregnant woman and leiomyomas. *Am J.Obstet Gynecol.* 182: 926-930, 2000
23. Civitelli R., Ziambaras K., Warlow P. M., et al: Regulation of connexin 43 expression and function by prostaglandin E2 (PGE2) and parathyroid hormone (PTH) in osteoblastic cells. *J.Cell.Biochem.* 68: 8-21, 1998

24. Cruciani V. R., Mikalsen S. O., Vasseur P., Sanner T.: Effects of peroxisome proliferators and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate on intercellular communication and connexin43 in two hamster fibroblast systems. *Int.J.Cancer* 73: 240-248, 1997
25. de Wit C., Roos F., Bolz S. S., et al: Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40 deficient mice. *Circ.Res.* 86: 649-655, 2000
26. Demello W. C.: Effect of isoprotenerol and 3-isobutyl-1-methylxanthine on the junctional conductance in heart cell pairs. *Biochim.Biophys.Acta* 1012: 291-298, 1989
27. Dhaunsi G. S., Matthews C., Kaur K., Hassid A.: NO increases protein tyrosine phosphatase activity in smooth muscle cells: Relationship to antimitogenesis. *Am.J.Physiol.* 272: H1342-H1349, 1997
28. Dietrich H. H., Tymi K.: Capillary as a communicating medium in the microvasculature. *Microvasc.Res.* 43: 87-99, 1992
29. Dookwah H. D., Barhoumi R., Narasimhan T. K., Safe S. H., Burghardt R. C.: Gap junctions in myometrial cell cultures: evidence for modulation by cAMP. *Biol.Reprod.* 47: 397-406, 1992
30. Draijer R., Vaandrager A. B., Nolte C., de Jonge H. R., Walter U., van Hinsbergh V. W.: Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin. *Circ.Res.* 77: 897-905, 1995

31. Emdad L., Uzzaman M., Takagishi Y., et al: Gap junction remodeling in hypertrophied left ventricles of aortic-banded rats: Prevention by angiotensin II type 1 receptor blockade. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 33: 219-231, 2001
32. Falcone J. C., Meininger G. A.: Arteriolar dilation produced by venule endothelium-derived nitric oxide. *Microcirculation London* 4: 303-310, 1997
33. Fallon R. F. G.: Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. *J.Cell Biol.* 90: 521-526, 1981
34. Fisslthaler B., Dimmeler S., Herrmann C., Busse R., Fleming I.: Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol.Scand.* 168: 81-88, 2000
35. Flagg-Newton J., Löwenstein W. R.: Experimental depression of junctional membrane permeability in mammalian cell culture. A study with tracer molecules in the 300 to 800 Dalton range. *J.Membr.Biol.* 50: 65-100, 1979
36. Frame M. D., Sarelius I. H.: Regulation of capillary perfusion by small arterioles is spatially organized. *Circ.Res.* 73: 155-163, 1993
37. Furchgott RF, Khan MT, Jothianandan D: Evidence supporting the proposal that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. *Thromb.Res.* 1987; 7 (Suppl): 5-5.(Abstract)
38. Furchgott R. F., Vanhoutte P. M.: Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 3: 2007-2018, 1989

39. Furchgott R. F., Zawadzki J. V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980
40. Furshpan E. J., Potter D. D.: Transmission at the giant motor synapses of the Crayfish. *J.Physiol.Lond.* 145: 289-325, 1959
41. Garthwaite J., Southam E., Boulton C. L., Nielsen E. B., Schmidt K., Mayer B.: Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol.Pharmacol.* 48: 184-188, 1995
42. George C. H., Kendall J. M., Evans W. H.: Intracellular trafficking pathways in the assembly of connexins into gap junctions. *J.Biol.Chem.* 274: 8678-8685, 1999
43. Godwin A. J., Green L. M., Walsh M. P., McDonald J. R., Walsh D. A., Fletcher W. H.: In situ regulation of cell-cell communication by the cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol.Cell.Biochem.* 127/128: 293-307, 1993
44. Goodenough D. A.: The crystalline lens. A system networked by gap junctional intercellular communication. *Semin.Cell Biol.* 3: 49-58, 1992
45. Griffith T. M.: Modulation of blood flow and tissue perfusion by endothelium-derived relaxing factor. *Exp.Physiol.* 79: 873-913, 1994
46. Haefliger J. A., Castillo E., Waeber G., et al: Hypertension increases connexin43 in a tissue-specific manner. *Circulation* 95: 1007-1014, 1997

