

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl



Die Bedeutung von Gap Junctions bei der
interzellulären Ausbreitung von Calciumsignalen
in humanen Endothelzellen

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

Angela Ritter
aus Stuttgart

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München.

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Ulrich Welsch
Prof. Dr. Johannes Hoffmann

Mitbetreuung durch
die promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. biol. hum. Petra Kameritsch

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2011

Zusammenfassung

Das Gefäßendothel hat eine wichtige Funktion in der lokalen Regulation des Gefäßtonus. Veränderungen im Blutfluss („shear stress“) und/oder die Bindung von vasoaktiven Substanzen (Histamin, ATP) führen über einen endothelialen Calciumanstieg zur Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), das in der benachbarten glatten Gefäßmuskulatur zur Relaxation der Zellen und damit zur Dilatation des Gefäßes führt. Für eine wirkungsvolle Endothelfunktion ist dabei ein synchrones Verhalten aller Endothelzellen - als Folge eines synchronen zytosolischen Calciumanstiegs - eine wichtige Voraussetzung. Für die vorliegende Arbeit wurde postuliert, dass eine synchrone Calciumantwort nach Stimulation der Endothelzellen mit Histamin oder ATP entscheidend von der Gap Junction Kopplung zwischen den Zellen abhängt. Dieser Kopplung käme somit eine neue modulierende Rolle für die Reaktion des Endothels auf vasodilatierende Substanzen zu.

Kultivierte humane Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) wurden mit Histamin oder ATP vor, während und nach pharmakologischer Gap Junction Blockade stimuliert und der zeitliche Verlauf des Calciumanstiegs in allen individuellen Zellen eines Sichtfeldes wurde mit Hilfe eines Mikroskop-basierten Kamerasystems analysiert. Als Maß für die calciumabhängige NO-Bildung wurde der Histamin-induzierte cGMP Anstieg in Endothelzellen unter Kontrollbedingungen und nach Gap Junction Inhibition untersucht. Die Verteilung von Histamin- und ATP-Rezeptoren innerhalb der HUVEC-Population wurde mit Durchflusszytometrie bzw. Immunfluoreszenz analysiert. Zusätzlich wurde nach mechanischer Stimulation von Einzelzellen untersucht, ob der von Gap Junctions abhängige zytosolische Calciumanstieg in Nachbarzellen („Calciumwelle“) auf der Ausbreitung von Ca^{2+} und/oder der Ausbreitung des calciumfreisetzenden Signalstoffs IP_3 beruht.

Ausgehend von initial reagierenden Zellen erfolgte der Calciumanstieg nach Zugabe von Histamin und ATP zeitlich verzögert in deren Nachbarzellen. Während einer Blockade der gap-junctionalen Kommunikation konnte nur in etwa 40 % der Zellen eine Calciumreaktion beobachtet werden. Diese Beobachtungen an HUVEC wurden zudem in ersten Versuchen am isolierten Gefäß nach Stimulation mit ATP bestätigt. Die

Histaminrezeptoren waren in HUVEC-Kulturen inhomogen verteilt und nur in einem Teil der Zellen nachweisbar. Außerdem war nach einer Gap Junction Blockade die cGMP-Konzentration (als Maß für die NO-Bildung) in HUVEC-Zelllysat nach Stimulation mit Histamin deutlich verringert. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass IP₃ eine wichtige Rolle für die Ausbreitung der Calciumwelle über Gap Junctions spielt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions für eine synchrone Antwort des Endothels auf die vasoaktiven Substanzen Histamin und ATP wesentlich ist. Eine Inhibition der interzellulären Kommunikation führt zu einem verminderten Calciumanstieg und verminderter NO-Produktion in der Endothelschicht. Gap Junctions modulieren somit die Sensitivität des Endothels auf vasoaktive Substanzen. Eine gezielte Beeinflussung der Gap Junction-Permeabilität des Endothels könnte somit ein vielversprechender Ansatzpunkt für die Therapie von pathophysiologischen Gefäßveränderungen wie Atherosklerose oder Diabetes darstellen, die mit vasomotorischen Endothelfunktionsstörungen einhergehen.

| | |
|---|-----------|
| ZUSAMMENFASSUNG | V |
| 1 EINFÜHRUNG | 1 |
| 2 LITERATURÜBERSICHT | 2 |
| 2.1 DAS ENDOTHEL IN DER DURCHBLUTUNGSREGULATION | 2 |
| 2.2 GAP JUNCTIONS | 3 |
| 2.3 BEDEUTUNG UND FUNKTION VON Ca^{2+} AUF ZELLULÄRER EBENE | 5 |
| 2.4 ZIELE DER ARBEIT | 11 |
| 3 MATERIAL | 13 |
| 3.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN | 13 |
| 3.2 CHEMIKALIEN | 14 |
| 3.3 PUFFERLÖSUNGEN | 16 |
| 4 METHODEN..... | 18 |
| 4.1 ZELLKULTUR | 18 |
| 4.1.1 HUVEC | 18 |
| 4.1.2 HeLa-Zellen | 19 |
| 4.2 PRÄPARATION DER MURINEN AORTA..... | 20 |
| 4.3 MESSUNG UND DARSTELLUNG DER CALCIUMAUSBREITUNG | 20 |
| 4.3.1 Funktionsweise von Fura-2/AM..... | 20 |
| 4.3.2 Calciummessung | 22 |
| 4.3.3 Calciummessung in HUVEC..... | 25 |
| 4.3.3.1 Humorale Zellstimulation | 25 |
| 4.3.3.2 Mechanische Zellstimulation..... | 26 |
| 4.3.4 Calciummessung in Endothelzellen der murinen Aorta | 28 |
| 4.3.5 Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration..... | 29 |
| 4.3.6 Auswertung der Calciummessungen..... | 31 |
| 4.4 MESSUNG VON cGMP IN ZELLYSAT | 32 |
| 4.5 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG..... | 35 |
| 4.6 DURCHFLUSSZYTOMETRIE | 37 |
| 4.7 STATISTIK | 39 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5 | ERGEBNISSE | 40 |
| 5.1 | IMMUNZYTOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG VON HUVEC UND NACHWEIS VON GAP JUNCTIONS | 40 |
| 5.2 | CALCIUMKONZENTRATION IN UNSTIMULIERTEN HUVEC..... | 42 |
| 5.3 | CALCIUMANSTIEG DURCH STIMULATION MIT HISTAMIN ODER IONOMYCIN | 43 |
| 5.3.1 | <i>Einfluss einer Gap Junction Blockade auf den Histamin-induzierten Calciumanstieg in HUVEC</i> | <i>46</i> |
| 5.3.2 | <i>Expression von Histaminrezeptor-1 auf HUVEC.....</i> | <i>48</i> |
| 5.3.3 | <i>NO-abhängiger Anstieg der cGMP-Produktion unter Histamin</i> | <i>50</i> |
| 5.4 | CALCIUMANSTIEG DURCH STIMULATION MIT ATP | 51 |
| 5.4.1 | <i>Einfluss der Gap Junction Blockade auf den ATP-induzierten Calciumanstieg.....</i> | <i>53</i> |
| 5.4.2 | <i>Effekt des P_{2Y}-Rezeptorhemmers Suramin auf den ATP-induzierten Calciumanstieg.....</i> | <i>54</i> |
| 5.4.3 | <i>Verteilung der P_{2Y2}-Rezeptoren auf HUVEC</i> | <i>55</i> |
| 5.5 | CALCIUMANSTIEG DURCH STIMULATION MIT ATP IM ENDOTHEL ISOLIERTER BLUTGEFÄßE | 56 |
| 5.6 | CALCIUMANSTIEG NACH MECHANISCHER STIMULATION..... | 58 |
| 5.6.1 | <i>HeLa-Zellen.....</i> | <i>58</i> |
| 5.6.1.1 | <i>Transfizierte HeLa-Zellen exprimieren Cx43.....</i> | <i>58</i> |
| 5.6.1.2 | <i>Mechanische Stimulation von HeLa-Zellen.....</i> | <i>59</i> |
| 5.6.2 | <i>Mechanische Stimulation von HUVEC</i> | <i>60</i> |
| 5.7 | AUSBREITUNGSGESCHWINDIGKEIT DES CALCIUMSIGNALS..... | 62 |
| 5.8 | XESTOSPONGIN VERRINGERT DIE AUSBREITUNGSFLÄCHE DER CALCIUMWELLE IN HUVEC | 63 |
| 6 | DISKUSSION | 65 |
| 7 | VERZEICHNISSE..... | 80 |
| 7.1 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 80 |
| 7.2 | LITERATURVERZEICHNIS | 85 |
| | DANKSAGUNG..... | 98 |

1 EINFÜHRUNG

Kommunikation ist eine notwendige Voraussetzung für eine funktionelle und effiziente Abstimmung der Zellverbände in einem Organismus, sowohl bei der Aufrechterhaltung der Homöostase, als auch bei Anpassungsreaktionen auf veränderte Umgebungsbedingungen. Dabei muss jeder Zelltyp seine Individualität wahren, während er gleichzeitig seine zellulären Aktivitäten mit denen anderer Zellen koordiniert. Kommunikation kann auf verschiedenen Wegen erfolgen: Unterschieden werden einerseits die neuronalen und endokrinen Kommunikationswege, über die auch bei großen Distanzen Informationen schnell weitergegeben werden können, und andererseits der Informationsaustausch über kurze Strecken, der innerhalb von Zellverbänden in Geweben oder Organen wichtig ist. Diese interzelluläre Kommunikation kann parakrin über den Extrazellulärraum erfolgen, findet aber häufig über Gap Junction Membrankanäle statt. Diese verbinden benachbarte Zellen miteinander und ermöglichen dadurch einen direkten Informationsaustausch über das Zellinnere. Zellen können über diese Verbindungen ein sogenanntes funktionelles Synzytium ausbilden.

Calcium (Ca^{2+}) ist als wichtiges Signalmolekül an vielen zellulären Prozessen beteiligt. Calciumsignale im Gefäßendothel vermitteln z.B. über die verstärkte Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) eine Dilatation der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand. Bei kommunizierenden Zellen tritt ein solcher Calciumanstieg nicht streng lokalisiert, sondern in Form von Calciumwellen auf. Als Calciumwelle bezeichnet man einen lokalen Anstieg der Calciumkonzentration im Zytoplasma, der sich zunächst intrazellulär und dann auch interzellulär ausbreitet. Diese Ausbreitung kann über extrazelluläre Kommunikation und/oder über Gap Junctions erfolgen und ermöglicht durch die Ausbreitung dieses Signals von Zelle zu Zelle koordinierte Aktivitäten.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht die Untersuchung der Rolle von Gap Junctions für die Ausbreitung von Calciumwellen im Gefäßendothel und ihrer Bedeutung für die Endothelfunktion.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Das Endothel in der Durchblutungsregulation

In allen mehrzelligen Organismen muss sichergestellt sein, dass jede einzelne Zelle des Organismus ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird. Diese Versorgung und der gleichzeitige Abtransport von Metaboliten werden in höheren Organismen über konvektiven Transport durch den Blutstrom sichergestellt. Das Blut wird dabei rasch über das Gefäßsystem verteilt, so dass nur noch kürzeste Wege von etwa 10 bis 30 μm mittels der - prinzipiell langsameren - Diffusion überwunden werden müssen. Das Kreislaufsystem sorgt für eine kontinuierliche Aufrechterhaltung des Blutflusses. Das Blut wird aus dem linken Ventrikel in die Aorta ausgeworfen, aus der die großen Körperarterien abzweigen. Diese wiederum teilen sich erst in Arterien, dann in Arteriolen, dann in feinstverästelte Kapillaren auf. Nachdem in den Kapillaren der Stoffaustausch stattgefunden hat, münden diese im venösen System in Venolen und später in Venen, die wiederum zu den Hohlvenen und letztlich zurück zum Herz in den rechten Vorhof führen. Der Wandaufbau der Gefäße ist dabei in jedem Abschnitt auf die jeweilige Funktion abgestimmt [81].

Generell sind Gefäßwände aus drei Schichten aufgebaut, der Tunika Intima, die aus Endothelzellen und dem subendothelialen Bindegewebe besteht, der Tunica Media, die aus glatten Muskelzellen und elastischen Fasern gebildet wird, und der Tunica Adventitia, die hauptsächlich aus Kollagenfasern besteht und das Gefäß damit im umliegenden Gewebe verankert. In den verschiedenen Abschnitten des Kreislaufsystems variiert vor allem der Anteil der glatten Muskelzellen stark.

Die Endothelzellen bilden eine Barriere zwischen Intravasalraum und der übrigen Gefäßwand [12, 81] und haben in Kapillaren eine wichtige Funktion bei der Kontrolle des Gas- und Stoffaustauschs zwischen dem Gefäßlumen und dem umgebenden Gewebe. Endothelzellen können Änderungen im Blutfluss, und damit Änderungen der Wandschubspannung („wall shear stress“), detektieren und in vielfältiger Weise darauf reagieren [12, 21, 81-82, 101].

Darüber hinaus produzieren Endothelzellen kontinuierlich Botenstoffe, die auf die Gefäßmuskulatur einwirken und dadurch den Gefäßdurchmesser beeinflussen können [21, 54, 81, 94]. Eine Erhöhung der zytosolischen Konzentration des (freien) Ca^{2+} in den Endothelzellen, beispielsweise als Reaktion auf Faktoren wie Histamin, Bradykinin, Serotonin oder Adenosintriphosphat (ATP), führt zu der vermehrten Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) [29, 81]. Außerdem setzt das Endothel Botenstoffe frei, wie z.B. Prostacyclin, das die Adenylzyklase (AC) aktiviert und über cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) Muskelrelaxation bewirkt, oder EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor), der ebenfalls relaxierend wirkt [54, 65]. Unter pathophysiologischen Bedingungen werden vom Endothel auch stark konstringierend wirkende Faktoren wie Endotheline freigesetzt (ET-1, ET-2 und ET-3) [54, 81].

Der am besten charakterisierte dilatierende Endothelfaktor ist NO (Stickstoffmonoxid), dessen kontinuierliche Freisetzung vor allem durch die Wandschubspannung stimuliert wird, die über verschiedene Signalwege zu vermehrter Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) führen kann. NO wird aus L-Arginin gebildet und löst über vermehrte Produktion von cGMP (zyklisches/cyclic Guanosinmonophosphat) in den glatten Muskelzellen der Gefäßwand eine Dilatation des Gefäßes aus. cGMP wird durch die NO-abhängige Stimulation der löslichen Guanylylzyklase (GC) gebildet und vermittelt seine Wirkung hauptsächlich über die Aktivierung von Proteinkinasen (G-Kinasen) [3, 5, 29, 65, 94].

2.2 Gap Junctions

Viele Zellen können direkt über interzelluläre Membrankanäle kommunizieren, sogenannte Gap Junctions (GJs) [96]. Diese bestehen aus zwei Hemikanälen, den Connexonen, die in gegenüberliegende Plasmamembranen eingebettet sind, sich aus je sechs Connexinen (Cx) zusammensetzen und durch ihre Anordnung eine zentrale Pore ausbilden [70, 76]. Durch Verbindung eines individuellen Connexons einer Zelle mit einem entsprechenden Connexon der Nachbarzelle entsteht ein Gap Junction Kanal. Gap Junction Kanäle können aus einem Connexontyp (homomer) oder aus zwei verschiedenen Connexontypen (heteromer) aufgebaut sein [53, 59] und konzentrieren sich in bestimmten Membranbereichen zu Gap Junction Plaques. Das am häufigsten

verwendete Nomenklaturesystem für Connexine basiert auf der molekularen Masse der Connexin-Polypeptide (z.B. Cx40 mit 40 kDa Molekulargewicht). Trotz Unterschieden in Größe und Primärstruktur zeigen die unterschiedlichen Connexintypen weitgehend den gleichen Aufbau aus vier membrandurchgängigen Domänen, die zwei extrazelluläre und eine intrazelluläre Schleife ausbilden. N- und C-Terminus liegen dabei im Zytoplasma [57, 59]. Connexine in der Membran haben Halbwertszeiten von etwa 1 bis 5 h (die Halbwertszeit von Connexin 43 (Cx43) beträgt ca. 1,6 h) [12, 18, 23]. Im Gegensatz zu anderen Membrankanälen verbinden Gap Junction Kanäle nicht das Zytoplasma mit dem Extrazellulärraum, sondern zwei benachbarte Zellen direkt miteinander. Die Poren haben einen Durchmesser von 1,5 bis 2 nm und lassen kleine Moleküle und Ionen bis zu einer Masse von etwa 1500 Dalton passieren. Der Austausch von Ionen, sekundären Botenstoffen (second messenger) und kleinen Metaboliten erlaubt damit eine biochemische Kopplung zwischen den Zellen [67, 74]. Direkte Diffusion von beispielsweise Ca^{2+} und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) wird so ermöglicht [59].

Die Assoziation verschiedener Erkrankungen mit Mutationen von spezifischen Connexinen zeigt, dass Connexindysfunktion in hochdifferenzierten Geweben oder bei spezifischen Funktionen bestimmter Organe zu elementaren Störungen führen kann. Der (Funktions-)Verlust eines Connexintyps kann oft nicht durch andere Connexintypen im jeweiligen Zellverband oder Gewebe kompensiert werden [57, 67]. So werden Abweichungen in der Connexinexpression mit Tumorgenese, kardialer Ischämie und Hypertrophie in Verbindung gebracht. Keimzellmutationen in Connexingenen bei Cx32 bzw. Cx43 sind Ursache für Erbkrankheiten wie das Charcot-Marie-Tooth Syndrom (CMT) und das Visceroatriale Heterotaxie Syndrom (VAH). Mutationen von Cx26 sind Ursache für autosomal rezessive und dominant vererbte Taubheit [2]. Ebenfalls Taubheit, aber auch Hauterkrankungen, werden mit verschiedenen Mutationen von Cx31 assoziiert. Katarakte können das Ergebnis von Mutationen von Cx46 und Cx50 sein [37, 57, 59]. Die weite Verteilung in verschiedenen Zellen und Organismen sowie ihre Modulation auf der transkriptionalen und der Proteinebene sind ein weiterer Hinweis für die fundamentale Wichtigkeit der Connexine für Zellfunktionen [96].

Interzelluläre Kommunikation durch Gap Junctions ist nicht zuletzt im Gefäßsystem von großer Bedeutung; Dort sind Gap Junctions an der Kontrolle des vaskulären Tonus

beteiligt. Viele Studien zeigen, dass die komplexe und hochdynamische Vernetzung von Zellen über Gap Junctions eine zentrale Rolle im kardiovaskulären System spielt [12, 18, 23-24, 35, 51, 104]. Gap Junctions können sowohl zwischen Endothelzellen als auch zwischen glatten Muskelzellen nachgewiesen werden und in kleinen Blutgefäßen wurden auch myoendotheliale Gap Junctions gefunden, d.h. Gap Junctions zwischen Endothel und glattem Muskel [5, 14, 21, 89]. Endothelzellen exprimieren Cx37, Cx40 und Cx43, die darunter liegenden glatten Muskelzellen (SMC) typischerweise Cx40, Cx43 und Cx45 [5, 23, 44]. Gap Junctions sind außer in die Kontrolle des Gefäßtonus auch in eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen und weiterer physiologischer Vorgänge in Endothelzellen eingebunden, wie z.B. Angiogenese und Wundheilung [12]. In der Entwicklung von Atherosklerose lassen sich Veränderungen der Connexinexpression in Endothelzellen und glatten Muskelzellen beobachten [10, 18]. Außerdem ist bekannt, dass Cx40 Knockout-Mäuse unter Bluthochdruck leiden [12, 21, 23, 53, 59, 101], während Mäuse mit einer endothelspezifischen Deletion von Cx43 unter Hypotonie und Bradykardie leiden [12]. Homozygote Mäuse mit einem nicht funktionellen Cx43 Gen sterben perinatal an einer Rechtsherzinsuffizienz, während Verluste von Cx37 und Cx40 nicht letal sind, solange sie nicht kombiniert auftreten [23-24, 59, 86]. Die Rolle, die Gap Junctions beispielsweise bei der Entstehung von Atherosklerose oder kardialen Arrhythmien spielen, macht sie zu einem möglichen Ziel therapeutischer Ansätze [10, 23, 103].

2.3 Bedeutung und Funktion von Ca^{2+} auf zellulärer Ebene

Das Mengenelement Calcium befindet sich im Körper zu 99 % als Hydroxylapatit in Knochen und Zähnen gebunden. Der Einbau in Knochen und bei Bedarf auch die Freisetzung werden hormonell reguliert. So wird die Calciumkonzentration des Blutes effektiv in einem Bereich von 2,1 bis 2,6 mM gehalten. Im Extrazellulärraum ist Ca^{2+} zu je etwa der Hälfte in frei ionisierter (biologisch aktiver) und in gebundener (komplexierter) Form vorhanden. Im Extrazellulärraum befindet sich nur etwa 0,1 % des gesamten Ca^{2+} im menschlichen Organismus, ein Austausch mit dem Zytosol erfolgt über $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und verschiedene Calciumkanäle [54, 88].

In Ruhe liegt Ca^{2+} im Zellinneren zytosolisch in einer Konzentration von etwa 100 nM vor. Gespeichert liegt Ca^{2+} im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) oder des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) an Speicherproteine wie Calsequestrin und Calretikulin gebunden vor. Beim Calciumeintritt ins Zytosol aus intrazellulären Speichern oder aus dem Extrazellulärraum findet eine schnelle Pufferung durch Calbindin, Calretinin oder Parvalbumin statt, d.h. ein großer Teil des ionisierten Ca^{2+} wird praktisch sofort gebunden. Ein Teil des Ca^{2+} bindet an Calciumsensoren, zum Beispiel EF-Hand-Proteine wie Calmodulin (CaM), Annexine und s100-Proteine. Eine Stimulation der Zelle erhöht die Konzentration von freiem, ionisiertem Calcium vorübergehend auf 500 nM bis 1 mM [6, 88]. Solche Konzentrationen werden benötigt, um eine ausreichend starke Bindung des Ca^{2+} an beispielsweise Calmodulin zu ermöglichen.

Ca^{2+} ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff in verschiedenen Funktionen und Prozessen, Calciumsignale werden dafür zeitlich und räumlich hoch organisiert [6]. Im Endothel moduliert Ca^{2+} viele unterschiedliche Abläufe, wie die Kontrolle des vaskulären Tonus, Plättchenadhäsion und -aggregation, Permeabilität und Barriereigenschaften. Ca^{2+} ist auch sehr wichtig für Reendothelialisierungsprozesse nach Verletzungen [107] und beeinflusst die Sekretion parakriner Mediatoren [71]. Um diese Mechanismen zu regulieren, müssen Calciumsignale und deren Ausbreitung in und zwischen Zellen bis ins Detail einer permanenten Kontrolle unterliegen.

Neben Veränderungen im Blutfluss („shear stress“), die mechanosensitive Kationenkanäle in der Zellmembran aktivieren, bewirken auch viele Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter und Hormone eine Reaktion über den Anstieg von intrazellulärem freiem Calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Einer der Agonisten, die über G-Protein gekoppelte Rezeptoren eine Signalkette auslösen, die in einer Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ resultiert, ist das Gewebshormon Histamin. Histamin entsteht durch Decarboxylierung aus der Aminosäure Histidin. Es wird in den Granula von Mastzellen gespeichert und ist deren hauptsächliches Sekretionsprodukt. Es kann aber auch aus anderen Zelltypen, wie basophilen Granulozyten, vaskulären Endothelzellen, aktivierten Plättchen, T-Lymphozyten und Monozyten bzw. Makrophagen, freigesetzt werden [63]. Primär führen lokale Traumen und allergische Reaktionen zur Histaminfreisetzung. Histamin ist ein wichtiger Mediator in Entzündungsreaktionen und auch an anderen

physiologischen Prozessen wie Neurotransmission, Wundheilung und Tumorwachstum beteiligt. Histamin ist für die klassischen Symptome der Typ-1-Allergie wie Blutdruckabfall und Hautödeme verantwortlich und kann die Funktionen einer Vielzahl von Zelltypen modulieren, darunter Endothelzellen [73, 98]. Zudem ist Histamin auch ein etablierter endothelabhängiger Vasodilator, der in erster Linie über die Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ in Endothelzellen und die daraus resultierende NO-Freisetzung wirkt [63].

Die Histaminwirkung wird über vier verschiedene Typen von Membranrezeptoren vermittelt. Histaminrezeptoren vom Typ-1 (H1-R) werden in glatten Muskelzellen sowie in Endothelzellen stark exprimiert [45]. Über diese Rezeptoren moduliert Histamin Entzündungsantworten und allergische Reaktionen. Histaminrezeptoren vom Typ-2 (H2-R) stimulieren die Adenylatzyklase und erhöhen so die zellulären cAMP Spiegel [73, 81], H2-R sind an der Stimulation der Magensäuresekretion und an der Regulation der Zytokinproduktion in verschiedenen Zelltypen beteiligt. Histaminrezeptoren Typ-3 wurden hauptsächlich im Gehirn gefunden, wo sie als präsynaptische Autorezeptoren auf histaminhaltigen Neuronen fungieren. Histaminrezeptoren Typ-4 werden vor allem im Knochenmark und in Leukozyten exprimiert.

Die Aktivierung der H1-R (Abb. 2-1) führt über G-Proteine zur Aktivierung von Phospholipase C (PLC), PLC hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu IP_3 und Diacylglycerol (DAG). IP_3 bindet an IP_3 -Rezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum und initiiert eine Calciumausschüttung ins Zytosol, ein Prozess der durch den IP_3 -Rezeptor-Blocker Xestospongin C gehemmt werden kann [6, 8, 19, 68, 73, 75, 95]. Ca^{2+} und DAG aktivieren die Proteinkinase C (PKC), die wiederum Zellproteine phosphoryliert und für Translation und Transkription verschiedener Faktoren, z.B. im Rahmen der Zellproliferation, verantwortlich ist. Ca^{2+} aktiviert unter anderem auch die PLC und verstärkt damit die IP_3 -Produktion [6].

Aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) freigesetztes Ca^{2+} bindet an Calmodulin (CaM) das unter anderem zur Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) beiträgt (Abb. 2-2) [63, 84, 98]; Diese wandelt L-Arginin in L-Citrullin und NO um. Zusätzlich kann CaM die Calcium-Calmodulinabhängige Kinase (CaMK) II aktivieren, die ebenfalls eNOS aktiviert [17, 78]. NO diffundiert in glatte Muskelzellen und erhöht dort die Aktivität der löslichen (soluble) Guanylylzyklase (sGC). Dadurch entsteht

vermehrt cGMP, das die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG) aktiviert. PKG reduziert die Kontraktion in der glatten Muskelzelle, indem es die MLC (myosin light chain)-Phosphatase aktiviert, die die leichten Ketten des Myosins dephosphoryliert. Zusätzlich reduziert PKG $[Ca^{2+}]_i$ über eine vermehrte Wiederaufnahme in interzelluläre Speicher bzw. über den Auswärtstransport von Ca^{2+} über die Zellmembran. Es kommt zur Relaxation der Zellen und das Gefäß dilatiert [3, 55, 94-95].

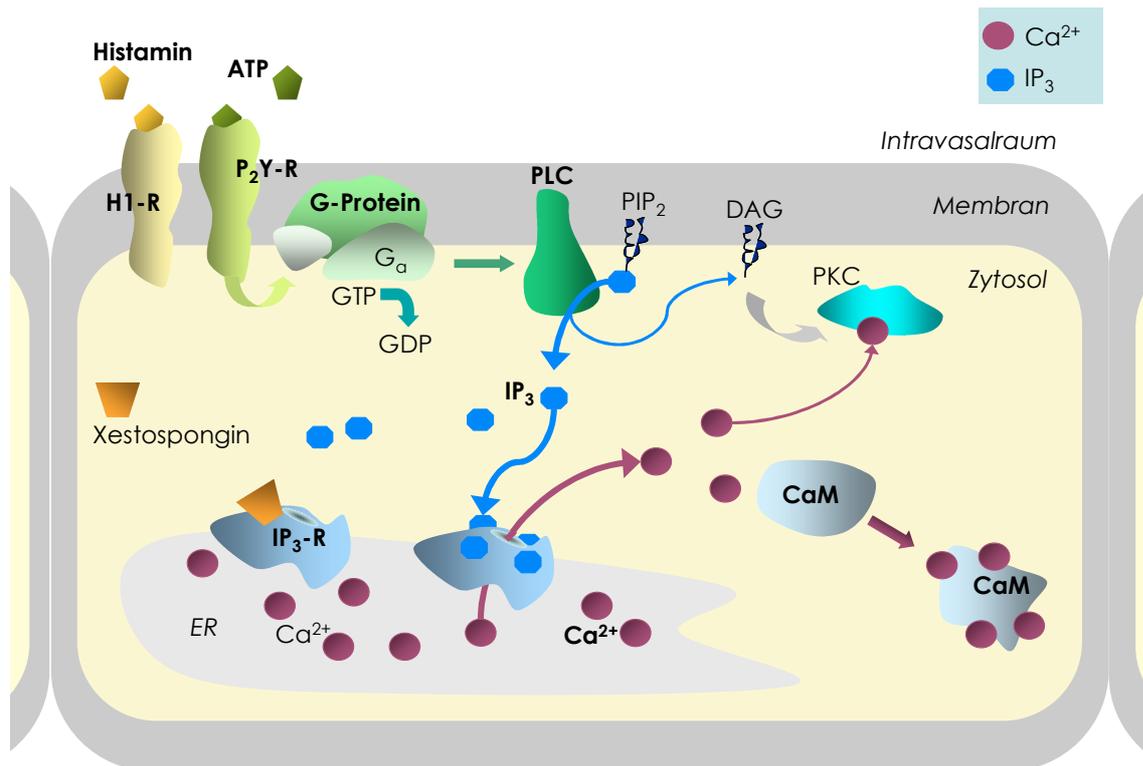


Abb. 2-1: Rezeptor-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern der Endothelzelle

Histamin bindet an H1-Rezeptoren (H1-R) oder ATP an P_{2Y}-Rezeptoren. Der jeweilige Rezeptor koppelt an ein G-Protein, an der G_α-Untereinheit wird GDP durch GTP ersetzt, die Untereinheit löst sich und aktiviert die Phospholipase C (PLC). Letztere hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerol (DAG) und IP₃. IP₃ bindet an IP₃-Rezeptoren (IP₃-R) auf dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und initiiert die Calciumausschüttung ins Zytosol. Ca²⁺ aktiviert Calmodulin (CaM), und CaM spielt eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS), so dass eine endothelvermittelte Dilatation erfolgt.

eNOS wird als Reaktion auf verschiedene Stimuli aktiviert. Dazu gehören neben Histamin auch Bradykinin, VEGF (vascular endothelial growth factor), TNF- α (tumor necrosis factor- α), Insulin und ACh (Acetylcholin) [17]. Das durch die eNOS produzierte NO ist ein wichtiges Signalmolekül in Prozessen wie Vasodilatation, Entzündung und Angiogenese und hat protektive Hemmeffekte hinsichtlich der

Plättchenadhäsion, Leukozytenadhäsion, Apoptose und Proliferation der Gefäßmuskulatur. Endotheliale Dysfunktion und vaskuläre Veränderungen, die bei Erkrankungen wie Diabetes mellitus und Atherosklerose beobachtet werden können, gehen mit einer verminderten Aktivität der eNOS und einer dadurch verminderten NO-Produktion einher [17, 63].

