

Aus dem Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med Ulrich Pohl

Cx37-abhängige Calciumsignalausbreitung durch myoendotheliale Gap Junctions

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

vorgelegt von
Monika Pintsch
aus
Deggendorf

Jahr
2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med Ulrich Pohl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Laurenz Wurzinger
Prof. Dr. Andreas Schober

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Petra Kameritsch

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

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2015

Inhaltsübersicht

1.	Einleitung.....	6
1.1.	Bedeutung der Zell-Zellkommunikation im vaskulären System	6
1.2.	Aufbau der Gap Junctions.....	7
1.3.	Gap Junctions im vaskulären System	9
1.4.	Bedeutung von Gap Junctions für die Ausbreitung interzellulärer Signalwege.....	11
1.5.	Der Einfluss von NO auf den Signalaustausch über Gap Junctions.....	12
1.6.	Fragestellung und Ziele der Arbeit	14
2.	Methoden	15
2.1.	Zellkultur von HeLa- und HUVEC-Zellen.....	15
2.1.1.	Isolierung und Kultivierung von HUVEC.....	15
2.1.2.	Isolierung und Kultivierung von HUVSMC.....	16
2.1.3.	Kultivierung von HeLa Cx37-Zellen.....	17
2.1.4.	Einfrieren und Auftauen von HeLa Cx37-Zellen	17
2.1.5.	Inkubation der HeLa Cx37-Zellen, HUVEC bzw. HUVSMC mit dem NO-Donor SNAP, NO-Synthaseinhibitor LNA und Peroxynitritinhibitor SOD	18
2.1.6.	Kokultur HeLa Cx37-Cx43-Zellen -HUVSMC nach PKH-Färbung	18
2.1.7.	Gap Junction Blockade mit Meclofensäure	20
2.1.8.	Downregulation von Cx43 mittels small interfere RNA	20
2.2.	Charakterisierung der Connexinexpression in HeLa-Zellen/ HUVEC/ HUVSMC.....	21
2.2.1.	Immunhistochemie der HUVEC/HUVSMC	21
2.2.2.	Zelllyse HeLa Cx37-Zellen und HUVEC.....	22
2.2.3.	Western Blot.....	22
2.3.	Nachweis funktioneller Gap Junction Kopplung	25
2.3.1.	Farbstoffinjektion in HeLa Cx37-Cx43-Kokulturen und HUVEC	25
2.3.2.	Mechanische Stimulation der Zellen	26
2.3.3.	Messung der intrazellulären Calciumkonzentration in HUVEC/ HUVSMC.....	28
2.3.4.	Analyse der Calciumwellenausbreitung	29
2.4.	Statistische Analyse	31
3.	Ergebnisse	32
3.1.	Charakterisierung der Connexinexpression in HeLa Cx37- Zellen	32
3.1.1.	Nachweis der Cx37-Expression in HeLa Cx37 im Western Blot	32
3.2.	Funktionelle Gap Junction-Kopplung in HeLa Cx37 Zellen	33
3.2.1.	Farbstoffausbreitung via Gap Junctions in HeLa Cx37-Cx43-Kokultu- ren.....	33
3.2.2.	Calciumwellenausbreitung in HeLa Cx37-Cx43-Monokulturen	35
3.3.	Calciumwellenausbreitung in HUVEC	37
3.3.1.	Mechanische Stimulation und Ausbreitung des Calciumsignals in HUVEC/HUVSMC	37
3.3.2.	Effekte einer Blockade der Gap Junction-Kopplung mit Meclofensäure..	39
3.3.3.	Calciumwellenausbreitung in HUVEC nach Vorbehandlung mit dem exogenen NO-Donor SNAP	42

3.3.4.	Connexinexpression HUVEC nach Downregulation von Cx43 mittels small interference RNA	45
3.3.5.	Effekt der Cx43 Suppression durch si-RNA auf die Calciumausbreitung in HUVEC.....	46
3.3.6.	Calciumsignalausbreitung in HUVEC nach Suppression von Cx43 unter Vorbehandlung mit NO.....	48
3.4.	Myoendothiale Gap Junctions	50
3.4.1.	Calciumwellenausbreitung in HUVSMC/HUVEC-Kokulturen	50
3.4.2.	Immunhistochemische Darstellung der Cx-Expression in Kokulturen von HUVSMC/HUVEC	53
4.	Diskussion	55
	Ausbreitung von interzellulären Calciumwellen als Signal- und Koordinations- mechanismus	55
5.	Zusammenfassung	71
6.	Literaturverzeichnis	73

1. Einleitung

1.1. Bedeutung der Zell-Zellkommunikation im vaskulären System

In der Evolution von der Einzelzelle zum mehrzelligen Organismus kommt der Entwicklung einer interzellulären Kommunikation eine große Bedeutung zu. Auch wenn Einzelzellen als kleinste isoliert noch lebensfähige Bauelemente des menschlichen Körpers individuell auf einen Stimulus hin mit einer Vielzahl von Antwortmöglichkeiten reagieren können, funktioniert ein Zellverband erst dann adäquat, wenn die Reaktionen der Einzelzellen aufeinander abgestimmt erfolgen. Erst die Koordination der Zellantworten ermöglicht es einem Zellverband, sich optimal an die aktuell herrschenden äußeren Einflussfaktoren und Umgebungsbedingungen zu adaptieren [49].

Das Blutgefäßsystem bildet das erste vollständig ausgebildete Organ des sich entwickelnden Embryos [99] und formt dabei das größte in sich geschlossene Netzwerk unseres Körpers. Die wichtigsten Aufgaben des vaskulären Systems sind die adäquate Versorgung von Geweben und Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen, der Abtransport von Metaboliten, die Regulation des Blutdrucks über den peripheren Widerstand sowie die Homöostase des extrazellulären Milieus [63]. Um diese Funktionen zu gewährleisten, ist eine fein abgestimmte Wechselwirkung der einzelnen Gefäßwandzellen sowie der Gefäßwand mit Zellen im strömenden Blut erforderlich [111,132].

Essentielle Aufgabe des Kreislaufes ist die stets ausreichende Blutversorgung der Organe unter wechselnden Belastungs- und Umgebungsbedingungen. Dies erfordert eine dynamische Kontrolle des Blutstroms zu den einzelnen Organen, welche im Wesentlichen auf Änderungen des Strömungswiderstands in den Arteriolen dieser Organe beruht. Die Regulation des Strömungswiderstands erfolgt hierbei über eine Steuerung des Kontraktionszustandes der glatten Muskulatur in Widerstandsgefäßen [84]. Dieser „Vasotonus“ wird durch eine Vielzahl von Größen [110], wie Faktoren aus dem Gefäßendothel, die Aktivität des sympathischen Nervensystems, die Dehnungssensitivität der Gefäßmuskulatur sowie zahlreichen im Blut zirkulierenden

oder lokal entstehenden humoralen Faktoren beeinflusst [20]. Diese Faktoren wirken zunächst lokal an jeder Gefäßmuskelzelle einzeln. Zu einer Koordination der individuellen Antworten kommt es letztlich durch einen gezielten Signalaustausch, der im Gefäßsystem u.a. durch parakrine Effekte lokal freigesetzter Stoffe, durch integrierende Einflüsse der gemeinsamen Zellmatrix, durch Hormone, den Sympathikus sowie nicht zuletzt durch Austausch von Signalmolekülen bzw. elektrischen Signalen über Gap Junctions [35] bewerkstelligt wird.

Gap Junctions dienen der interzellulären Informationsübertragung in Geweben und Organen. Sie bestehen aus einer Ansammlung membranüberschreitender Kanäle, die jeweils einen direkten Kontakt zwischen dem Zytosol benachbarter Zellen herstellen und so eine Übertragung sowohl elektrischer, wie auch chemischer Signale zwischen benachbarten Zellen des Gefäßsystems ermöglichen [42]. Gap Junction-Kanäle ermöglichen beispielsweise eine interzelluläre Kommunikation zwischen Endothelzellen bzw. zwischen Myozyten in der Gefäßwand, aber auch, in Form von myoendothelialen Gap Junctions zwischen Endothel- und glatten Muskelzellen [26]. Wenngleich beide Zellsysteme voneinander unabhängig sind und sich bezüglich ihrer Funktion grundsätzlich voneinander unterscheiden, sind sie dennoch durch ihre Fähigkeit zu einer gegenseitigen interzellulären Kommunikation als „funktionelle Einheit“ anzusehen [35].

1.2. Aufbau der Gap Junctions

Gap Junction Kanäle bestehen aus zwei Halbkanälen (=Connexone), die sich jeweils in den Membranen zweier benachbarter Zellen gegenüber liegen. Jeder Halbkanal ist hierbei aus je sechs Untereinheiten, den sogenannten Connexinen, aufgebaut [32,102].