47. Halliwell B., Zhao K., Whiteman M.: Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good - A personal view of recent controversies. *Free Radic.Res.* 31: 651-669, 1999
48. Heller R., Polack T., Gräbner R., Till U.: Nitric oxide inhibits proliferation of human endothelial cells via a mechanism independent of cGMP. *Atherosclerosis* 144: 49-57, 1999
49. Hoffmann A., Gloe T., Pohl U.: NO activates tyrosine- and serine threonine-phosphatases in endothelial cells. *Pflügers Arch.* 437(5): R159-R1591999
50. Hossain M. Z., Ao P., Boynton A. L.: Platelet-derived growth factor-induced disruption of gap junctional communication and phosphorylation of connexin43 involves protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *J.Cell.Physiol.* 176: 332-341, 1998b
51. Hossain M. Z., Ao P., Boynton A. L.: Rapid disruption of gap junctional communication and phosphorylation of connexin43 by platelet-derived growth factor in T51B rat liver epithelial cells expressing platelet-derived growth factor receptor. *J.Cell.Physiol.* 174: 66-77, 1998a
52. Huang T. Y., Chu T. F., Chen H. I., Jen C. V. Y.: Heterogeneity of Ca²⁺ signaling in intact rat aortic endothelium. *FASEB J.* 14: 797-804, 2000
53. Ignarro L. J.: Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ.Res.* 65: 1-21, 1989

54. Ignarro L. J., Buga G. M., Wood K. S., Byrns R. E., Chaudhuri G.:
Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery
and vein is nitric oxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84: 9265-9269, 1987
55. Jaffe E. A., Nachman R. L., Becker C. G., Minick C. R.: Culture of human
endothelial cells derived from umbilical veins: identification by
morphologic and immunologic criteria. *J.Clin.Invest.* 52: 2745-2756,
1973
56. Karasinski J., Semik D., Lilarski W.: Connexin43 in porcine myocardium an
non-pregnant myometrium. *Tissue Cell* 32(2): 133-140, 2000
57. Kim D. Y., Kam Y., Koo S. K., Joe C. O.: Gating connexin 43 channels
reconstituted in lipid vesicles by mitogen-activated protein kinase
phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 274: 5581-5587, 1999
58. Koller A., Sun D., Kaley G.: Role of shear stress and endothelial
prostaglandins in flow- and viscosity-induced dilation of arterioles in
vitro. *Circ.Res.* 72: 1276-1284, 1993
59. Koval M., Geist S. T., Westphale E. M., et al: Transfected connexin 45 alters
gap junction permeability in cells expressing endogenous connexin 43.
J.Cell Biol. 130: 987-995, 1995
60. Kumar N. M., Gilula N. B.: The gap junction communication channel. *Cell* 84:
381-388, 1996
61. Kwak B. R., Hermans M. M., De-Jonge H. R., Lohmann S. M., Jongsma H. J.,
Chanson M.: Differential regulation of distinct types of gap junction

- channels by similar phosphorylating conditions. *Mol.Biol.Cell* 6: 1707-1719, 1995
62. Kwak B. R., Jongsma H. J.: Regulation of cardiac gap junction channel permeability and conductance by several phosphorylating conditions. *Mol.Cell.Biochem.* 157: 93-99, 1996
63. Kwak B. R., Saez J. C., Wilders R., et al: Effects of cGMP dependent phosphorylation on rat and human connexin43 gap junction channels. *Pflügers Arch.* 430: 770-778, 1995
64. Laird D. W.: The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation. *J.Bioenerg.Biomembr.* 28: 311-318, 1996
65. Laird D. W. C.: Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells. *J.Cell Biol.* 131: 1193-1203, 1995
66. Langheinrich U., Daut J.: Hyperpolarization of isolated capillaries from guinea-pig heart induced by K⁺ channel openers and glucose deprivation. *J.Physiol.Lond.* 502: 397-408, 1997
67. Larson D. M., Haudenschild C. C., Beyer E. C.: Gap junction messenger RNA expression by vascular wall cells. *Circ.Res.* 66: 1074-1080, 1990
68. Larson D. M. S.: Junctional transfer in cultured vascular endothelium: II. Dye and nucleotide transfer. *J.Membr.Biol.* 83: 157-167, 1985