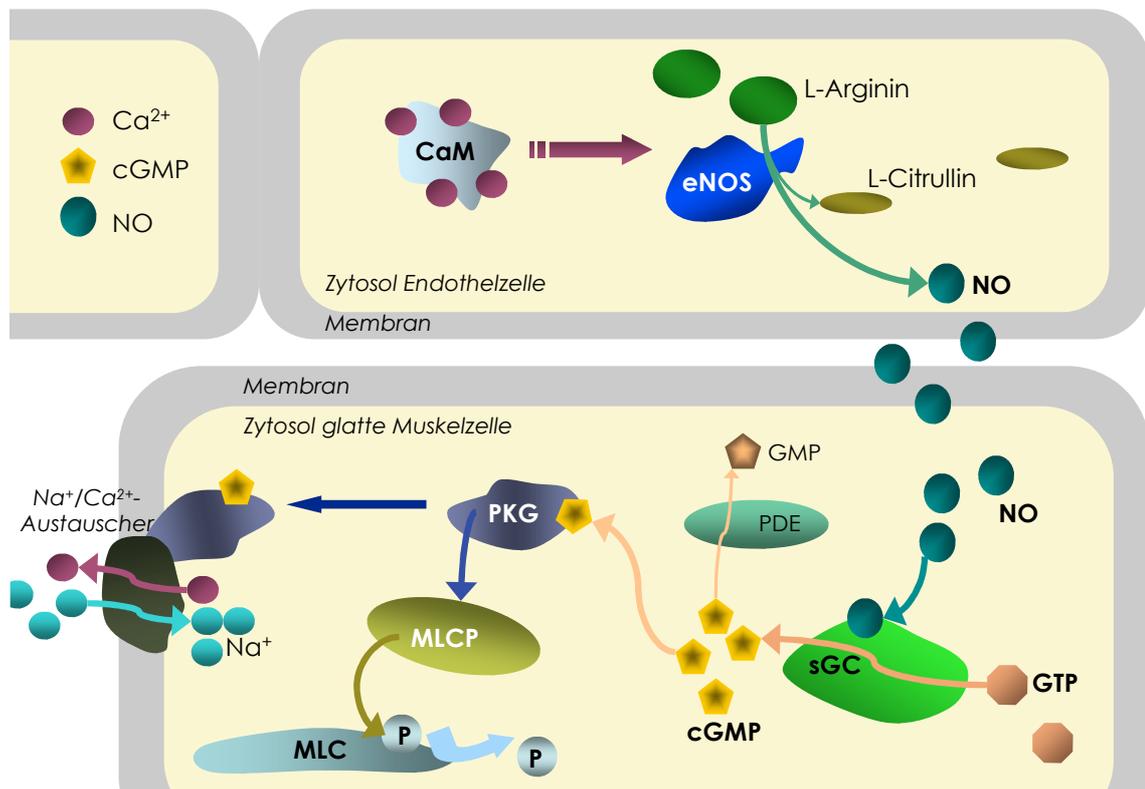


Abb. 2-2: NO-Signalweg

Der Ca²⁺-CaM-Komplex aktiviert endotheliale NO-Synthasen (eNOS). Diese wandeln L-Arginin in L-Citrullin um, dabei entsteht NO, das in die angrenzenden glatten Muskelzellen diffundiert und die lösliche (soluble) Guanylylzyklase (sGC) aktiviert. Dadurch entsteht vermehrt cGMP aus GTP. cGMP aktiviert die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG). Phosphodiesterasen (PDE) bauen parallel cGMP zu GMP ab. PKG fördert den Transport von Ca²⁺ in Organellen und den Extrazellulärraum (z.B. über Na⁺/Ca²⁺-Austauscher) und verringert so [Ca²⁺]_i. Außerdem hemmt PKG die Calciumfreisetzung aus Zellorganellen durch IP₃-Rezeptoren. PKG aktiviert die MLCP (Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase) und dephosphoryliert die MLC (leichte Kette des Myosin/myosin light chain). Es kommt zur Relaxation der glatten Muskelzellen.

ATP und andere extrazelluläre Nukleotide verursachen ebenfalls einen Anstieg in der intrazellulären Calciumkonzentration über eine Aktivierung von P_{2Y}- und P_{2X}-Rezeptoren. P_{2Y1}, P_{2Y2} und P_{2Y11} sind die am stärksten exprimierten P_{2Y}-Rezeptoren in Endothelzellen. Sie vermitteln die Wirkungen der extrazellulären Nukleotide ATP,

ADP, UTP und UDP und regulieren verschiedene physiologische Reaktionen, einschließlich Gefäßtonus, Glattmuskelzellproliferation und Freisetzung endothelialer Faktoren [65]. P_{2Y}-Rezeptoren koppeln an G_{αq/11}-Proteine, die wiederum PLC(δ) aktivieren, gefolgt von IP₃-Bildung und einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration [17, 32, 99]. ATP aktiviert also infolge der Calciumerhöhung auch die endotheliale NO-Synthase, erhöht dadurch die NO-Produktion und führt somit zur Vasodilatation [8, 13, 17, 65, 84, 95]. Ein anderer P₂-Rezeptorsubtyp, P_{2X}, ist ein ligandengesteuerter Ionenkanal in der Membran, der die Permeabilität für Kationen (vor allem für Ca²⁺) und darüber die Calciumkonzentration in der Zelle erhöht. In Endothelzellen wird die Calciumantwort auf ATP hauptsächlich durch P_{2Y}-Rezeptoren vermittelt [17, 71-72, 99]. ATP kann von Endothelzellen als Reaktion auf Veränderungen im Blutstrom (Änderung des Shear Stress, Turbulenzen) oder bei Hypoxie freigesetzt werden und auf purinerge Rezeptoren an anderen Endothelzellen wirken [13]. Dass ATP den Gefäßtonus beeinflussen kann, ist möglicherweise bei erhöhter ATP-Konzentration im Blut von Bedeutung, beispielsweise bei Verletzungen, Hypoxie oder nach Freisetzung aus roten Blutkörperchen [8].

Über die Bindung von Membranrezeptoren und die Bildung von IP₃ bewirken chemische Stimuli wie Histamin oder ATP einen Calciumanstieg aus intrazellulären Speichern. Dagegen wird der Calciumanstieg bei mechanischer Stimulation durch die Aktivierung von (dehnungssensitiven) Ionenkanälen und den dadurch ermöglichten Calciumeinstrom ausgelöst [72, 101]. Zellen, die auf die eine oder andere Weise stimuliert werden und mit einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration reagieren, können dieses Calciumsignal an andere Zellen weitergeben. Generell gibt es zwei mögliche Mechanismen über die Calciumsignale interzellulär weitergeleitet werden können: Die direkte Passage von Molekülen über Gap Junctions und die humorale Variante, bei der über die Freisetzung von Molekülen wie ATP die interzelluläre Kommunikation durch das Binden an Membranrezeptoren der umliegenden Zellen ausgelöst wird [49, 76].

Bei der Ausbreitung von Calciumsignalen über Gap Junctions können Calciummoleküle durch Gap Junction Kanäle diffundieren. Alternativ kann das Signalmolekül IP₃, das über IP₃-Rezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum als Calcium-mobilisierender Botenstoff agiert, durch die Gap Junctions diffundieren und Ca²⁺ in Nachbarzellen

freisetzen. Gelangt Ca^{2+} in ausreichenden Mengen über Gap Junctions in eine Nachbarzelle, besteht auch die Möglichkeit, dass dieses die Freisetzung von weiterem Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum der Nachbarzelle durch Ryanodinrezeptoren bewirkt [31, 76, 107].

In der Kommunikation durch Botenstoffe zwischen Zellen ohne direkte Verbindung spielt der Energiebaustein ATP eine herausragende Rolle als Ligand. ATP wurde in vielen unterschiedlichen Zelltypen, darunter auch in Endothelzellen, als wichtige Komponente der Calciumsignalweiterleitung, vor allem bei mechanischer Zellstimulation, nachgewiesen [2, 9]. Es gibt Hinweise darauf, dass diese Fähigkeit, ATP freizusetzen und darauf zu reagieren, auch mit Connexinen verknüpft ist [9, 16, 76]. Demnach bestimmt die Effizienz der Connexinexpression die Ausbreitung des Calciumsignals entscheidend mit, unabhängig davon, ob sich Ca^{2+} über Gap Junctions oder simultan über ATP ausbreitet [76]. Nach verschiedenen Befunden kann eine Freisetzung von ATP jedoch auch über Pannexine, Anionenkanäle, Membrantransporter, exozytotische Sekretion oder natürlich bei der Zerstörung von Zellen stattfinden. Einmal freigesetztes ATP erreicht per Diffusion die purinergen Rezeptoren benachbarter Zellen, welche nach Bindung einen Calciumanstieg initiieren [2, 31-32, 101]. Die so entstehenden ATP-vermittelten Calciumsignale können größere Distanzen zwischen Zellen überbrücken. Das ATP-degradierende Enzym Apyrase hemmt die ATP-Konzentration und damit die Entstehung einer Calciumwelle.

2.4 Ziele der Arbeit

Die Synchronisation der Vorgänge im Gefäßendothel ist von großer Bedeutung für eine effektive und gleichmäßige Regulation der Durchblutung. Dies gilt besonders für den gleichzeitigen Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels bei Stimulation des Endothels. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, inwieweit die Ausbreitung des Calciumsignals über Gap Junctions eine Rolle bei der Stimulation von Endothelzellen mit den vasoaktiven Substanzen Histamin bzw. ATP spielt. An HUVEC, einem verbreiteten und gut charakterisierten Zellkultur-Modell für menschliches Endothel, wurden daher im Einzelnen folgende Fragestellungen untersucht:

Welche Rolle spielen Gap Junctions bei Histamin- oder ATP-induzierten Calciumsignalen?

- Verfügen alle HUVEC über Histaminrezeptoren?
- Sind HUVEC funktionell durch Gap Junctions gekoppelt?
- Ergibt die zeitliche Analyse der lokalen Calciumanstiege Hinweise für eine interzelluläre Ausbreitung des Calciumsignals?
- Verändern sich die Histamin-induzierten Calciumsignale, wenn Gap Junction Kanäle entkoppelt werden?
- Sind mögliche Veränderungen spezifisch für Histamin-induzierte Calciumanstiege oder werden sie auch bei Stimulation mit einem alternativen Stimulus (ATP) beobachtet?

Wie funktioniert die interzelluläre Weiterleitung von Calciumsignalen in HUVEC, und hat eine Störung dieser Weiterleitung funktionelle Auswirkungen?

- Ist für die Ausbreitung von Calciumwellen primär Ca^{2+} oder/und IP_3 verantwortlich?
- Hat die Hemmung gap-junctionaler Kommunikation Einfluss auf die Bildung des endothelialen Vasodilators NO?
- Sind mögliche Veränderungen nur in Zellkulturen oder auch im Endothel in situ, in frisch isolierten Blutgefäßen, nachzuweisen?

3 MATERIAL

3.1 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|---------------------------------------|
| Deckgläser (Ø 15 mm) | Saur Laborbedarf, Reutlingen |
| Discofix-3 (3-Wege-Hahn) | Braun, Melsungen |
| Ethilon Nahtmaterial BV-6 | Ethicon, Somerville, USA |
| Glaskapillaren (Rohlinge) GB 100F-10 | Science Products GmbH, Hofheim |
| Insulinspritze BD MicroFine (U40) | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| Knopfkanülen | Braun, Melsungen |
| Kryotubes | Biozym Scientific, Hessisch-Oldendorf |
| Multiwell (24 Well) | Falcon/BD, Franklin Lakes, USA |
| Objektträger | Marienfeld, Lauda-Königshofen |
| PD Tips | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettenspitzen | Sarstedt, Nürnbergrecht |
| Polystyrene Round-Bottom Tube 5ml | Falcon/BD, Eremdodegem, Belgien |
| Präparationsbesteck (Pinzetten, Scheren) | FST fine science tools, Heidelberg |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml | Eppendorf, Hamburg |
| Reaktionsgefäße 15 und 50 ml | Falcon/BD, Franklin Lakes, USA |
| Schaber | Falcon/BD, Franklin Lakes, USA |
| Silikonfett, Hoch-Vakuumfett schwer | Wacker Chemie GmbH, München |
| Silikonkautschuk Elastosil RT622A | Wacker Chemie GmbH, München |
| Stripetten (5, 10 und 25 ml) | Costar, Corning, USA |
| Zellkulturflaschen T 25 | Falcon/BD, Franklin Lakes, USA |
| Zellkulturschalen (Ø 3,5 und 10 cm) | Falcon/BD, Franklin Lakes, USA |

3.2 Chemikalien

| | |
|--|--|
| 1-Heptanol | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Accutase | PAA, Pasching, Österreich |
| Acetylcholin | Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim |
| APS (Antibiotic antimycotic solution) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Apyrase (Grad III) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| ATP (Adenosintriphosphat) | Sigma-Aldrich, Schnelldorf |
| Bovines Serum Albumin/Albumin-Fraktion V | Applichem, Darmstadt |
| Calciumchlorid, CaCl ₂ | Merck, Darmstadt |
| Collagen G | Biochrom AG, Berlin |
| Collagenase A | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Cyclic GMP EIA Kit | Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA |
| DAPI (4',6-Diamino-2-Phenylindol) | Invitrogen, Karlsruhe |
| DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | AppliChem, Darmstadt |
| EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) | AppliChem, Darmstadt |
| EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure) | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Ethanol absolut (für Molekularbiologie) | AppliChem, Darmstadt |
| FACS Lysing Solution | BD Biosciences, Heidelberg |
| FCS (fetal calf serum) | Biochrom AG, Berlin |
| Formaldehyd 37 % | AppliChem, Darmstadt |
| Fura-2/AM | Merck, Darmstadt |
| Glukose (wasserfrei) | AppliChem, Darmstadt |
| HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| HEPES (Ringerlösung) | Apotheke des Klinikums Innenstadt, München |
| Histamin dihydrochlorid | Sigma-Aldrich, Schnelldorf |
| IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) | Sigma-Aldrich, Schnelldorf |
| Immersionsöl Zeiss Immersol® | Zeiss, Oberkochen |

| | |
|--|---|
| Immu-Mount Einbettmedium | Shandon, Pittsburg, USA |
| Ionomycin | Sigma-Aldrich, Schnelldorf |
| Kaliumchlorid, KCl | Merck, Darmstadt |
| Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 | Merck, Darmstadt |
| LNA (N-Nitro-L-arginin) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Magnesiumchlorid, MgCl_2 | AppliChem, Darmstadt |
| Meclofensäure | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Medium199 | Gibco Invitrogen, Karlsruhe |
| Methanol | AppliChem, Darmstadt |
| MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure) | AppliChem, Darmstadt |
| Nagellack | Manhattan Cosmetics, Stuttgart |
| Natriumchlorid, NaCl | AppliChem, Darmstadt |
| Natriumdihydrogenphosphat, NaH_2PO_4 | AppliChem, Darmstadt |
| Natriumhydrogencarbonat, NaHCO_3 | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydroxid, NaOH | AppliChem, Darmstadt |
| Natriumpyruvat | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| NBCS (new born calf serum) | Biochrom AG, Berlin |
| PBS-/PBS+ | Apotheke des Klinikums Innenstadt, München |
| Puromycin | AppliChem, Darmstadt |
| SNAP (S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin) | Alexis, Lörrach |
| SOD (Superoxiddismutase) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Suramin | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| TritonX100 | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Trypsin | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Tween®20 | AppliChem, Darmstadt |
| Wachstumsmedium für Endothelzellen | Promocell, Heidelberg |
| Xestospongin C | Merck, Darmstadt |

3.3 Pufferlösungen

HEPES-:

| | |
|----------------------------------|-----------------------|
| destH ₂ O | |
| NaCl | 145 mM |
| KCl | 3 mM |
| NaH ₂ PO ₄ | 1,25 mM |
| MgCl ₂ | 1,5 mM |
| Glukose | 10 mM |
| HEPES | 10 mM |
| NaOH | pH auf 7,4 einstellen |

HEPES (Ringerlösung):

| | |
|-------------------|--------|
| HEPES- | |
| CaCl ₂ | 2,5 mM |

HEPES-EGTA:

| | |
|-------|------|
| HEPES | |
| EGTA | 1 mM |

HEPES++:

| | |
|-------|---------|
| HEPES | |
| SOD | 50 U/ml |
| LNA | 30 μM |

MOPS++:

| | |
|------|---------|
| MOPS | |
| SOD | 50 U/ml |
| LNA | 30 μM |

MOPS:

| | |
|----------------------------------|-----------------------|
| destH ₂ O | |
| NaCl | 145 mM |
| KCl | 4,7 mM |
| CaCl ₂ | 1,5 mM |
| MgSO ₄ | 1,17 mM |
| NaH ₂ PO ₄ | 1,2 mM |
| Natriumpyruvat | 2,0 mM |
| EDTA | 20 µM |
| MOPS | 3,0 mM |
| Glukose | 5,0 mM |
| NaOH | pH auf 7,4 einstellen |

PBS+:

| | |
|---|----------|
| destH ₂ O | |
| NaCl | 136,9 mM |
| Glukose (Monohydrat) | 5,6 mM |
| KCl | 5,4 mM |
| MgSO ₄ (Heptahydrat) | 0,30 mM |
| MgCl ₂ (Hexahydrat) | 0,36 mM |
| CaCl ₂ (Dihydrat) | 0,94 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 0,44 mM |
| Na ₂ HPO ₄ (Dihydrat) | 0,84 mM |
| NaHCO ₃ | 3,6 mM |

PBS-:

| | |
|---|----------|
| destH ₂ O | |
| NaCl | 138,6 mM |
| Na ₂ HPO ₄ (Dihydrat) | 4,8 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,8 mM |

4 METHODEN

4.1 Zellkultur

4.1.1 HUVEC

HUVEC (human umbilical vein endothelial cells/Nabelschnurvenenendothelzellen) werden aus humanen Nabelschnurvenen gewonnen. Sie sind ein etabliertes Kultur-Modell für Versuche mit humanen Endothelzellen.

Isolation:

HUVEC wurden mit einer modifizierten, ursprünglich von Jaffe et al. [47] beschriebenen Methode isoliert. Frische Nabelschnüre (aus dem Klinikum Großhadern und der Frauenklinik in München) wurden bis max. drei Tage in steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS+), die ein Antibiotikum/Antimykotikum (APS) enthielt, gelagert und dann unter einer Sterilbank (LaminAir HB 2448, Heraeus Instruments, Hanau) weiterverarbeitet. Blutreste wurden entfernt und in jede Öffnung der Vena umbilicalis eine Knopfkanüle eingeführt und mit Kabelbindern gesichert. Die Vene wurde mit PBS+ durchgespült und dann für 6 min mit 1 mg/ml Collagenase A in PBS- gefüllt und bei 37 °C inkubiert. Alle Puffer und Medien wurden hier und im Folgenden im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Die abgelösten Zellen wurden dann mit Medium (M199), supplementiert mit 20 % hitzeinaktiviertem NBSC (new born calf serum) und 1 % antibiotischer Lösung (APS)) herausgespült, bei 1200 g 5 min abzentrifugiert (in Megafuge 1.0R, Heraeus Instruments) und das gewonnene Pellet einmal mit M199 (ohne Serum) gewaschen. Die Zellen wurden in Wachstumsmedium für Endothelzellen (PromoCell) aufgenommen, auf Zellkulturflaschen (25 cm²) ausgesät und im Brutschrank (CO₂ Incubator MCO-17AI, Sanyo, München) bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium erneuert und die Zellen weiter inkubiert, bis sie das Konfluenzstadium erreichten.

Kultur und Passage:

Konfluente Zellrasen wurden mit PBS- gewaschen und mit Trypsin inkubiert, bis sich die Zellen von der Unterlage ablösen. Die enzymatische Wirkung des Trypsins wurde anschließend durch Zugabe von Medium unterbrochen. Die gewonnene Zellsuspension wurde dann auf die doppelte Fläche neu ausgesät und wie oben beschrieben weiter kultiviert. Für alle Versuche wurden Zellen der Passagen I und II verwendet, wobei die Zellen für Calciummessung und Immunfärbung in der jeweils letzten Passage in Wachstumsmedium (Promocell) auf collagenbeschichtete Deckgläschen ausgesät wurden ($1,5 \times 10^6$ Zellen/Well einer 24-Well-Zellkulturplatte, Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer). Die Kollagenbeschichtung erfolgte durch Inkubation von Deckgläschen (\varnothing 15 mm) in 24 Well Zellkulturplatten mit Kollagen (Collagen G, 10 $\mu\text{g/ml}$ in PBS-) für 1 h im Brutschrank.

4.1.2 HeLa-Zellen

HeLa-Zellen waren eine der ersten humanen Zelllinien überhaupt und sind folglich sehr gut charakterisiert. Zwei verschiedene HeLa-Linien wurden in dieser Arbeit für Kontrollversuche verwendet. HeLa-Wildtypzellen (HeLaWT) und eine stabil transfizierte Linie, die Connexin43 exprimiert (HeLa43), wurden für die Versuche in Kultur genommen. Beide Zelllinien stammen ursprünglich aus dem Labor von Professor Willeke in Bonn und wurden bei Bedarf aufgetaut, vermehrt und wieder eingefroren.

Kultur und Passage:

HeLaWT wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % APS bis zur völligen Konfluenz kultiviert und dann im Verhältnis von 1:4 auf neue Kulturschalen gesplittet. Ein Medienwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Bei HeLa43-Zellen wurde dem Medium zur Selektion 1 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin zugegeben. Die Zelllinien wurden regelmäßig mit Western Blot und Immunohistochemie auf die Expression von Cx43 untersucht. Für die Versuche wurden jeweils 10^5 Zellen in 24-Well Platten auf 15 mm Deckgläschen ausgesät und über Nacht kultiviert, wobei sie etwa 80 % Konfluenz erreichten.

4.2 Präparation der murinen Aorta

Für Experimente an intakten Gefäßen wurden Aorten von Mäusen aus dem Stamm C57BL/6 (Janvier, St. Berthevin, Frankreich) verwendet. Bei den Mäusen handelte es sich um männliche Tiere, die 6 bis 8 Wochen alt und 18 bis 24 g schwer waren. Die Tierhaltung erfolgte entsprechend den deutschen Tierschutzbestimmungen. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Die Aorta wurde mit Hilfe von Pinzetten und Scheren möglichst vollständig herauspräpariert, dabei sorgfältig von umgebendem Gewebe befreit und bei Raumtemperatur (RT) für 1 bis 2 h in MOPS-Puffer inkubiert. Dann wurde dem Puffer 1 μ M Acetylcholin zugesetzt, die Aorta wurde vorsichtig mit einer Gefäßschere (No. 15000-00, FST) der Länge nach aufgeschnitten und unter Verwendung feiner Nadeln (Ethilon Nahtmaterial) auf einer mit Silikonkautschuk ausgegossenen Zellkulturplatte (\varnothing 3,5 cm) aufgespannt. Die gesamte Präparation wurde unter einem Mikroskop (StemiDV4 SPOT, Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Dabei wurde stets auf ausreichende Befeuchtung mit MOPS-Puffer geachtet und das Präparat nach dem Aufspannen nochmals mit MOPS-Puffer gewaschen. Um die Endothelzellen auf der Oberfläche des Präparates anzufärben, wurde der Puffer abgenommen, durch 250 μ l frischen MOPS-Puffer mit 6 μ g/ml Antikörper gegen CD31 ersetzt (anti-CD31, Rat anti-mouse IgG2a κ , Klon MEC 13.3, FITC konjugiert (BD Pharmingen, Heidelberg)) und für 15 min unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Danach wurde das Präparat zweimal mit MOPS-Puffer gewaschen, für weitere 10 min in MOPS++ inkubiert und in der Kulturschale auf eine Heizplatte am Mikroskop überführt.

4.3 Messung und Darstellung der Calciumausbreitung

4.3.1 Funktionsweise von Fura-2/AM

Für die Beobachtung der Calciumausbreitung wurde der Farbstoff Fura-2, beziehungsweise dessen Derivat Fura-2/AM, eingesetzt. Bei Fura-2/AM sind fünf Acetomethylgruppen über Esterbindungen mit den Carboxylgruppen des Fura-2-Moleküls verknüpft (Abb. 4-1). Dieses Molekül ist hydrophob und diffundiert daher durch die Plasmamembran. So können intakte Zellen mit dem Farbstoff beladen

werden. Im Zytosol werden die Acetomethylgruppen von Esterasen wieder entfernt [33, 87].

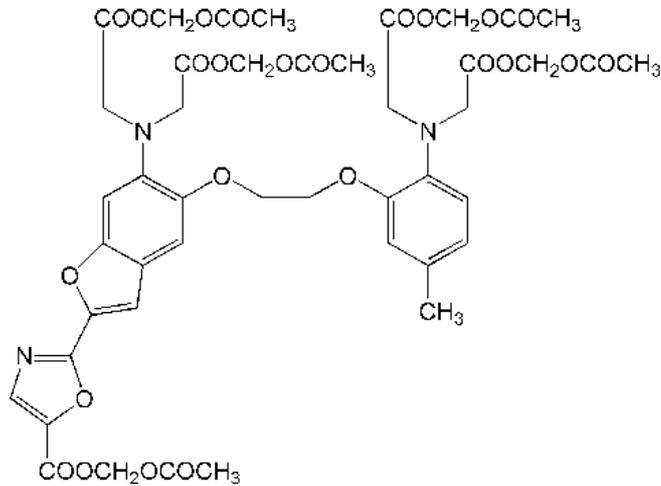


Abb. 4-1: Fura-2/AM Molekül

Im Gegensatz zu anderen Calciumfarbstoffen weist Fura-2 eine wichtige Besonderheit auf: Bei der Bindung von Ca^{2+} kommt es durch die positive Ladung des Calciumions zu einer Strukturveränderung des Fura-2-Moleküls, die in einer Zunahme der Fluoreszenz bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 340 nm resultiert, während die Fluoreszenz bei Anregung mit 380 nm mit zunehmender Calciumbeladung abnimmt (Anregungs- und Emissionsspektren, siehe Abb. 4-2). Gleichzeitig kommt es nur zu einer minimalen Änderung des Emissionsmaximums (von 512 auf 505 nm), so dass die Detektionsmessung mit einer Wellenlänge (510 nm) erfolgen kann [30, 33, 87]. Durch alternierende Anregung der Zellen und die Bildung der Ratio aus den Werten der beiden Anregungswellenlängen wird die Verschiebung von ungebunden zu gebunden detektiert. Zur Calciumbestimmung bedarf es damit nicht der absoluten Emissionswerte, welche von der Beladung der Zellen mit Fura abhängen und sich zusätzlich infolge der Ausbleichung während des Experiments ändern können. So haben beispielsweise die Farbstoffkonzentration im Zytosol, die Dicke der Zelle oder die Intensität des Anregungslichtes, lokale Ionenkonzentrationen und die Viskosität des Mediums, in dem Fura-2 gelöst wird, Einfluss auf die gemessenen Werte [87]. Fura-2/AM wurde als Stammlösung 1 mM in DMSO angesetzt und in M199 mit 1 % APS auf eine Konzentration von 4 μM verdünnt (1:250).

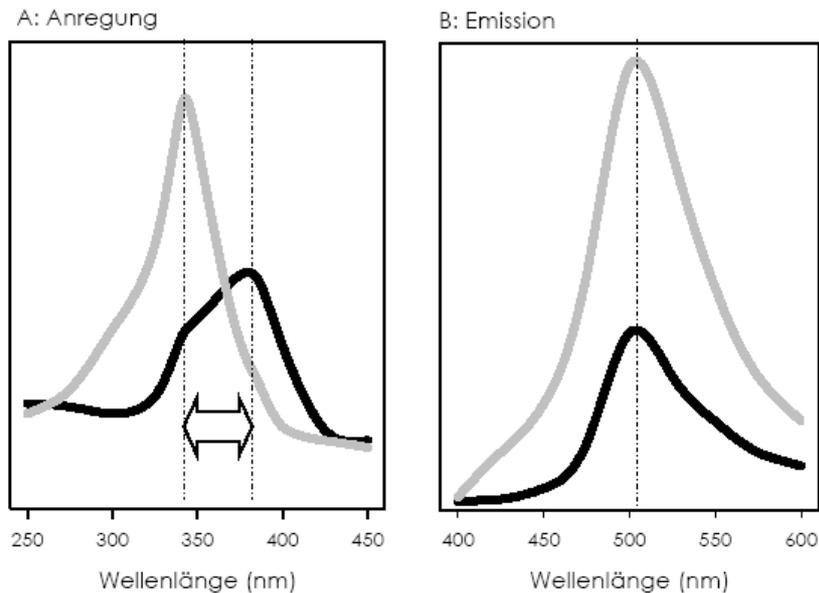


Abb. 4-2: Anregungs- (A) und Emissionsspektrum (B) von Fura-2/AM

Die schwarze Linie zeigt das Spektrum der Fura-2 Moleküle ohne Calciumbeladung. Die graue Linie zeigt das Anregungs- bzw. Emissionsspektrum von Fura-2 mit gebundenem Ca^{2+} , das Anregungsmaximum liegt bei 340 nm. Der Pfeil weist auf die unterschiedlichen Maxima der Anregung von Fura-2 mit und ohne Ca^{2+} hin.

4.3.2 Calciummessung

Von den Deckgläschen mit den etwa 80 % konfluenten HUVEC wurde 1 bis 2 h vor Messbeginn das Kulturmedium abgenommen und durch 400 μl M199 mit 4 μM Fura-2/AM ersetzt. Die Farbstoffaufnahme in die Zellen erfolgte bei 37 °C im Brutschrank. Die Deckgläschen wurden anschließend in eine speziell angefertigte Kammer (Abb. 4-3) aus der institutseigenen Werkstatt unter Verwendung von Silikonfett zum Abdichten eingespannt.

Diese Kammer wurde in eine Wärmeplatte auf dem Mikroskoptisch eingesetzt, durch die über eine Umwälzpumpe und ein Wasserbad (MGW Lauda RM3) temperiertes Wasser geleitet wurde. Damit wurde die Temperatur des Puffers in der Kammer konstant auf 37 °C gehalten. Um Temperaturschwankungen in der Flüssigkeit zu vermeiden, wurde die Kammer zusätzlich abgedeckt.

Nachdem die Zellen vorsichtig mit 400 μl HEPES gewaschen wurden, um die Farbstoffreste zu entfernen, die nicht von den Zellen aufgenommen worden waren,

wurden sie vor Beginn der eigentlichen Messung noch für 10 bis 12 min in 200 μ l HEPES++ inkubiert. Alle verwendeten Puffer und Lösungen, die mit den Zellen in Kontakt kamen, wurden vorher auf 37 °C erwärmt. Die Stammlösungen der verwendeten Blocker/Hemmsubstanzen und Stimuli (Tab. 4-1 und 4-2) wurden jeweils in HEPES++ so verdünnt, dass die angegebenen Konzentrationen in der Kammer mit den Zellen erreicht wurden.

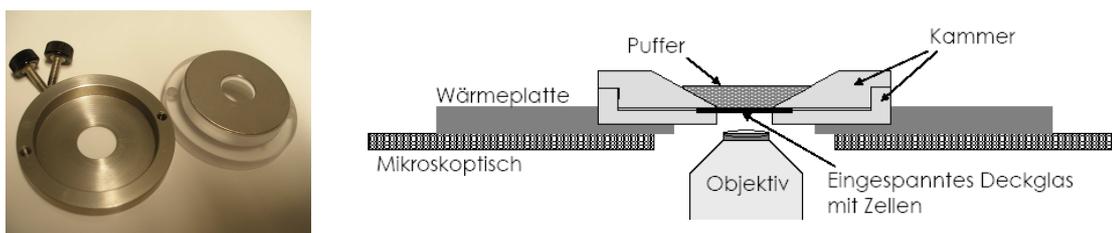


Abb. 4-3: Kammer zum Einsetzen der Deckgläser

| Hemmsubstanz: | Konzentration: | Stammlösung: |
|---------------|---------------------------|----------------------------------|
| Apyrase | 25 U/ml | 500 U/ml in destH ₂ O |
| H-M1 | 0,5 mM Heptanol | 1 M in Ethanol |
| | 25 μ M Meclofensäure | 10 mM in destH ₂ O |
| H-M4d | 0,5 mM Heptanol | 1 M in DMSO |
| | 100 μ M Meclofensäure | 10 mM in destH ₂ O |
| H2* | 2 mM Heptanol | 1 M in Ethanol |
| Xestospongin | 10 bzw. 40 μ M | 1 mM in DMSO |
| Suramin | 150 μ M | 1 mM in HEPES |

Tab. 4-1: Blocker und Inhibitoren

Apyrase und Xestosponginlösungen wurden aus tiefgekühlten Stammlösungen am Versuchstag frisch hergestellt. Heptanol-Meclofensäure (H-M) wurde aus ebenfalls tiefgekühlter Meclofensäure Stammlösung und bei 4 °C gelagerter Heptanol-Stammlösung am Versuchstag angesetzt und im Ultraschallbad gelöst. Die Suramin Stammlösung wurde max. 2 h vor Versuchsbeginn frisch angesetzt und 15:1000 verdünnt. * Heptanol 2 mM wurde nur für Versuche verwendet, in denen die cGMP Spiegel gemessen wurden.

| Stimulus: | Konzentration: | Stammlösung: |
|-----------|------------------------|-------------------------------|
| Ionomycin | 134 nM/13,4 μ M* | 1,34 mM in Ethanol |
| Histamin | 10 μ M | 2 mM in dest H ₂ O |
| ATP | 5 μ M/10 μ M** | 100 μ M in PBS+ |

Tab. 4-2: Calciumanstieg auslösende Stimuli

* Ionomycin wurde für Kalibrierungsversuche in einer höheren Konzentration (13,4 μ M) eingesetzt. Alle übrigen Versuche wurden mit der Konzentration 134 nM durchgeführt.

** ATP wurde für die Experimente an HUVEC 5 μ M und an der isolierten Aorta in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt.

Zur Detektion des Calciumsignals wurde ein computergesteuertes System von Till Photonics (Gräfelfing) verwendet, das mittels Monochromator aus dem Spektrum einer Xenonlampe alternierend die Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm selektierte und die jeweilige Fluoreszenz der Zellen bei 505 nm detektierte (Abb. 4-4). Nach den einzelnen Experimenten wurde nach Abzug der jeweiligen Hintergrundfluoreszenz die Ratio der Signalstärken aus den einzelnen Aufnahmen ermittelt. Verarbeitet wurden die Daten mit der TILLvisION Software von TILL Photonics.