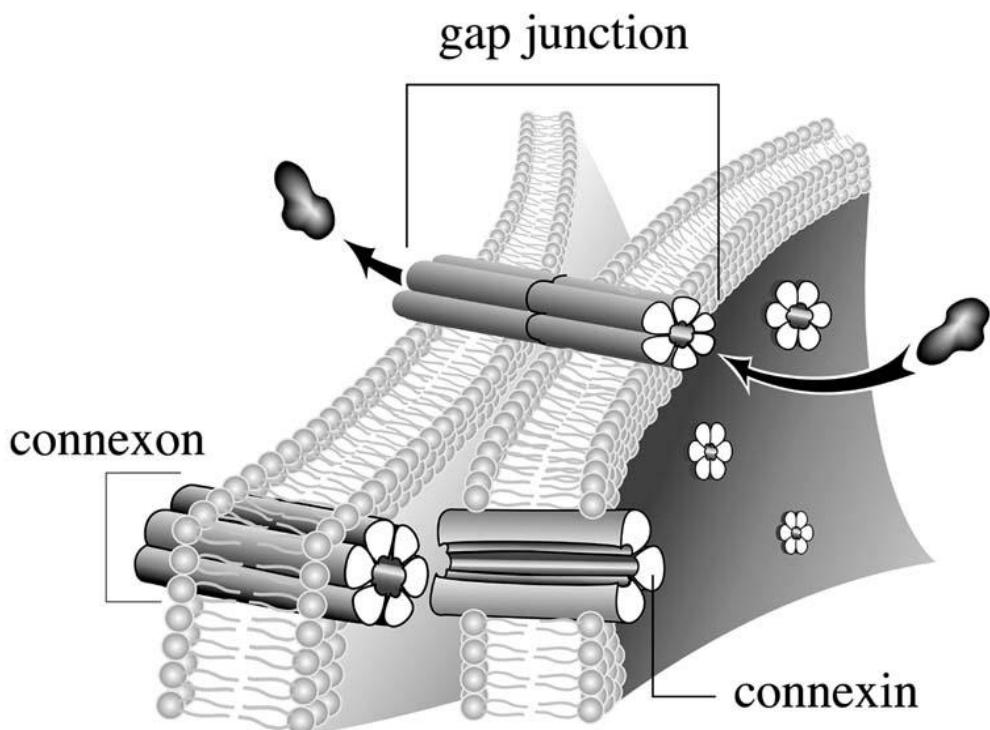


Abbildung 1-1

Strukturmodell eines Gap Junction Kanals: Nach Wilhelma Echevarria and Michael H. Nathanson, www.landesbioscience.com

Es sind derzeit 22 Connexine bekannt, die sich in ihrem Molekulargewicht voneinander unterscheiden und nach diesem benannt werden [116]. Connexine bilden in der Membran vier Transmembrandomänen aus. So entstehen zwei extrazelluläre Schleifen, die für die Kopplung mit Connexinen der Nachbarzelle von Bedeutung sind, sowie eine intrazelluläre Schleife. Sowohl C- als auch N-Termini sind an der Membraninnenseite lokalisiert. Die vier die Plasmamembran durchspannenden Transmembrandomänen sind hoch konserviert und weisen eine α-helicale Konformation auf. Die beiden extrazellulären Domänen, die aus 31 bis 34 Aminosäuren bestehen, sind untereinander durch drei Disulfidbrücken verbunden und sind ebenfalls hoch konserviert [12,102]. Durch die Extrazellulärdomänen wird eine Stabilisierung des Connexons gerade während des Aneinanderdockens der beiden Halbkanäle erreicht. Der im Zytoplasma lokalisierte N-Terminus, der aus circa 20 Aminosäuren besteht, ist ebenfalls weitgehend homolog zwischen den Connexinen. Große Unterschiede bestehen hingegen sowohl bezüglich der Aminosäuresequenzen wie auch der Länge des C-Terminus, was das unterschiedliche Molekulargewicht der einzelnen Connexine bedingt [32]. Je nach

Länge des C-Terminus der einzelnen Connexine weisen diese unterschiedliche bzw. unterschiedlich viele Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen, wie zum Beispiel die Proteinkinase C, MAP-Kinasen oder auch Src-Kinasen auf, wodurch eine Regulation oder Modifikation der einzelnen Connexine und damit der Permeabilität der von ihnen gebildeten Kanäle erfolgen kann [73,76,87,131].

Gap Junctions erlauben aufgrund ihrer Kanaleigenschaften den Austausch von Ionen und kleinen Molekülen wie z.B. IP₃, cAMP und ATP bis zu einer Größe von circa 1,0 kDa [32,102]. Da jedoch Gap Junctions prinzipiell aus 22 verschiedenen Connexinen mit jeweils individuellen Eigenschaften (wie Selektivität oder subzellulärer Lokalisation) aufgebaut sein können, unterscheiden sie sich deutlich in Hinblick auf ihre Funktion [36,37,102,113]. Zum einen ist der Signalaustausch über diese interzellulären Kanäle als gemeinsame Funktion aller Connexine anzusehen, zum anderen kann aber in vielen Fällen die individuelle Funktion einzelner Connexine nicht durch andere Connexinisoformen ersetzt werden, da diese entweder in bestimmten Zellen gar nicht exprimiert werden oder nicht miteinander im gleichen Kanal vorkommen können [113]. Auch wenn Connexine überwiegend als Bausteine für interzelluläre Kanäle fungieren, konnte zum Beispiel in einer Reihe von Untersuchungen, insbesondere für Connexin 43 (Cx43), gezeigt werden, dass dieses unabhängig von seiner kanalbildenden Funktion Prozesse der Zellmigration, der Zelladhäsion sowie der intrazellulären Regulation mitsteuern, also Kanal-unabhängig wirken kann [58].

1.3. Gap Junctions im vaskulären System

Für das Gefäßsystem konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen überwiegend die Connexine Cx37, Cx40, und Cx43 exprimieren, glatte Gefäßmuskelzellen dagegen vor allem Cx43 und Cx45 [61] möglicherweise auch Cx40 [6,77]. Ob glatte Muskelzellen überdies auch Cx37 enthalten, wie in einzelnen Arbeiten aufgrund immunhistochemischer Untersuchungen berichtet wird [101], ist umstritten. Die Funktion der einzelnen Connexine für das Gefäßsystem ist bisher noch weitgehend unklar. Hinweise auf deren Funktion geben jedoch die vaskulären Phänotypen von Connexin Knockout Mäusen.

Zur potentiellen Erklärung der Rolle dieser Connexine für die Ausprägung des vaskulären Phänotyps kann zunächst nicht zwischen deren kanalabhängigen – und für die Kommunikation relevanten – und den bereits erwähnten kanalunabhängigen Wirkungen der Connexine unterschieden werden. Vorarbeiten im eigenen Labor zeigten jedoch bereits auf, dass ein Verlust von Cx40 in Mäusen die Weiterleitung vasomotorischer Signale entlang von Arteriolen einschränkt [22], was eindeutig der Kanalfunktion zuzuordnen ist. Zusätzlich sind diese Tiere hyperton und entwickeln zeitweise eine irreguläre Vasomotion, die temporär zu einem kompletten Gefäßverschluss führen kann [22]. Ein isolierter Knockout der Cx43 Expression im Endothel geht im Gegensatz dazu einher mit einer Bradykardie und Hypotension [75]; zudem zeigt sich eine Änderung in der Expression einzelner Gene, welche für die Differenzierung, die Funktionalität der Gefäßzellen, sowie die Vaskulogenese und Angiogenese verantwortlich sind [129]. Der komplette Verlust der Cx43-Expression hingegen schränkt die Embryonalentwicklung überraschend wenig ein, sondern ist erst bei Geburt letal. Insgesamt fällt kein vaskulärer Phänotyp auf.

Cx37 wird in vielen verschiedenen Geweben des Körpers exprimiert, wobei für Cx37-defiziente Mäuse eine Infertilität beschrieben wurde [113]. Der Verlust von Cx37 oder Cx40 geht nicht mit einem vaskulären Phänotyp einher, jedoch erweisen sich Mäuse bei gleichzeitigem Verlust der Cx37 und Cx40 Expression im Endothel als nicht überlebensfähig [115]. Durch den Verlust der Connexine kommt es hierbei partiell zu einer irregulären Vasodilatation und intravasalen Stauung, die sekundär zu lokalisierten Blutungen der Gefäße von Haut, Testis, Organen und Lunge führt. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass Cx37 und Cx40 zum Zeitpunkt der Embryonalentwicklung voneinander abhängig sind und sich gegenseitig bei der Entwicklung des vaskulären Phänotyps beeinflussen [115]. Für Cx37 ist zudem bekannt, dass ein Cx37-Polymorphismus oder eine unzureichende Cx37-Expression mit einem gehäuften Auftreten von Gefäßerkrankungen wie der Arteriosklerose und der koronaren Herzkrankheit in Zusammenhang steht [15,134].

1.4. Bedeutung von Gap Junctions für die Ausbreitung interzellulärer Signalwege

Die Kommunikation zwischen benachbarten Zellen über Gap Junctions kann sowohl über eine Fortleitung elektrischer Signale wie auch einen Austausch von Signalmolekülen erfolgen. Autakoide wie Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandine oder der „Endothelium-derived hyperpolarizing factor“ (EDHF), die vom Endothel selbst gebildet werden, können zudem die interzelluläre Signalweiterleitung beeinflussen [11,20,27,97].

Calcium stellt in diesem Kontext ein wichtiges Signal „molekül“ dar. Sowohl bei rezeptor-abhängigen Stimulation einer Endothelzelle z.B. durch Histamin, Acetylcholin oder Bradykinin, als auch bei rezeptor-unabhängiger mechanischer Stimulation z.B. durch Erhöhung der Schubspannung [14] kommt es zu einer Ausschüttung von Ca^{2+} aus intrazellulären Calciumspeichern [100,104] bzw. zum Calciumeinstrom über TRP-Kanäle [91,124]. Der Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels wiederum steigert die calciumabhängige Synthese von Endothelfaktoren wie Stickstoffmonoxid, Prostacyclin und EDHF [26], die den Gefäßtonus entscheidend mitregulieren.