69. Lippincott-Schwartz J. Y., Yuan L. C., Bonifacino J.S., Klausner R. D.: Rapid redisruption of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* 56: 801-813, 1989
70. Little T. L., Beyer E. C., Duling B. R.: Connexin 43 and connexin 40 gap junctional proteins are present in arteriolar smooth muscle and endothelium in vivo. *Am.J.Physiol.* 268: H729-H739, 1995
71. Little T. L., Xia J., Duling B. R.: Dye tracers define differential endothelial and smooth muscle coupling patterns within the arteriolar wall. *Circ.Res.* 76: 498-504, 1995
72. Loo L. W. B.: pp60src-mediated phosphorylation of connexin 43, a gap junction protein. *J.Biol.Chem.* 270: 12751-12761, 1995
73. Löwenstein W. R.: Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim.Biophys.Acta* 560: 1-65, 1979
74. Löwenstein W. R.: Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol.Rev.* 61: 829-913, 1981
75. Löwenstein W. R., Kanno Y.: Studies on an epithelial (gland) cell junction. Modifications of surface membrane permeability. *J.Cell Biol.* 22: 565-586, 1964
76. Lu C. B., McMahon D. G.: Modulation of hybrid bass retinal gap junctional channel gating by nitric oxide. *J.Physiol.Lond.* 499: 689-699, 1997

77. Makowski L. C.: Gap junctions structures. II. Analysis of the X-Ray diffraction data. *J.Cell Biol.* 74: 629-645, 1977
78. Manolopoulos V. G., Lelkes P. I.: Cyclic strain and forskolin differentially induce cAMP production in phenotypically diverse endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 191: 1379-1385, 1993
79. Mayer B., Schmidt K., Humbert P., Böhme E.: Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor - A cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca^{2+} - dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 164: 678-685, 1989
80. Mikalsen S. O., Husoy T., Vikhamar G., Sanner T.: Induction of phosphotyrosine in the gap junction protein, connexin43. *FEBS Lett.* 401: 271-275, 1997
81. Moncada S., Vane J. R.: Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacol.Rev.* 30: 293-331, 1978
82. Musil L. S., Cunningham B. A., Edelman G. M., Goodenough D. A.: Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin-43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J.Cell Biol.* 111: 2077-2088, 1990
83. Musil L. S., Goodenough D. A.: Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap-junctional plaques. *J.Cell Biol.* 115: 1357-1374, 1991

84. Musil L. S., Goodenough D. A.: Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from ER. *Cell* 74: 1065-1077, 1993
85. Mülsch A., Böhme E., Busse R.: Stimulation of soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from cultured endothelial cells. *Eur.J.Pharmacol.* 135: 247-250, 1987
86. Niessen H., Willecke K.: Strongly decreased gap junctional permeability to inositol 1,4-5trisphosphate in connexin32 deficient hepatocytes. *FEBS Lett.* 466(1): 112-114, 2000
87. Pacicca C., Schaad O., Bény J. L.: Electrotonic propagation of kinin-induced, endothelium- dependent hyperpolarizations in pig coronary smooth muscles. *J.Vasc.Res.* 33: 380-385, 1996
88. Palmer R. M., Ashton D. S., Moncada S.: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L- arginine. *Nature* 333: 664-666, 1988
89. Palmer R. M., Ferrige A. G., Moncada S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987
90. Palmer R. M., Rees D. D., Ashton D. S., Moncada S.: L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 153: 1251-1256, 1988
91. Pohl U., Busse R.: Hypoxia stimulates the release of endothelium-derived relaxant factor (EDRF). *Am.J.Physiol.* 256: H1595-H1600, 1989