Zur Beobachtung der HUVEC und HeLa-Zellen wurde das inverse Mikroskop Axiovert S100 mit einem 20x oder 40x Objektiv (alles von Zeiss, Oberkochen) verwendet. Bei Verwendung des 40x Objektivs (Plan Neofluar 40x /1.30 Oil DIC) ergab sich dabei ein Bildausschnitt von 320 x 240 μ m und eine Vergrößerung von 40 (Objektiv) x 10 (Okular) x Halbierungslinse = 200fach. Bei Verwendung des 20x Objektivs (Fluar 20x /0,75) entsprechend eine 100fache Vergrößerung und ein Sichtfeld von 640 x 480 μ m. Für die Beobachtung des Aortenendothels wurde ein Auflichtmikroskop (Axioskop, Zeiss, Oberkochen) mit einem 63x (Achromplan, NA 0,95, w Ph3, Zeiss) Objektiv verwendet. Dabei ergab sich eine 315fache Vergrößerung.

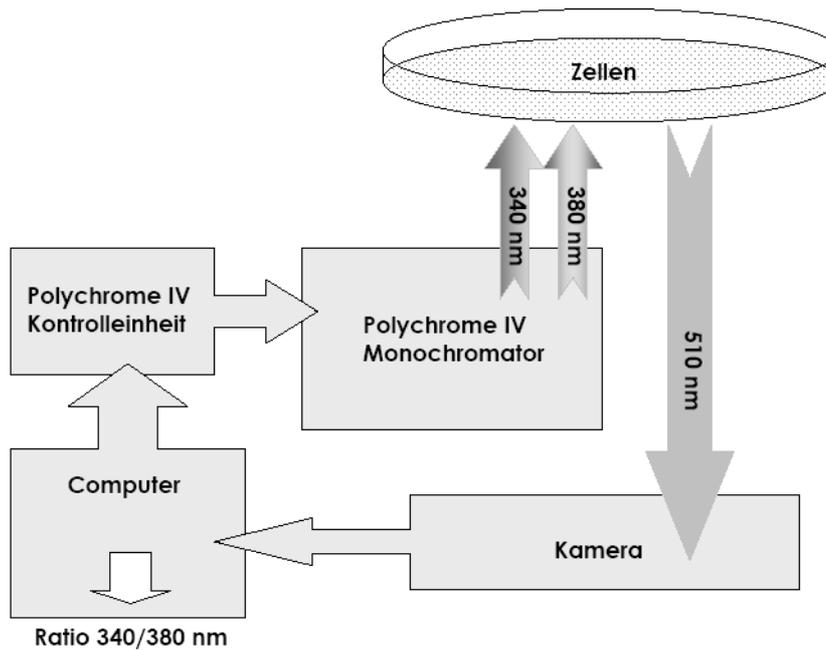


Abb. 4-4: Schema Mikroskopaufbau (invers)

4.3.3 Calciummessung in HUVEC

4.3.3.1 Humorale Zellstimulation

Für die Beobachtung der Calciumreaktion nach den unterschiedlichen Behandlungen wurde mit zwei verschiedenen Protokollen gearbeitet (Übersicht in Tab. 4-3).

Protokoll 1:

Zellen, die zuvor in 24-Well-Platten kultiviert wurden, wurden mit Histamin oder Ionomycin stimuliert und die resultierenden Calciumanstiege in den Zellen analysiert. Die Zugabe der Substanzen erfolgte durch Pipettieren von 200 μ l Lösung je Well, nach einer initialen Inkubationszeit von 10 min. Die Messung von Ca^{2+} wurde 5 s vor Zugabe der Substanz begonnen und bis etwa 35 s nach der Zugabe durchgeführt. Das ergab 400 Messzyklen mit je 100 ms Dauer, wobei die Aufnahmezeit für jedes Einzelbild 20 ms betrug. Die Zugabe von Histamin, Ionomycin oder HEPES++ wurde jeweils in getrennten Wells durchgeführt. Histamin wurde in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt, die Ionomycinkonzentration betrug 134 nM (100 ng/ml). Die Vorinkubation mit dem Gap Junction Blocker H-M4d (oder HEPES++) erfolgte 10 min vor Zugabe der

Testsubstanzen. Bei allen Behandlungen wurde Apyrase in einer Konzentration eingesetzt (25 U/ml), die in Vorversuchen eine Calciumreaktion auf exogenes ATP (5 μ M) verhindert hatte.

Protokoll 2:

Die Zellen wurden nach Inkubation in HEPES++ (Kontrolle/K) oder H-M4d (Blockerbehandlung) mit Histamin oder ATP stimuliert. Die Zugabe erfolgte wie in Protokoll 1 beschrieben, es wurden aber nur 40 Messzyklen mit je 1000 ms Dauer durchgeführt, wobei die Aufnahmezeit für jedes Einzelbild jeweils 50 ms betrug. Die Messungen zu Kontrolle und Behandlung wurden hintereinander im selben Well und im selben Sichtfeld durchgeführt. Teilweise erfolgte nach dem Auswaschen des Blockers eine zweite Kontrollstimulation (in HEPES++) bzw. eine Behandlung mit Suramin (nur bei der Stimulation mit ATP). Nach jeder Behandlung/Stimulation wurden die Zellen gewaschen und 10 min später erneut gemäß dem jeweiligen Protokoll stimuliert. Die Kammer mit dem Deckgläschen wurde nach dem Einsetzen in die Wärmeplatte mit einem Klebestreifen fixiert, um eine unbeabsichtigte Verschiebung des Sichtfelds zu verhindern. ATP wurde in einer Konzentration von 5 μ M eingesetzt, die Suramin-konzentration betrug 150 μ M. Für die Experimente mit Histamin wurde allen Lösungen Apyrase zugesetzt.

| | K (vorher) | H-M4d | Suramin | (K) nachher | Protokoll: |
|-----------|------------|-------|---------|-------------|------------|
| Ionomycin | ✓ | ✓ | | | 1 |
| Histamin | ✓ | ✓ | | | 1 |
| Histamin* | ✓ | ✓ | | (✓) | 2 |
| ATP* | ✓ | ✓ | (✓) | ✓ | 2 |

Tab. 4-1: Übersichtsschema aller durchgeführten Versuche

* alle Behandlungen nacheinander im selben Well durchgeführt

4.3.3.2 Mechanische Zellstimulation

Als Alternative zur humoralen Stimulation erfolgte eine mechanische Stimulation von Zellen. Die mechanische Stimulation einer einzelnen Zelle mittels Berührung durch eine

Mikropipette wurde unter optischer Kontrolle mit einem Manipulator (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die für die Mikropipetten verwendeten Rohlinge aus Borosilikatglas wurden mit einem Universal-Puller (WZ DMZ, Zeitz-Instrumente, Planegg) unter Hitzeeinwirkung ausgezogen, so dass Pipettenspitzen mit einem Durchmesser von weniger als 1 μm entstanden. Für die mechanische Stimulation wurde die Spitze der Mikropipette über der zu stimulierenden Zelle in Position gebracht und nach Starten des Films mit einem Mikromanipulator abgesenkt, bis eine Calciumreaktion der Zelle auftrat. Die Spitze wurde dann sofort wieder auf ein Niveau oberhalb des Zellrasens angehoben. Die Calciummessung erfolgte in 200 Messzyklen mit je 200 ms Dauer, wobei die Aufnahmezeit für jedes Einzelbild jeweils 70 ms und die Gesamtdauer etwa 40 s betrug. In jeder Zellpopulation wurden nacheinander vier oder fünf weit voneinander entfernt liegende Zellgruppen nach jeweiliger Stimulation analysiert.

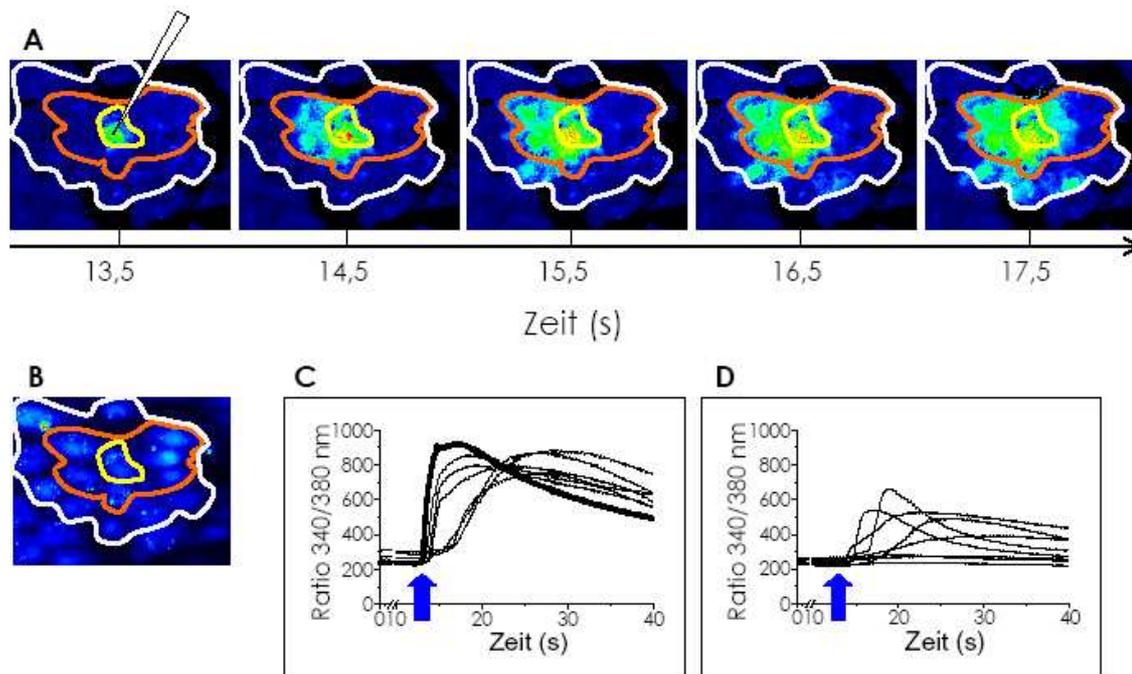


Abb. 4-5: Beispiel für mechanische Stimulation

Calciumausbreitung (Ratio) nach mechanischer Stimulation (weiße Spitze) einer zentralen Einzelzelle („initiale Zelle“) (Zeitreihe mit 2 Hz aufgenommen). **A)** Von der initialen Zelle (gelbe Markierung) breitet sich die Calciumwelle in den 1.Kranz (orange), den 2.Kranz (weiß) und darüber hinaus aus (Bildausschnitte 100 x 127 μm). **B)** Die Aufnahme zeigt die Anordnung der Zellen (aufgenommen bei 380 nm). **C+D)** Zu beobachten ist zunächst ein Anstieg der Calciumkonzentration nach Stimulation (blauer Pfeil) in der initialen Zelle (**C**, breite Linie), mit leichter Verzögerung erfolgt dann ein Calciumanstieg in den Zellen im 1.Kranz (**C**) und im 2.Kranz (**D**).

Versuche mit mechanischer Simulation wurden an HeLaWT, HeLa43 und HUVEC nach Inkubation mit Apyrase und/oder Heptanol-Meclofensäure (H-M1/H-M4d) durchgeführt. Mit HUVEC wurden zusätzlich Versuche nach Inkubation mit Xestospongine gemacht. Zur Beobachtung wurde das oben beschriebene 40x Objektiv verwendet.

| | HEPES (K) | A | H-M | A+H-M | Xesto |
|---------|-----------|---|---------|---------|-------|
| HeLa WT | ✓ | ✓ | | | |
| HeLa 43 | | ✓ | ✓ H-M1 | ✓ H-M1 | |
| HUVEC | ✓ | ✓ | ✓ H-M1 | ✓ H-M1 | |
| | ✓ | ✓ | ✓ H-M4d | ✓ H-M4d | |
| | | ✓ | | | ✓ |

Tab. 4-2: Zelltypen und die durchgeführten Behandlungen bei mechanischer Stimulation

HUVEC wurden, wie im Kapitel Zellkultur beschrieben, vorbereitet. Bei den HeLa-Zellen wurde ebenfalls 1 h vor Messbeginn das Kulturmedium abgenommen und durch 400 μ l DMEM mit Fura2-AM (4 μ M) ersetzt. Nach zweimaligem Waschen und weiteren 5 bis 10 min Inkubation in HEPES++ wurde jeweils eine Zelle mechanisch stimuliert. Diese Stimulation wurde in einem Well in vier bis sechs unterschiedlichen Sichtfeldern im Abstand von etwa 2 min wiederholt. Um nachzuweisen, dass die mechanisch stimulierten Zellen nach dem Versuch noch intakt waren, wurden die Zellen nach der Manipulation und Aufnahme der Calciumreaktion stichprobenartig mit Trypanblau angefärbt. Trypanblau wird von abgestorbenen Zellen aufgenommen und färbt diese dunkelblau. Bei den untersuchten Präparaten ließen sich die Zellen nach erfolgter Stimulation nicht anfärben.

4.3.4 Calciummessung in Endothelzellen der murinen Aorta

Ein Segment einer frisch entnommenen Aorta wurde der Länge nach aufgeschnitten und mit der Endothelseite nach oben aufgespannt (Kapitel 4.2). Nachdem die Endothelzellen mit CD31 markiert wurden, wurde die Aorta für 30 min bei 37 °C mit 4 μ M Fura-2/AM (gelöst in MOPS++) inkubiert. Danach wurde das Präparat zweimal mit MOPS-Puffer

gespült und, bevor die Messungen durchgeführt wurden, weitere 30 min in MOPS++ inkubiert.

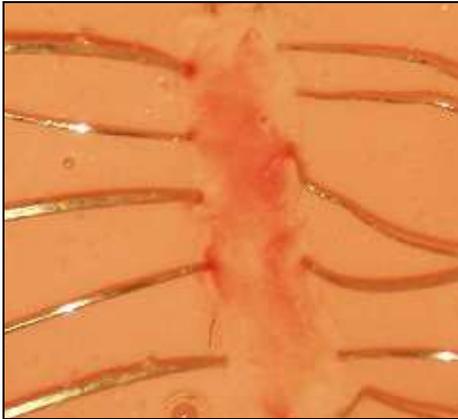


Abb. 4-6: Aortenabschnitt mit Nadeln auf Silikonkautschuk gespannt

In jedem Segment erfolgte eine Stimulation durch Zugabe von ATP zur extrazellulären Lösung. ATP-Zugabe und Messung erfolgten vor und nach Inkubation mit H-M4d. Es wurden 300 Messzyklen mit je 250 ms Dauer durchgeführt, wobei die Aufnahmezeit für jedes Einzelbild jeweils 100 ms und die Gesamtdauer etwa 75 s betrug. ATP wurde in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt.

4.3.5 Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration

Eine annäherungsweise Berechnung der intrazellulären Konzentration des freien Ca^{2+} aus den ermittelten Ratios wurde nach der folgenden Formel in einzelnen HUVEC-Populationen durchgeführt [33].

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \times \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

| | |
|--------------------------------------|--|
| K_d: | Dissoziationskonstante für Calcium (bei 37 °C: 224 nM) |
| R: | Ratio F340nm/F380nm |
| S_{f2}: | F380nm (calciumfrei) |
| S_{b2}: | F380nm (maximales Calcium) |
| R_{min}/R_{max}: | siehe Abb. 4-7 |

Die Zellen wurden vor Start der Messung für 10 min in HEPES inkubiert. Dann wurde das Protokoll (in Tab. 4-5) gestartet. Alle zwei Sekunden erfolgte eine Messung.

| Zeit (~ s) | Inkubationsmedium |
|------------|--|
| 0 - 80 | HEPES (2,5 mM Ca ²⁺) |
| 80 - 150 | calciumfreier HEPES (HEPES-) |
| 150 - 200 | HEPES- mit EGTA (HEPES-EGTA) |
| 200 - 600 | Zugabe von Ionomycin (13 µM) |
| 600 - 750 | HEPES (2,5 mM Ca ²⁺) mit Ionomycin (13 µM) |

Tab. 4-3: Zeitlicher Ablauf für die Bestimmung der absoluten Ca²⁺-Konzentration

Mit HEPES- und EGTA wurde zuerst das extrazelluläre Ca²⁺ ausgewaschen oder gebunden. EGTA hat eine hohe Selektivität für Ca²⁺ [30] und bildet mit freiem Ca²⁺ einen Chelatkomplex. Durch die Zugabe von Ionomycin wurde danach die Zellmembran durchlässig für Ca²⁺. Parallel setzt dieses Ionophor auch verbliebenes Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern frei (sichtbar am deutlichen Anstieg der Kurve in Abb. 4-7 C), das entsprechend dem Konzentrationsgradienten die Zelle verlässt und ebenfalls von EGTA gebunden wird. Am Tiefpunkt der Kurve konnte somit R_{min} (Ratio 340/380 nm bei minimaler Calciumkonzentration) bestimmt werden. Danach wurde die Lösung mit EGTA abgenommen und durch calciumhaltigen HEPES mit Ionomycin ersetzt. Damit war Ca²⁺ wieder im Überschuss vorhanden und verteilte sich auch in den Zellen. Eine maximale Calciumkonzentration wurde erreicht und R_{max} (Ratio 340/380 nm bei maximaler Calciumkonzentration) konnte bestimmt werden.

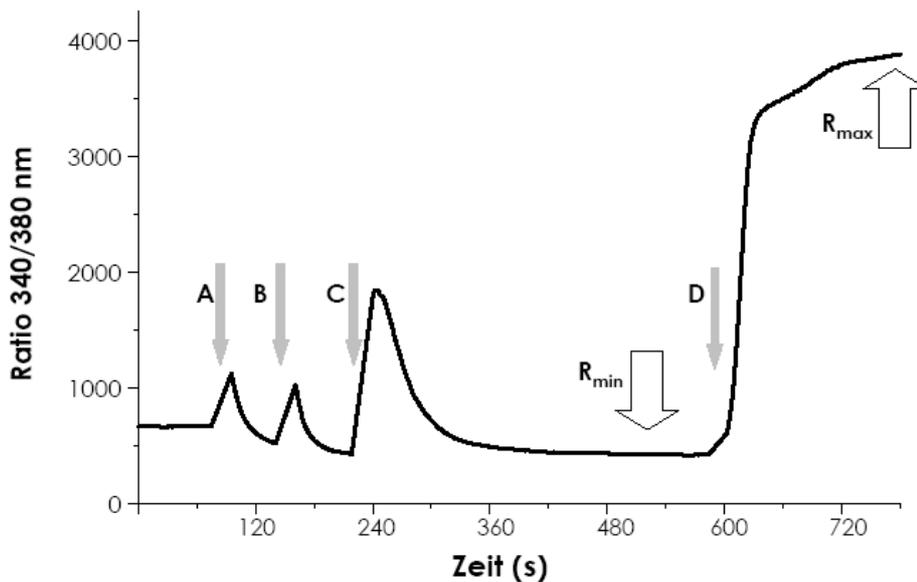


Abb. 4-7: Beispielkurve der Ermittlung von R_{\min} und R_{\max}

Nach 10 min Inkubation in HEPES wurde die Kalibrierung gestartet (0 s). Der Puffer wurde durch calciumfreien HEPES (HEPES-) ersetzt (**A**), dieser durch HEPES- mit EGTA (**B**), danach erfolgte die Zugabe von Ionomycin (**C**) sowie schließlich der Austausch des calciumfreien Puffers gegen calciumhaltigen Puffer mit Ionomycin (**D**). Die breiten Pfeile zeigen R_{\min} und R_{\max} für die Berechnung der Calciumkonzentration.

4.3.6 Auswertung der Calciummessungen

Für die Auswertung der Calciummessungen wurde aus den Grauwerten der Aufnahmen bei 340 und 380 nm in TILLvisION nach dem Abzug der jeweiligen Hintergrundfluoreszenz die Ratio errechnet und als Bild gespeichert. Zur Auswertung der mechanischen Stimulation wurden danach in den „Ratio-Bildern“ die zu analysierenden Zellen (Initialzelle und Zellen des 1. bzw. 2.Kranzes) umrandet und als ROI (regions of interest) markiert. Die diesen Bildbereichen zugeordneten Ratio-Werte wurden zur weiteren Berechnung und numerischen Dokumentation in Origin 5.0 Professional (MicroCal, Freiburg) übertragen. Um die Ausbreitungsgeschwindigkeit abzuschätzen, wurden Regionen im jeweiligen Zentrum der Zellen markiert und die Zeitdifferenz des Beginns des Calciumanstiegs durch die gemessene Entfernung dividiert (siehe Abb. 4-8 A). Um die Gesamtausdehnung der Calciumwellen während des Untersuchungszeitraums zu bestimmen, wurden alle Zellen, die zu diesem

Zeitpunkt einen Calciumanstieg aufwiesen, markiert (Abb. 4-8 B) und die Größe der so markierten Fläche bestimmt.

Bei Stimulation der Zellen mit den Agonisten Histamin oder ATP wurden nach Bildung der Ratio die Zellen im mikroskopischen Sichtfeld entsprechend ausgewertet. Die Ratioänderung wurde über die Zeit betrachtet. Bei Stimulation mit Histamin, ATP und Ionomycin wurde jeweils eine Änderung der Ratio um > 100 als Calciumanstieg definiert. In der deutlich schwächer ausfallenden Reaktion der Zellen auf die mechanische Stimulation wurde bereits eine Änderung der Ratio um > 25 als positiv definiert. Dies entspricht bei Stimulation mit Agonisten jeweils ungefähr 10 % des durchschnittlichen Anstiegs aller Zellen bzw. bei mechanischer Stimulation etwa 10 % des Calciumanstiegs in der mechanisch stimulierten Zelle.

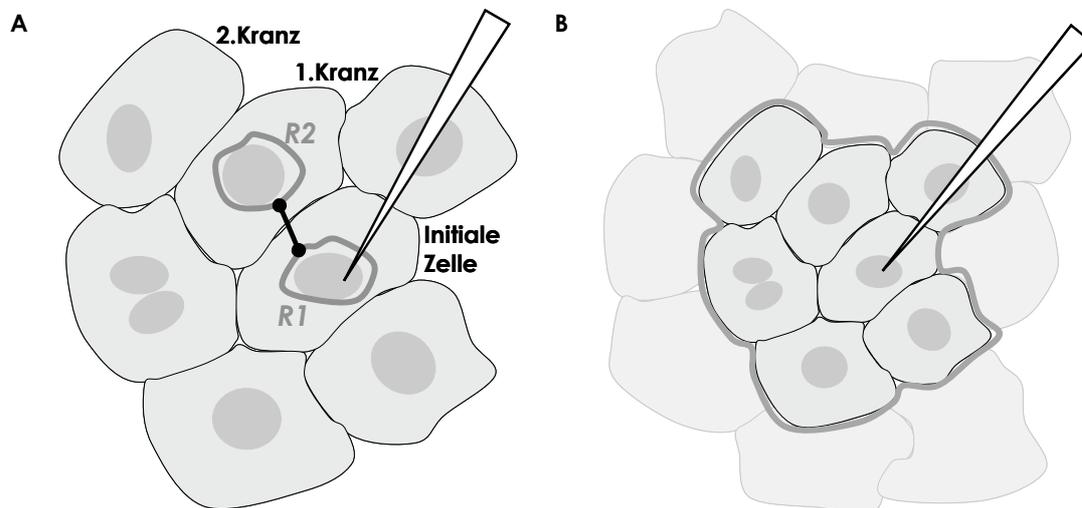


Abb. 4-8: Geschwindigkeit und Fläche der Calciumausbreitung nach mechanischer Stimulation

A) zeigt die Bestimmung der Ausbreitungsgeschwindigkeit zwischen Initialer Zelle und 1.Kranz. Die schwarze Verbindung zeigt die Strecke an, die mit der jeweiligen Zeitdifferenz des Calciumanstiegs in den Regionen R1 und R2 verrechnet wurden. **B)** zeigt die schematische Darstellung der Gesamtfläche von Beispielzellen (breite graue Umrandung), in denen ein Calciumanstieg beobachtet werden konnte.

4.4 Messung von cGMP in Zelllysat

Nach einer Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ Histamin oder dem NO-Donor SNAP ($10 \mu\text{M}$), jeweils mit oder ohne Zugabe von 2 mM Heptanol als GJ-Blocker, wurde die

Konzentration von cGMP in Zelllysat gemessen. Da NO die lösliche Guanylylzyklase in Endothelzellen stimuliert und somit cGMP erhöht, sollte auf diese Weise festgestellt werden, ob sich eine Entkoppelung der Gap Junctions auf die Bildung von NO auswirkt. Als Kontrolle, dass der cGMP-Anstieg durch endotheliales NO ausgelöst wurde, wurden Zellen mit HEPES oder mit Histamin in Gegenwart des NO-Synthase-Hemmers N-Nitro-L-arginin (LNA) behandelt. Für den cGMP-Nachweis wurde ein GMP EIA Kit von Cayman Chemicals verwendet, dabei handelt es sich um einen kompetitiven Immunoassay. In dem Assay wird eine genau definierte Menge der Proben mit AChE (Acetylcholinesterase)-verlinktem cGMP als Konkurrenz zum freien cGMP eingesetzt und über die Konzentrationsbestimmung dieses „Tracers“ indirekt die Konzentration des cGMP-Gehalts der Proben ermittelt. Anteilig wird die Bindung von cGMP und cGMP-Tracer an einen limitierten Rabbit-Antikörper (Rabbit-AK) bestimmt. Der cGMP-rabbit-AK-Komplex wiederum bindet an monoklonalen Mouse anti-rabbit Antikörper, mit dem die Wells beschichtet sind. Nach Inkubation wird mit der Zugabe von Ellmans Reagenz, einem Substrat für AChE, eine enzymatische Reaktion ausgelöst, deren Endprodukt (5-Thio-2-nitrobenzoesäure) intensiv gelb gefärbt ist und bei 412 nm stark absorbiert. Die Intensität dieser Färbung ist umgekehrt proportional zur Konzentration des cGMPs in den Proben bzw. im Standard.

HUVEC wurden auf drei 12-Well-Platten ausgesät und bis zur Konfluenz im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und nach einmaligem Waschen der Zellen durch HEPES mit 5 mM Glukose plus 26 mM NaHCO₃ ersetzt. Zusätzlich wurden dem Puffer 100 µM des Phosphodiesterasehemmers IBMX und 10 µg/ml Superoxiddismutase (SOD) zugegeben. IBMX und SOD wurden allen im weiteren Protokoll verwendeten Lösungen zugesetzt. Die HUVEC wurden dann für 30 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und Wasserdampfsättigung inkubiert. Danach wurde der Puffer abgenommen und die Zellen wurden für die jeweiligen Behandlungen in Tab. 4-6 über 2 x 20 min weiter inkubiert. Pro Behandlung wurden jeweils drei Wiederholungen angesetzt.

| Behandlung | Inkubation für 20 min in: | weitere 20 min in HEPES mit: |
|-----------------------------|--------------------------------------|---|
| Kontrolle (HEPES) | HEPES | - |
| Histamin | HEPES | Histamin |
| Histamin nach Heptanol (H2) | HEPES+H2 | H2+Histamin |
| Histamin und LNA (30 µM) | HEPES+LNA | Histamin+LNA |
| SNAP | HEPES | SNAP |
| SNAP nach Heptanol | HEPES+H2 | H2+SNAP |

Tab. 4-4: Behandlungen für die cGMP Messung

Direkt im Anschluss an die Inkubation wurde der Überstand abgesaugt und jeweils 150 µl 0,1 M HCl in die Wells pipettiert. Nach 10 min bei RT wurden die Zellen mit einem Gummischaber gelöst und durch mehrfach wiederholte Aspiration mit Hilfe einer Insulinspritze lysiert, als Lysat anschließend in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C mit 14500 g für 10 min abzentrifugiert (in Biofuge®primoR, Heraeus, Hanau). Von dem Überstand wurden je 110 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das mit 90 µl EIA-Puffer (Kit) auf 200 µl aufgefüllt und auf Eis gestellt wurde. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate von cGMP wurde einer Kontrollprobe cGMP (aus dem Kit) in einer Endkonzentration von 0,75 pM zugegeben.

Da in den Proben nur geringe cGMP Konzentrationen erwartet wurden (< 1 pmol/ml), wurden die Proben acetyliert, um die Nachweisempfindlichkeit des Kits zu verbessern. Zur Acetylierung der Proben wurde zu den Lysaten auf Eis 40 µl Kaliumhydroxid (KOH, 4 M, Kit) und 10 µl Essigsäureanhydrid zugegeben. Der Ansatz wurde sofort für 15 s gemischt, weitere 10 µl KOH wurden zugegeben und erneut gemischt. Danach wurden zur Acetylierung des Standards jeweils 500 µl mit 100 µl KOH und 25 µl Essigsäureanhydrid versetzt, gemischt, weitere 25 µl KOH zugegeben und erneut gemischt.

Im EIA-Kit wurden jeweils 50 µl der acetylierten Proben und des Standards eingesetzt. Außerdem wurden für die Auswertung eine Standardkonzentrationsreihe und Kontrollen nach Vorgaben des Kits angesetzt. Kontrollen, Standard und Proben wurden auf eine antikörperbeschichtete 96-Well-Platte aufgetragen. Die Platte wurde verschlossen und für 18 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Wells in fünf Durchgängen mit Waschpuffer gewaschen und anschließend wurden je 200 µl

Ellman's Reagenz zugegeben. Die Platte wurde wieder mit der Abdeckung verschlossen und für weitere 60 bis 90 min im Dunkeln bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Gemessen wurde an einem ELISA Reader Infinite F200 (Tecan, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 405 nm. Da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass Meclofensäure die cGMP-Messung beeinflusst, wurden Gap Junctions nur mit Heptanol und nicht mit der sonst eingesetzten Kombination von Heptanol und Meclofensäure gehemmt.

4.5 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfärbung wurden die auf Deckgläschen kultivierten Zellen fixiert und mit spezifischen Antikörpern (Primärantikörper/1.AK) gegen die gesuchten Proteine behandelt. Mit einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper, der gegen den spezifischen Antikörper gerichtet war, konnten die Proteine und ihre zelluläre Lokalisation mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

HUVEC wurden mehrfach auf die Expression des Endothelmarkers CD31 (Pecam-1), sowie auf die Expression von Cx37, Cx40 und Cx43 untersucht. Die HeLa43-Zellen wurden mit dieser Methode auf Cx43 untersucht, um die erfolgreiche Transfektion und Selektion zu verifizieren, HeLaWT wurden als Kontrolle verwendet. In HUVEC wurde außerdem die Verteilung des P_{2Y2}-Rezeptors in der Zellpopulation untersucht.

HUVEC und HeLa wurden auf 15 mm Deckgläschen in 24-Well-Platten kultiviert. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen wurden mit PBS+ dreimal gewaschen und mit 3,7 % Formaldehyd in PBS+ 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach drei weiteren Waschschritten in PBS+ wurde 0,3 % TritonX100 (für die Connexin-Antikörper) oder Tween20 (für den P_{2Y2}-Antikörper), jeweils in PBS+, für 1 min auf die Zellen gegeben, um die Membran zu permeabilisieren. Nach weiteren drei Waschschritten wurden die Zellen mit 1 % Albumin Fraktion V/Bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS+ für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die einprozentige BSA-Lösung wurde auch zum Verdünnen der Primär- und Sekundärantikörper verwendet.

| 1. Antikörper: | | Konzentration: | Hersteller: |
|-----------------------|--|----------------|--|
| anti-CD31 | Mouse anti-human IgG, monoklonal (Clone JC70A) | 3,5 µg/ml | DAKO, Glostrup, Dänemark |
| anti-Cx37 | Rabbit anti-mouse IgG, polyklonal | 20 µg/ml | Alpha Diagnostics, San Antonio, USA |
| anti-Cx40 | Rabbit anti-mouse IgG, polyklonal | 20 µg/ml | Alpha Diagnostics, San Antonio, USA |
| anti-Cx43 | Rabbit anti-human IgG, polyklonal | 5 µg/ml | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| anti-P2Y ₂ | Rabbit anti-human IgG, polyclonal | 10 µg/ml | Abnova, Jhongli City, Taiwan |
| 2. Antikörper: | | | |
| Alexa Fluor® 546 | Goat anti-rabbit IgG | 10 µg/ml | Molecular Probes, Eugene, USA |
| Alexa Fluor® 488 | Chicken anti-mouse IgG | 10 µg/ml | Molecular Probes, Eugene, USA |
| Alexa Fluor® 488 | Goat anti-mouse IgG | 10 µg/ml | Molecular Probes, Eugene, USA |

Tab. 4-5: Antikörper für die Immunfluoreszenz

Die Proben wurden mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert, nach drei Waschschritten in PBS+ folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Zweitantikörper für 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Danach folgten drei abschließende Waschschrritte. Für die Färbung der Zellkerne wurde der DNA-Fluoreszenzfarbstoff DAPI während des ersten Waschschriffs zugegeben (1 µg/ml; Stammlösung 1 mg/ml in destH₂O). Schließlich wurden die Präparate zur leichteren Handhabung und Konservierung in Immu-Mount Medium auf einen Objektträger gebettet. Nach dem Antrocknen wurde das Deckglas ringsum mit Nagellack versiegelt.

Die Bilder der Connexin-Färbungen wurden an einem Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit einem Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC Objektiv aufgenommen und mit AxioVision Software (Zeiss) ausgewertet. Die

Anregung der Fluoreszenz erfolgte mit einer HBO100-Quecksilberdampflampe bei Wellenlängen von 488 nm und 543 nm. Kontrollen auf Autofluoreszenz und unspezifische Bindungen des Zweitantikörpers wurden parallel durchgeführt.