Ein Anstieg des Calciumspiegels in einer Zelle kann auch in Nachbarzellen zu einem Calciumanstieg führen, wenn es nach dem Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels in einer Endothelzelle zu einer Gap Junction-abhängigen Ausbreitung des Calciumsignals auf direkt und indirekt benachbarte Zellen kommt. Sowohl die Passage des second messengers Calcium [96,140] selbst, als auch von IP_3 durch Gap Junction-Kanäle [43,104] kann prinzipiell einen Calciumanstieg in den Nachbarzellen verursachen. Neben dem so beschriebenen Weg der interzellulären Calciumsignalweiterleitung können Calciumanstiege in Nachbarzellen aber auch über parakrine Botenstoffe wie z.B. ATP ausgelöst werden [55,85] und prinzipiell so von einer Zelle zur anderen weitergeleitet werden. Im speziellen Falle der parakrinen Wirkung von ATP können trotzdem Connexine eine Rolle spielen, da ATP über Hemikanäle (Connexons) [30] aus den Zellen freigesetzt werden kann.

1.5. Der Einfluss von NO auf den Signalaustausch über Gap Junctions

Die interzelluläre Kommunikation über Gap Junction Kanäle ist kein statischer, sondern ein ausgesprochen dynamischer Prozess. Dieser wird durch die unterschiedliche Expression verschiedener Connexinisoformen, durch deren posttranskriptionale Modifikationen und den variablen Einbau der Kanäle mit kurzer Halbwertszeit in die Zellmembran beeinflusst. Weiterhin modifizieren einzelne Connexin-Subtypen bei Einbau in Gap Junction Kanäle, deren Permeabilitätseigenschaften für elektrische Ströme bzw. Ionen in charakteristischer Weise [17,107]. Zusätzlich haben auch endogene Modulatoren wie z.B Stickstoffmonoxid, welches von den Endothelzellen selbst gebildet wird, einen Einfluss auf die Gap Junction Permeabilität [48,57,119].

Auch für nichtvaskuläre Zellen wie z.B in Astrozyten, Horizontalzellen bzw. Myozyten des Uterus konnte ein Einfluss von NO, auf die Gap Junction Permeabilität bzw. die zelluläre Connexinexpression aufgezeigt werden [10,80]. Als modulierende Mechanismen sind dabei die Bildung von Peroxynitrit [10], die PKG-abhängige Phosphorylierung von Connexinproteinen [80], sowie ein sekundärer Anstieg von cAMP [98] beschrieben.

In vaskulären Zellen wurde nachgewiesen, dass die modulierende Wirkung von NO auf die Gap Junction Permeabilität entscheidend vom exprimierten Connexintyp abhängt. NO hemmt z.B die funktionelle Gap Junction-Kopplung über Cx37. Dies zeigt sich sowohl in einer Verminderung der elektrischen Kopplung zwischen Endothelzellen in der Mikrozirkulation [82], wie auch in einem reduzierten interzellulären Austausch von Signalmolekülen bzw. Farbstoffmolekülen [57].

Hierbei wurde z.B in einem isoliert Cx37-exprimierenden HeLa-Zellsystem beschrieben, dass nach Farbstoffinjektion der Austausch des Farbstoffs Alexa Fluor 488 über Gap Junctions auf die unmittelbar benachbarten Zellen nach NO-Inkubation deutlich reduziert war [57]. Auch in HUVEC, welche die Connexine Cx37, Cx40 und Cx43 exprimieren, zeigte sich unter akuter NO-Einwirkung eine verminderte Farbstoffausbreitung auf die Nachbarzellen durch bereits bestehende Gap Junction Kanäle [57]. Im Gegensatz dazu fand sich nach NO-Inkubation in HUVEC ein zeitlich verzögter Anstieg der Gap Junction Kopplung durch verstärkten Neu-Einbau von

Cx40 in Gap Junctions der Plasmamembran [48]. Diese primär gegensätzlichen NO-Effekte beruhen zum einen auf der Wirkung auf ein spezifisches Connexin (Cx37 versus Cx40); zudem ist eine Abhängigkeit der Wirkung auf akut bestehende und neu gebildete Gap Junction Kanäle zu konstatieren [57]. Gap Junctions zwischen glatten Muskelzellen und dem Endothel weisen an sogenannten myoendothelialen Kontaktzonen ebenfalls die Fähigkeit auf, second messenger wie z.B Calcium bzw. IP₃ und elektrische Ströme untereinander auszutauschen zu können [52,108,136]. IP₃ wiederum kann z.B nach Stimulation der glatten Muskelzelle mit Noradrenalin über Gap Junction Kanäle aus dem Myozyten in die Endothelzelle diffundieren. Im Endothel kann IP₃ eine Calciumsteigerung und davon abhängige erhöhte Synthese von NO auslösen, was im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus die weitere Vasokonstriktion im glatten Muskel verringern kann [27,135]. An myoendothelialen Gap Junctions wird von manchen Autoren insbesondere der Expression von Cx43 eine besondere funktionelle Bedeutung beigemessen [45]; zudem wurde beschrieben, dass die konstitutiv exprimierte NO-Synthase (eNOS) bevorzugt an myoendothelialen Gap Junctions lokalisiert ist und unter NO-Einfluss die Gap Junction Permeabilität von Cx43 durch Nitrosylierung von Cystein 271 des C-Terminus stark beeinflusst wird [119]. Auch für Cx43-Hemikanäle konnte in Astrozyten eine Modulation der Permeabilität durch Nitrosylierung von Cx43 unter NO-Wirkung aufgezeigt werden [94,95].

Die lokalisierte Wirkung der endothelialen NO-Synthase an Gap Junctions zwischen dem Endothel und dem glatten Muskel wird in neueren Arbeiten auch auf eine Koexpression mit Hämoglobin Hb alpha zurückgeführt [120]; durch eine Modulation der NO-Verfügbarkeit soll so die Permeabilität von Cx43-exprimierenden Gap Junctions moduliert werden.

1.6. Fragestellung und Ziele der Arbeit

Wie oben dargestellt ist Stickstoffmonoxid bereits als Modulator der Zell-Zellkommunikation über Cx37-haltige Gap Junctions [56,57] unter bestimmten Bedingungen beschrieben. In der Literatur sind darüber hinaus NO-abhängige Regulationsvorgänge der Permeabilität von Gap Junctions und Hemichannels berichtet, welche die Connexine Cx40, Cx43, bzw. Cx46 enthalten [48,94,95,119]. Schwerpunkt dieser Arbeit war die Analyse der Wirkung von NO auf Cx37 hinsichtlich des Calcium-Austausches zwischen Endothelzellen bzw. mit anderen Zellen der Gefäßwand, da Endothelzellen neben Cx37 auch andere Connexine exprimieren. Dies ist von besonderem Interesse, da sich die mehrere gleichzeitig exprimierte Connexine gegenseitig funktionell teilweise ersetzen können [65,114,115], was die Effekte von NO auf die Funktion der Gap Junction abhängigen Kommunikation unter physiologischen Bedingungen möglicherweise entscheidend beeinflußt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte vor allem untersucht werden, ob NO eine modulierende Rolle bei der interzellulären, Gap Junction-abhängigen Ausbreitung von Calciumsignalen spielt, oder ob hier eine Kompensation durch NO-insensitive Connexine stattfinden kann. Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Ist nach humoraler bzw. lokaler mechanischer Stimulation eine Ausbreitung von Calciumsignalen (Calciumwellen) zwischen HeLa Cx37-Zellen (als Modellsystem), humanen Endothelzellen (HUVEC) bzw. humanen Muskelzellen (HUVSMC) bzw. zwischen beiden Zelltypen nachweisbar?
2. Ist die Ausbreitung der Calciumsignale unter diesen Bedingungen ausschließlich Connexin- bzw. Gap Junction abhängig?
3. Beeinflusst NO die Ausbreitung der Calciumsignale zwischen Endothel-, glatten Muskelzellen bzw. an myoendothelialen Zellverbindungen gleichermaßen und ist dies jeweils an die Expression von Cx37 gebunden?
4. Beeinflusst NO die Expression bestimmter Connexine im Endothel bzw. im glatten Muskel?
5. Gibt es eine lokale Präferenz oder Kompartimentierung der NO Wirkung für die Ausbreitung von Calciumsignalen ?

2. Methoden

Die Arbeiten an kultivierten HeLa-Zellen sowie humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) bzw. glatten Muskelzellen (HUVSMC) erfolgten unter sterilen Bedingungen. Alle verwendeten Materialien wurden vor Versuchsdurchführung bei 121°C und 1 hPa autoklaviert. Lösungen mit hitzeempfindlichen Komponenten waren sterilfiltriert. Proteinproben sowie Nukleinsäuren wurden, sofern nicht anders beschrieben, auf Eis gekühlt.