92. Pohl U., Busse R.: Endothelium-dependent modulation of vascular tone and platelet function. *Eur.Heart J.* 11 (Suppl B): 35-42, 1990
93. Pohl U., Busse R., Kuon E., Bassenge E.: Pulsatile perfusion stimulates the release of endothelial autacoids. *J.Appl.Cardiol.* 1: 215-235, 1986
94. Rees D. D., Palmer R. M., Moncada S.: Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86: 3375-3378, 1989
95. Robbins D. J., Zhen E., Owaki H., et al: Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *J.Biol.Chem.* 268: 5097-5106, 1993
96. Rubanyi G. M., Freay A. D., Kauser K., Johns A., Harder D. R.:
Mechanoreception by the endothelium - mediators and mechanisms of pressure-induced and flow-induced vascular responses. *Blood Vessels* 27: 246-257, 1990
97. Saffitz J.E.: Structure and function of cardiac gap junctions. *J Electrocardiol.* 34: 55-55, 2001
98. Schmidt H. H., Lohmann S. M., Walter U.: The nitric oxide and cGMP signal transduction system -regulation and mechanism of action. *Biochim.Biophys.Acta* 1178: 153-175, 1993
99. Segal S. S.: Cell-to-cell communication coordinates blood flow control. *Hypertension* 23: 1113-1120, 1994

100. Segal S. S., Bény J. L.: Intracellular recording and dye transfer in arterioles during blood flow control. *Am.J.Physiol.* 263: H1-H71992
101. Segal S. S., Damon D. N., Duling B. R.: Propagation of vasomotor responses coordinates arteriolar resistances. *Am.J.Physiol.* 256: H832-H8371989
102. Segal S. S., Welsh D. G., Kurjiaka D. T.: Spread of vasodilatation and vasoconstriction along feed arteries and arterioles of hamster skeletal muscle. *J.Physiol.Lond.* 516: 283-291, 1999
103. Simpson I., Connor J. A., Spray D. C., Bennett M. V. L.: Size limit of molecules permeating the junctional membrane channel. *Science* 195: 294-296, 1977
104. Song H., Tymi K.: Evidence for sensing and integration of biological signals by the capillary network. *Am.J.Physiol.* 265: H1235-H12421993
105. Spray D. C., Stern J. H., Harris A. L., Bennett M. V. L.: Gap junctional conductance: Comparison of Sensitivities to H⁺ and Ca²⁺ Ions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 79: 441-445, 1989
106. Steinberg T. H., Civitelli R., Geist S. T., et al: Connexin43 and connexin45 form gap junctions with different molecular permeabilities in osteoblastic cells. *EMBO J.* 73: 744-750, 1994
107. Stock A., Sies H., Stahl W.: Enhancement of gap junctional communication and connexin43 expression by thyroid hormones. *Biochem.Pharmacol.* 55: 475-479, 1998

108. Traub O., Hertlein B., Kasper M., et al: Characterization of the gap junction protein connexin37 in murine endothelium, respiratory epithelium, and after transfection in human HeLa cells. *Eur.J.Cell Biol.* 77: 313-322, 1998
109. Traub O. L.: Cyclic adenosine monophosphate stimulates biosynthesis and phosphorylation of the 26 kDA gap junction protein in cultured mouse hepatocytes. *Eur.J.Cell Biol.* 43: 48-54, 1987
110. Van Rijen H. V., van Kempen M. J., Analbers L. J., et al: Gap junctions in human umbilical cord endothelial cells contain multiple connexins. *Am.J.Physiol.* 272: C117-C130, 1997
111. van Rijen H. V. M., van Veen T. A. B., Hermans M. M. P., Jongsma H. J.: Human connexin40 gap junction channels are modulated by cAMP. *Cardiovasc.Res.* 45: 941-951, 2000
112. Warn-Cramer B. J., Cottrell G. T., Burt J. M., Lau A. F.: Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase. *J.Biol.Chem.* 273: 9188-9196, 1998
113. Warner A., Clements D. K., Parikh S., Evans W. H., DeHaan R. L.: Specific motifs in the external loops of connexin proteins can determine gap junction formation between chick heart myocytes. *J.Physiol.Lond.* 488: 721-728, 1995
114. Welsh D. G., Segal S. S.: Role of EDHF in conduction of vasodilation along hamster cheek pouch arterioles in vivo. *Am.J.Physiol.* 278: H1832-H1839, 2000