Aufnahmen der P_{2Y2}-R Färbungen wurden mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop Leica TCS SP5 X (Leica Microstems, Wetzlar) mit einem HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV Objektiv erstellt.

4.6 Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie werden Einzelzellen in eine Kapillare gesaugt und passieren dort ein Sensormodul, in dem mittels Laser nach der Brechung bzw. Beugung des emittierenden Lichts die relative Größe und Granularität der jeweiligen Zelle detektiert werden können. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, Forward Scatter) hängt dabei vom Volumen der Zelle ab, das Seitwärtsstreulicht (SSC, Side Scatter) von der Granularität, die wiederum auf Größe und Struktur des Zellkerns und der Anzahl von Vesikeln in der Zelle beruht. Durch eine zusätzliche Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern können Proteine nachgewiesen werden. Dazu wird nach Anregung durch die entsprechende Wellenlänge die Emission mittels Fluoreszenzdetektoren erfasst. Die Durchflusszytometrie wurde eingesetzt, um die Verteilung von Histaminrezeptoren (H1-R) auf Endothelzellen zu untersuchen. Der verwendete Histaminrezeptor-1 Antikörper (anti-H1-R) bindet an einem extrazellulären Loop des Rezeptors [61].

Für die Messung wurden von einer 100 % konfluenten Kulturschale mit HUVEC (Ø 10 cm) die Zellen mit Trypsin abgelöst. Um die Zellen zu waschen, wurden sie mit PBS+ in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und darin 5 min mit 400 g zentrifugiert (in Rotina 35R, Hettich, Bäch, Schweiz). Der Überstand wurde verworfen und die verbliebenen Zellen wurden in 4 ml FACS Lysing solution (1:10 mit destH₂O verdünnt) resuspendiert und für 10 min bei RT in dieser Lösung fixiert und permeabilisiert. Danach wurde das Lysat erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und die verbliebenen Zellen in PBS+ gewaschen (Zentrifugationsschritt wie oben). Die gewaschenen Zellen wurden dann in 1 ml PBS+ resuspendiert und für die folgenden vier Färbeprotokolle auf 5 ml Polystyrolröhrchen aufgeteilt:

1. Kontrolle: Zellen in PBS+ (Leerwert)
2. Kontrolle auf unspezifische Bindung: Zweitantikörper (Goat anti-rabbit, FITC konjugiert) und Isotyp mouse IgG (PE)
3. Histaminrezeptor-1: anti-H1-R und Zweitantikörper (Goat anti-rabbit, FITC)
4. Endothelmarker: anti-CD31 PE konjugiert

| Antikörper (direkt markiert) | | Konzentration: | Hersteller: |
|------------------------------|--|---|------------------------------|
| anti-CD31 Clone WM59 | Rabbit anti-human IgG, monoklonal, PE konjugiert | 1:50 verdünnt (nach Herstellerangaben) | BD Pharmingen, Heidelberg |
| Isotyp mouse IgG1 γ 1 | PE konjugiert | 1:50 verdünnt (nach Herstellerangaben) | BD Pharmingen, Heidelberg |
| 1. Antikörper: | | | |
| anti-H1-Rezeptor | Rabbit anti-human IgG, polyklonal | 36 μ g/ml | AbD Serotec, Oxford, UK |
| 2. Antikörper: | | | |
| Goat anti-rabbit | IgG, polyklonal, FITC konjugiert | 10 μ g/ml | BD Pharmingen, Heidelberg |

Tab. 4-6: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Nach Zugabe des Primärantikörpers erfolgte eine Inkubation für 20 min auf Eis (im Dunkeln). Danach wurde für 5 min mit 400 g abzentrifugiert, nicht gebundener Antikörper durch einmaliges Waschen in PBS+ entfernt und erneut zentrifugiert. Dieser Ablauf wurde für die Inkubation mit dem Zweitantikörper wiederholt.

Die Zellsuspension wurde im FACSort (BD, Heidelberg) analysiert. Es wurden 10000 Zellen je Behandlung gemessen. Mit der Cellquest Software (BD, Heidelberg) erfolgte die Auswertung der Messungen, die mit Hilfe des Programms WinMDI 2.9 (Scripps Institute, North Torrey, USA) grafisch dargestellt wurden.

4.7 Statistik

Zellen aus einer Nabelschnur wurden jeweils als einheitliche HUVEC-Population betrachtet ($n = 1$). Mehrere Versuchsdurchführungen an Zellen aus einer Population wurden als Wiederholungen gewertet. Diese Gesamtzahl der Versuchsdurchführungen ist in Klammern hinter der n -Zahl angegeben (z.B. $n = 3(15)$). Aus allen Wiederholungen wurde ein Mittelwert gebildet, der dann in die Gruppenwertung einging. Die statistische Auswertung und Darstellung der einzelnen Ergebnisse erfolgte in SigmaStat für Windows 2.03 und SigmaPlot (SPSS Inc., Chicago, USA). Wenn im Text oder in der Legende nicht ausdrücklich ein anderes Testverfahren angegeben wird, wurde zum Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen bei normalverteilten Daten ein t -Test durchgeführt, bei nicht normalverteilten Daten ein Mann-Whitney Rangsummentest. Bei mehreren Gruppen wurde eine ANOVA (Varianzanalyse) durchgeführt, gefolgt von einem Student-Newman-Keuls-Test. Bei nicht normalverteilten Daten wurde statt der ANOVA die ANOVA on Ranks für unverbundene Stichproben (Kruskal-Wallis) angewendet, gefolgt von einem Student-Newman-Keuls-Test. Auch wenn ein Rangsummentest durchgeführt wurde (und nicht-parametrisch getestet wurde), sind die Ergebnisse aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit in den Grafiken als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler des Mittelwerts (SF) dargestellt, wenn diese nicht deutlich ($> 5\%$) vom jeweiligen Median abwichen. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug.

5 ERGEBNISSE

5.1 Immunzytochemische Charakterisierung von HUVEC und Nachweis von Gap Junctions

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten HUVEC wurden auf die Expression von Connexinen untersucht. Abb. 5-1 1B-D zeigt ein Beispiel für die Färbung auf CD31, in der die Zellgrenzen, grün dargestellt, deutlich erkennbar sind. In den Präparaten wurden keine CD31-negativen Zellen gefunden, da nach Markierung der Zellkerne mit DAPI (in Abb. 5-1 1A-D blau dargestellt) alle Zellen sowohl eine Kernfärbung als auch die CD31-Markierung aufwiesen. Cx37, Cx40 und Cx43 konnten ebenfalls in jeder Stichprobe nachgewiesen werden. Die für Gap Junctions typischen Plaques sind als punktförmige Strukturen (in Abb. 5-1 1B-D in rot, in Abb. 5-1 2B-D in weiß) an den Zellgrenzen sichtbar. In den gezeigten Aufnahmen in Abb. 5-1 sind Cx37 (Abb. 5-1 B), Cx40 (Abb. 5-1 C) und Cx43 (Abb. 5-1 D) etwa gleich stark exprimiert. Zwischen den verschiedenen untersuchten HUVEC-Kulturen variierte die Expression von Cx37 von kaum vorhanden (einzelne Zellen) bis gleichmäßig verteilt (alle Zellen, wie in Abb. 5-1 B), während Cx40 und Cx43 regelmäßig exprimiert waren.

Die Funktionalität der Gap Junctions wurde bereits in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe mit Farbstoffinjektion in Einzelzellen und einer Farbstoffausbreitung in die angrenzenden Zellen nachgewiesen [52].

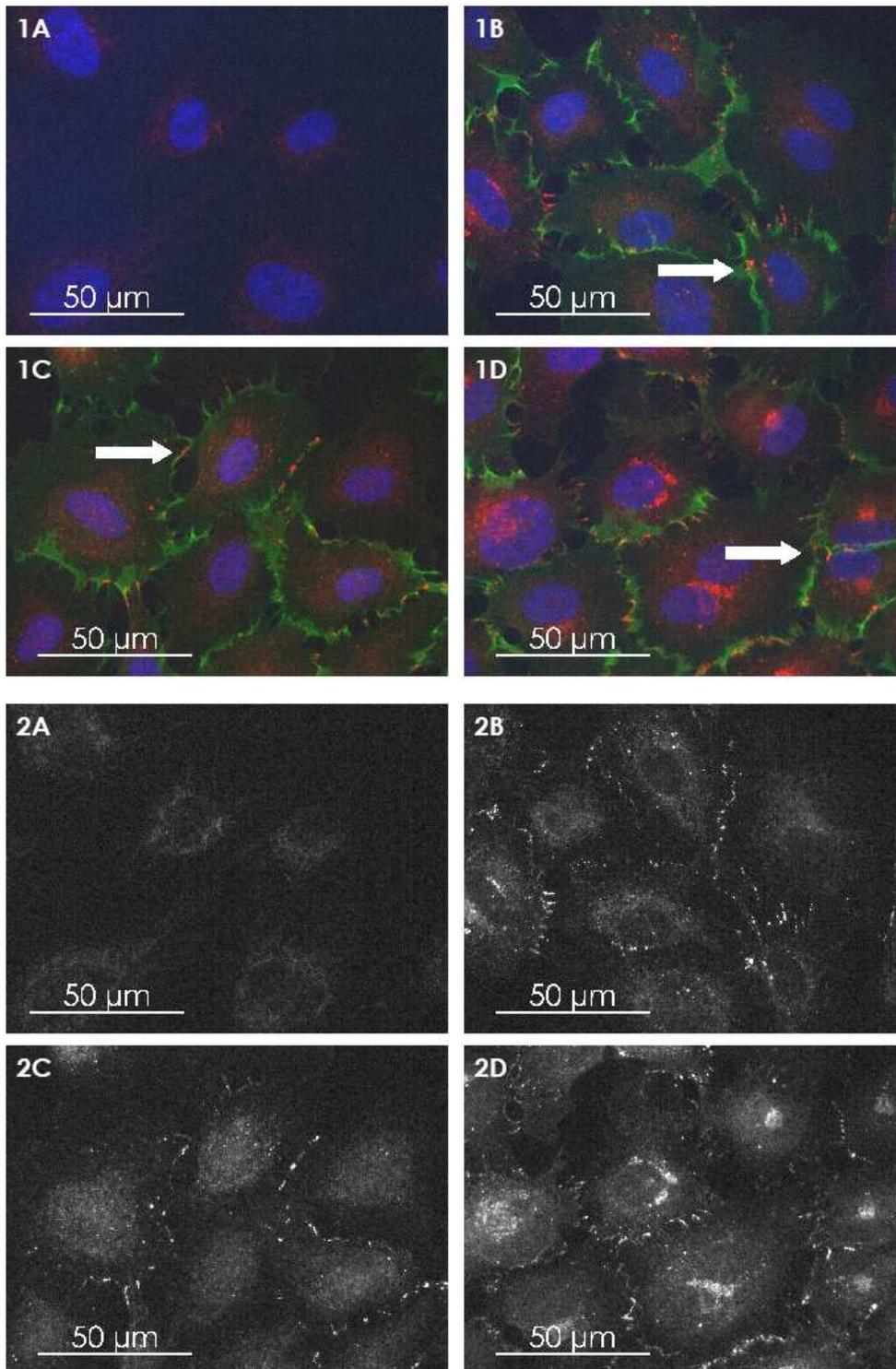


Abb. 5-1: Cx37, Cx40 und Cx43 in HUVEC.

Die Bilder **1B-D** zeigen Immunfluoreszenzdoppelfärbungen mit CD31 in grün und den folgenden Connexinen in rot: Cx37 (**B**), Cx40 (**C**) und Cx43 (**D**). Connexine sind als Gap Junction Plaques punktförmig an den Zellgrenzen sichtbar (Beispiele mit weißen Pfeilen markiert). In **1A** wurde nur 2.AK zugegeben. Zusätzlich sind die Zellkerne in allen Aufnahmen mit DAPI markiert (blau). **2A-D** zeigt von denselben Bildausschnitten jeweils nur den „Rotkanal“ (Gap Junctions) (Anregungswellenlänge 546 nm). Die dargestellten Beispielbilder repräsentieren n = 3 verschiedene Kulturen.

5.2 Calciumkonzentration in unstimulierten HUVEC

In insgesamt drei HUVEC-Kulturen wurde die basale Calciumkonzentration in jeweils fünf Wiederholungen gemessen. In Abb. 5-2 ist die Verteilung der Ruhe-Calcium-Werte in jeweils zehn zufällig ausgewählten Zellen pro Wiederholung konsekutiv dargestellt. Die aus den Ratios errechneten Werte der Calciumkonzentration im Zytosol lagen im Bereich von 15 bis 131 nM, mit einem „Ausreißer“ bei 2 nM. Über 92 % der Werte lagen zwischen 10 und 100 nM.

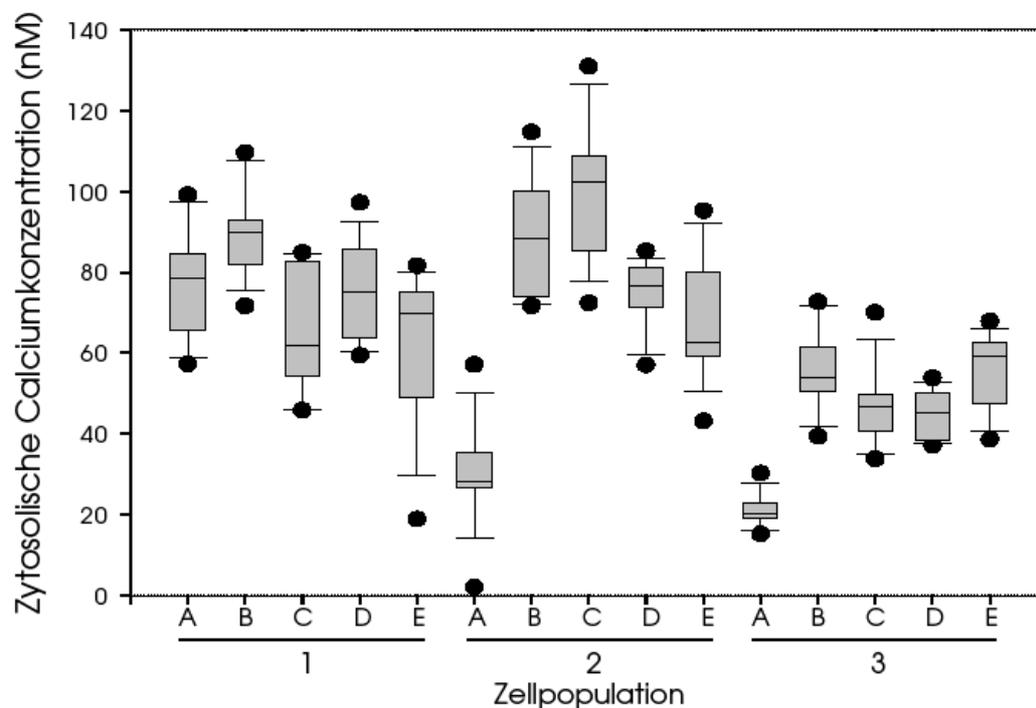


Abb. 5-2: Ruhe-Calciumkonzentration in HUVEC.

Dargestellt sind die Calciumkonzentrationen von je 10 Zellen aus je fünf Wiederholungen (A-E) an drei Versuchstagen (1-3) ($n = 3(15)$).

5.3 Calciumanstieg durch Stimulation mit Histamin oder Ionomycin

Bei Zugabe von Histamin zum Zellüberstand wurde bei nahezu allen HUVEC eine Calciumreaktion beobachtet. Allerdings erfolgte der Anstieg in HUVEC nicht homogen, initial reagierten nur einige Zellen mit einem Calciumanstieg. Erst mit einer zeitlichen Verzögerung von bis zu einigen Sekunden stieg die Calciumkonzentration in allen Zellen an. In Abb. 5-3 ist zu sehen, dass Ca^{2+} zuerst in einzelnen Zellen anstieg und sich dann von diesen Zellen in die Nachbarzellen auszubreiten schien.

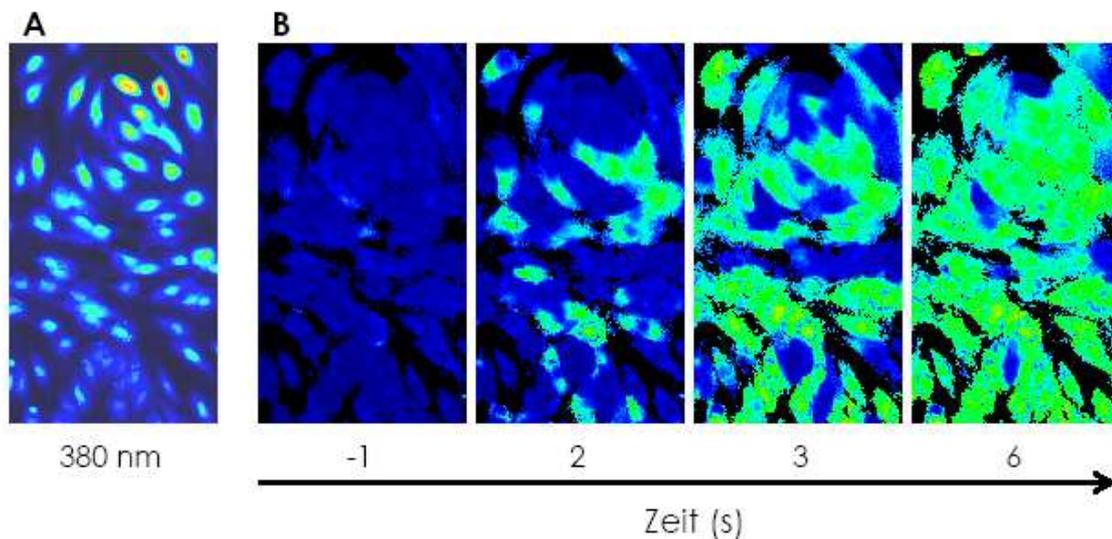


Abb. 5-3: Initial inhomogener Calciumanstieg in HUVEC nach Zugabe von Histamin.

Bildausschnitte eines Versuchs, exemplarisch für $n = 12(19)$. Der erste Bildausschnitt zeigt den konfluenten Zellrasen mit ungebundenem Fura-2 in den Zellen (Fluoreszenz bei 380 nm). Die folgenden vier Ausschnitte zeigen in einer Zeitreihe den Anstieg der Ratio 340/380 nm zu verschiedenen Zeiten vor und nach Zugabe von Histamin (etwa bei 0 s). Von den initial reagierenden Zellen scheint sich Ca^{2+} dabei auf die benachbarten Zellen auszubreiten, so dass schließlich beinahe alle Zellen einen Calciumanstieg zeigen. Die Bilder zeigen Ausschnitte von je $180 \times 480 \mu\text{m}$. Die Darstellung der Ratio erfolgt in Falschfarben. Mit zunehmender Calciumkonzentration ändert sich die Farbe von blau über türkis nach grün.

Kontrollexperimente mit dem rezeptorunabhängigen calciumsteigernden Ionophor Ionomycin zeigten dagegen einen synchronen Anstieg des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in allen Zellen des Sichtfelds. In Abb. 5-4 werden die Unterschiede in der Reaktion der Endothelzellen auf Histamin und Ionomycin deutlich. Der Calciumanstieg in den Zellen, als Reaktion auf

Ionomycin, vollzog sich zwar langsamer als bei Histamin, aber in allen Zellen gleichmäßig.

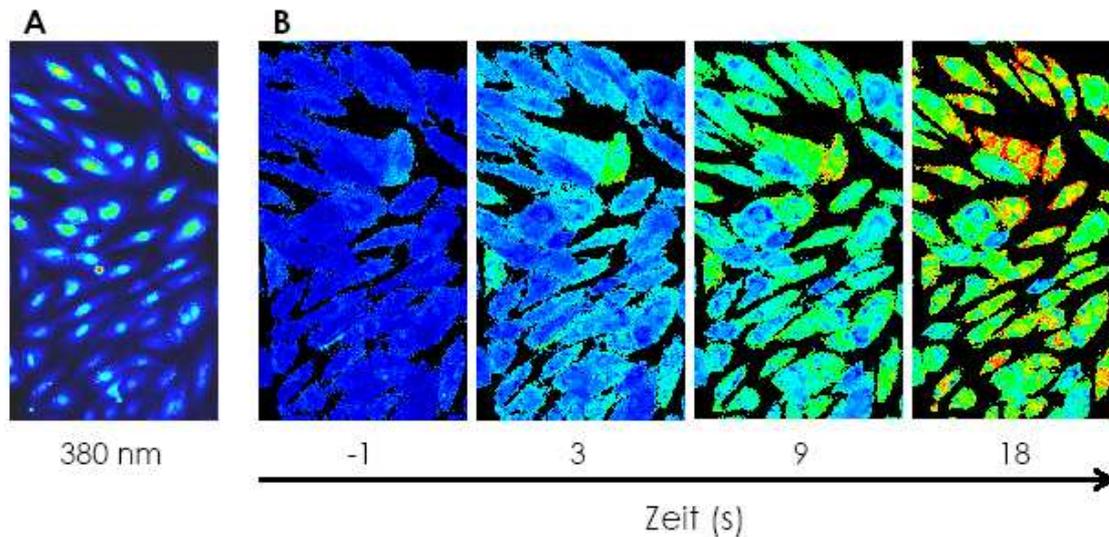
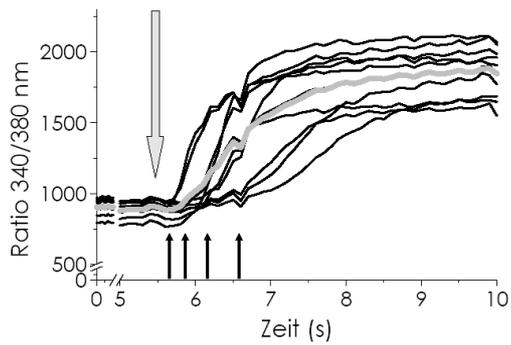


Abb. 5-4: Calciumausbreitung in HUVEC nach Zugabe von Ionomycin.

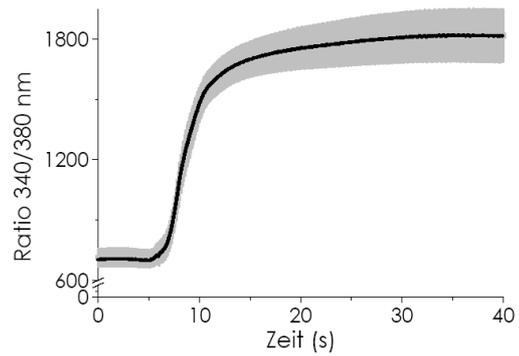
Bildausschnitte eines Versuchs, exemplarisch für $n = 10(10)$. Der erste Bildausschnitt zeigt den konfluenten Zellrasen (Fluoreszenz bei 380 nm). Die folgenden vier Ausschnitte zeigen in einer Zeitreihe den Anstieg der Ratio 340/380 nm zu verschiedenen Zeiten vor und nach Zugabe von Ionomycin (etwa bei 0 s). Die Bilder zeigen Ausschnitte von je $180 \times 480 \mu\text{m}$. Die Darstellung der Ratio erfolgt in Falschfarben. Mit zunehmender Ca^{2+} Konzentration ändert sich die Farbe von blau über türkis nach grün, gelb und orange.

In Abb. 5-5 1A-C ist für je ein Experiment an zehn Zellen exemplarisch der Verlauf des Calciumanstiegs nach Histamin (als Ratio) dargestellt. Während $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Histaminzugabe in den Zellen zeitlich versetzt anstieg (Abb. 5-5 1A, verdeutlicht durch die kleinen schwarzen Pfeile), konnte bei der Kontrolle mit Ionomycin ein gleichzeitiger Anstieg in allen ausgewerteten Zellen beobachtet werden (Abb. 5-5 2A). Die Startpunkte des Calciumanstiegs in den einzelnen Zellen nach Histaminzugabe verteilten sich über einen Zeitraum von ungefähr zwei Sekunden, in einigen Experimenten wurden Verzögerungen von mehr als fünf Sekunden beobachtet. Der gezeigte Zeitabschnitt wurde für die Darstellung bei Ionomycin jeweils vergrößert, um den langsamen Anstieg besser sichtbar zu machen.

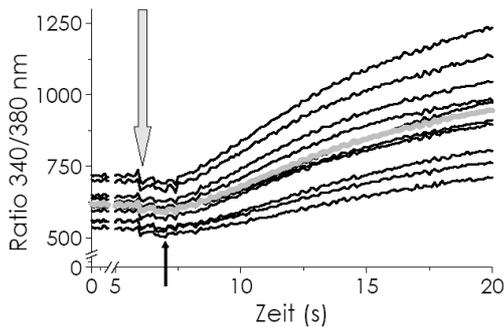
1A Histamin



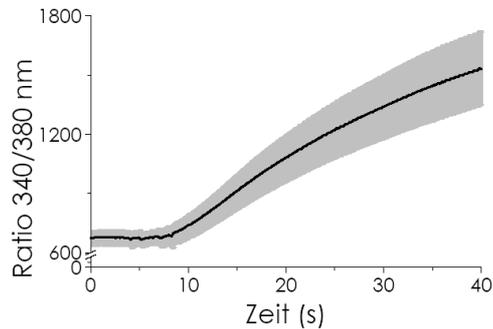
2A



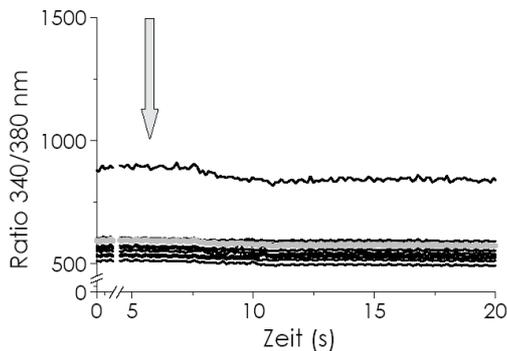
1B Ionomycin



2B



1C HEPES



2C

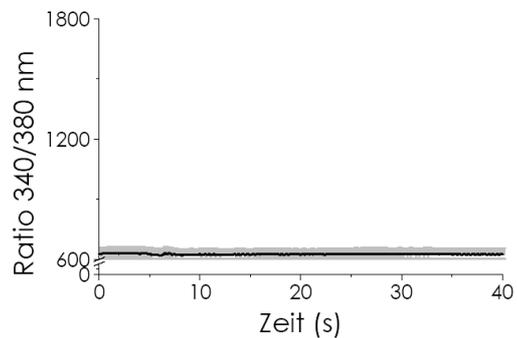


Abb. 5-5: Calciumantwort auf Histamin, Ionomycin und HEPES.

1) Änderungen in der Calciumkonzentration dargestellt als Ratio (340/380 nm) nach Zugabe (hell-graue Pfeile) von Histamin (A), Ionomycin (B) und HEPES (C), die kleinen schwarzen Pfeile zeigen auf Anstiegspunkte der Calciumreaktion, in 1A zeigen sie auf die Anstiege in individuellen Zellen nach Histaminzugabe. 1A-C zeigt die Änderungen der Ratio an Daten von je zehn zufällig ausgewählten Einzelzellen, die in jeweils einem der Versuche analysiert wurden. 2A-C zeigt die Mittelwerte (schwarze Linie, mit Standardfehler grau hinterlegt) aller Einzelzellen und damit die typischen Kurvenverläufe aus n = 12(19) bei Histamin, n = 10(10) bei Ionomycin und n = 8(8) bei HEPES (Kontrolle) Experimenten. Pro Behandlung wurden Werte von 800 bis über 2000 Einzelzellen analysiert, 10 Messwerte pro s.

Die Kurven aus den Mittelwerten des Calciumanstiegs in allen ausgewerteten Einzelzellen in Abb. 5-5 2A-C zeigen die Unterschiede im Anstieg der Calciumkonzentration. Bei Histamin zeigen die Kurven einen schnellen steilen Anstieg, der dann über die gemessenen 40 s in eine Plateauphase übergeht (Abb. 5-5 2A), bei Ionomycin dagegen einen langsamen, kontinuierlichen Anstieg, der offensichtlich auch nach 40 s sein Maximum noch nicht erreicht hat (Abb. 5-5 2B). Nach Zugabe von HEPES kommt es über die gesamte Aufnahme zu keiner Konzentrationsänderung, was zeigt, dass die mechanischen Effekte der Zugabe in den Zellüberstand per se keinen Calciumanstieg auslösen (Abb. 5-5 2C).

5.3.1 Einfluss einer Gap Junction Blockade auf den Histamin-induzierten Calciumanstieg in HUVEC

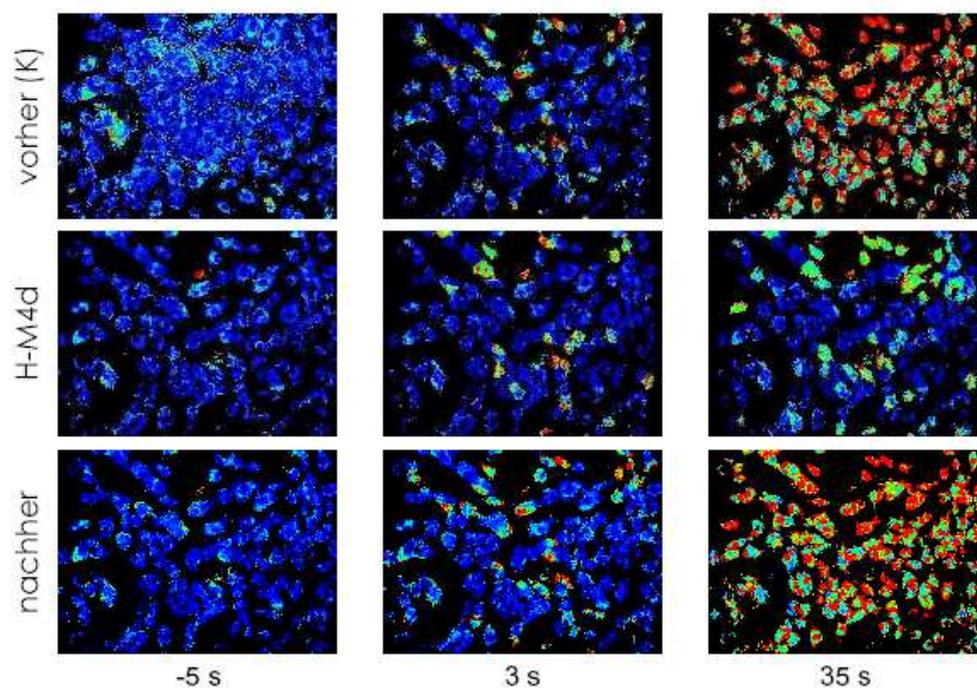


Abb. 5-6: Calciumanstieg nach Histamin: vor, während und nach reversibler Gap Junction Blockade.

Histaminantwort vor, während und nach dem Auswaschen von Heptanol-Meclofensäure (H-M4d). Die Bilder zeigen dasselbe Sichtfeld jeweils etwa 5 s vor Histaminzugabe, 3 s nach der Zugabe von 10 μ M Histamin (3 s) und weitere 30 s später (35 s). Diese Beispielbilder sind repräsentativ für n = 7(8) Versuche. Die Bilder zeigen Ausschnitte von 480 x 640 μ m.

Nach Zugabe von Histamin war in Abb. 5-6 in der oberen Bildserie („vorher(K)“) nach initial inhomogenem Calciumanstieg schließlich ein Calciumanstieg in allen Zellen des Gesichtsfelds zu beobachten. Nach Inkubation mit der Gap Junction Blockermischung H-M4d blieb diese Calciumerhöhung im Wesentlichen auf diejenigen Zellen beschränkt, die bereits initial mit einem Calciumanstieg reagiert hatten. Die Ausbreitung einer „Calciumwelle“ war nicht zu beobachten (Abb. 5-6, mittlere Bildserie). Nach Auswaschen des Blockers war erneut ein Calciumanstieg in allen Zellen zu beobachten („nachher“).

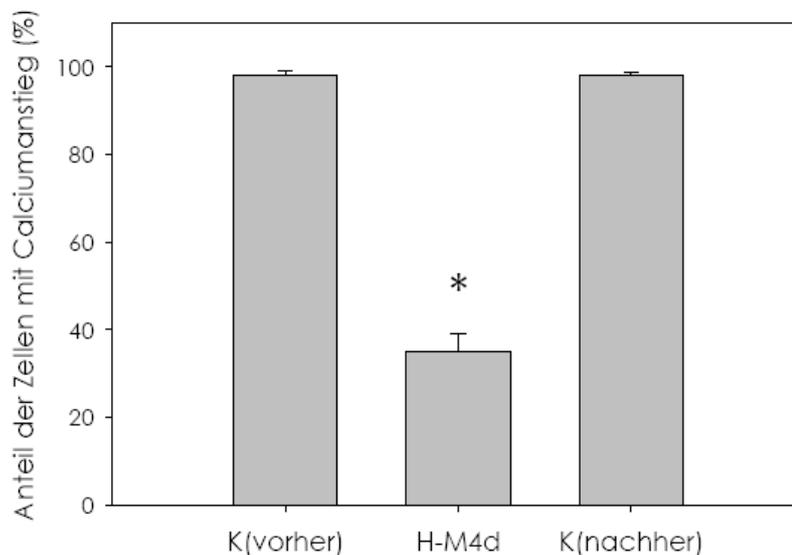


Abb. 5-7: Einfluss der Gap Junction Blockade (H-M4d) auf die Anzahl der Zellen, die mit einem Calciumanstieg nach Zugabe von Histamin reagieren.