Grundlegende molekularbiologische Arbeitsmethoden, die hier nicht gesondert erwähnt werden, erfolgten gemäß „Current Protocols in Molecular Biology“ [1]

2.1. Zellkultur von HeLa- und HUVEC-Zellen

2.1.1. Isolierung und Kultivierung von HUVEC

Verwendete Lösungen:

HEPES:	145 mM NaCl, 3 mM KCl, 2,5 mM CaCl ₂ , 1,25 mM NaH ₂ PO ₄ , 1,5 mM MgCl ₂ , 10 mM D-Glucose, 10 mM HEPES
HUVEC-20%-Medium:	500 ml M199 (Promocell), 100 ml Newborn Calf Medium, 0,0083% Streptomycin, 0,006 % Penicillin
Promocell:	500 ml Promocell-Medium, 12,3 ml Supplement Mix Promocell
Kollagenase:	17 U/ml (Roche diagnostics, Mannheim) in PBS +
PBS +:	160 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,7 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,7 mM CaCl ₂ ; 0,25 mM MgCl ₂ (PBS+)
PBS -:	160 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , (PBS-)
Trypsin/EDTA:	0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS+

Die Gewinnung und Kultivierung der Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (human) erfolgte entsprechend dem ursprünglich von Jaffe und seinen Mitarbeitern angewendeten Verfahren [54]. Die anonym gespendete Nabelschnur wurde direkt nach der Entbindung in sterilen HEPES überführt und bei 4°C gelagert. Die Endothelzellen wurden unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur isoliert, indem in die Nabelschnur an beiden Seiten eine Knopfkanüle mit Schlaucheinsatz eingeführt und befestigt wurde. Im Anschluss erfolgte nach Spülung der Nabelschnur

mit PBS⁺ und Verschluss beider Gefäßenden eine 30 minütige Inkubation mit Kollagenase (17 U/ml in PBS⁺). Danach wurden die Endothelzellen mit HUVEC-20%-Medium ausgespült, zentrifugiert (1000 rpm /2 Minuten, bei 20°C Temp.), in 10 ml HUVEC-Wachstumsmedium aufgenommen und in einzelne Zellkulturflaschen überführt. Konfluente Kulturen wurden in 10 cm Zellkulturschalen in HUVEC-Wachstumsmedium bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigtem Wasserdampf kultiviert. Die Subkultivierung der Zellen erfolgte bei 70-80% Konfluenz durch Ablösung der Zellen aus der Kulturschale mit Trypsin. Hierzu wurden die Zellen für circa 2-3 min mit 1 ml 0,05% Trypsin im Wärmeschrank behandelt und die enzymatische Wirkung des Trypsins anschließend durch Zugabe von HUVEC-20% Medium unterbrochen. Anschließend erfolgte eine Resuspension im Verhältnis 1/8-1/10 in HUVEC-20%-Medium. Für Versuche wurden nur Zellen der ersten bis dritten Passage verwendet. Für immunhistochemische Untersuchungen und Calciummessungen wurden die Zellen am Tag vor der Versuchsdurchführung auf kollagenbeschichteten Glasplättchen (ø 13 mm) ausgebracht.

2.1.2. Isolierung und Kultivierung von HUVSMC

Verwendete Lösungen:

SMC-Medium : 500 ml DMEM (Promocell), 10 % FCS (fetal calf serum)
 20% SMC Medium II (Promocell) 0,083% Penicillin/Streptomycin

Zur Gewinnung der HUVSMC wurden Stücke der Nabelschnurvene durch vorsichtiges Schaben mit einem Skalpell vom Endothel befreit und mit den exponierten SMC nach unten auf Petrischalen verteilt. Abschließend wurden diese mit 10-15 ml SMC-Medium bedeckt und in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Sobald ein Auswachsen der Zellen mikroskopisch sichtbar war, wurde das Zellkulturmedium erstmalig gewechselt und die Nabelschnurstücke entfernt. Nach Erreichen einer 80-90% Konfluenz wurden die glatten Muskelzellen zunächst in 10 cm Petrischalen ausgesät. Zur Herstellung der Kokulturen aus glatten Muskelzellen und Endothelzellen wurden die Zellen mittels Trypsinbehandlung (Trypsin 0,05%, 5 min) aus der Zellkulturschale abgelöst und anschließend im Verhältnis 1/3-1/5 gemeinsam mit den abgelösten Endothelzellen auf kollagenbeschichteten Glasplättchen ausgebracht. Calciummessversuche konnten nach 12-24 h Inkubationszeit durchgeführt werden.

2.1.3. Kultivierung von HeLa Cx37-Zellen

Verwendete Lösungen:

Hela-Medium: 400 ml DMSO (Dulbecco's modified eagle medium), 50 ml NBCS (New born calf serum), 0,006% Penicillin, 0,013% Streptomycin, 1 µg/ml Puromycin

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten HeLa-Zellen waren stabil mit Cx37 transfiziert (Dr. Klaus Willecke, Bonn). Sie wurden unter erhöhtem Selektionsdruck durch Puromycin in beschichteten Zellkulturschalen bei 37°C, 5% CO₂ und dampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Als Nährmedium diente HeLa-Medium. Zu 80-90% konfluent gewachsene Zellen wurden zunächst mit PBS⁻ gewaschen und durch Trypsinbehandlung (5 min Trypsin 0,05 %) von der vorbeschichteten Fläche der Zellkulturschale abgelöst. Nach kurzer Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank wurde die Zellsuspension in je 10 ml Medium resuspendiert und anschließend im Verhältnis 1/5 bis 1/10 in neue Zellkulturschalen überführt.

2.1.4. Einfrieren und Auftauen von HeLa Cx37-Zellen

Verwendete Lösungen:

Einfriermedium : 1 ml DMSO, 2 ml FCS/NBCS, 7 ml DMEM

Für eine längerfristige Aufbewahrung der HeLa Cx37-Zellen wurden diese in Flüssigstickstoff kryokonserviert. Nach Ablösen der Zellen aus der Kulturschale mit 1 ml 0,05% Trypsin wurden diese in je 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in Einfrierröhrchen eingefüllt. Die Zellsuspension wurde jeweils zunächst langsam bei -20°C für mindestens 2 h eingefroren, im Anschluss für 1 Woche bei -80°C und zur langfristigen Lagerung in Flüssigstickstoff bei -200°C überführt. Das Auftauen der Zellen erfolgte im 37°C Wasserbad. Direkt im Anschluss konnten die Zellen zusammen mit dem Einfriermedium in Wachstumsmedium resuspendiert und für 2 min bei 1000 rpm zentrifugiert werden. Nach Entfernung des DMSO-haltigen Mediums wurden die Zellen in 10 ml frischem Hela-Medium auf 10 cm Kulturschalen ausgebracht.

2.1.5. Inkubation der HeLa Cx37-Zellen, HUVEC bzw. HUVSMC mit dem NO-Donor SNAP, NO-Synthaseinhibitor LNA und Peroxynitritinhibitor SOD

Verwendete Lösungen:

NO-Synthase-Inhibitoren:	N-nitro-L-Arginin (LNA): 30 µM, Fa Sigma N5501, gelöst in HEPES
Peroxynitritinhibitor:	Superoxiddismutase (SOD):100 U/ml, Roche Diagnostics Nr. 837113 gelöst in HEPES
NO-Synthase:	S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamin (SNAP): 1-2 µM. Firma Alexis Biochemicals Nr. ALX-420-003-M025; gelöst in HEPES
Apyrase:	25 U/ml 500 U/ml in HEPES

Vor Beginn der Versuche wurden zunächst die NO-Synthase- bzw. Peroxynitritsynthase-Inhibitoren (LNA+SOD) sowie die exogene NO-Synthase (SNAP) in HEPES gelöst und auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Die ausgebrachten HeLa Cx37-Zellen, HUVEC bzw. HUVSMC wurden vor Beginn der Versuche in PBS⁺ gewaschen und anschließend 30 min mit LNA und SOD bei 37°C inkubiert. In einigen Experimenten wurden die Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit LNA und SOD zusätzlich für 20 min mit SNAP (2 µM) behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen mittels immunhistologischer, proteinbiochemischer und funktioneller Methoden auf mögliche NO-Effekte weiteruntersucht.

2.1.6. Kokultur HeLa Cx37-Cx43-Zellen -HUVSMC nach PKH-Färbung

Verwendete Lösungen:

PKH 26 red fluorescent cell linker kit for general cell labeling PKH 26:Sigma: PKH26-GL

Zur Identifikation der jeweiligen HeLa-Zellart in HeLa Cx37-Cx43-Kokulturen oder der Endothel/glatten Muskelzellen in HUVEC/HUVSMC-Kokulturen erfolgte die Anfärbung der HeLa Cx37-Zellen bzw. HUVEC mit dem Farbstoff PKH26. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS⁺ gewaschen und dann mit einer Lösung aus 1000 µl Diluent und 3 µl PKH 26 angefärbt. Nach gründlicher Verteilung der Lösung auf den Zellen erfolgte eine 5 min Inkubationszeit bei 37°C im Dunklen. Um den Färbeprozess zu stoppen wurden die Zellen danach 1 min mit 1 ml NBCS (New born calf serum) inkubiert, bevor die Farb-/Nährstofflösung abpipettiert wurde.

Die Ablösung der Zellen von der Kulturschale erfolgte nach Vorbehandlung mit 1 ml Trypsin 0,05%. Die HeLa Cx43-Zellen/HUVSMC wurden von der 10 cm Kulturschale nach Trypsinbehandlung abgelöst und anschließend gemeinsam mit den PKH

gefärbten HeLa Cx37-Zellen/HUVEC in einem Verhältnis von HeLa Cx37:HeLa Cx43 bzw. HUVEC:HUVSMC=1:5 auf Glasplättchen (\varnothing 13 mm) ausgebracht. Nach einer Inkubationszeit von circa 12 h bei 37°C wurden die Glasplättchen aus den Zellkulturschalen herausgenommen, in eine spezielle Aluminiumkammer eingesetzt und mit 1 ml HEPES inkubiert, bevor die Kammer auf das beheizte Mikroskop eingebracht wurde. Die Zellen wurden mit einem 40x Objektiv dargestellt. Eine Unterscheidung zwischen HeLa Cx37- und HeLa Cx43-Zellen bzw. HUVEC und HUVSMC konnte bei einer Anregungs-Wellenlänge von $\lambda=541$ nm (Emission: 570 nm) vorgenommen werden. Bei dieser Wellenlänge fluoreszierten HeLa Cx37-Zellen bzw. HUVEC nach Anfärbung rot, wohingegen HeLa Cx43-Zellen und HUVSMC ungefärbt erschienen.