115. White R. L., Doeller J. E., Verselis V. K., Wittenberg B. A.: Gap junctional conductance between pairs of ventricular myocytes is modulated synergistically by H⁺ and Ca⁺⁺. *J.Gen.Physiol.* 95: 1061-1075, 1990
116. White T. W., Bruzzone R., Paul D. L.: The connexin family of intercellular channel forming proteins. *Kidney Int.* 48: 1148-1157, 1995
117. Willecke K., Hennemann H., Dahl E., Jungbluth S., Heynkes R.: The diversity of connexin genes encoding gap junctional proteins. *Eur.J.Cell Biol.* 56: 1-7, 1991
118. Xie H. Q., Laird D. W., Chang T. H., Hu V. W.: A mitosis-specific phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in human vascular cells: Biochemical characterization and localization. *J.Cell Biol.* 137: 203-210, 1997
119. Ying X. Y., Minamiya Y., Fu C. Z., Bhattacharya J.: Ca²⁺ waves in lung capillary endothelium. *Circ.Res.* 79: 898-908, 1996
120. Yu W. D.: The connexin43 gene is responsive to oestrogen. *Proc.R.Soc.Lond.B Biol.Sci.* 255: 125-132, 1994

VII. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med U. Pohl danke ich für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung meiner Dissertationsarbeit und zahlreiche über das Thema hinausgehende Ratschläge, Anregungen und Diskussionen.

Dem Kreißsaalteam der Horst-Schmidt Kliniken GmbH Wiesbaden und der Universitätsfrauenklinik Maistraße München danke ich für das Sammeln und die Aufbewahrung der Nabelschnüre.

Herzlich bedanken möchte ich mich besonders bei Sabine Wawro und Sabine Hentze für die Präparation der Nabelschnüre und Kultur der Endothelzellen und die angenehme Art ihrer Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Name: Christina Hundhausen geb. Schellen
Geburtsdatum: 27. Dezember 1973 in Köln
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Verheiratet, seit 06.09.2002
Eltern: Horst Peter Schellen
Erika Dahlmann, geb. Salz
Geschwister: Thorsten Peter Schellen, geb. 05.08.67

Schulischer Werdegang:

80 – 84 Grundschule Siegburg Kaldauen
84 - 88 Gymnasium Alleestraße Siegburg
88-90 Carl-Duisberg Gymnasium Wuppertal
6/90 – 9/90 Stipendium der Society of German-Australian-Newzealand
Exchange am Methodist Ladies College Melbourne
Australien
9/90 – 93 Gymnasium Alleestraße Siegburg
7/93 Allgemeine Hochschulreife

Beruflicher Werdegang:

8/93 - 12/93 Freiwilliges soziales Jahr in der Johanniter Kinderklinik St.
Augustin

1/94	Eintritt in die Bundeswehr als Sanitätsoffizieranwärter an der Sanitätsschule der Luftwaffe in Giebelstadt
4/95	Beurlaubung zum Studium der Humanmedizin an der Johannes-Gutenberg Universität Mainz
3/97	Ärztliche Vorprüfung
3/98	1. Staatsexamen
4/97	Beginn der Dissertation bei Prof. Dr. Ulrich Pohl am Institut für Physiologie und Pathophysiologie in Mainz "Kontrolle der Zellkopplung über Gap Junctions durch endotheliale Autakoide"
10/97	Young Investigator Award der Gesellschaft für Mikrozirkulation
11/98	Wechsel an die Ludwig Maximilian Universität München
4/00	2. Staatsexamen
04/00-12/00	Praktisches Jahr in der Chirurgischen und Medizinischen Klinik des KKrhs Starnberg GmbH
12/00-03/01	Praktisches Jahr in der Urologischen Klinik Großhadern
05/01	3. Staatsexamen
seit 05/01	AiP im Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz Abteilung I Innere Medizin
seit 06/02	AiP im Bundeswehrkrankenhaus Koblenz Abteilung II Allgemeinchirurgie
seit 11/02	Vollapprobation
seit 12/02	Assistenzärztin im Bundeswehrkrankenhaus Koblenz Abteilung IX Orthopädie