Anzahl der Zellen im Sichtfeld (anteilig in %) mit Calciumantwort vor, während und nach H-M4d. Auswertung aller Einzelzellen in jeweils gleichen Sichtfeldern. n = 7(8). * = signifikant verschieden von K vorher und K nachher (p < 0,05).

Die Auswertung der Einzelzellen nach Histaminzugabe (Abb. 5-7) ergab, dass in der Kontrolle vorher 98,0 +/- 1,0 % der HUVEC mit einem Calciumanstieg reagierten. Nach Inkubation mit H-M4d zeigte sich eine signifikante Reduktion des Calciumanstiegs auf 35,0 +/- 3,9 % der Zellen, während nach dem Auswaschen des Blockers wieder 98,2 +/- 0,6 % der Zellen einen Calciumanstieg auf Histamin zeigten (Abb. 5-7).

In weiteren Experimenten wurde der Effekt der Gap Junction Blockade mit H-M4d auf die mit Histamin bzw. Ionomycin induzierten Calciumanstiege untersucht. Der Calciumanstieg durch Ionomycin wurde durch H-M4d nicht beeinflusst, dagegen nahm

die Anzahl der Zellen, die einen Calciumanstieg nach Histamin zeigten, nach Gap Junction Blockade signifikant ab (Abb. 5-8). Während bei Ionomycin zwischen Kontrolle (100,0 +/- 0,0 %) und H-M4d Behandlung (98,6 +/- 0,7 %) kein signifikanter Unterschied bestand, war für die Histamin-induzierte Ausbreitung ein deutlicher Effekt von H-M4d nachweisbar. Im Kontrollansatz reagierten 98,9 +/- 0,3 % der Zellen, bei Gap Junction Blockade noch 41,1 +/- 4,3 %.

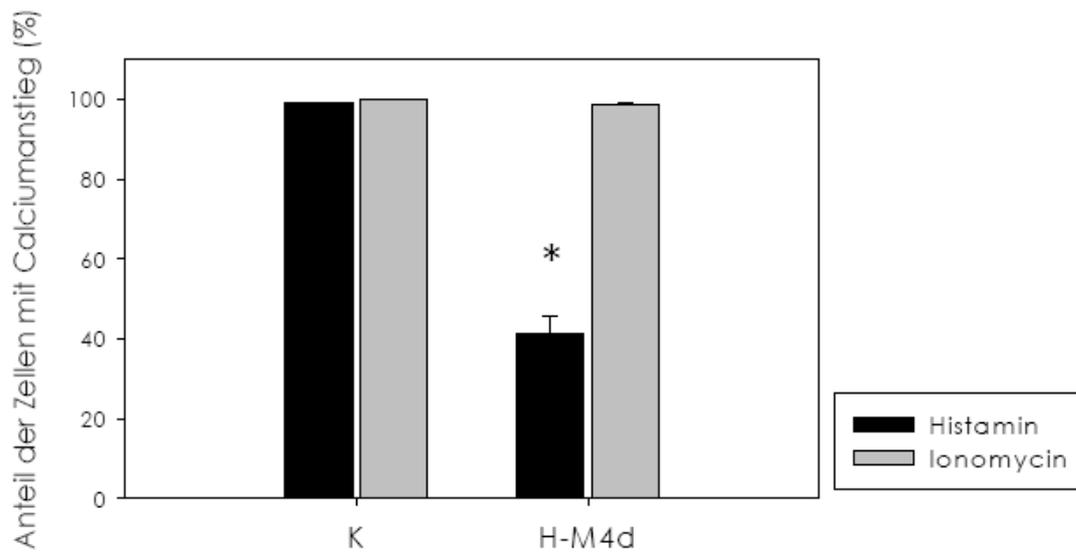


Abb. 5-8: Calciumanstieg nach Zugabe von Histamin oder Ionomycin.

Stimulation mit Histamin (n = 12(19)) oder Ionomycin (n = 10(10)) auf HUVEC. * = signifikant verschieden zu Histamin Kontrolle (p < 0,001).

5.3.2 Expression von Histaminrezeptor-1 auf HUVEC

Die Verteilung der H1-Rezeptoren (H1-R) auf HUVEC wurde durchflusszytometrisch in vier Populationen analysiert. Die Auswertung der Versuche ergab stets eine in Größe (FSC-H) und Granularität (SSC-H) einheitliche Zellpopulation, wie im Beispiel in Abb. 5-9 A+C gut zu erkennen ist. 96,5 +/- 2,6 % der Zellen waren positiv für den endothelialen Marker CD31 und damit eindeutig als Endothelzellen zu identifizieren. Wie in Abb. 5-9 E dargestellt, waren jedoch nur 34,6 +/- 2,2 % der gemessenen Zellen positiv für den H1-R, bei den übrigen Zellen war der Rezeptor nicht nachweisbar. In den Histogrammen Abb. 5-9 B+C ist die jeweilige Kontrollfärbung in hellgrau dargestellt, die eigentliche Färbung wird von der schwarzen Linie markiert.

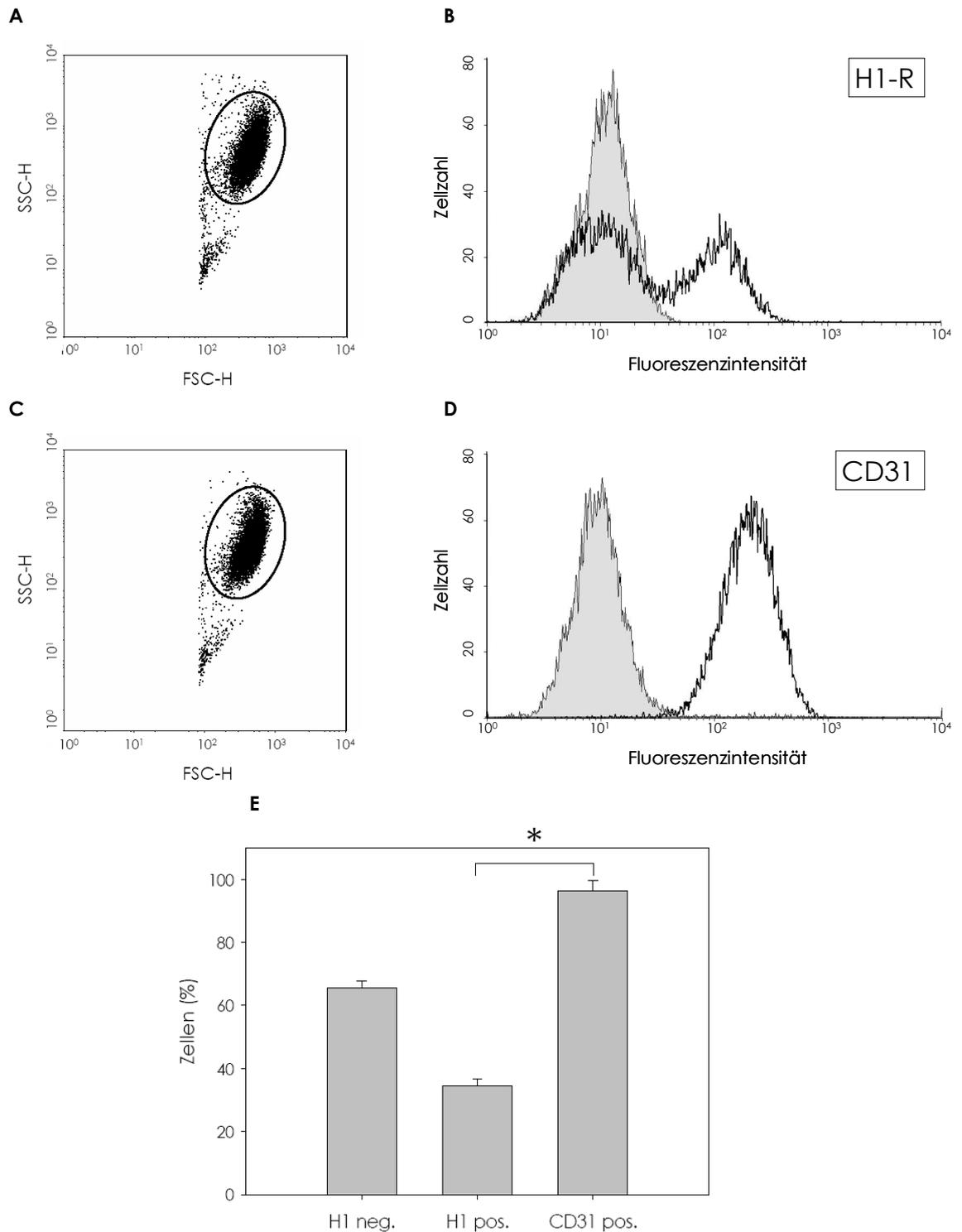


Abb. 5-9: Verteilung von H1-R und CD31 auf HUVEC.

Die Verteilung von H1-R (**B**) innerhalb der untersuchten Zellpopulation (**A**) zeigt eine Zweiteilung der Kurve (schwarze Linie) im Vergleich zur Kontrolle mit Zweitantikörper (grau hinterlegt). Für CD31 (**C+D**) zeigte sich im vorliegenden Beispiel im Histogramm eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenz zwischen der Isotypkontrolle (grau hinterlegt) und den angefärbten Zellen (schwarze Linie) (**D**). **A-D** wurden exemplarisch aus $n = 4(17)$ gewählt. Das Balkendiagramm (**E**) zeigt den prozentualen Anteil der H1-R negativen bzw. positiven HUVEC verglichen mit der CD31 positiven Kontrolle. MW +/- SF, $n = 4(17)$, * $p < 0,001$.

5.3.3 NO-abhängiger Anstieg der cGMP-Produktion unter Histamin

Der potentielle Einfluss einer Blockade der Gap Junctions auf die NO-Bildung unter Histamin wurde indirekt durch die Messung der cGMP-Konzentration der Proben untersucht. Die cGMP-Konzentration in Histamin-behandelten Zellen stieg im Vergleich zur Kontrolle signifikant an. Dieser Anstieg wurde durch die Blockade der Gap Junctions mit 2 mM Heptanol (H2) unterdrückt. Nach Hemmung der eNOS durch LNA (N-Nitro-L-arginin) wurde ebenfalls kein Anstieg gemessen. Nach Zugabe des NO-Donors SNAP wurde dagegen kein Einfluss von Heptanol (H2) auf den Anstieg der cGMP-Konzentration gefunden. In einer weiteren Kontrolle, in der bei der Inkubation mit SNAP noch LNA zugesetzt wurde, war in n = 2 Versuchen kein Unterschied zu SNAP ohne LNA zu beobachten (Ergebnis nicht dargestellt). In Tab. 5-1 sind Mediane und Mittelwerte im Vergleich aufgeführt. Da die cGMP-Werte zwischen den einzelnen Kulturen relativ große Unterschiede aufwiesen, wurden in Abb. 5-10 die Daten in Form eines Box-Plots dargestellt.

| Behandlung | Median (n = 12-18) | MW +/- SF (n = 4-6) |
|------------|-----------------------|------------------------|
| K | 0,04 | 0,04 +/- 0,01 |
| Hist | 0,17 | 0,22 +/- 0,06 |
| Hist+LNA | 0,04 | 0,04 +/- 0,01 |
| Hist+H2 | 0,04 | 0,04 +/- 0,01 |
| SNAP | 0,26 | 0,36 +/- 0,12 |
| SNAP+H2 | 0,46 | 0,49 +/- 0,14 |

Tab. 5-1: Vergleich der Mediane und Mittelwerte +/- Standardfehler der cGMP Daten, Angaben in pmol/ml

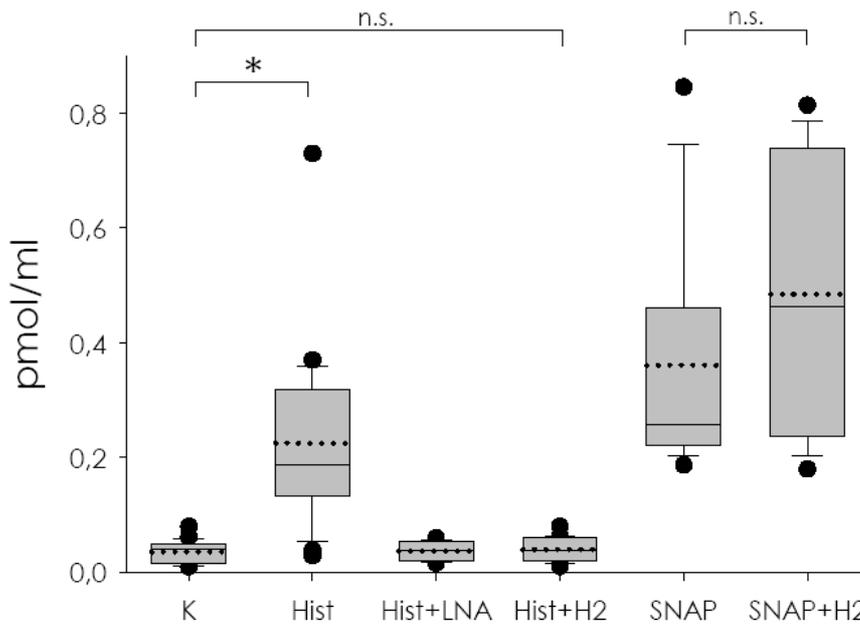


Abb. 5-10: Einfluss einer Gap Junction Blockade durch Heptanol (H2) auf die NO-induzierte cGMP-Produktion von HUVEC.

Dargestellt sind Median, Quartile, 10- und 90-Perzentilwerte sowie Einzelwerte außerhalb. Der Mittelwert ist zusätzlich als punktierte Linie eingefügt. n = 6(18) für K und Hist, n = 6(17) für Hist+H2, n = 4(12) für Hist+LNA, SNAP und SNAP+H2. * = signifikant verschieden mit $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant unterschiedlich (Dunns Test).

5.4 Calciumanstieg durch Stimulation mit ATP

Um zu prüfen, ob die ungleichmäßige Rezeptorverteilung und Calciumerhöhung nur bei Stimulation mit Histamin besteht, wurden Experimente mit einem weiteren vasoaktiven Agonisten, ATP, durchgeführt. In Abb. 5-11 B ist zu sehen, dass bei der Stimulation von HUVEC mit ATP ebenfalls initial nur einige Zellen mit einem Calciumanstieg reagieren. Im weiteren Verlauf zeigten dann alle Zellen einen Calciumanstieg. In Abb. 5-11 C ist der zeitlich verzögerte Calciumanstieg nach Zugabe von ATP für zehn Zellen aus einem Experiment exemplarisch dargestellt. In Abb. 5-11 D sind Mittelwerte aller Einzelzellen über alle Experimente dargestellt. Sie zeigen, dass der Calciumanstieg nach ATP-Zugabe rasch erfolgt und nach etwa 5 s ein Maximum erreicht, danach folgt ein allmählicher Abfall der Calciumkonzentration, die jedoch über den ganzen Beobachtungszeitraum im Vergleich zu den Ausgangswerten deutlich erhöht bleibt.

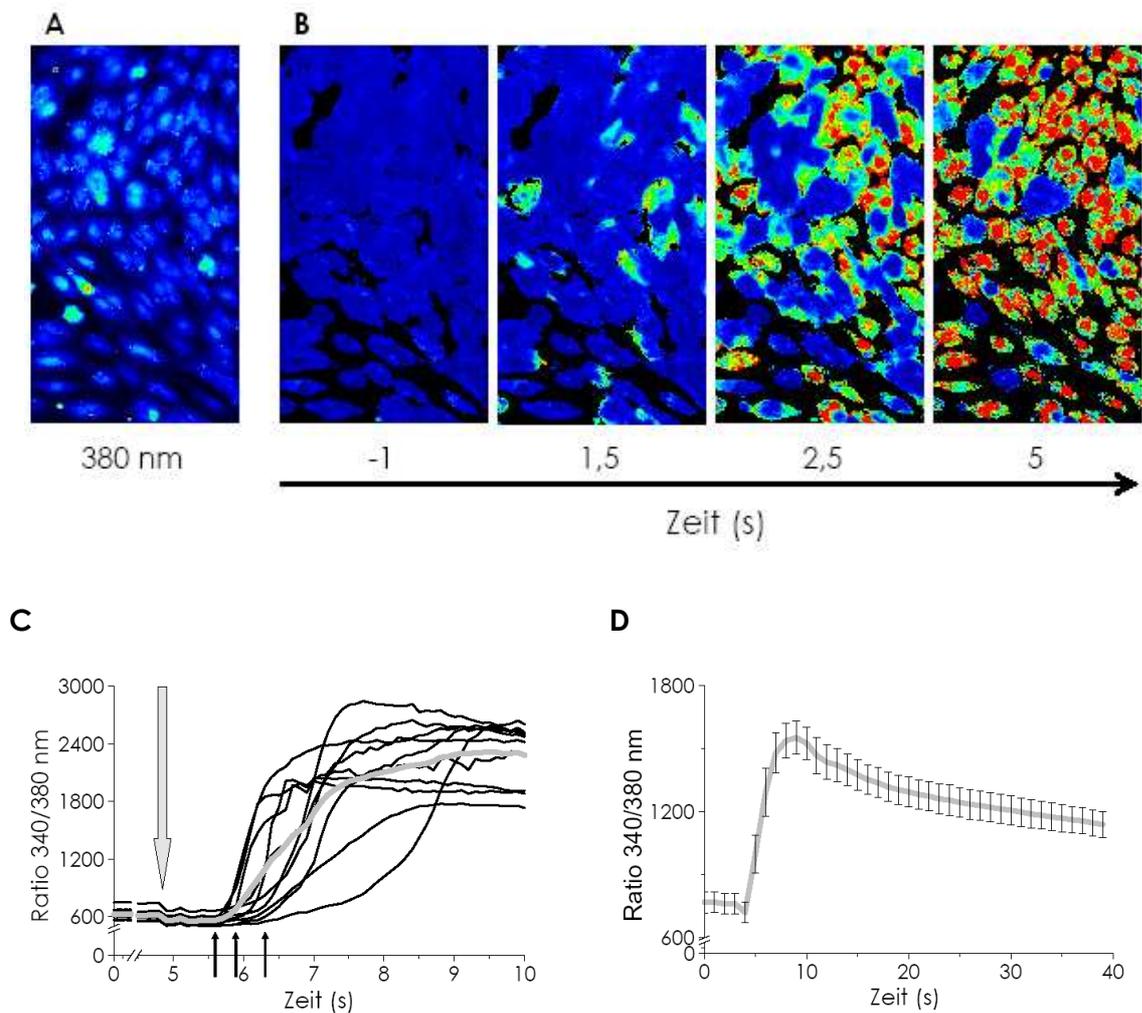


Abb. 5-11: Calciumanstieg und (inhomogene) Calciumausbreitung in HUVEC nach Zugabe von ATP.

A) zeigt den konfluenten Zellrasen vor dem Filmstart (380 nm). Die folgenden vier Ausschnitte (**B**) zeigen eine Zeitreihe nach der Zugabe von ATP (Ratio 340/380 nm). Von den initial reagierenden Zellen breitet sich Calcium dabei auf die benachbarten Zellen aus, bis zur beinahe vollständigen Reaktion aller Zellen. Die Bilder zeigen Ausschnitte von je 180 x 480 μm , exemplarisch für $n = 16$. **C**) zeigt den zeitlichen Verlauf individueller $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Kurven von 10 Zellen nach Zugabe von ATP. Die Anstiege zeigen eine zeitliche inhomogene Reaktion auf den Stimulus. Die Kurve der Mittelwerte aller Einzelzellen ($n > 1600$) (**D**) zeigt einen raschen und steilen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Kurve die ca. 5 s nach Zugabe von ATP ihr Maximum erreicht.

5.4.1 Einfluss der Gap Junction Blockade auf den ATP-induzierten Calciumanstieg

Nach Inkubation mit dem Gap Junction Blocker H-M4d zeigten, ähnlich wie bei Histamin, im Wesentlichen nur bereits initial reagierende Einzelzellen einen Calciumanstieg (Abb. 5-12 mittlere Bildreihe). In den jeweiligen Kontrollen im selben Sichtfeld, die vor bzw. nach dem Auswaschen des Gap Junction Blockers durchgeführt wurden, zeigten dagegen alle Zellen eine Calciumantwort. Innerhalb von etwa 5 s nach der initialen Reaktion ist in beinahe allen Zellen im Sichtfeld ein Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ zu beobachten (Abb. 5-12 obere bzw. untere Bildreihe).

Die statistische Auswertung für diese Versuchsreihe ist in Abb. 5-13 zusammengefasst. Unter Kontrollbedingungen reagieren nach Stimulation mit ATP 98,9 +/- 0,5 % der Zellen, nach 10 min Inkubation mit H-M4d jedoch nur 39,8 +/- 6,8 %. Nach Auswaschen des Gap Junction Blockers und erneuter Stimulation in ATP wird der Kontrollwert wieder erreicht (98,9 +/- 0,7 %).

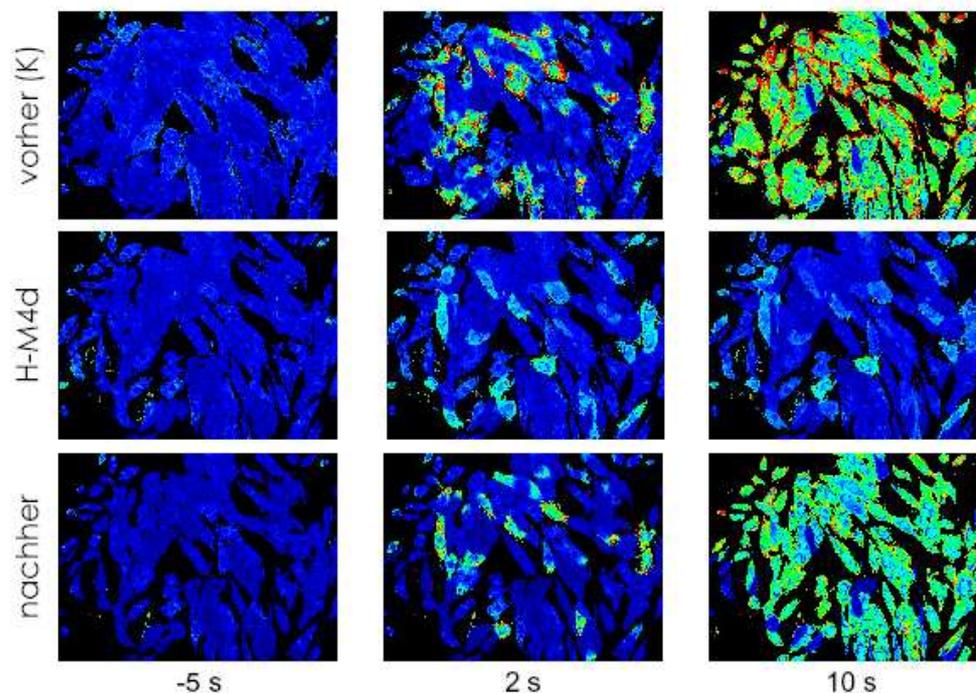


Abb. 5-12: Calciumausbreitung nach ATP ohne und mit GJ-Blocker.

ATP-Antwort im selben Sichtfeld vor („vorher(K)“) und während der Inkubation („H-M4d“) und nach dem Auswaschen („nachher“) des Gap Junction Blocker H-M4d. Die Bilder zeigen dasselbe Sichtfeld jeweils etwa 5 s vor ATP-Zugabe, 2 s nach der Zugabe von 5 μ M ATP (2 s) und weitere 8 s später (10 s). Diese Beispielbilder repräsentieren n = 10(13) Versuche. Die Bilder zeigen Ausschnitte von 480 x 640 μ m.

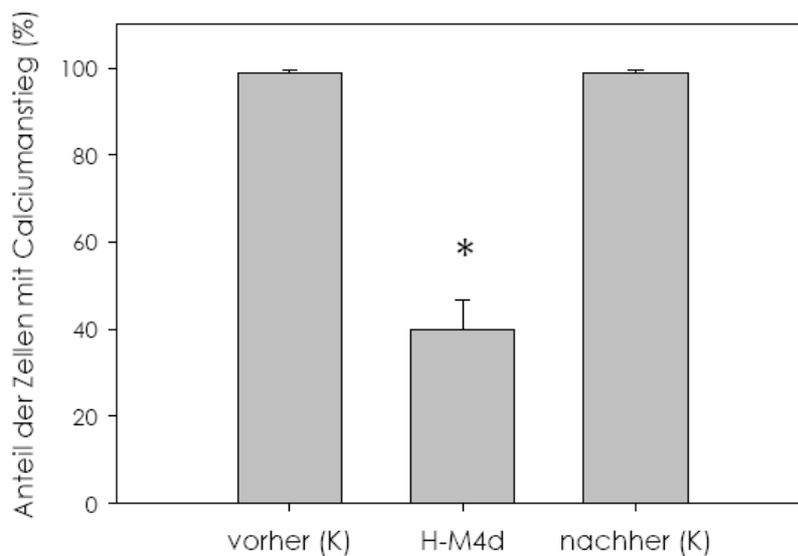


Abb. 5-13: Einfluss der Gap Junction Blockade (H-M4d) auf die Anzahl der Zellen, die nach Zugabe von ATP mit einem Calciumanstieg reagierten.

Prozentualer Anteil der Zellen mit Calciumantwort vor, nach und mit H-M4d (Auswertung aller Einzelzellen im selben Sichtfeld). Dargestellt sind MW +/- SF, n = 10(13). * = signifikant verschieden von K vorher und K nachher ($p < 0,05$).

5.4.2 Effekt des P_{2Y} -Rezeptorhemmers Suramin auf den ATP-induzierten Calciumanstieg

Nach Inkubation mit 150 μ M Suramin war der Calciumanstieg als Reaktion auf die Zugabe von ATP praktisch vollständig blockiert (> 99 %), lediglich 0,9 +/- 0,5 % der Zellen zeigten einen Anstieg der Calciumkonzentration. Die abschließende Kontrolle nach dem Auswaschen von Suramin ergab in 98,6 +/- 0,8 % der Zellen einen Calciumanstieg.

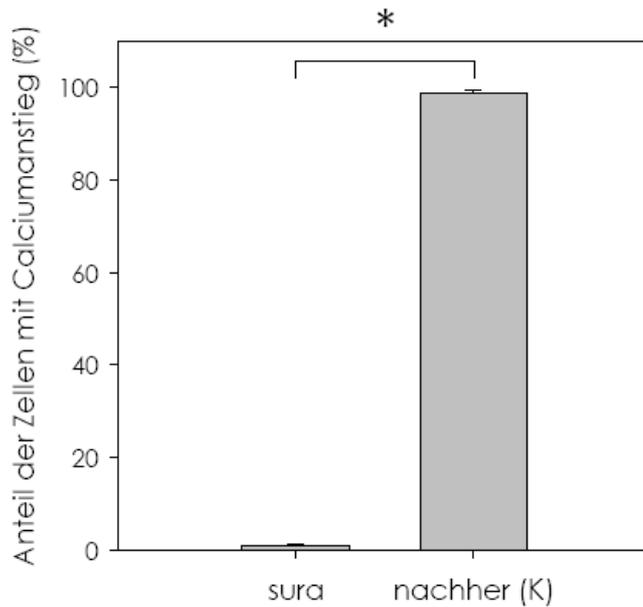


Abb. 5-14: Suramin blockiert Calciumantwort auf ATP.

Anteil der Zellen, die eine Calciumantwort nach ATP-Zugabe zeigten. Auswertung aller Einzelzellen im Sichtfeld pro Behandlung. MW +/- SF, n = 3(7), * p < 0,001.

5.4.3 Verteilung der P_{2Y2}-Rezeptoren auf HUVEC

Die Immunfluoreszenzfärbung mit CD31-Antikörper als Endothelmarker und P_{2Y2}-Antikörper zeigte eine homogene Verteilung von CD31 auf allen untersuchten Zellen (Abb. 5-15 A). Die Verteilung der P_{2Y2}-Rezeptoren in HUVEC war dagegen unregelmäßig (Abb. 5-15 B). Deutlich zu erkennen ist dies bei der Überlagerung der beiden Bilder (Abb. 5-15 C). Während in einigen Zellen eine Bindung der P_{2Y2}-Antikörper nachweisbar war, zeigten andere Zellen keine entsprechende Färbung. Die Verteilung der P_{2Y2} positiven Zellen variierte in unterschiedlichen Bildausschnitten der Präparate, jedoch war in allen Bildern eine inhomogene Verteilung des P_{2Y2}-Rezeptors erkennbar. Allerdings lässt sich mit dieser Methode keine sichere quantitative Aussage treffen. Eine Untersuchung der Verteilung des P_{2Y2}-Rezeptors mittels Durchflusszytometrie war nicht möglich, da kein geeigneter Antikörper erhältlich war.

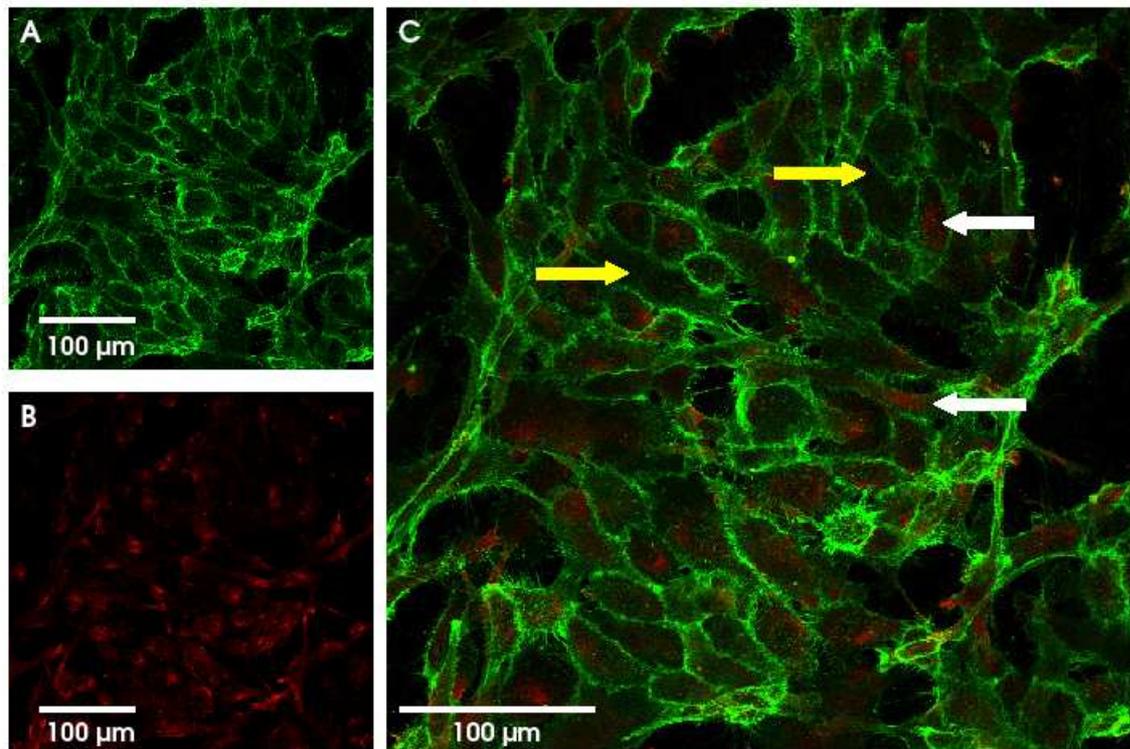


Abb. 5-15: Verteilung von P_{2Y2}-Rezeptor und CD31.

A und **B** zeigen die einzelnen Kanäle, **C** die Überlagerung einer Färbung auf CD31 und den P_{2Y2}-Rezeptor. **A)** CD31 in grün und **B)** P_{2Y2}-Rezeptor in rot. In **C)** sind die Beispielzellen, die keine Färbung für P_{2Y2} zeigen, mit gelben Pfeilen markiert. Die weißen Pfeile zeigen auf Beispielzellen mit deutlicher P_{2Y2}-Färbung. Die Abbildung ist exemplarisch für n = 4.

5.5 Calciumanstieg durch Stimulation mit ATP im Endothel isolierter Blutgefäße

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus der Zellkultur auf ein intaktes Endothel in Blutgefäßen zu prüfen, wurden zwei frisch entnommene murine Aorten mit Fura-2 beladen und die Calciumantwort der Endothelzellen auf Stimulation mit ATP untersucht. Die Reaktion der einzelnen Zellen auf ATP erfolgte auch in situ nicht gleichzeitig, sondern zeitlich dispergiert, wie bereits in den kultivierten HUVEC beobachtet werden konnte.