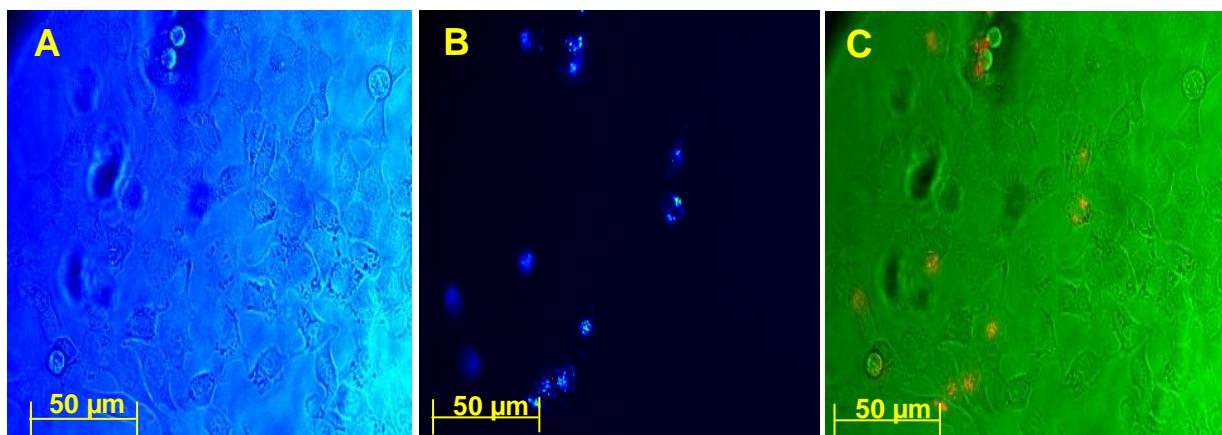


Abbildung 2-1

(A) Transmissionsbild: HeLa Kokultur Cx37-Cx43. (B) Nach Anregung bei $\lambda=541$ nm können einzelne Cx37-exprimierende Zellen eindeutig identifiziert werden. (C) Durch Überlagerung des Transmissions- (A) mit dem Fluoreszenzbild (B) können Cx37-exprimierende Zellen eindeutig identifiziert werden. Kulturen:6 (HeLa; HUVEV/HUVSMC: N=17-106, 14-21 wells)

2.1.7. Gap Junction Blockade mit Meclofensäure

Verwendete Lösungen:

Meclofensäure: 100 µM gelöst in HEPES

Gap Junction Kanäle wurden mit dem Blocker Meclofensäure inhibiert. Nach Ausbringung der HUVEC auf Glasplättchen (\varnothing 13 mm) sowie deren Anfärbung mit dem calciumsensitiven Farbstoff Fura 2 (Dauer: 1h, siehe 2.3.3) wurden die Zellen zusätzlich für 30 Minuten in 100 µM Meclofensäure gelöst in PBS⁺ bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde ein Anstieg des Calciumspiegels durch mechanische Stimulation einer einzelnen HUVEC ausgelöst (siehe 2.3.2) und die Ausbreitung der Calciumwelle auf die benachbarten Zellen beobachtet. Die Auswertung der Calciumwellenausbreitung erfolgte anhand der in Kapitel 2.3.4 beschriebenen Methodik.

2.1.8. Downregulation von Cx43 mittels small interfere RNA

Verwendete Lösungen:

si43_RNA: 3 µl human si43 RNA (20 µM), 97µl DMEM ,3µl Hiperfect Transfektionsreagenz, 397 µl HUVEC-20%-Medium
si43-2RNA, target sequence: ATGCTTAGAGTGGACTATTAA, Qiagen

Ctrl_siRNA: 3 µl Human-si RNA- ohne Vektor (20 µM), 97µl DMEM, 3 µl Hiperfect-Transfektionsreagenz, 397 µl HUVEC-20%-Medium
Ctrl-siRNA, target sequence: AATTCTCCGAACGTGTCACGT, Qiagen

Mock Kontrolle: 100 µl DMEM, 3 µl Hiperfect- Transfektionsreagenz, 397 µl HUVEC-20%-Medium

Zur Reduktion der Cx43-Expression in HUVEC wurde si43_RNA verwendet. Als Kontrollzellen wurden HUVEC mit nicht wirksamer Ctrl-siRNA oder nur mit Transfektionsreagenzien (Mock-Kontrolle) behandelt. Während der Transfektion (12 bis 24 h) wurden die Zellen bei 37°C + 5% CO₂ in HUVEC-20%- Medium inkubiert. Nach Anfärbung der Zellen mit dem calciumsensitiven Farbstoff Fura 2 für 1 h (siehe Kapitel 2.3.3) wurden die Zellen für 30 min in HEPES+LNA+SOD+Apyrase mit bzw. ohne SNAP vorbehandelt (siehe Kapitel 2.1.5)

2.2. Charakterisierung der Connexinexpression in HeLa Zellen/HUVEC/ HUVSMC

2.2.1. Immunhistochemie der HUVEC/HUVSMC

Verwendete Lösungen:

Fixierung:	3% Formalin in PBS ⁺
Permeabilisierung:	0.1 % Triton X 100 in PBS ⁺
Blockingpuffer:	BSA 0.2% (100 mg BSA auf 50 ml 1x PBS, 0.1% Tween 20) in PBS ⁺
Erstantikörper:	Anti-Cx37 (Alexander Simon) 1,25 µg/ml, 1/60 in PBS ⁺ Anti-Cx43 Rabbit anti-human IgG,polyclonal, 1,25 µg/ml, 1/50 in PBS ⁺ Sigma-Aldrich,Steinheim Anti-CD 31 AK(3 µg/ml, Abcam, Cat NO ab9409)
Zweitantikörper:	Alexa Fluor 488 Goat anti rabbit: 1/200 in PBS ⁺ , Molecular Probes, Eugene, USA Alexa Fluor 466,Goat anti mouse IgG: 1/200 in PBS ⁺ , Molecular Probes, Eugene, USA

Auf Glasplättchen (\varnothing 13 mm) kultivierte Ko-Kulturen aus HUVEC und HUVSMC wurden mit einer 3% Formalinlösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte durch Inkubation mit 0.1% Triton X-100 Lösung für 3.5 min. Eine Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen geschah durch 1 h Inkubation mit 0.2% BSA bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Connexin-spezifische Erstantikörper gleichmäßig auf die Zellen aufpipettiert und für 2 h inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Bindung des Antikörpers am intrazellulär gelegenen C-Terminus des jeweiligen Connexins gewährleistet werden. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem an einen Farbstoff (Alexa Fluor 488 bzw. Alexa Fluor 466) gekoppelten Zweitantikörper für 1 h unter völligem Lichtausschluss inkubiert. Nach abschließenden Waschschritten mit PBS⁺ erfolgte die luftdichte Fixierung der angefärbten Zellen auf dem Glasplättchen unter Einschluss von 50 µl PBS⁺. Die Connexinexpression konnte im Anschluss mit einem Confokalen Mikroskop (LSM 410, Zeiss, Jena, Deutschland) mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 488$ nm für Cx37 (Emission: $\lambda = 515$ nm), $\lambda = 546$ für Anti- α -smooth-muscle-actin bzw. $\lambda = 633$ nm für Anti-CD 31 AK unter 40x Vergrößerung beurteilt werden. Unspezifische Bindungen des Erst- sowie Zweitantikörpers wurden in Kontrollexperimenten ausgeschlossen, in welchen die Zellen nicht mit Triton X-100 permeabilisiert, bzw. die Zellen nur mit dem Zweitantikörper angefärbt wurden.

2.2.2. Zelllyse HeLa Cx37-Zellen und HUVEC

Verwendete Lösungen:

2x SDS- Probenpuffer:	0.13 M TrisHCl , pH=6.8, 4% SDS,20% glycerin, 0.02% bromphenol blue, 200 mM Mercaptoethanol
RIPA-Puffer:	250 mM Tris-HCl, ph 7.5, 750 mM NaCl, Detergenzienmix: 5% Nonidet P40 (Igepal), 2.5% Natriumdesoxycholat, 0.5% SDS

Die Zelllyse der zu circa 80 % konfluent gewachsenen HeLa Cx37-Zellen und HUVEC erfolgte unmittelbar vor Durchführung des Western Blot. Vor Beginn der Zelllyse wurden die Zellen in eisgekühltem PBS⁻ gewaschen und dann mit einem Gummischaber vom Boden der Kulturschale abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in 250 µl RIPA-Puffer bzw. 500 µl 2x SDS Probenpuffer aufgenommen. Eine Homogenisierung des Zelllysats konnte durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 1 ml Spritze erreicht werden. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde das Lysat in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reagenzrörchen überführt.