In beiden Experimenten wurden die GJ-Blocker Heptanol und Meclofensäure in der gleichen Konzentration wie in Zellkulturen appliziert. In Übereinstimmung mit den Versuchen an HUVEC war unter Gap Junction Blockade die Zahl der Zellen, die mit

einem Calciumanstieg auf ATP reagierten, erheblich reduziert. In Abb. 5-16 zeigen die Diagramme B bis D die Calciumantwort von Endothelzellen einer Aorta auf ATP. Unter Kontrollbedingungen reagierten alle 12 der zuvor für die Auswertung selektierten Zellen (A), nach Inkubation mit H-M4d (B) reagierten nur noch 6 Zellen. Nach dem Auswaschen des Gap Junction Blockers war wieder in allen Zellen ein Calciumanstieg nachweisbar. In einem zweiten Experiment wurden diese Beobachtungen bestätigt. Unter Kontrollbedingungen reagierten alle 26 zur Beobachtung selektierten Zellen und mit Gap Junction Blockern noch 10 von 26 Zellen.

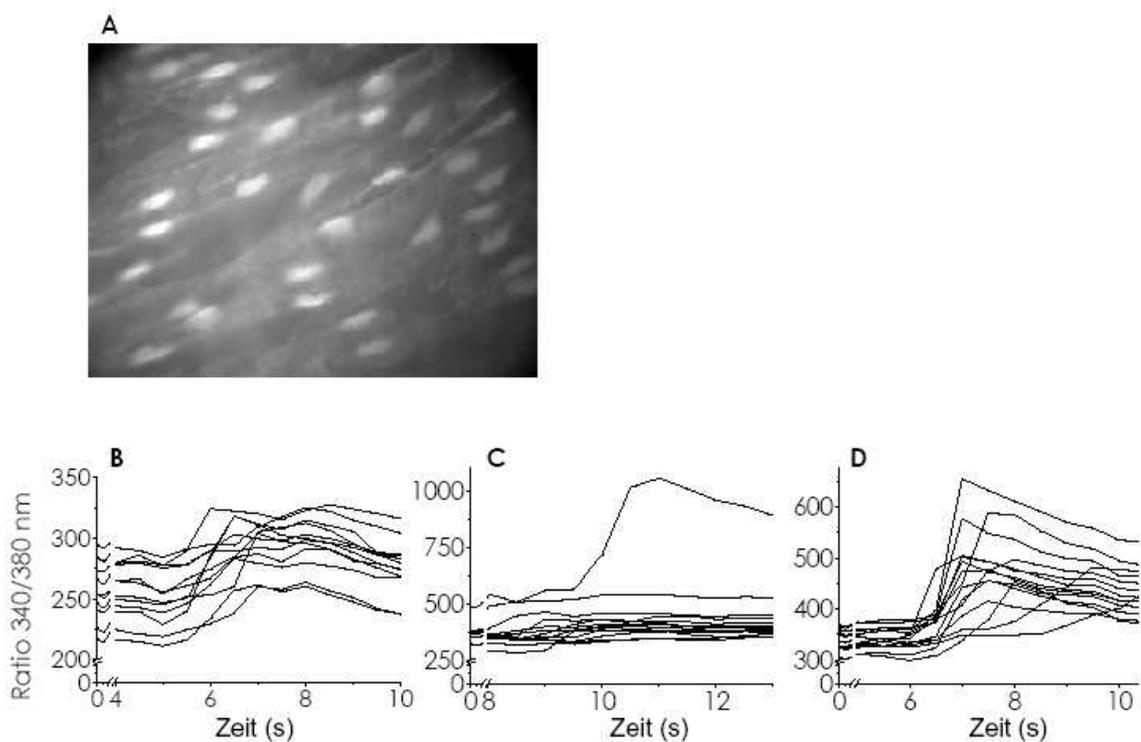


Abb. 5-16: Calciumanstieg in murinem Aortenendothel nach Zugabe von ATP.

Das Foto (A) zeigt einen Bildausschnitt des mit Fura-2 gefärbten Aortenendothels (Aufnahme bei 380 nm Anregungslicht). Die Diagramme B bis D zeigen die Calciumanstiege in Endothelzellen in situ vor (B) und während der Inkubation mit H-M4d (C), sowie nach dem Auswaschen der Gap Junction Blocker (D) am Beispiel einer Aorta.

5.6 Calciumanstieg nach mechanischer Stimulation

5.6.1 HeLa-Zellen

5.6.1.1 Transfizierte HeLa-Zellen exprimieren Cx43

Die verwendeten HeLa-Zellen, Connexin defiziente HeLaWT, und Cx43 transfizierte HeLa43, wurden mittels einer Immunfärbung auf ihre Connexinexpression untersucht (Beispiel Abb. 5-17). HeLaWT zeigten durchgehend keine Färbung für Cx43 (Abb. 5-17 1A und B), während bei den transfizierten HeLa43 an den Zellgrenzen deutliche Gap Junction Plaques sichtbar waren (Abb. 5-16 2A und B). Cx43 Plaques waren allerdings nicht bei allen Zellen an den Zellgrenzen nachweisbar.

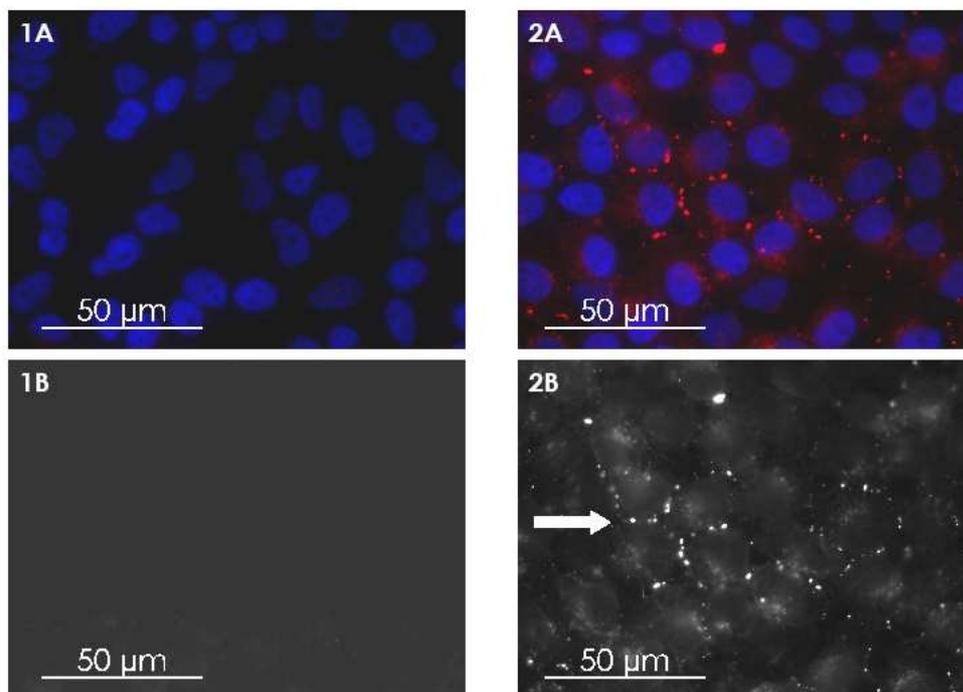


Abb. 5-17: Connexin 43-Expression in HeLa-Zellen

Anti-Cx43 (rot bzw. weiß) in HeLaWT (**1A+B**) und HeLa43 (**2A+B**). Zusätzlich wurde eine Kernfärbung mit DAPI durchgeführt (blau) die in 1A und 2A als Überlagerung gezeigt wird. **1B** und **2B** zeigen jeweils nur die Connexinfärbung. An Zellgrenzen sind die punktförmigen Strukturen (Gap Junction Plaques) sichtbar (Beispiel weißer Pfeil). In Kontrollfärbungen, in denen nur mit dem Zweitantikörper inkubiert wurde, war keine Färbung sichtbar (nicht dargestellt). Die Bilder sind exemplarisch für $n = 3$ Färbungen.

5.6.1.2 Mechanische Stimulation von HeLa-Zellen

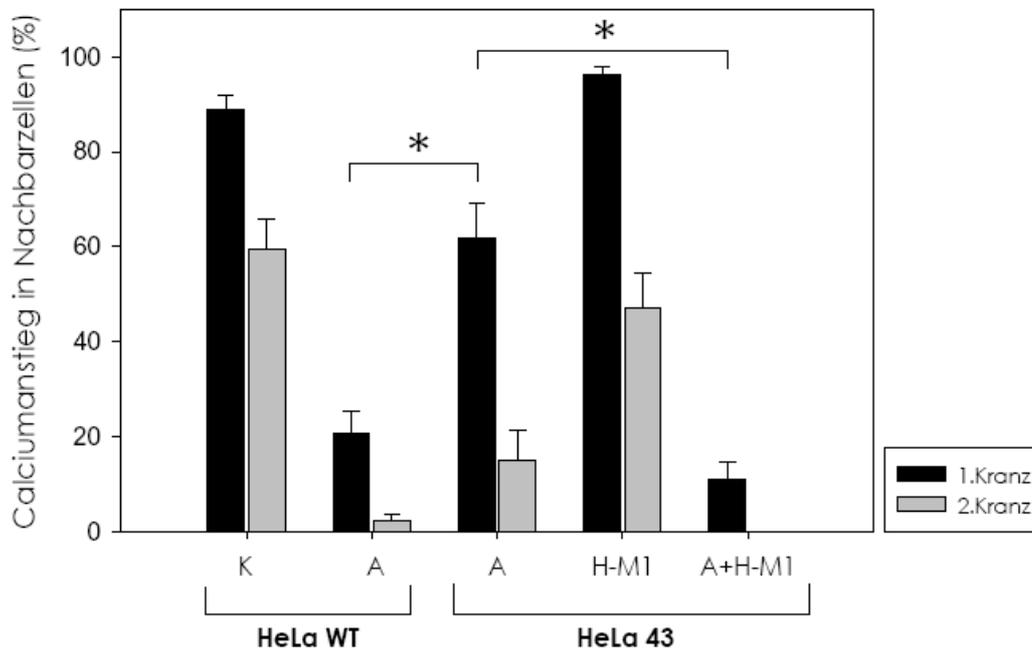


Abb. 5-18: Calciumanstieg im 1. und 2.Kranz in HeLa-Zellen nach mechanischer Stimulation.

Prozentualer Anteil der Nachbarzellen, die nach mechanischer Stimulation der initialen Zelle einen Calciumanstieg zeigten (für den 1.Kranz in schwarz und den 2.Kranz in grau dargestellt). n = 5 (20-23), MW +/- SF. * = im 1.Kranz signifikant unterschiedlich (p < 0,001). Im 2.Kranz ebenfalls signifikant verschieden, die Daten sind hier aber nicht normalverteilt (p < 0,05).

Die mechanische Stimulation mit einer Mikropipette erzeugte in allen direkt stimulierten Zellen einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Nach der mechanischen Stimulation von einzelnen Zellen war dabei in HeLaWT Zellen ein Anstieg des Calciumsignals auch in 85,7 +/- 5,1 % der Zellen im 1.Kranz und 60,9 +/- 5,3 % der Zellen im 2.Kranz zu beobachten. Wenn dem Inkubationsmedium jedoch zuvor das ATP-abbauende Enzym Apyrase zugegeben wurde, reagierten nur noch 18,4 +/- 7,9 % der Zellen im 1.Kranz und 1,2 +/- 1,2 % im 2.Kranz mit einem Anstieg des intrazellulären Ca²⁺, während der Calciumanstieg in der initial stimulierten Zelle auch unter diesen Bedingungen stets nachweisbar war. In HeLa43 führte mechanische Stimulation dagegen auch nach Inkubation mit Apyrase noch zu einem Calciumanstieg in 62,9 +/- 10,4 % der Zellen im 1.Kranz und 15,0 +/- 6,0 % der Zellen im 2.Kranz. Nach Inkubation mit den Gap Junction Blockern Heptanol und Meclofensäure (H-M1) stieg [Ca²⁺]_i noch in 96,0 +/- 1,4 % der Zellen im 1.Kranz und 47,1 +/- 12,4 % im 2.Kranz an. Bei zusätzlicher Zugabe von Apyrase wurde eine

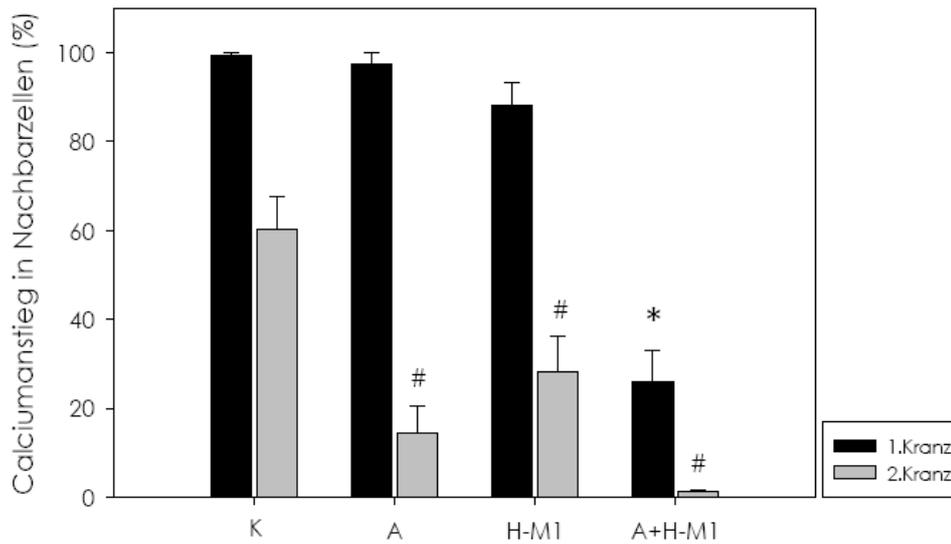
Reaktion nur noch bei 10,5 +/- 4,4 % der Zellen im 1.Kranz beobachtet, Zellen im 2.Kranz reagierten nicht mehr (Abb. 5-18). Keine signifikanten Unterschiede fanden sich dagegen zwischen den HeLaWT mit Apyrase und den HeLa43 mit Apyrase und zusätzlich Gap Junction Blockern, sowie zwischen HeLaWT in HEPES (K) und HeLa43 mit Gap Junction Blockern.

5.6.2 Mechanische Stimulation von HUVEC

Nach Inkubation mit dem GJ-Blocker H-M1 (Abb. 5-19 A) reagierten nach mechanischer Stimulation unter Kontrollbedingungen 99,3 +/- 0,7 % der Zellen im 1.Kranz und 60,4 +/- 7,2 % der Zellen im 2.Kranz. Bei Zugabe von Apyrase (alleinige ATP-Hemmung) zeigten noch 97,4 +/- 2,6 % der Zellen im 1. und 14,6 +/- 6,0 % der Zellen im 2.Kranz einen Calciumanstieg, während bei alleiniger Entkopplung von GJs durch H-M1 noch bei 88,2 +/- 5,0 % der Zellen im 1. und 28,3 +/- 7,8 % der Zellen im 2. Kranz die Calciumkonzentration anstieg. Wenn sowohl Apyrase als auch Gap Junction Blocker eingesetzt wurden, konnte noch bei 28,3 +/- 7,0 % der Zellen im 1.Kranz und bei 1,2 +/- 0,5 % im 2.Kranz ein Calciumanstieg beobachtet werden.

Bei Inkubation mit einer höheren Meclofensäurekonzentration in der Gap Junction Blockerlösung (H-M4d, Abb. 5-19 B) änderten sich die Werte im Vergleich zu der geringeren Konzentration nicht signifikant. In den Kontrollzellen reagierten 100,0 +/- 0,0 und 88,0 +/- 5,5 % (1. und 2.Kranz), nach Apyrase-Behandlung 97,9 +/- 1,1 und 26,1 +/- 7,1 % und nach H-M4d 84,9 +/- 7,6 und 35,7 +/- 7,8 %. Nach Zugabe beider Blocker reagierten noch 22,0 +/- 8,9 im 1.Kranz und 0,7 +/- 0,7 % im 2.Kranz.

A



B

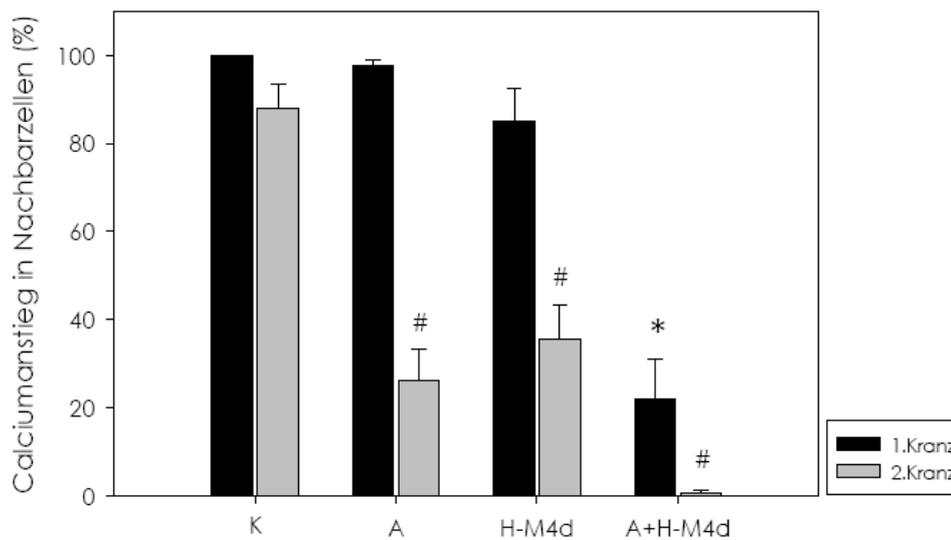


Abb. 5-19: Einfluss der Konzentration des Gap Junction Blockers auf den Calciumanstieg im 1. und 2.Kranz in HUVEC nach mechanischer Stimulation.

A) zeigt die Ergebnisse der mechanischen Stimulation von HUVEC mit H-M1 als Gap Junction Blocker (Heptanol 0,5 mM und Meclofenolol 25 µM). MW +/- SF, n = 4(18-23). * = Signifikant verschieden von K (HEPES), Apyrase und H-M1 (p < 0,001). # Signifikant verschieden von K (p < 0,001 bei A und A+H-M1 und p = 0,03 bei H-M1). In den Versuchen in Diagramm **B)** wurde H-M4d als Gap Junction Blocker eingesetzt (Heptanol 0,5 mM, in DMSO gelöst, und Meclofenolol 100 µM). Dargestellt sind MW +/- SF, n = 3(13). * Signifikant verschieden von K, Apyrase und H-M4d (p < 0,001). # Signifikant verschieden von K (jeweils < 0,001).

5.7 Ausbreitungsgeschwindigkeit des Calciumsignals

Der perinukleäre Calciumanstieg in den Nachbarzellen einer mechanisch stimulierten Zelle erfolgte in HeLa und HUVEC mit deutlicher Verzögerung. Die errechnete Geschwindigkeit betrug in HUVEC unter Kontrollbedingungen (Inkubation in HEPES) $20 \pm 3 \mu\text{m/s}$. Zwischen den Ausbreitungsgeschwindigkeiten in den unterschiedlichen Behandlungen wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (Abb. 5-20). Die Ausbreitung erfolgte in HUVEC nach Inkubation mit H-M4d mit $19 \pm 3 \mu\text{m/s}$, in Apyrase mit $17 \pm 2 \mu\text{m/s}$ und in HeLa43 (in Apyrase) mit $16 \pm 3 \mu\text{m/s}$. In HUVEC wurden nach Inkubation mit Apyrase+H-M4d in allen Experimenten, in denen noch eine Calciumsignalweiterleitung auftrat, ebenfalls die Ausbreitungsparameter gemessen. Für $n = 3(6)$ Experimente wurde dabei eine durchschnittliche Ausbreitungsgeschwindigkeit von $14 \pm 4 \mu\text{m/s}$ ermittelt.

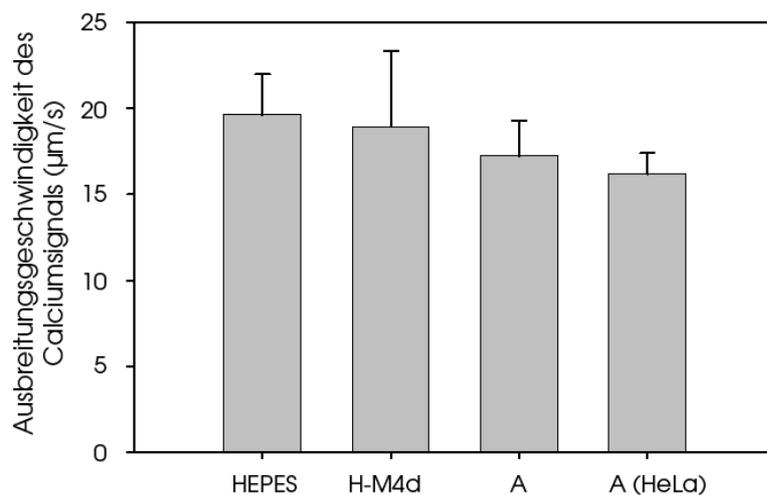


Abb. 5-20: Ausbreitungsgeschwindigkeit des Calciumsignals.

Die Geschwindigkeiten, mit der sich die Calciumwelle bei den verschiedenen Behandlungen in HUVEC und HeLa von der initial stimulierten in die Nachbarzelle (1.Kranz) ausbreitet, unterschieden sich nicht signifikant ($p = 0,81$). MW \pm SF; $n = 4(18-23)$ für HUVEC, $n = 5(20)$ für HeLa.

5.8 Xestospongine verringert die Ausbreitungsfläche der Calciumwelle in HUVEC

Während der Inkubation mit Xestospongine war die Fläche aller Zellen, auf die sich das Calciumsignal nach mechanischer Stimulation ausbreitete, konzentrationsabhängig reduziert. Unter Kontrollbedingungen betrug die Ausbreitungsfläche nach Stimulation einer Zelle $15423 \pm 1185 \mu\text{m}^2$, während sie nach Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ Xestospongine noch $11608 \pm 1357 \mu\text{m}^2$ und nach Inkubation mit $40 \mu\text{M}$ Xesto nur noch $4616 \pm 735 \mu\text{m}^2$ betrug (Abb. 5-21). Die Ausbreitungsfläche, und damit die Zahl der reagierenden Zellen, war nach $40 \mu\text{M}$ Xestospongine signifikant kleiner als die Ausbreitungsfläche in den Kontrollversuchen und nach Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ Xestospongine.

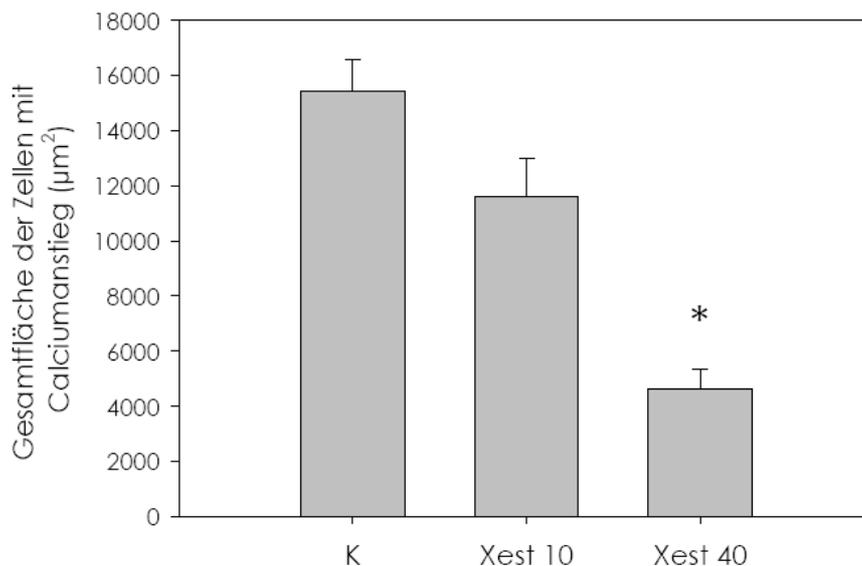


Abb. 5-21: Ausbreitungsfläche der Calciumwelle nach Inkubation mit Xestospongine.

Die Ausbreitungsfläche (in μm^2) war nach Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ Xestospongine im Vergleich zur Kontrolle reduziert, nach Inkubation mit $40 \mu\text{M}$ Xestospongine war die Hemmung der Ausbreitung signifikant. * signifikant verschieden von K ($p = 0,001$).

Eine Analyse der einzelnen Zellen zeigte die Veränderungen nach Inkubation mit $40 \mu\text{M}$ Xestospongine (Abb. 5-22 1A+B) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 5-22 2A+B). Während unter Kontrollbedingungen im 1.Kranz noch alle Zellen mit einem deutlichen Anstieg der Ratio reagierten (Abb. 5-22 1A) und auch im 2.Kranz noch die Hälfte der Zellen entsprechend antwortete (Abb. 5-22 1B), wurde unter dem Einfluss von

Xestospongine bereits im 1. Kranz eine Hemmung deutlich. Die Zellen reagierten nur mit schwachem oder deutlich verzögertem Anstieg (Abb. 5-22 2A), im 2. Kranz wurde keine Calciumantwort mehr ausgelöst (Abb. 5-22 2B).

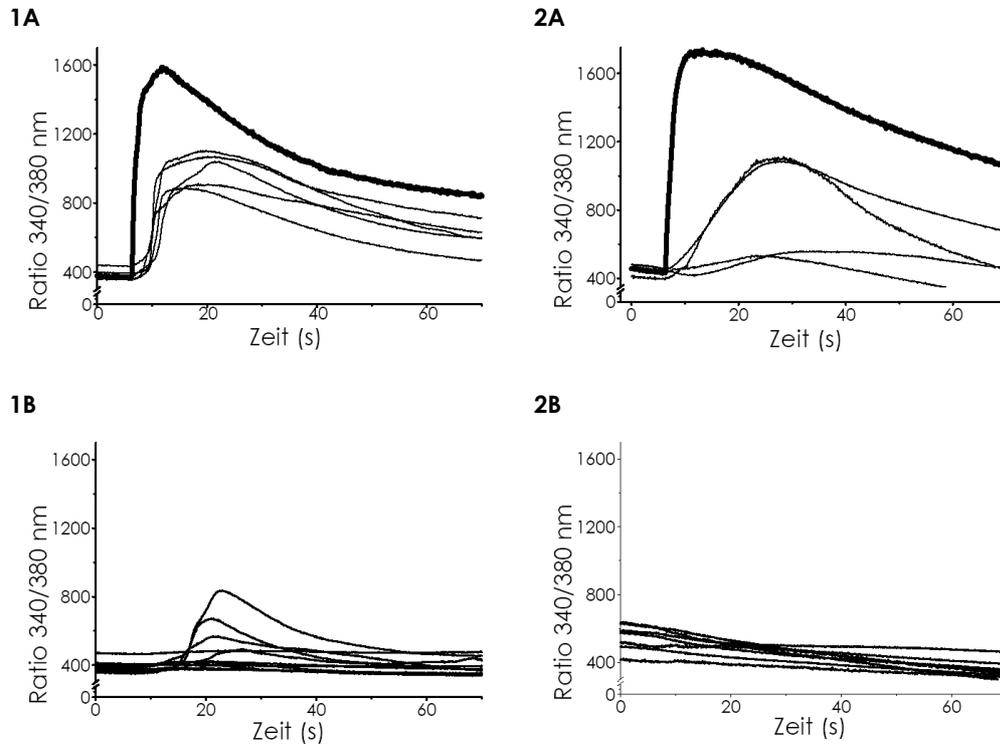


Abb. 5-22: Auswertung 1. und 2. Kranz nach Inkubation mit Xestospongine.

Beispiel für typische Zeitverläufe des Calciumanstiegs in der mechanisch stimulierten Zelle (**1A** und **2A**, dickere Linie) bzw. Zellen im 1. Kranz (**1A** und **2A** dünnere Linien) und im 2. Kranz (**1B** und **2B**). **1A** und **1B** zeigt den Calciumanstieg in den Zellen unter Kontrollbedingungen (Inkubation in HEPES++), **2A** und **B** zeigt Zellen nach Inkubation mit 40 μM Xestospongine.

6 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle der endothelialen Gap Junctions für die Calciumantwort von Endothelzellen auf die vasoaktiven Stimuli ATP und Histamin am Modell humaner Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) untersucht. Dabei zeigte sich, dass funktionelle Gap Junctions eine Voraussetzung dafür sind, dass Histamin und ATP (und möglicherweise auch andere Stimuli), überhaupt eine umfassende Calciumantwort aller Zellen in HUVEC und murinen Aortenendothelzellen auslösen können. Es konnte gezeigt werden, dass die für eine Calciumantwort verantwortlichen Rezeptoren für Histamin (Histaminrezeptor-1) und ATP (höchstwahrscheinlich P_{2Y2}-Rezeptoren) im Endothel nicht homogen verteilt sind, so dass nur ein Teil der Zellen durch diese Substanzen direkt stimuliert werden kann. Nur wenn die Zellen über Gap Junctions miteinander gekoppelt waren, konnte auch in den Zellen ohne Rezeptoren ein Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration erreicht werden. Somit ergibt sich die Schlussfolgerung, dass das Calciumsignal, ausgehend von initial direkt erregten „Schrittmacherzellen“, die über die entsprechenden Rezeptoren verfügen, in Form einer Calciumwelle an die umgebenden Zellen weitergegeben wird.

Um zu klären, ob Ca²⁺ oder ein Calcium-freisetzendes Signalmolekül von den Schrittmacherzellen über Gap Junctions an ihre Nachbarzellen abgegeben wird, wurden Experimente mit mechanischer Stimulation von Einzelzellen durchgeführt. In diesen Versuchen zeigte sich, dass Calciumanstiege in den nicht unmittelbar angrenzenden Zellen durch eine Vorbehandlung mit dem IP₃-Rezeptorblocker Xestospongin stark eingeschränkt wurden. Daraus lässt sich schließen, dass für eine Ausbreitung der Calciumwelle über längere Strecken IP₃ als Signalmolekül notwendig ist. Es wurde bereits gezeigt, dass IP₃ durch Gap Junctions in angrenzende Zellen diffundieren kann [7, 76]. Wurde die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions unterbrochen, in diesem Fall durch eine Behandlung der Zellen mit Substanzen, die eine beinahe vollständige Entkopplung der Gap Junctions bewirken, waren die Schrittmacherzellen nicht mehr in der Lage einen Calciumanstieg in Nachbarzellen zu induzieren. Nur ein Teil des Endothels reagierte daher mit einem Calciumanstieg. Das hatte die funktionelle Konsequenz, dass dadurch insgesamt weniger eNOS aktiviert werden konnte und somit weniger NO gebildet wurde. Dies wurde in dieser Arbeit indirekt über eine Bestimmung

der endothelialen cGMP-Konzentration nachgewiesen. Unter diesen Bedingungen kann das Endothel seiner Rolle als Vermittler von Vasodilatation auf humorale Stimuli nur noch unvollständig nachkommen. Die Modulation der Calciumausbreitung über Gap Junctions stellt somit eine neue Form der Funktionskontrolle in Endothelzellen dar.

Die Verwendung von Fura-2 als Calciumindikator hat den bereits im Methodenkapitel beschriebenen Vorteil, dass stets das Emissionsverhältnis (Ratio) des bereits gebundenen mit dem noch ungebundenen Fura-2 nach unterschiedlicher Anregung ermittelt wird und die Messung somit unabhängig von der tatsächlichen Beladung mit Fura-2 und von Ausbleichphänomenen während der Messung vorgenommen wird. In ruhenden Zellen betrug das aus der Ratio ermittelte $[Ca^{2+}]_i$ durchschnittlich 64 ± 9 nM, mit nur wenigen stark abweichenden Messwerten, und ist damit vergleichbar mit bereits publizierten Werten in Endothelzellen [15, 64]. Die Berechnung erfolgte nach einer näherungsweisen Bestimmung der minimalen und maximalen Ratio (mit entsprechender Beeinflussung der Calciumkonzentration F_{min} und F_{max}), da die exakte Konzentration in den Zellen ohne deren Lyse nicht messbar gewesen wäre [33]. Aus praktischen Gründen war es auch nicht möglich, vor (oder nach) jedem Versuch eine Bestimmung von R_{min} und R_{max} durchzuführen. Daher werden Calciumänderungen als Veränderungen der Ratio dargestellt. Wie bereits früher gezeigt wurde, besteht im diesem Bereich der Ratios ein direkter Zusammenhang zwischen der Ratio und der intrazellulären Calciumkonzentration, so dass Aussagen über Calciumanstiege möglich sind.

Bei Stimulation der HUVEC mit dem Gewebshormon Histamin, das über H1-Rezeptoren einen G-Protein-vermittelten Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ auslöst, konnte in dem HUVEC-Zellrasen in Abb. 5-3 der Calciumanstieg zuerst in einzelnen Zellen beobachtet werden. In allen weiteren Zellen stieg das Calciumsignal dann erst mit Verzögerung an. Dieser initiale Anstieg wird nicht durch mechanische Stimulation einzelner besonders empfindlicher Zellen durch Zugabe von Histamin beeinflusst: In Kontrollversuchen, in denen statt der Histaminlösung ausschließlich HEPES auf die HUVEC gegeben wurde, wurden keine Änderungen in $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet. Die Reaktion erfolgte auch unabhängig von der Konzentration der Histaminlösung, wie in Vorversuchen mit Histaminkonzentrationen von 5 bis 500 μ M nachgewiesen wurde, in denen stets eine ähnliche initiale Reaktion einzelner Zellen beobachtet werden konnte

(hier nicht dargestellt). Dies wird noch dadurch unterstrichen, dass bei Behandlung mit dem Calciumionophor Ionomycin alle Zellen gleichzeitig mit steigendem $[Ca^{2+}]_i$ reagierten (Abb. 5-4), obwohl die Zugabe in gleicher Weise erfolgte. Eine aufgrund unserer Versuche sehr wahrscheinliche Erklärung für den zeitversetzten Calciumanstieg ist dagegen, dass nur ein Teil der Zellen direkt durch Histamin stimuliert wurde und in die übrigen Zellen eine Weiterleitung von Calciumwellen über Gap Junctions erfolgte. Ein wichtiger Faktor ist in diesem Kontext die unterschiedliche Verteilung oder Dichte von Rezeptoren.

In der Literatur gibt es vereinzelt bereits Hinweise auf eine ungleichmäßige Verteilung der Histaminrezeptoren in verschiedenen Gefäßen der Maus und Endothelzellen der Rattenaorta [39, 45]. In Endothelzellen werden zwei von insgesamt vier bekannten Histaminrezeptoren exprimiert, Histaminrezeptor Typ-1 und Histaminrezeptor Typ-2. Der Histaminrezeptor Typ-1 vermittelt über G-Proteine, PLC und IP_3 eine Erhöhung des intrazellulären Calciumanstiegs. Nachfolgend kommt es so zu einer Erhöhung der eNOS-Aktivität, einer vermehrten NO-Freisetzung und damit verbunden, erhöhten cGMP-Spiegeln in Endothelzellen und glatter Muskulatur [34, 45, 62]. Der Histaminrezeptor-2 hat in diesem Zusammenhang kaum Bedeutung [73, 81] und wurde nicht weiter untersucht. Die Verteilung der H1-R auf den HUVEC wurde in dieser Arbeit durchflusszytometrisch untersucht, was eine quantitative Auswertung ermöglichte. Der Befund, dass nur rund ein Drittel der HUVEC positiv für den H1-R waren (Abb. 5-9) erklärt die Beobachtung, dass initial nur eine bestimmte Fraktion mit einem Calciumanstieg auf Histamin reagierte. Bei den Zellen ohne H1-R handelte es sich ebenfalls um Endothelzellen, da auf ihnen der Endothelmarker CD31 nachgewiesen wurde: 97 % der Zellen waren CD31 positiv und somit als Endothelzellen identifizierbar. Die wenigen CD31 negativen Zellen könnten eine Verunreinigung der HUVEC-Kultur mit anderen Zelltypen, beispielsweise Fibroblasten oder Perizyten darstellen. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass zumindest in Kultur nicht alle Endothelzellen den H1-R in Mengen exprimieren, die mit dem verwendeten Antikörper nachweisbar sind. Diese inhomogene Expression scheint keine Besonderheit der H1-Rezeptoren zu sein, da bereits für andere Rezeptoren endothelabhängiger Vasodilatoren in der murinen Aorta und der Aorta der Ratte eine inhomogene Verteilung gefunden wurde [42, 45, 65].

Um der Frage nachzugehen, ob eine inhomogene Verteilung und Calciumausbreitung über das „Schrittmacherzellensystem“ auch in unserem Modell für Rezeptoren anderer Agonisten im Endothel gilt, wurden zusätzliche Versuche mit ATP durchgeführt.

ATP kann den vaskulären Tonus in gegensätzlicher Weise beeinflussen: Als sympathischer Kotransmitter vermittelt ATP über P_2 -Rezeptoren an glatten Muskelzellen Vasokonstriktion. ATP wirkt jedoch auch auf endotheliale P_2 -Rezeptoren ein und hat dadurch vasodilatierende Effekte. Dies wurde unter anderem in kleinen Mesenterialarterien von Hamster, Kaninchen und Huhn nachgewiesen [13, 91]. ATP kann nicht nur aus Nervenendigungen, sondern auch aus Erythrozyten oder Endothelzellen selbst freigesetzt werden, zum Beispiel bei erhöhtem Shear Stress, Hypoxie oder Stimulation durch bestimmte Agonisten [13]. Es führt dann in diesem Fall über Stimulation an P_2 -Rezeptoren an intaktem Endothel zu verstärkter NO-Freisetzung und damit zur Vasodilatation der glatten Muskelzellen [4, 13]. In größeren und mittleren Gefäßen wird das von perivaskulären Nerven freigesetzte ATP abgebaut, bevor es bis zu den Endothelzellen vordringt, aber in der Mikrozirkulation ist es wahrscheinlich, dass freigesetztes ATP auch das Endothel erreicht.

Die P_2 -Rezeptorfamilie lässt sich in zwei Untergruppen unterteilen: P_{2X} -Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, über die Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum in die Zelle einströmt, P_{2Y} -Rezeptoren koppeln an G-Proteine und vermitteln ihre Wirkung über die Aktivierung der Phospholipase C. Über die resultierende IP_3 -Erhöhung wird Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern freigesetzt [1, 4, 17, 26, 41, 62, 69, 99]. Die ATP-Effekte auf P_2 -Rezeptoren werden durch eine extrazelluläre Hydrolyse beeinflusst: EktoATPasen bauen ATP zu ADP ab, Ektoapyrasen bauen ATP zu ADP und AMP ab und Ekto-5P-Nukleosidasen bauen AMP weiter zu Adenosin ab [4]. ATP wurde in dieser Arbeit in einer Konzentration von 5 μ M (Versuche an intakter Aorta 10 μ M) eingesetzt. Diese Konzentration induzierte in den hier durchgeführten Kontrollversuchen bei 99 % der Zellen einen Calciumanstieg und war daher ausreichend, um diesen Anstieg zu untersuchen. In anderen Veröffentlichungen wurden zum Teil höhere ATP-Konzentrationen, um 100 μ M, eingesetzt [4, 17, 36, 38, 64], da nach Endothelverletzungen die extrazelluläre ATP-Konzentration bis in diesen Bereich ansteigen kann [43, 106-107].

Ähnlich wie bei Histamin reagierte im Experiment nur ein Teil der HUVEC auf die Stimulation mit ATP (Abb. 5-10A). Dieses Ergebnis ist mit einer Untersuchung an

kultivierten mikrovaskulären Rattenendothelzellen vergleichbar, in der Hong et al. [42] ebenfalls eine zeitversetzte Reaktion der Zellen auf ATP, eine ungleichmäßige Rezeptorverteilung und eine verminderte Ausbreitung des Calciumsignals von „sensibleren“ Zellen auf die angrenzenden Zellen beschreiben.

Um die Verteilung der Expression der ATP-Rezeptoren innerhalb der HUVEC-Kulturen untersuchen zu können, musste erst der Frage nachgegangen werden, welcher Rezeptor die Calciumreaktion nach Zugabe von ATP vermittelt. In HUVEC wurde bisher die Expression von P_{2Y1} , P_{2Y2} , P_{2Y4} , P_{2Y6} , P_{2Y11} und P_{2X4} nachgewiesen [91, 99, 105]. P_{2X4} , P_{2Y11} , P_{2Y1} und P_{2Y2} sind die am stärksten exprimierten P_2 -Rezeptoren im Endothel, und damit die wahrscheinlichsten Vermittler der Calciumantwort [65]. In Kupfferschen Sternzellen wird der Calciumanstieg nach ATP P_{2Y} -vermittelt [26]. Aber auch in Endothelzellen ist bekannt, dass der ATP-vermittelte Calciumanstieg hauptsächlich über P_{2Y} -Rezeptoren ausgelöst wird [17], was durch Hemmung des Effekts mit P_{2Y} -Antagonisten nachgewiesen wurde [71]. In den für die vorliegende Arbeit untersuchten HUVEC dürfte ebenfalls ein P_{2Y} -Rezeptor für den ATP-induzierten Calciumanstieg verantwortlich sein, da nach Inkubation mit Suramin die Zahl der Zellen, die einen Calciumanstieg unter ATP-Stimulation zeigten, auf unter 1 % zurückging (Abb. 5-14). Von den zum Teil widersprüchlichen Angaben über die antagonistische Wirkung von Suramin auf P_{2X} - und/oder P_{2Y} -Rezeptoren bezieht sich diese Schlussfolgerung auf neuere Daten, nach denen Suramin zwar auch P_{2X} -Rezeptoren hemmen kann, jedoch nicht den auf Endothelzellen vorkommenden P_{2X4} , dafür aber die auf Endothel vorkommenden P_{2Y} -Rezeptoren P_{2Y2} , P_{2Y4} und P_{2Y11} [13, 27]. Die eingesetzte Suraminkonzentration von 150 μM liegt im Bereich der in der Literatur genannten effektiven Hemmkonzentration von Suramin [31-32, 72].

Der Calciumanstieg in HUVEC wurde also höchstwahrscheinlich durch P_{2Y} -Rezeptoren vermittelt. Publikationen verweisen in der Tat darauf, dass der vaskuläre Effekt von ATP zu einem großen Teil P_{2Y2} -vermittelt ist [43], während P_{2Y1} und P_{2Y13} vorwiegend durch ADP, P_{2Y4} hauptsächlich durch UTP, P_{2Y6} vorwiegend durch UDP und P_{2Y14} hauptsächlich durch UDP-Glukose aktiviert werden [26, 46, 58]. Die Untersuchungen konzentrierten sich in dieser Arbeit daher auf den P_{2Y2} -Rezeptor. Zwar kann bei Verwendung von ATP als Stimulus eine Beteiligung der ADP- oder auch Adenosinrezeptoren nie vollständig ausgeschlossen werden, da ein stetiger Abbau

stattfindet [91], das Fehlen einer ATP-Wirkung nach Vorbehandlung mit Apyrase (s.u.) spricht allerdings gegen eine wesentliche Beteiligung von ATP-Abbauprodukten.

Die Untersuchung der P_{2Y2}-Rezeptorverteilung im Durchflusszytometer und damit auch eine Doppelfärbung auf P_{2Y2}-R und H1-R waren im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich, da kein geeigneter Antikörper erhältlich war und sich ein P_{2Y2}-Antikörper für Immunzytochemie in Vorversuchen als ungeeignet für die Durchflusszytometrie erwies. Daher wurden ausschließlich immunzytochemische Untersuchungen durchgeführt. Ähnlich wie bei den Untersuchungen mit dem H1-R waren nahezu alle Zellen für den Endothelmarker CD31 positiv, wohingegen nur ein Teil der Zellen positiv für P_{2Y2}-R war. Einzelne Zellen wiesen so gut wie keine Färbung auf (Beispiele sind in der Abb. 5-15 mit Pfeilen markiert), in den meisten Zellen waren jedoch deutliche Abstufungen der Fluoreszenzintensität sichtbar. Eine quantitative Aussage über die Rezeptorverteilung ist ebenso wenig möglich wie eine nachträgliche Zuordnung der „Rezeptordichte“ zur Calciumantwort. Es bleibt offen, ob beispielsweise eine Mindestanzahl an Rezeptoren vorhanden sein muss, um ein Calciumsignal auszulösen. Die Verteilung von P_{2Y2}-Rezeptoren und die Bedingungen, die als Voraussetzung für eine Calciumreaktion auf ATP geschaffen werden, müssen zukünftig näher untersucht werden. Auch sollte eine mögliche Beteiligung weiterer P_{2Y}-Rezeptoren an den ATP-induzierten Calciumanstiegen noch genauer untersucht werden.

Das Calciumionophor Ionomycin, das als Kontrollsubstanz bei der Stimulation mit Histamin und ATP verwendet wurde, führte in allen Zellen gleichzeitig zu einem gleichmäßigen und homogenen Calciumanstieg. Da $[Ca^{2+}]_i$ von Ionomycin rezeptorunabhängig erhöht wird, sind keine Verzögerungseffekte infolge der Ausbreitung einer Calciumwelle zu erwarten. In der Tat war im Gegensatz zur Stimulation mit ATP und Histamin nach Ionomycin keine zeitliche Verzögerung in den Anstiegskurven verschiedener Zellen erkennbar (Abb. 5-4). Die Ratioänderung nach Ionomycin vollzieht sich allerdings allmählich, in einem langsamen Anstieg. Diese Unterschiede im Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ sind auf die verschiedenen Mechanismen zurückzuführen, die die Erhöhung der Calciumkonzentration bewirken.

Die Tatsache, dass nur ein Teil der Zellen Rezeptoren für ATP bzw. Histamin aufwies, aber alle Zellen nach kurzer Verzögerung mit einem Calciumanstieg antworteten, legt

eine Calciumausbreitung über andere Wege, zum Beispiel über Gap Junctions, nahe. Der Nachweis von Gap Junctions wurde in den verwendeten HUVEC und HeLa mit einer Immunfluoreszenzfärbung für Connexine, den Grundbausteinen der Gap Junctions, durchgeführt (Abb. 5-1 und Abb. 5-17). Ein funktioneller Kopplungsnachweis für Gap Junctions in HUVEC bzw. HeLa wurde bereits früher erbracht [51-52]. Übereinstimmend mit anderen Veröffentlichungen [5, 18, 20, 22-23, 89, 101] konnten in den hier verwendeten HUVEC die Connexine Cx37, Cx40 und Cx43 nachgewiesen werden (Abb. 5-1). Zwischen den einzelnen Experimenten variierte dabei die Expression von Cx37 und Cx40, und die Gesamtheit der Bilder zeigt Cx43 relativ am stärksten exprimiert. Es ist bekannt, dass Cx43 eine wichtige Rolle in der endothelialen Kopplung spielt, da es von den vier Connexinsubtypen, die in vaskulären Zellen exprimiert werden, das vielseitigste ist. So weisen die homomeren Kanäle, die von Cx43 gebildet werden, die geringste Selektivität auf, haben die größte Durchlässigkeit und können gleichzeitig am stärksten durch intrazelluläre Signalkaskaden reguliert werden [40].

Für eine Bestimmung der eigentlichen Rolle, die die Kopplung über Gap Junctions spielt, musste die Kommunikation über die Gap Junction Kanäle blockiert werden. Im Gegensatz zu den z.T. hochspezifischen Antagonisten für spannungs- und liganden-gesteuerte Kanäle gibt es kaum spezifische Antagonisten für Gap Junction Kanäle [79]. Für die selektive Inhibition einzelner Connexinformen wurden zwar synthetische Oligopeptide entwickelt [37, 50, 60], diese hemmen Gap Junctions jedoch nur partiell. Es ist eine Vielzahl von Substanzen bekannt (beispielsweise Fenamate und langkettige Alkohole), die die Eigenschaft besitzen, Kommunikation durch Gap Junctions zu verringern oder zu verhindern. Die Verwendung dieser Gap Junction Blocker ermöglicht die experimentelle Charakterisierung von Gap Junctions und ihrer Funktionen im Endothel, auch wenn die Substanzen häufig weitere Wirkungen haben.

Langkettige Alkohole wie Heptanol oder auch Octanol sind dafür bekannt, in relativ hohen Konzentrationen, üblicherweise im millimolaren Bereich, die Permeabilität von Gap Junctions reversibel und effektiv zu hemmen [7, 52, 66, 70, 79, 97]. Der exakte Wirkungsmechanismus dieser Blocker ist bisher nicht bekannt. Heptanol scheint nicht spezifisch auf Gap Junction Kanäle, sondern auf die Struktur der Lipidmembran zu wirken und durch Veränderungen dieser Struktur die Kanalöffnung zu beeinflussen [77,

97]. Damit lässt sich möglicherweise die Beobachtung erklären, dass der Calciumanstieg in allen Zellen, nach Inkubation in Gap Junction Blocker, abhängig von der Blockerkonzentration in den Versuchen, im Allgemeinen geringfügig gedämpft ausfällt.

Auch Meclofensäure (2-[(2,6-Dichloro-3-methylphenyl)amino]-benzoesäure) ist, neben anderen Fenamaten, ein sehr effektiver Gap Junction Blocker. Abhängig vom Zelltyp wurde über einen Hemmeffekt ab 10 μM berichtet, eine vollständige Hemmung wurde bei 100 bis 200 μM erreicht [37, 79]. Meclofensäure hat keine selektive Wirkung auf Gap Junctions mit spezifischer Connexinzusammensetzung [37, 79]. In Versuchen mit Fibroblasten hatte eine Inkubation der Zellen mit 250 μM Meclofensäure für 10 min keinen signifikanten Effekt auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oder den pH-Wert [37]. Meclofensäure wirkt wahrscheinlich als allosterischer Modifikator auf den Kanaltransport, mutmaßlich durch direktes Binden an den Gap Junction Kanal. Möglich ist aber auch, dass sie Veränderungen der Membranfluidität im Umkreis des Kanalproteins hervorruft [93]. Die Hemmung durch Meclofensäure wird nicht durch Änderungen des intrazellulären pH-Wertes, des Membranpotentials oder des Calciumgehalts beeinflusst, und es gibt keinen Zusammenhang mit PKC- oder Cyclooxygenaseaktivität [37].

Weil unspezifische Nebenwirkungen der Hemmsubstanzen vor allem in hohen Dosierungen auftreten, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Kombination beider Blocker verwendet. Die Kombination von Heptanol und Meclofensäure wurde in der Arbeitsgruppe bereits in vorhergehenden Experimenten erfolgreich eingesetzt und zeichnet sich durch eine effektive und reversible Hemmung der gap-junctionalen Kommunikation ohne erkennbare Zellschädigungen aus. Für die cGMP-Messung wurde Heptanol in höherer Konzentration (2 mM), dafür aber ohne Zugabe von Meclofensäure verwendet, da in Vorversuchen eine Inkompatibilität der Meclofensäure mit dem verwendeten Assay beobachtet wurde.

Ein Vergleich des Anstiegs der Calciumkonzentration in HUVEC, nach Inkubation mit ATP oder Histamin, vor und nach Gap Junction Blockade zeigte, dass nach Gap Junction Blockade eine Beschränkung der Calciumantwort auf die initial antwortenden Zellen zu beobachten war. Bei Ionomycin, das Ca^{2+} in jeder einzelnen Zelle erhöhte, war dagegen keine Beschränkung nachweisbar. Für eine Signalübertragung durch Gap

Junctions spricht, dass die Beschränkung auf initiale Zellen nur nach Hemmung der gap-junctionalen Kommunikation auftrat. Bei Stimulation derselben Zellen mit Histamin oder ATP unter Kontrollbedingungen, vor und nach der Gap Junction Blockade, war ein Calciumanstieg dagegen in allen Zellen sichtbar.

Um die Mechanismen der Ausbreitung der Calciumwelle von stimulierten zu unstimulierten Zellen über Gap Junctions genauer zu untersuchen, wurde ein weiteres experimentelles Modell verwendet: die mechanische Stimulation. Von mechanischer Stimulation ist bereits seit längerem bekannt, dass sie nicht nur lokal einen Calciumanstieg auslöst, sondern auch zur Ausbreitung von Calciumwellen in einer Vielzahl von Zellen führt [76]. Mechanische Stimulation erfolgte durch eine kurze Verformung der Zellmembran mit einer Glaspipette und löste einen Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ aus. Ausgelöst wird der Calciumanstieg durch eine Dehnung der Zellmembran, die eine Aktivierung von (dehnungssensitiven) Ionenkanälen, zum Beispiel TRP (transient receptor potential)-Kanälen [25] und den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} zur Folge hat. Sekundär kann über Ryanodinrezeptoren oder calciumabhängige PLC-Aktivierung und IP_3 Produktion auch Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden [72, 85, 100]. In vielen Zelltypen werden durch mechanische Stimulation Calciumwellen induziert, welche auf einer Ausbreitung des Calciumsignals durch Gap Junctions auf die benachbarten Zellen beruhen [76, 85, 107]. Eine mechanische Stimulation kann jedoch auch die Freisetzung von ATP aus der stimulierten Zelle auslösen [76], welches parakrin, das heißt unabhängig von einer gap-junctionalen Kopplung der Zellen, einen Calciumanstieg in den Nachbarzellen generieren kann. Die ATP-vermittelte Calciumwellenausbreitung lässt sich durch Zusatz von Apyrase unterbinden [76].

Eine andere Möglichkeit, eine Calciumerhöhung in benachbarten Zellen auszulösen, ist eine mechanische Deformation auch der Nachbarzellen, vor allem bei starker mechanischer Stimulation einer Zelle. Über Zelloberflächenadhäsionsrezeptoren, die durch fokale Adhäsionen an das Aktinzytoskelett geknüpft sind, kann so der mechanische Stimulus weitergeleitet werden und auch in der Nachbarzelle zu einem Calciumanstieg führen [85]. In Fibroblasten kann durch Zug oder Druck an Cadherinkontakten eine Calciumerhöhung ausgelöst werden, die zu lokaler Umstrukturierung der Aktinfasern führt, wahrscheinlich eine mechanoprotektive Antwort auf hohe Drücke [28]. Solche mechanischen Übertragungswege bieten eine

Erklärung dafür, dass in den hier gezeigten Versuchen nach mechanischer Stimulation, trotz Inkubation in Apyrase (ATP-Hemmung) und Gap Junction Blockade, einige Nachbarzellen immer noch einen Calciumanstieg zeigen.

Um die Rolle von Gap Junctions bei der Ausbreitung des Calciumsignals zu untersuchen, wurden WT und Cx43-transfizierte HeLa-Zellen nach den verschiedenen Vorbehandlungen mechanisch stimuliert und die Calciumanstiege in den unmittelbar angrenzenden Zellen des „1.Kranz“ und deren weiter entfernten Nachbarn („2.Kranz“) ausgewertet. HeLaWT-Zellen exprimieren im Allgemeinen keine Connexine, obwohl über eine schwache Expression von Cx45 [5] berichtet wurde, die die Zellen allerdings nicht zur funktionellen Kopplung befähigt. Die Kontrollversuche für die Gap Junction Blocker wurden mit Cx43 transfizierten HeLa-Zellen durchgeführt, da Cx43 das am stärksten exprimierte Connexin in den von uns untersuchten HUVEC war. In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass Cx43-Gap Junctions in HeLa-Zellen funktionell gut koppeln und wesentlich größere Moleküle als Ca^{2+} gut passieren lassen [51].

Experimente in HeLa-Zellen und in HUVEC zeigen, dass sowohl ATP als auch Gap Junctions an der Ausbreitung des Calciumsignals, ausgehend von einer mechanisch stimulierten Zelle, beteiligt sein können. Als Hemmsubstanzen wurden die Gap Junction Blocker Heptanol und Meclofensäure sowie Apyrase eingesetzt. Apyrase hydrolysiert 5'-Nukleotridiphosphate schnell zu Monophosphatasen: $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{AMP} + 2\text{P}_i$ [56, 71, 101]. Die Wirksamkeit von Apyrase wurde in Vorversuchen durch fehlende Calciumerhöhung nach ATP-Stimulation nachgewiesen.

Während Apyrase in HeLaWT-Zellen die Ausbreitung fast vollständig hemmte (ATP-Anteil), fand in HeLa43-Zellen mit Apyrase noch eine Ausbreitung in über 60 % der angrenzenden Zellen statt, die durch Gap Junctions vermittelt wurde. Erst die Hemmung von beiden Signalwegen reduzierte den Calciumanstieg auf einen wahrscheinlich mechanisch bedingten Rest. In HUVECs konnten beide Signalwege sich gegenseitig kompensieren, da in den unmittelbar benachbarten Zellen die Hemmung jeweils nur eines Signalwegs keinen signifikanten Effekt auf die Calciumausbreitung hatte. Nur in den weiter entfernten Zellen nahmen die Calciumanstiege schon bei der Hemmung eines einzelnen Signalwegs ab. Daher wurden alle Experimente an Endothelzellen (Ausnahme war die Stimulation mit ATP) in Gegenwart von Apyrase durchgeführt. Aus

diesen Versuchen lässt sich schlussfolgern, dass Gap Junctions die Zellen zu einer effektiven Calciumausbreitung befähigen. Das gilt sowohl für den transfizierten Modellorganismus, die HeLa-Zellen, als auch für HUVEC, die drei verschiedene Connexine exprimieren und in denen die Effizienz der gap-junctionalen Calciumausbreitung noch höher ist.

Modellberechnungen nach experimentellen Daten berechtigen zu der Annahme, dass die Calciumwellen auf der Diffusion von Calciumionen oder eines intrazellulären Signalmoleküls durch Gap Junctions beruhen [72]. Als Basis für den Calciumanstieg in Nachbarzellen, also für eine interzelluläre Weiterleitung von Calciumwellen in HUVEC über Gap Junctions, kommen daher verschiedene Moleküle in Frage. Frühere Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass IP_3 als Ca^{2+} -mobilisierendes Signalmolekül durch Gap Junctions in benachbarte Zellen diffundieren kann [7, 76]. Alternativ könnte Ca^{2+} selbst durch Gap Junctions diffundieren und zur Calciumerhöhung in den Nachbarzellen führen. Beide Szenarien setzen das Vorhandensein von Gap Junctions voraus [6-7, 41, 49, 76]. Wenn es sich bei dem Signalüberträgermolekül um IP_3 handelt, könnte der Calciumanstieg in der Nachbarzelle durch IP_3 -induzierte Calciumfreisetzung, sowie eine daraus resultierende Aktivierung der Phospholipase C und nachfolgender IP_3 -Produktion erfolgen.

Um die Frage zu klären, ob der Calciumanstieg in Nachbarzellen durch Calciummoleküle direkt oder durch den sekundären Botenstoff IP_3 erfolgte, wurden Experimente in mechanisch stimulierten HUVEC nach Inkubation mit dem IP_3 -Rezeptor Blocker Xestospongin durchgeführt. Xestospongin ist ein hochwirksamer Blocker von IP_3 -Rezeptoren [19, 75, 80], der in einer Konzentration von $40 \mu M$ die Calciumausbreitung deutlich verringerte.

In Abb. 5-21 ist dargestellt, dass die Zahl der Zellen (Ausbreitungsfläche) mit Calciumanstieg nach mechanischer Stimulation einer Einzelzelle unter Einwirkung von Xestospongin signifikant abnahm. Dies war vor allem auf das Ausbleiben einer Calciumantwort in weiter entfernt liegenden Zellen („2.Kranz“) zurück zu führen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass in HUVEC die Weiterleitung von Calciumwellen in unmittelbar angrenzende Zellen entweder auf der Diffusion von Ca^{2+} beruht, oder dass soviel IP_3 durch die Gap Junctions diffundierte, dass Xestospongin selbst in der hohen

Konzentration nicht ausreichte, um die IP_3 Effekte vollständig zu hemmen. Über längere Distanzen (2.Kranz) scheint IP_3 jedoch eine Rolle zu spielen, da Xestospongin die Ausbreitung über größere Entfernungen abschwächte. Diese Daten korrelieren auch mit Ergebnissen aus anderen Publikationen, nach denen die „Lebensdauer“ von IP_3 im Zytoplasma viel höher ist, als die von ionisiertem Ca^{2+} , da Ca^{2+} im Zytosol rasch an Proteine gebunden und abgepuffert wird [7, 41], was vor allem bei Diffusion über längere Strecken eine Rolle spielen dürfte. Eine räumliche Schätzung nach einem Modell nach Höfer et al. gibt als durchschnittliche Diffusionsreichweite für Ca^{2+} etwa 3 bis 6 μm und für IP_3 etwa 55 μm an [41].

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Calciumsignals in den durchgeführten Experimenten mit mechanischer Stimulation betrug zwischen 14 und 20 $\mu m/s$. Diese Werte sind mit Daten aus verschiedenen anderen Studien vergleichbar, in denen in verschiedenen Zelltypen interzelluläre Geschwindigkeiten von etwa 5 bis 30 $\mu m/s$ gemessen wurden [7, 28, 41, 72, 90, 102]. Diese Werte liegen auch im Rahmen von für Ca^{2+} ermittelten Diffusionsgeschwindigkeiten [11, 48, 92]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass keine signifikanten Unterschiede in der Geschwindigkeit der Calciumsignalausbreitung zwischen den verschiedenen Behandlungen bestanden (Abb. 5-20). Die unterschiedlichen Hemmsubstanzen scheinen also keinen Einfluss auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit zu haben.

Natürlich muss berücksichtigt werden, dass die Messung der Geschwindigkeit nach Gap Junction Hemmung nur in den Zellen möglich war, in denen noch eine Calciumantwort erfasst werden konnte. Mit der Messung wurden somit vielleicht gerade diejenigen Zellen erfasst, in denen aus unbekanntem Gründen die Blocker nicht vollständig effektiv waren. Überdies handelt es sich bei der vorliegenden Bestimmung um keine exakte Geschwindigkeitsmessung, da die Geschwindigkeit über die Entfernung zwischen perinukleären Regionen der mechanisch stimulierten Zelle und der reagierenden Zelle, sowie über das Zeitintervall zwischen den beiden Regionen rechnerisch bestimmt wurde, und diese Parameter auch andere Prozesse, zum Beispiel IP_3 -Freisetzung in den Nachbarzellen und Bindung an den IP_3 -Rezeptor, beinhalten könnten. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit nach Stimulation der Zellen mit Histamin oder ATP wurde nicht gemessen. Da Calciumwellen von mehreren initial reagierenden Zellen an Nachbarzellen weitergegeben werden, ist es nicht möglich festzustellen von welcher initialen Zelle die nicht primär stimulierte Zelle ihr Signal erhält.

Unsere Befunde zeigen, dass die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions den Calciumanstieg in Endothelzellen bei Stimulation mit ATP oder Histamin entscheidend modulieren kann. Dies sollte unmittelbare Auswirkungen auf die durch diese Substanzen ausgelöste NO-Bildung im Endothel haben. Aus methodischen Gründen war es uns nicht möglich, NO direkt zu messen. Wir wählten daher einen indirekten Nachweis, nämlich die NO-bedingte Steigerung des cGMP-Spiegels in den Endothelzellen. Diese Methode wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits früher erfolgreich etabliert [83]. Die Messung des cGMP-Anstiegs in den mit dem NOS-Hemmer LNA vorbehandelten Zellen belegt, dass die cGMP-Veränderung nach Stimulation mit Histamin tatsächlich durch endotheliales NO bedingt war. Nach Gap Junction Blockade war die Histamin-induzierte NO-Bildung fast vollständig gehemmt. In den Kontrollmessungen mit dem NO-Donor SNAP führte Heptanol nicht zu einer Verringerung der cGMP-Konzentration, sondern sogar zu einem leichten Anstieg, der belegt, dass die Gap Junction Blocker den cGMP-Anstieg durch NO nicht per se verringern.

Ein ähnliches Ergebnis für eine cGMP-Messung nach ATP-Behandlung, und zwar, dass nach Zugabe von ATP als Agonist zu kultivierten HUVEC ein deutlicher Anstieg des cGMP messbar war, wurde bereits publiziert [17], allerdings ohne Berücksichtigung gap-junctionaler Effekte. Da NO eine bedeutende Rolle für die endothelvermittelte Relaxation spielt, zeigen die vorliegenden Daten, dass Gap Junctions einen wichtigen Beitrag zur Funktionalität des Endothels und damit zur Kontrolle des Gefäßtonus leisten können. Eine verminderte endotheliale NO-Bildung durch eNOS infolge einer eingeschränkten Funktion endothelialer Gap Junctions könnte daher bei Erkrankungen wie Bluthochdruck, Atherosklerose und Diabetes eine früher nicht beachtete Ursache für endotheliale Dysfunktion bei diesen Erkrankungen darstellen [94].

Eine solche Betrachtung setzt allerdings voraus, dass die in Zellkulturen beobachtete Funktion von Gap Junctions, die vor allem in Kombination mit einer inhomogenen Rezeptorexpression Bedeutung hat, auch in Gefäßen in situ nachweisbar ist. Um die Übertragbarkeit dieser an kultivierten Zellen gewonnenen Erkenntnisse auf intakte Endothelien zu prüfen, wurden daher orientierend Experimente in isolierten murinen Aorten durchgeführt. In der Aorta ließen sich die Endothelzellen in ihrem natürlichen

Verband unmittelbar nach der Entnahme aus dem Organismus beobachten. Die vorläufigen Ergebnisse an intakten Endothelien in situ sind mit den an HUVEC gewonnenen Daten vergleichbar: Auch hier zeigte sich ein früher Calciumanstieg in nur wenigen Zellen mit einem verzögerten Anstieg in Nachbarzellen nach Stimulation mit ATP. Nach Gap Junction Blockade blieb der Calciumanstieg auf die initial reagierenden Zellen beschränkt. So gelang, in allerdings bisher noch wenigen Experimenten, der prinzipielle Nachweis, dass die Prozesse, die in HUVEC gefunden wurden, auch im intakten Gefäß eine Rolle spielen dürften. In den Gefäßen wurde nur ATP als Stimulus verwendet, da Histamin in physiologischen Konzentrationen kaum eine Wirkung auf das endotheliale Ca^{2+} dieser großen Gefäße hatte.