2.2.3. Western Blot

SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS PAGE)

Verwendete Lösungen:

12% Gel (Trenngel):	3,3 ml aqua dest., 2,5 ml Tris 1.5 M, 100 µl SDS 10%, 2,5 ml Acrylamid 30, 50 µl APS 10%, 5 µl Temed
12% Gel (Sammelgel):	6 ml Aqua dest., 2.5 ml Tris 0.5 M, 100µl SDS 10%,1.3 ml Acrylamid 30%, 65 µl APS 10%, 10 µl TEMED
Marker (MW):	Fermentas Page Ruler™ prestained Protein Ladder #M0671
2 × SDS Auftragspuffer:	0.13 M TrisHCl , pH=6.8, 4% SDS, 20% Glycerin, 0.02% Bromphenolblau, 200 mM Mercaptoethanol
Laufpuffer:	Tris-Glycin (Für 1L 10x Stammlösung 30,32g Tris; 144g Glycin); 0,1% SDS

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts erfolgte in Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen im diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli [68]. Zur Herstellung des Trenngels, wurden die Einzelsubstanzen (Aqua, Tris, SDS, Acrylamid sowie SDS) in einem Eppendorfgefäß zusammenpipettiert und abschließend Temed als Katalysator hinzugegeben. Nach abschließender 5 minütiger Entgasung wurde das

Gel zwischen 2 Glasplatten in einen Gießstand eingefüllt. Die Polymerisierung des Gels erfolgte in der Regel nach 20 bis 30 min bei Raumtemperatur. Nach Fertigstellung des Sammelgels (analog der Herstellung des Trengels) konnte dieses dem Trengel aufpipettiert und ein Kamm in das flüssige Gel eingeführt werden, um einzelne Probentaschen auszusparen. Nach vollständiger Polymerisierung des Sammelgels konnte der Gel-Glasplattensandwich in die mit Laupuffer gefüllte Kammer gesetzt werden. Vor Probenauftrag wurde die Proteinlösung mit derselben Menge an 2x SDS Auftragspuffer verdünnt, 5 min bei 95°C erhitzt und abschließend 3 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Auftragung des Markers (7 µl) und des Probenvolumens in die einzelnen Taschen erfolgte mithilfe einer 20 µl Spritze. Die Gellaufdauer bei 20 mA betrug in der Regel 1.5 bis 2 h, bis eine vollständige Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts zu verzeichnen war.

Western Blot (Harlow und Lane,1988)

Verwendete Lösungen:

Transferpuffer:	5,8 g Tris, 2,9 g Glycin, 3,7 ml 10% SDS Lösung, 200 ml Methanol add 1000 ml H ₂ O _{bidest}
Waschpuffer:	900 ml Aqua dest., 100 ml PBS ⁺ (10x), 1 ml Tween 20

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen in Zellextrakten aus HeLa- sowie HUVEC-Kulturzellen wurden die Proteinextrakte durch SDS-Page aufgetrennt und durch Elektroblotting (Semi-Dry-Blot-Apparatur) auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Vor dem Blotvorgang wurde ein Sandwich aus in Transferpuffer equilibriertem Whatmanpapier, der mit Methanol beschichteten Nitrocellulosemembran, sowie dem Gel gebildet. Mögliche Luftblasen im Sandwich wurden durch sanftes Rollen mit einer Pipette über das Papier entfernt, bevor die Blotapparatur an den Strom angeschlossen wurde. Das Gel wurde für 45-60 min entsprechend der jeweiligen Membrangröße geblottet. Die dazu benötigte Stromstärke wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Stromstärke} = \text{Länge} \times \text{Breite} \times 0,8$$

Direkt im Anschluss an dem Blotvorgang wurden Gelreste durch 10 minütiges Waschen in Waschpuffer von der Nitrocellulosemembran entfernt.

Anfärbung geblotteter Proteine auf der Nitrocellulose Membran mit Ponceau Rot**Verwendete Lösungen:**

Ponceau Rot: 0.1% Ponceau-Rot, 5 % Essigsäure in H₂O bidest.

Um die geblottete Proteinmenge qualifizieren zu können, wurde die Membran direkt nach dem Blotvorgang für circa 2 min in Ponceau-Rot angefärbt und anschließend für 1 min in Aqua dest. gewaschen. Nach Dokumentation des Proteinbandenmusters mithilfe eines digitalen Analysesystems wurde die Membran vollständig in Aqua dest. entfärbt und mit dem immunologischen Nachweis des Antigens auf der Membran mittels Immunoprint fortgefahrene.

Immunoprint**Verwendete Lösungen:**

Waschpuffer:	900 ml Aqua dest., 100 ml PBS ⁺ (10x), 1 ml Tween 20
Blockinglösung:	5 ml Western Blocking Reagenz (Roche:10 x conc. Blocking Solution, 100 ml, Cat No 11921673001), 45 ml Waschpuffer
Erstantikörper:	Cx37A11-A, anti mouse connexin 37, α-Diagnostics, IgG aff pure 100µg, Antibody Pure IgG/Peptide(s) /Poly rabbit oder Cx 37 AK,anti rabbit connexin 37 IgG, Alexander Simon
Zweitantikörper:	Goat anti rabbit IgG H&L, Calbiochem, Cat# 401353 2ml Chain specific Peroxidase Conjugate Lot# D 27878
Chemilumineszenz:	Applichem, Chemiluminescence Detection Kit for Horseradish peroxidase A3417

Zur Quantifizierung der geblotteten Proteine wurden spezielle Anti-Cx37-Antikörper verwendet. Eine Blockierung unspezifischer Antikörperbindungstellen erfolgte zunächst durch 1.5 h Inkubation mit 100% Blockinglösung. Anschließend wurde der Anti-Cx37-Antikörper (Alex Simon AK:1/6000 bzw. α-diagnostics: 1/1000 gelöst in Blockinglösung) für 1.5 h auf der Membran inkubiert. Nach 4 Waschschritten wurde der Zweitantikörper (Goat anti rabbit IgG 1/1000 gelöst in Blockinglösung) 1 h inkubiert. Nach abschließenden Waschvorgängen erfolgte die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe durch Behandlung mit 1 ml Chemilumineszenzlösung unter UV Licht. Je nach Intensität der Chemilumineszenz wurde die Membran 5 s bis 2 min mit UV Licht (425 nm) belichtet. Das Molekulargewicht der jeweiligen Bande konnte nach Abgleich mit der jeweiligen Markerhöhe festgestellt werden. Sollte die Membran anschließend weiteren Antikörperreaktionen unterzogen werden, wurden die bestehenden Antigen-Antikörper-Komplexe durch Inkubation in Waschpuffer für 45 bis 70 min bei leichtem Schütteln dissoziiert.

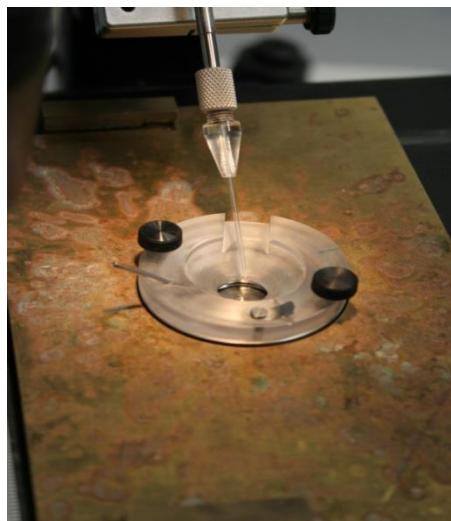
2.3. Nachweis funktioneller Gap Junction Kopplung

2.3.1. Farbstoffinjektion in HeLa Cx37-Cx43-Kokulturen und HUVEC

Verwendete Lösungen:

Alexa Fluor Farbstoff: Alexa Fluor 488 3,5 mM, Invitrogen, gelöst in 150 mM KCl-Lösung

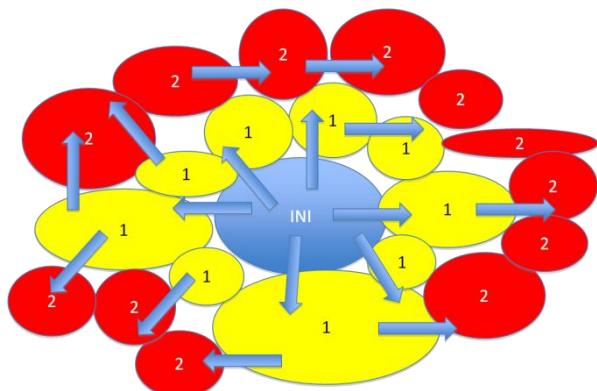
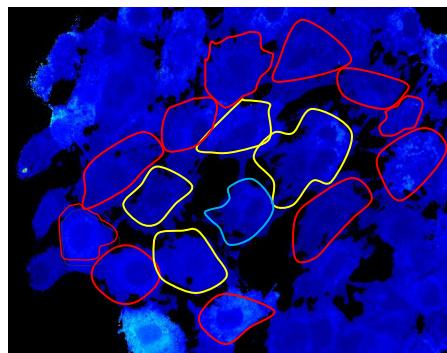
Der Gap Junction permeable, jedoch Membran impermeable Farbstoff Alexa Fluor wurde über Glaskapillaren in einzelne Zellen injiziert. Zur Farbstoffapplikation erfolgte zunächst die Herstellung von Kapillaren mit einem Spitzendurchmesser von circa 1 µm aus Borosilikatglas (Sience Products, GmbH, Hofheim, Deutschland) mithilfe eines Pipettenpullers (DMZ-Universal Puller, Zeitz-Instrumente, Deutschland). Die Kapillaren wurden mit je 1 µl Alexa Fluor befüllt und an einem semi-automatischen Mikroinjektor (Femtojet, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) befestigt. Danach wurde die Kapillarspitze mithilfe eines am Mikroskop befestigten Mikromanipulators (InjectMan, Eppendorf) in das Mikroskopiefeld gefahren. Die zu injizierende Einzelzelle wurde fokussiert und die Kapillarspitze über der Zelle positioniert. Die Injektion wurde dann am InjektMan ausgelöst. Während der Injektion, war die Pipette einem konstanter Druck von 65 hPa (Dauer: 1.2 s) ausgesetzt. Nach Einströmen des Farbstoffs in die initial injizierte Einzelzelle wurde die Glaskapillare mit dem restlichen Farbstoff aus dem Mikroskopierfeld gefahren und im Anschluss die Ausbreitung des Farbstoffs auf direkt sowie indirekt benachbarte Zellen beobachtet (Vergrößerung 40x). Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs geschah bei 488 nm, die emittierte Fluoreszenz wurde bei 515 nm aufgenommen (Aufnahme von 30 Bildern alle 20 s). Zur Auswertung wurde die Anzahl fluoreszierender Zellen 10 min nach Farbstoffinjektion mit Hilfe der zugehörigen Software (Tillvision von Till Photonics) bestimmt. Konnte keine Ausbreitung des Farbstoffs auf Nachbarzellen nachgewiesen werden, so galt die Zelle als nicht gekoppelt.