Die frisch isolierte murine Aorta ist ein gutes Modell für intaktes Endothel und eignet sich auch für weiterführende Untersuchungen, um beispielsweise an Connexin-Knockout-Stämmen die Bedeutung der Gap Junctions und auch einzelner Connexine für die Calciumsignalweiterleitung näher zu charakterisieren [5, 7-8, 12, 22, 65]. Allerdings ist die Aorta ein großes Leitungsgefäß, in dem die endothelvermittelte Vasodilatation sicher eine untergeordnete Rolle spielt. Zusätzliche Untersuchungen am Endothel von Widerstandsgefäßen sind daher unbedingt erforderlich.

Das Vorkommen sogenannter Schrittmacherzellen im Endothel wurde schon von Christ et al. als Hypothese aufgestellt und als Grundlage einer vasomotorischen Antwort in Gefäßen angenommen [14]. Es ist bekannt, dass die Effizienz der Connexinexpression die Ausdehnung der Calciumwellen bestimmt [76], und es ist nicht überraschend, dass in einer Vielzahl von weiteren Experimenten Beweise für die wichtige Rolle von Gap Junctions in vaskulären Erkrankungen gefunden wurden. Es gibt eine positive Korrelation zwischen endothelialer Cx43-Expression und veränderten Strömungsbedingungen. Die Expression von Cx43 erhöht sich als Reaktion auf oszillatorischen Shear Stress und die Expression von Cx37 und Cx40 bzw. Cx43 verändert sich bei atherosklerotischen Veränderungen der Gefäße [10, 12]. In Astrozyten resultiert eine Deletion von Cx43 in einer Umstellung der interzellulären Calciumwellenausbreitung, was auf einem P_2 -Rezeptor-abhängigen Mechanismus basiert [13].

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass Gap Junctions von fundamentaler Bedeutung für eine gleichmäßige und effektive Endothelantwort auf die vasoaktiven Stimuli Histamin und ATP sind. Die Calciumantwort bleibt auf einen

Teil der Zellen beschränkt, und zwar den Teil, der über die entsprechenden Rezeptoren verfügt, und die Freisetzung des Endothelfaktors NO findet nur in stark abgeschwächter Form statt. Ohne Gap Junctions ist eine effektive Vernetzung des Endothels, und die dadurch stattfindende Synchronisierung der Calciumantwort auf bestimmte vasoaktive Stimuli, nicht möglich. Die funktionellen Konsequenzen können pathologische Gefäßveränderungen begünstigen und vorhandene Endothelstörungen verstärken. Gap Junctions und ihre Auswirkung auf die vasoaktiven Funktionen des Endothels müssen also in die Betrachtung und Planung zukünftiger Untersuchungen zur endothelialen Dysfunktion im Rahmen von Gefäßkrankheiten mit einbezogen werden.

7 VERZEICHNISSE

7.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------------------|---|
| ∅ | Durchmesser |
| °C | Grad Celsius |
| [Ca ²⁺] _i | intrazelluläres Calcium |
| µg | Mikrogramm |
| µM | mikromolar |
| µm | Mikrometer |
| 1.K/2.K | 1./2.Kranz |
| A | Apyrase |
| AC | Adenylcyclase |
| ACh | Acetylcholin |
| AChE | Acetylcholinesterase |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AK | Antikörper |
| ANOVA | Varianzanalyse (analysis of variance) |
| APS | Antibiotikum mit Antimykotikum |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BSA | bovines Serumalbumin (Albumin-Fraktion) |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid |
| CaM | Calmodulin |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CaMK II | Calcium-Calmodulinabhängige-Kinase II |
| CD(31) | cluster of differentiation (31) |
| cGMP | zyklisches Guanosinmonophosphat |
| cm | Zentimeter |
| CMT | Charcot-Marie-Tooth Syndrom |
| Cx | Connexin |
| DAG | Diacylglycerol |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| ddH ₂ O | H ₂ O für Injektionszwecke |

| | |
|----------------------------|---|
| destH ₂ O | deionisiertes H ₂ O |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EC | Endothelzelle (endothelial cell) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EDHF | endothelium derived hyperpolarizing factor |
| EGTA | Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure |
| EIA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| eNOS | endotheliale NO-Synthase |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ET-1/2/3 | Endothelin-1/2/3 |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorting |
| FCS | Fötale Kälberserum (Fetal Calf Serum) |
| F _{max} | maximale [Ca ²⁺] _i |
| F _{min} | minimale [Ca ²⁺] _i |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FSC | Vorwärtsstreulicht (forward scatter) |
| Fura-2/AM | 1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethane-N,N,N,N'-tetraessigsäure-pentaacetoxymethyl-ester |
| g | Gramm |
| g (bezogen auf Zentrifuge) | Erdschwerebeschleunigungszahl |
| GJ | Gap Junction |
| GMP/GDP/GTP | Guanosinmono-/di-/triphosphat |
| h | Stunde |
| H2 | Heptanol 2 mM |
| H1-R (H2-R, H3-R, H4-R) | Histaminrezeptor-1 (2,3,4) |
| HeLa43 | HeLa-Zelllinie, transfiziert mit Connexin 43 |
| HeLaWT | HeLa-Zelllinie Wildtyp |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HEPES- | calciumfreier HEPES |

| | |
|---------------------------------|---|
| HEPES++ | HEPES mit LNA und SOD |
| Hist | Histamin |
| H-M1 | Heptanol 0,5 mM und Meclofensäure 25 µM |
| H-M4d | Heptanol 0,5 mM (in DMSO) und 100 µm Meclofensäure |
| HUVEC | human umbilical vein endothelial cell |
| IBMX | 3-Isobutyl-1-methylxanthin |
| IgG | Immunglobulin G |
| ini | initial stimulierte Zelle |
| Iono | Ionomycin |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-triphosphat |
| IP ₃ -R | Inositol-1,4,5-triphosphat -Rezeptor |
| K | Kontrolle |
| KCl | Kaliumchlorid |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| KOH | Kaliumhydroxid |
| LNA | N-Nitro-L-arginin |
| M | molar |
| M199 | Medium 199 |
| MFA | Meclofensäure (2-[(2,6-Dichloro-3-methylphenyl)amino] benzoessäure) |
| mg | Milligramm |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| ml | Milliliter |
| MLC | Myosin-Leichte-Kette (myosin light chain) |
| MLCP | Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (myosin light chain phosphatase) |
| min | Minute(n) |
| mm | Millimeter |
| mM | millimolar |
| mmol | Millimol |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure |
| ms | Millisekunden |
| MW | Mittelwert |

| | |
|------------------------------------|--|
| n | Anzahl der Experimente |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaH ₂ PO ₄ | Natriumdihydrogenphosphat |
| NaHCO ₃ | Natriumhydrogencarbonat |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NCBS | Kälberserum (new born calf serum) |
| neg. | negativ |
| nM | nanomolar |
| nm | Nanometer |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| O ₂ ⁻ | Superoxid |
| p | p-Wert |
| P _{2Y2} -R | P _{2Y2} -Rezeptor |
| PBS | Phosphatpuffer (phosphate buffered saline) |
| PDE | Phosphodiesterase |
| PE | Phycoerythrin |
| PECAM-1 | platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (= CD31) |
| PGI ₂ | Prostazyklin |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat |
| PKC | Proteinkinase C |
| PKG | Proteinkinase G |
| PLC | Phospholipase C |
| pmol | Picomol |
| pos. | positiv |
| R _{min} /R _{max} | Ratio 340/380 nm bei minimaler/maximaler Calciumkonzentration |
| ROI | region of interest |
| RT | Raumtemperatur |
| RyR | Ryanodinrezeptor |
| s | Sekunde(n) |
| SF | Standardfehler des Mittelwerts |
| cGC | lösliche (soluble) Guanylylzyklase C |
| SMC | Glatte Muskelzelle (smooth muscle cell) |

| | |
|---------------|--|
| SNAP | S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin |
| SOD | Superoxiddismutase |
| SR | Sarkoplasmatisches Reticulum |
| SSC | Seitwärtsstreulicht (side scatter) |
| sura | Suramin |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor- α |
| tPA | gewebsspezifischer (tissue-type) Plasminogenaktivator |
| U | Einheit (unit) |
| UDP | Uridindiphosphat |
| UTP | Uridintriphosphat |
| VAH | Viszeroatriales Heterotaxie Syndrom |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| Xest | Xestospongine |

7.2 Literaturverzeichnis

1. Abbracchio, M.P. and G. Burnstock, *Purinoreceptors: are there families of P2X and P2Y purinoreceptors?* Pharmacol Ther, 1994. **64**(3): p. 445-75.
2. Anselmi, F., V.H. Hernandez, G. Crispino, A. Seydel, S. Ortolano, S.D. Roper, N. Kessaris, W. Richardson, G. Rickheit, M.A. Filippov, H. Monyer, and F. Mammano, *ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca²⁺ signals across the inner ear.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(48): p. 18770-5.
3. Beavo, J.A. and L.L. Brunton, *Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 710-8.
4. Berchtold, S., A.L. Ogilvie, C. Bogdan, P. Muhl-Zurbes, A. Ogilvie, G. Schuler, and A. Steinkasserer, *Human monocyte derived dendritic cells express functional P2X and P2Y receptors as well as ecto-nucleotidases.* FEBS Lett, 1999. **458**(3): p. 424-8.
5. Berman, R.S., P.E. Martin, W.H. Evans, and T.M. Griffith, *Relative contributions of NO and gap junctional communication to endothelium-dependent relaxations of rabbit resistance arteries vary with vessel size.* Microvasc Res, 2002. **63**(1): p. 115-28.
6. Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman, *The versatility and universality of calcium signalling.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 11-21.
7. Blomstrand, F., S. Khatibi, H. Muyderman, E. Hansson, T. Olsson, and L. Ronnback, *5-Hydroxytryptamine and glutamate modulate velocity and extent of intercellular calcium signalling in hippocampal astroglial cells in primary cultures.* Neuroscience, 1999. **88**(4): p. 1241-53.
8. Boittin, F.X., F. Gribi, K. Serir, and J.L. Beny, *Ca²⁺-independent PLA2 controls endothelial store-operated Ca²⁺ entry and vascular tone in intact aorta.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(6): p. H2466-74.

9. Braet, K., S. Aspeslagh, W. Vandamme, K. Willecke, P.E. Martin, W.H. Evans, and L. Leybaert, *Pharmacological sensitivity of ATP release triggered by photoliberation of inositol-1,4,5-trisphosphate and zero extracellular calcium in brain endothelial cells*. J Cell Physiol, 2003. **197**(2): p. 205-13.
10. Braunersreuther, V. and F. Mach, *Leukocyte recruitment in atherosclerosis: potential targets for therapeutic approaches?* Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(18): p. 2079-88.
11. Bugrim, A., R. Fontanilla, B.B. Eutenier, J. Keizer, and R. Nuccitelli, *Sperm initiate a Ca²⁺ wave in frog eggs that is more similar to Ca²⁺ waves initiated by IP₃ than by Ca²⁺*. Biophys J, 2003. **84**(3): p. 1580-90.
12. Burnier, L., P. Fontana, A. Angelillo-Scherrer, and B.R. Kwak, *Intercellular communication in atherosclerosis*. Physiology (Bethesda), 2009. **24**: p. 36-44.
13. Burnstock, G., *Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission*. Physiol Rev, 2007. **87**(2): p. 659-797.
14. Christ, G.J., D.C. Spray, M. El-Sabban, L.K. Moore, and P.R. Brink, *Gap Junctions in Vascular Tissues* Circulation Research, 1996(79): p. 631-646.
15. Colden-Stanfield, M., W.P. Schilling, A.K. Ritchie, S.G. Eskin, L.T. Navarro, and D.L. Kunze, *Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells*. Circ Res, 1987. **61**(5): p. 632-40.
16. Cotrina, M.L., J.H. Lin, A. Alves-Rodrigues, S. Liu, J. Li, H. Azmi-Ghadimi, J. Kang, C.C. Naus, and M. Nedergaard, *Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15735-40.
17. da Silva, C.G., A. Specht, B. Wegiel, C. Ferran, and E. Kaczmarek, *Mechanism of purinergic activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells*. Circulation, 2009. **119**(6): p. 871-9.
18. De Maio, A., V.L. Vega, and J.E. Contreras, *Gap junctions, homeostasis, and injury*. J Cell Physiol, 2002. **191**(3): p. 269-82.

-
19. De Smet, P., J.B. Parys, G. Callewaert, A.F. Weidema, E. Hill, H. De Smedt, C. Erneux, V. Sorrentino, and L. Missiaen, *Xestospongins C is an equally potent inhibitor of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and the endoplasmic-reticulum Ca(2+) pumps*. *Cell Calcium*, 1999. **26**(1-2): p. 9-13.

 20. de Wit, C., *Closing the gap at hot spots*. *Circ Res*, 2007. **100**(7): p. 931-3.

 21. de Wit, C., B. Hoepfl, and S.E. Wolfle, *Endothelial mediators and communication through vascular gap junctions*. *Biol Chem*, 2006. **387**(1): p. 3-9.

 22. de Wit, C., F. Roos, S.S. Bolz, S. Kirchhoff, O. Kruger, K. Willecke, and U. Pohl, *Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice*. *Circ Res*, 2000. **86**(6): p. 649-55.

 23. Dhein, S., *Pharmacology of gap junctions in the cardiovascular system*. *Cardiovasc Res*, 2004. **62**(2): p. 287-98.

 24. Dhein, S. and H.J. Jongasma, *Forming the network-gap junctions in the cardiovascular system*. *Cardiovasc Res*, 2004. **62**(2): p. 225-7.

 25. Di, A. and A.B. Malik, *TRP channels and the control of vascular function*. *Curr Opin Pharmacol*.

 26. Dranoff, J.A., M. Ogawa, E.A. Kruglov, M.D. Gaca, J. Sevigny, S.C. Robson, and R.G. Wells, *Expression of P2Y nucleotide receptors and ectonucleotidases in quiescent and activated rat hepatic stellate cells*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004. **287**(2): p. G417-24.

 27. Erlinge, D. and G. Burnstock, *P2 receptors in cardiovascular regulation and disease*. *Purinergic Signal*, 2008. **4**(1): p. 1-20.

 28. Follonier, L., S. Schaub, J.J. Meister, and B. Hinz, *Myofibroblast communication is controlled by intercellular mechanical coupling*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 20): p. 3305-16.

29. Furchgott, R.F. and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-derived relaxing and contracting factors*. FASEB J, 1989. **3**(9): p. 2007-18.
30. Gerig, J.T., P. Singh, L.A. Levy, and R.E. London, *Calcium Complexation with a Highly Calcium Selective Chelator: Crystal Structure of Ca(CaFBAPTA) 5H₂O* Journal of Inorganic Biochemistry 1987. **31**: p. 113-121.
31. Gomes, P., S.P. Srinivas, J. Vereecke, and B. Himpens, *ATP-dependent paracrine intercellular communication in cultured bovine corneal endothelial cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(1): p. 104-113.
32. Gomes, P., S.P. Srinivas, J. Vereecke, and B. Himpens, *Gap junctional intercellular communication in bovine corneal endothelial cells*. Exp Eye Res, 2006. **83**(5): p. 1225-37.
33. Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien, *A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties*. J Biol Chem, 1985. **260**(6): p. 3440-50.
34. Hadri, L., C. Pavoine, L. Lipskaia, S. Yacoubi, and A.M. Lompre, *Transcription of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase type 3 gene, ATP2A3, is regulated by the calcineurin/NFAT pathway in endothelial cells*. Biochem J, 2006. **394**(Pt 1): p. 27-33.
35. Haefliger, J.A., P. Nicod, and P. Meda, *Contribution of connexins to the function of the vascular wall*. Cardiovasc Res, 2004. **62**(2): p. 345-56.
36. Hallam, T.J. and J.D. Pearson, *Exogenous ATP raises cytoplasmic free calcium in fura-2 loaded piglet aortic endothelial cells*. FEBS Lett, 1986. **207**(1): p. 95-9.
37. Harks, E.G., A.D. de Roos, P.H. Peters, L.H. de Haan, A. Brouwer, D.L. Ypey, E.J. van Zoelen, and A.P. Theuvsenet, *Fenamates: a novel class of reversible gap junction blockers*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **298**(3): p. 1033-41.

-
38. Haussig, S., A. Schubert, F.W. Mohr, and S. Dhein, *Sub-chronic nicotine exposure induces intercellular communication failure and differential down-regulation of connexins in cultured human endothelial cells*. *Atherosclerosis*, 2008. **196**(1): p. 210-8.
39. Heltianu, C., M. Simionescu, and N. Simionescu, *Histamine receptors of the microvascular endothelium revealed in situ with a histamine-ferritin conjugate: characteristic high-affinity binding sites in venules*. *J Cell Biol*, 1982. **93**(2): p. 357-64.
40. Hirschi, K.K., J.M. Burt, K.D. Hirschi, and C. Dai, *Gap junction communication mediates transforming growth factor-beta activation and endothelial-induced mural cell differentiation*. *Circ Res*, 2003. **93**(5): p. 429-37.
41. Hofer, T., A. Politi, and R. Heinrich, *Intercellular Ca²⁺ wave propagation through gap-junctional Ca²⁺ diffusion: a theoretical study*. *Biophys J*, 2001. **80**(1): p. 75-87.
42. Hong, D., K.A. Barbee, D.G. Buerk, and D. Jaron, *Heterogeneous cytoplasmic calcium response in microvascular endothelial cells*. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2005. **7**: p. 7493-6.
43. Hrafnkelsdottir, T., D. Erlinge, and S. Jern, *Extracellular nucleotides ATP and UTP induce a marked acute release of tissue-type plasminogen activator in vivo in man*. *Thromb Haemost*, 2001. **85**(5): p. 875-81.
44. Hu, J. and I.A. Cotgreave, *Differential regulation of gap junctions by proinflammatory mediators in vitro*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(10): p. 2312-6.
45. Huang, T.Y., T.F. Chu, H.I. Chen, and C.J. Jen, *Heterogeneity of [Ca²⁺]_i signaling in intact rat aortic endothelium*. *FASEB J*, 2000. **14**(5): p. 797-804.
46. Jacobson, K.A., A.A. Ivanov, S. de Castro, T.K. Harden, and H. Ko, *Development of selective agonists and antagonists of P2Y receptors*. *Purinergic Signal*, 2009. **5**(1): p. 75-89.

47. Jaffe, E.A., R.L. Nachman, C.G. Becker, and C.R. Minick, *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria.* J Clin Invest, 1973. **52**(11): p. 2745-56.
48. Jaffe, L.F., *Classes and mechanisms of calcium waves.* Cell Calcium, 1993. **14**(10): p. 736-45.
49. John, G.R., E. Scemes, S.O. Suadicani, J.S. Liu, P.C. Charles, S.C. Lee, D.C. Spray, and C.F. Brosnan, *IL-1beta differentially regulates calcium wave propagation between primary human fetal astrocytes via pathways involving P2 receptors and gap junction channels.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11613-8.
50. Juszczak, G.R. and A.H. Swiergiel, *Properties of gap junction blockers and their behavioural, cognitive and electrophysiological effects: Animal and human studies.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2009. **33**(2): p. 181-98.
51. Kameritsch, P., A. Hoffmann, and U. Pohl, *Opposing effects of nitric oxide on different connexins expressed in the vascular system.* Cell Commun Adhes, 2003. **10**(4-6): p. 305-9.
52. Kameritsch, P., N. Khandoga, W. Nagel, C. Hundhausen, D. Lidington, and U. Pohl, *Nitric oxide specifically reduces the permeability of Cx37-containing gap junctions to small molecules.* J Cell Physiol, 2005. **203**(1): p. 233-42.
53. Kleopa, K.A. and S.S. Scherer, *Molecular genetics of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease.* Neuromolecular Med, 2006. **8**(1-2): p. 107-22.
54. Klinker, R., H.-C. Pape, and S. Silbernagl, *Lehrbuch der Physiologie.* 5. Auflage ed. 2005: Georg Thieme Verlag.
55. Klipp, E. and W. Liebermeister, *Mathematical modeling of intracellular signaling pathways.* BMC Neurosci, 2006. **7 Suppl 1**: p. S10.
56. Komoszynski, M. and A. Wojtczak, *Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases.* Biochim Biophys Acta, 1996. **1310**(2): p. 233-41.

-
57. Krutovskikh, V. and H. Yamasaki, *Connexin gene mutations in human genetic diseases*. Mutat Res, 2000. **462**(2-3): p. 197-207.
58. Kukulski, F., F. Ben Yebdri, J. Lefebvre, M. Warny, P.A. Tessier, and J. Seigny, *Extracellular nucleotides mediate LPS-induced neutrophil migration in vitro and in vivo*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(5): p. 1269-75.
59. Kumar, N.M. and N.B. Gilula, *The gap junction communication channel*. Cell, 1996. **84**(3): p. 381-8.
60. Kwak, B.R. and H.J. Jongasma, *Selective inhibition of gap junction channel activity by synthetic peptides*. J Physiol, 1999. **516** (Pt 3): p. 679-85.
61. Leurs, R., M.J. Smit, R. Meeder, A.M. Ter Laak, and H. Timmerman, *Lysine200 located in the fifth transmembrane domain of the histamine H1 receptor interacts with histamine but not with all H1 agonists*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **214**(1): p. 110-7.
62. Leurs, R., M.J. Smit, and H. Timmerman, *Molecular pharmacological aspects of histamine receptors*. Pharmacol Ther, 1995. **66**(3): p. 413-63.
63. Li, H., C. Burkhardt, U.R. Heinrich, I. Brausch, N. Xia, and U. Forstermann, *Histamine upregulates gene expression of endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells*. Circulation, 2003. **107**(18): p. 2348-54.
64. Luckhoff, A. and R. Busse, *Increased free calcium in endothelial cells under stimulation with adenine nucleotides*. J Cell Physiol, 1986. **126**(3): p. 414-20.
65. Marie, I. and J.L. Beny, *Calcium imaging of murine thoracic aorta endothelium by confocal microscopy reveals inhomogeneous distribution of endothelial cells responding to vasodilator agents*. J Vasc Res, 2002. **39**(3): p. 260-7.
66. Matsue, H., J. Yao, K. Matsue, A. Nagasaka, H. Sugiyama, R. Aoki, M. Kitamura, and S. Shimada, *Gap junction-mediated intercellular communication between dendritic*

- cells (DCs) is required for effective activation of DCs. J Immunol, 2006. 176(1): p. 181-90.*
67. Mese, G., G. Richard, and T.W. White, *Gap junctions: basic structure and function. J Invest Dermatol, 2007. 127(11): p. 2516-24.*
68. Molkentin, J.D., *Dichotomy of Ca²⁺ in the heart: contraction versus intracellular signaling. J Clin Invest, 2006. 116(3): p. 623-6.*
69. Montiel, M., E.P. de la Blanca, and E. Jimenez, *P2Y receptors activate MAPK/ERK through a pathway involving PI3K/PDK1/PKC-zeta in human vein endothelial cells. Cell Physiol Biochem, 2006. 18(1-3): p. 123-34.*
70. Musil, L.S., B.A. Cunningham, G.M. Edelman, and D.A. Goodenough, *Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. J Cell Biol, 1990. 111(5 Pt 1): p. 2077-88.*
71. Nejime, N., N. Tanaka, R. Yoshihara, S. Kagota, N. Yoshikawa, K. Nakamura, M. Kunitomo, M. Hashimoto, and K. Shinozuka, *Effect of P2 receptor on the intracellular calcium increase by cancer cells in human umbilical vein endothelial cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2008. 377(4-6): p. 429-36.*
72. Nihei, O.K., A.C. Campos de Carvalho, D.C. Spray, W. Savino, and L.A. Alves, *A novel form of cellular communication among thymic epithelial cells: intercellular calcium wave propagation. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. 285(5): p. C1304-13.*
73. Niisato, N., Y. Ogata, S. Furuyama, and H. Sugiya, *Histamine H1 receptor-induced Ca²⁺ mobilization and prostaglandin E2 release in human gingival fibroblasts. Possible role of receptor-operated Ca²⁺ influx. Biochem Pharmacol, 1996. 52(7): p. 1015-23.*
74. Oyamada, M., Y. Oyamada, and T. Takamatsu, *Regulation of connexin expression. Biochim Biophys Acta, 2005. 1719(1-2): p. 6-23.*

-
75. Ozaki, H., M. Hori, Y.S. Kim, S.C. Kwon, D.S. Ahn, H. Nakazawa, M. Kobayashi, and H. Karaki, *Inhibitory mechanism of xestospongin-C on contraction and ion channels in the intestinal smooth muscle*. Br J Pharmacol, 2002. **137**(8): p. 1207-12.
76. Paemeleire, K., P.E. Martin, S.L. Coleman, K.E. Fogarty, W.A. Carrington, L. Leybaert, R.A. Tuft, W.H. Evans, and M.J. Sanderson, *Intercellular calcium waves in HeLa cells expressing GFP-labeled connexin 43, 32, or 26*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(5): p. 1815-27.
77. Palani, D., P. Ghildyal, and R. Manchanda, *Effects of heptanol and carbenoxolone on noradrenaline induced contractions in guinea pig vas deferens*. Auton Neurosci, 2007. **137**(1-2): p. 56-62.
78. Palmer, R.M., D.S. Ashton, and S. Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. Nature, 1988. **333**(6174): p. 664-6.
79. Pan, F., S.L. Mills, and S.C. Massey, *Screening of gap junction antagonists on dye coupling in the rabbit retina*. Vis Neurosci, 2007. **24**(4): p. 609-18.
80. Parthasarathi, K., H. Ichimura, E. Monma, J. Lindert, S. Quadri, A. Issekutz, and J. Bhattacharya, *Connexin 43 mediates spread of Ca²⁺-dependent proinflammatory responses in lung capillaries*. J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2193-200.
81. Pohl, U., *Kreislauf*, in *Lehrbuch Vorklinik Teil C*, R.F. Schmidt, Editor. 2003, Deutscher Ärzte Verlag: Köln.
82. Pohl, U., C. De Wit, and T. Gloe, *Large arterioles in the control of blood flow: role of endothelium-dependent dilation*. Acta Physiol Scand, 2000. **168**(4): p. 505-10.
83. Pohl, U., N. Heydari, and J. Galle, *Effects of LDL on intracellular free calcium and nitric oxide-dependent cGMP formation in porcine endothelial cells*. Atherosclerosis, 1995. **117**(2): p. 169-78.
84. Putney, J.W., Jr., *Pharmacology of capacitative calcium entry*. Mol Interv, 2001. **1**(2): p. 84-94.

85. Quinlan, M.R., N.G. Docherty, R.W. Watson, and J.M. Fitzpatrick, *Exploring mechanisms involved in renal tubular sensing of mechanical stretch following ureteric obstruction*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **295**(1): p. F1-F11.
86. Reaume, A.G., P.A. de Sousa, S. Kulkarni, B.L. Langille, D. Zhu, T.C. Davies, S.C. Juneja, G.M. Kidder, and J. Rossant, *Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43*. Science, 1995. **267**(5205): p. 1831-4.
87. Roe, M.W., J.J. Lemasters, and B. Herman, *Assessment of Fura-2 for measurements of cytosolic free calcium*. Cell Calcium, 1990. **11**(2-3): p. 63-73.
88. Rosado, J.A., P.C. Redondo, J.A. Pariente, and G.M. Salido, *Calcium signalling and tumorigenesis*. Cancer Therapy, 2004. **2**(B): p. 263-270.
89. Rummery, N.M. and C.E. Hill, *Vascular gap junctions and implications for hypertension*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2004. **31**(10): p. 659-67.
90. Sanderson, M.J., A.C. Charles, S. Boitano, and E.R. Dirksen, *Mechanisms and function of intercellular calcium signaling*. Mol Cell Endocrinol, 1994. **98**(2): p. 173-87.
91. Shen, J. and P.E. DiCorleto, *ADP stimulates human endothelial cell migration via P2Y1 nucleotide receptor-mediated mitogen-activated protein kinase pathways*. Circ Res, 2008. **102**(4): p. 448-56.
92. Shuai, J., H.J. Rose, and I. Parker, *The number and spatial distribution of IP3 receptors underlying calcium puffs in Xenopus oocytes*. Biophys J, 2006. **91**(11): p. 4033-44.
93. Srinivas, M. and D.C. Spray, *Closure of gap junction channels by arylaminobenzoates*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(6): p. 1389-97.
94. Stankevicius, E., E. Kevelaitis, E. Vainorius, and U. Simonsen, *[Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors]*. Medicina (Kaunas), 2003. **39**(4): p. 333-41.

-
95. Takahashi, K., F. Doge, and M. Yoshioka, *Prolonged Ca²⁺ transients in ATP-stimulated endothelial cells exposed to 50 Hz electric fields*. Cell Biol Int, 2005. **29**(3): p. 237-43.
96. Takamatsu, T., *Arrhythmogenic substrates in myocardial infarct*. Pathol Int, 2008. **58**(9): p. 533-43.
97. Takens-Kwak, B.R., H.J. Jongsma, M.B. Rook, and A.C. Van Ginneken, *Mechanism of heptanol-induced uncoupling of cardiac gap junctions: a perforated patch-clamp study*. Am J Physiol, 1992. **262**(6 Pt 1): p. C1531-8.
98. Talreja, J., M.H. Kabir, B.F. M, D.J. Stechschulte, and K.N. Dileepan, *Histamine induces Toll-like receptor 2 and 4 expression in endothelial cells and enhances sensitivity to Gram-positive and Gram-negative bacterial cell wall components*. Immunology, 2004. **113**(2): p. 224-33.
99. Tanaka, N., K. Kawasaki, N. Nejime, Y. Kubota, K. Nakamura, M. Kunitomo, K. Takahashi, M. Hashimoto, and K. Shinozuka, *P2Y receptor-mediated Ca(2+) signaling increases human vascular endothelial cell permeability*. J Pharmacol Sci, 2004. **95**(2): p. 174-80.
100. Thodeti, C.K., B. Matthews, A. Ravi, A. Mammoto, K. Ghosh, A.L. Bracha, and D.E. Ingber, *TRPV4 channels mediate cyclic strain-induced endothelial cell reorientation through integrin-to-integrin signaling*. Circ Res, 2009. **104**(9): p. 1123-30.
101. Toma, I., E. Bansal, E.J. Meer, J.J. Kang, S.L. Vargas, and J. Peti-Peterdi, *Connexin 40 and ATP-dependent intercellular calcium wave in renal glomerular endothelial cells*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. **294**(6): p. R1769-76.
102. Toma, I., J.J. Kang, A. Sipos, S. Vargas, E. Bansal, F. Hanner, E. Meer, and J. Peti-Peterdi, *Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney*. J Clin Invest, 2008. **118**(7): p. 2526-34.

103. Tribulova, N., V. Knezl, L. Okruhlicova, and J. Slezak, *Myocardial gap junctions: targets for novel approaches in the prevention of life-threatening cardiac arrhythmias*. *Physiol Res*, 2008. **57 Suppl 2**: p. S1-S13.
104. Van Rijen, H., M.J. van Kempen, L.J. Analbers, M.B. Rook, A.C. van Ginneken, D. Gros, and H.J. Jongsma, *Gap junctions in human umbilical cord endothelial cells contain multiple connexins*. *Am J Physiol*, 1997. **272**(1 Pt 1): p. C117-30.
105. Wang, L., L. Karlsson, S. Moses, A. Hultgardh-Nilsson, M. Andersson, C. Bornha, T. Gudbjartsson, S. Jern, and D. Erlinge, *P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002. **40**(6): p. 841-53.
106. Yip, L., T. Woehrle, R. Corriden, M. Hirsh, Y. Chen, Y. Inoue, V. Ferrari, P.A. Insel, and W.G. Junger, *Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors*. *FASEB J*, 2009.
107. Zhao, Z., P. Walczysko, and M. Zhao, *Intracellular Ca²⁺ stores are essential for injury induced Ca²⁺ signaling and re-endothelialization*. *J Cell Physiol*, 2008. **214**(3): p. 595-603.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ulrich Pohl für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Seine Förderung und fachliche Begleitung haben diese Dissertation überhaupt erst möglich gemacht.

Bei Dr. Petra Kameritsch möchte ich mich für die Betreuung der Arbeit, für ihre vielen Anregungen und ihre fachliche Unterstützung bedanken.

Dr. Kristin Pogoda danke ich für Ratschläge und fachliche Unterstützung bei methodischen Problemen im Labor und Dr. Jürgen Peters für schnelle Hilfe bei Hard- und Softwareproblemen.

Ich danke Silvia Münzing für ihre Hilfe bei den Calciummessungen und Dorothea Gössel und Katarzyna Stefanowski für ihre Unterstützung in der Zellkultur und für jede Menge HUVECs.

Bei Theres Hennig, Brigitte Bergner und Stefan Wallner möchte ich mich für ihren Beitrag zu dieser Arbeit bedanken. Für ihre konstruktive Kritik, die angeregten Diskussionen und hilfreichen Ratschläge.

Mein Dank gilt auch den nicht namentlich erwähnten Kollegen im Walter-Brendel-Zentrum und der „Außenstelle Innenstadt“, die mit Freundlichkeit, Hilfsbereitschaft, Institutsgillfesten und Doktorandenstammtischen immer für eine tolle Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.

Sandra Reinhard, Ramona Mettler und Jasmin Ritter danke ich für ihre Anteilnahme am Entstehungsprozess dieser Dissertation und ganz besonders danke ich auch Marcus Mahn, der mich in dieser Zeit immer unterstützt hat.