**Abbildung 2-2**

Inkubationskammer und Glaskapillare vor Farbstoffinjektion bzw. mechanischer Stimulation.

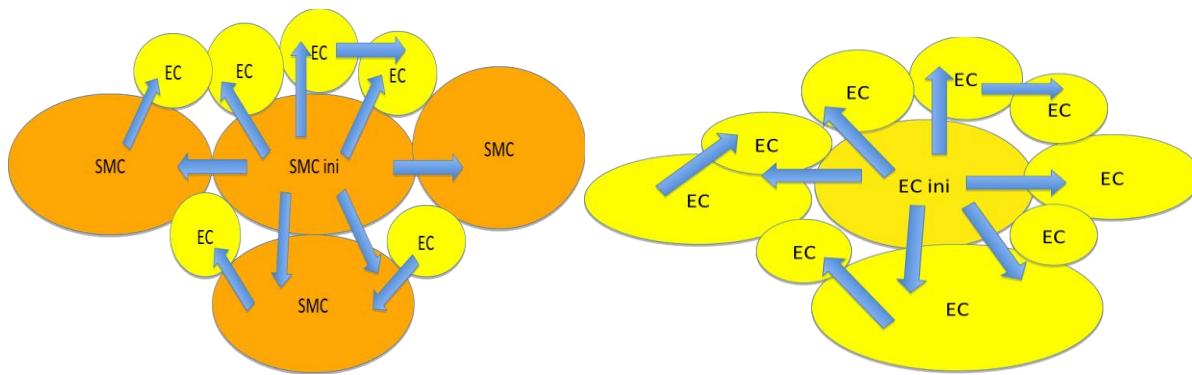
2.3.2. Mechanische Stimulation der Zellen

Die Zellmembran einer einzelnen HUVEC/HUVSMC bzw. HeLa-Zelle wurde mechanisch mit einer Glaspipette (Spitzendurchmesser 1 µm) stimuliert. Mithilfe eines elektrisch betriebenen Mikromanipulators konnte die Pipette innerhalb des Mikroskopiefeldes bewegt werden. Vor der mechanischen Stimulation (MS) wurde die Pipettenspitze unter mikroskopischer Kontrolle circa 10 µm über der zu stimulierenden Zelle platziert. Im Anschluss wurde die Filmaufnahme im Programm Tillvision gestartet und die Mikropipette langsam der zu stimulierenden Zelle angenähert. Sobald die initial mechanisch stimulierte Zelle einen Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels aufwies, wurde die Kapillare sofort aus dem Mikroskopiefeld zurückgefahren. Nach mechanischer Stimulation der Einzelzelle konnte die Ausbreitung einer Calciumwelle auf die benachbarten Zellen beobachtet werden. Als „Erstkranzzellen“ wurden Zellen bezeichnet, die unmittelbaren Membrankontakt zur initial mechanisch stimulierten Zelle aufzeigten (siehe Abbildung 2-3 A/gelb). „Zweitkranzzellen“ waren nicht direkt zur initialen Zelle benachbart, wiesen jedoch einen Zellkontakt zu den „Erstkranzzellen“ auf (siehe Abbildung 2-3 A/rot).

A**B****Abbildung 2-3**

Nach mechanischer Stimulation der initialen Zelle (INI /blau) kommt es zu einer Ausbreitung des Calciumsignals auf die direkt benachbarten „Erstkranzzellen“ (1/gelb). Ausgehend von den „Erstkranzzellen“ (gelb) wird das Calciumsignal auf indirekt benachbarte „Zweitkranzzellen“ (2/rot) fortgeleitet.

In Kokulturen aus Endothel- und glatten Muskelzellen HUVEC/HUVSMC, wie in Kapitel 2.1.1 und 2.1.2 beschrieben, wurde initial eine glatte Muskelzellen (SMC) (Abbildung 2-4 A/ SMC_{ini}) bzw. Endothelzelle (EC) (Abbildung 2-4 B/ EC_{ini}) mechanisch stimuliert und die Calciumwellenausbreitung auf direkt/indirekt benachbarte glatte Muskelzellen (SMC) und Endothelzellen (EC) beobachtet.

**A****B****Abbildung 2-4**

Calciumsignalausbreitung in einer Kokultur aus glatten Muskelzellen und Endothelzellen: Als Initialzelle (EC_{ini} bzw. SMC_{ini}) dargestellt ist jeweils die primär mechanisch stimulierte Zelle (EC = Endothelzelle, SMC=glatte Muskelzelle). Je nach Stimulation einer glatten Muskelzelle (A) bzw. Endothelzelle (B) kommt es zu einer Calciumsignalausbreitung auf benachbarte „SMC-oder EC-Erstkranzzellen“.

2.3.3. Messung der intrazellulären Calciumkonzentration in HUVEC/HUVSMC

Verwendete Lösungen:

Fura 2: 1 mM in DMSO angesetzt und in DMEM auf eine Konzentration von 2 µM verdünnt,
Calbiochem Nr. 344905

Zur Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration wurden die Zellen mit einer membrangängigen veresterten Form des Calcium-Chelators Fura 2 beladen, bei der die polaren Carboxylgruppen der Verbindung durch Methoxygruppen maskiert waren. Nach Diffusion des lipophilen Fluorochrom-Esters erfolgte im Cytosol die Abspaltung der Acetoxymethylgruppen durch zelluläre Esterasen sodass dann der funktionell aktive Farbstoff vorlag, der nicht wieder aus der Zelle heraus diffundieren konnte. Mit zunehmender Calciumkonzentration zeigte sich eine Zunahme der Fluoreszenz des Farbstoffs bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 340 nm (für den Calciumkomplex, Abbildung 2-5/B), wohingegen die Fluoreszenz bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 380 nm (für das freie Anion, Abbildung 2-5/A) mit zunehmender Calciumkonzentration abnahm. Das Emissionsmaximum zeigte sich unabhängig von der Anregung bei 510 nm. Durch alternierende Anregung mit den Wellenlängen 340 nm und 380 nm sowie anschliessende Bildung der Ratio R= 340 nm/380 nm konnten Änderungen der Calciumkonzentration unabhängig von der Fura-Konzentration in der Zelle erfasst werden.

Das Messsystem beinhaltete eine aus einem Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert S100, Firma Zeiss, Oberkochen), einem Monochromator-Beleuchtungssystem (Modell „Polychrom IV“, Till Photonics) und einer Digitalkamera (Imago, Firma Till-Photonics, München) bestehende Arbeitsstation, welche von einer PC basierten Bildanalyse Software „Tillvision“ (Firma Till Photonics, München) aus gesteuert wurde. Nach Beladung der Zellen für 1 h in 2 µM Fura 2 wurden die mit Zellen bewachsenen Glasplättchen im Anschluss in spezielle Aluminiumkammern überführt und 30 min in HEPES, 30 µM LNA und 100 U/ml SOD (siehe 2.1.5) inkubiert. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde bei den Wellenlängen $\lambda=340$ nm sowie $\lambda=380$ nm angeregt und die Fluorenszenzbilder 150 mal alle 250 ms bei $\lambda=510$ nm registriert. Daraus ergab sich eine Aufnahmedauer von 37.5 s. Mit der Bildanalysesoftware „Tillvision“ konnte zu jedem Bildpunkt und zu jedem Zeitpunkt aus den Grauwerten der Einzelbilder die Ratio R_{340/380} berechnet werden. Ein Anstieg der Ratio war

Ausdruck eines Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration. Durch Bildung der Ratio wurden mögliche Störgrößen wie die unterschiedlichen Zelldicke, intrazellulär ungleichmäßige Farbstoffverteilung, sowie das Ausbleichen der Zellen eliminiert. Weiterhin war es mit der Software möglich, einzelnen Zellen sogenannte „Regions of interest“ (ROI) zuzuweisen und somit den zeitlichen Verlauf der Calciumkonzentration innerhalb einzelner Zellen zu erfassen. Die weitere Auswertung erfolgte anschließend in einem Grafikprogramm (Origin).

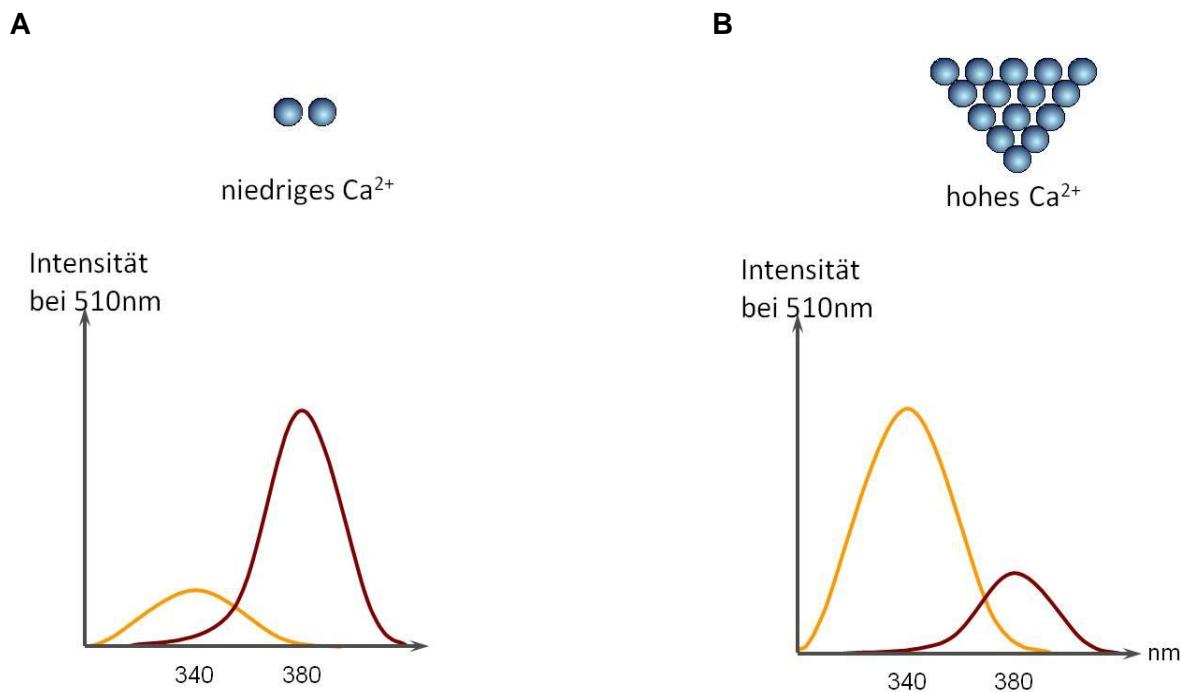


Abbildung 2-5

Je nach Höhe des Calciumspiegels zeigen sich unterschiedliche Absorptionsmaxima bei einer Wellenlänge von $\lambda=340$ (A) und $\lambda=380$ nm (B). Abbildung ohne Änderung nach Dr. Bernhard Friedrich Decard [24]

2.3.4. Analyse der Calciumwellenausbreitung

Die Calciumsignalausbreitung von der initial mechanisch stimulierten Zelle auf die „Erst“- bzw. „Zweitkranzzellen“ erfolgte anhand der Parameter: Amplitude, Zeitverzögerung, sowie der Prozentzahl „antwortende Zellen“ (Abbildung 2-6). Für die initial stimulierte Zelle und die „Erst“- bzw. „Zweitkranzzellen“ konnte im

Anschluss ein Mittelwert der oben genannten Parameter mit Standardabweichung (STW) berechnet werden.

Als „antwortende Zellen“ wurden die „Erst“- bzw. „Zweitkranzzellen“ bezeichnet, die nach mechanischer Stimulation der initialen Zelle einen Calciumanstieg mit einer Amplitude größer als 0,025 gegenüber dem Basalwert aufzeigten. Die weiteren Parameter wurden nur für antwortende Zellen berechnet.

Die Amplitude wurde wie folgt berechnet: $A = \text{Max}_{\text{ratio}} - \text{Min}_{\text{ratio}}$ ($\text{Min}_{\text{ratio}}: Y_1$, basaler Calciumspiegel der Zelle vor mechanischer Stimulation $\text{Max}_{\text{ratio}}: Y_2$, maximaler Calciumspiegel nach mechanischer Stimulation (vergleiche Abbildung 2-6) Die Amplitude aller Zellen wurde dann auf die Amplitude der Initialzelle normiert und in % angegeben. Die Zeitverzögerung errechnete sich aus der Subtraktion des Zeitpunktes des Calciumsanstieges der primär bzw. sekundär benachbarten Zelle (X_2) von Beginn der initialen Calciumsteigerung der stimulierten Zelle (X_1) entsprechend ($\Delta t = X_2 - X_1$).

Auswertungsparameter der Calciumwellenausbreitung nach primär mechanischer Zellstimulation:

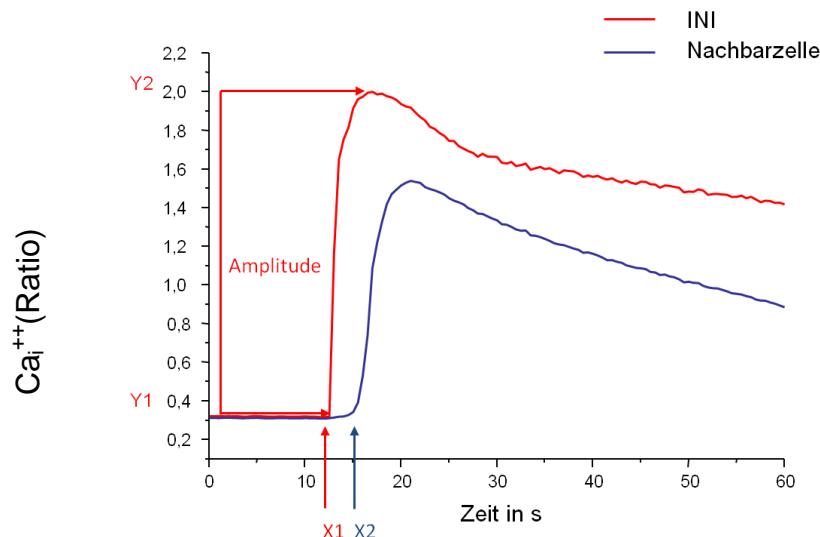


Abbildung 2-6

Auf der Y-Achse zeigt sich die Änderung der Ratio, die X-Achse bildet die Zeit ab. Rot zeigt die Änderung der Calciumkonzentration einer primär mechanisch stimulierten Zelle, blau zeigt beispielhaft die Zellantwort einer „Erstkranzzelle“.

2.4. Statistische Analyse

Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung einer experimentellen Gruppe angegeben. Statistische Vergleiche zweier experimenteller Serien untereinander wurden bei normalverteilten Daten mittels des t-Tests für ungepaarte Messwerte berechnet. Bei nicht normalverteilten Daten wurde statt dessen der Mann-Whitney Rangsummentest angewandt. Obwohl letzterer nicht die Mittelwerte sondern Verteilungen vergleicht, wurden in allen Fällen zur übersichtlicheren Darstellung die Mittelwerte angegeben. Bei mehreren gleichzeitig analysierten Datensätzen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt (bei nicht normalverteilten Daten: Kruskal Wallis ANOVA Rangsummentest mit nachfolgendem Tukey Test zum paarweisen Vergleich). Unterschiede wurden als statistisch signifikant erachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 5% betrug ($p<0,05$). Mehrere Versuchsdurchführungen an verschiedenen Zellen wurden als Wiederholungen gewertet und mit n angegeben ($n=x$). Die Versuche wurden in verschiedenen wells ($w=x$) mehrerer unabhängiger Kulturen (bei HUVEC: Nabelschnüren, $K=x$) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Connexinexpression in HeLa Cx37-Zellen

3.1.1. Nachweis der Cx37-Expression in HeLa Cx37 im Western Blot

(A) zeigt die Bande von Cx37 in Hela Cx37-Zellen auf einer Höhe von 37 kDa im Western Blot. Die Expression von Cx37 in HeLa Cx37-Zellen war unter NO (2 μ M SNAP, 20min) weder verändert, noch war die Bande verschoben. Als Negativkontrolle dienten HeLa-WT-Zellen, die keine Cx37 Bande aufwiesen. Zur Quantifizierung der aufgetragenen Proteinlademenge wurde Glycerinaldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Kontrolle verwendet (B). Die Auf trennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts erfolgte in einem 12%-Gel.

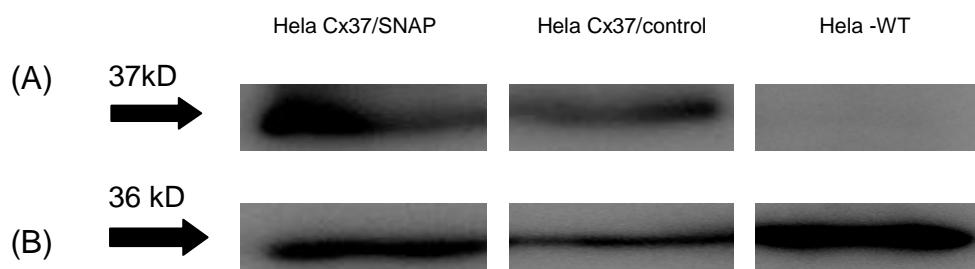


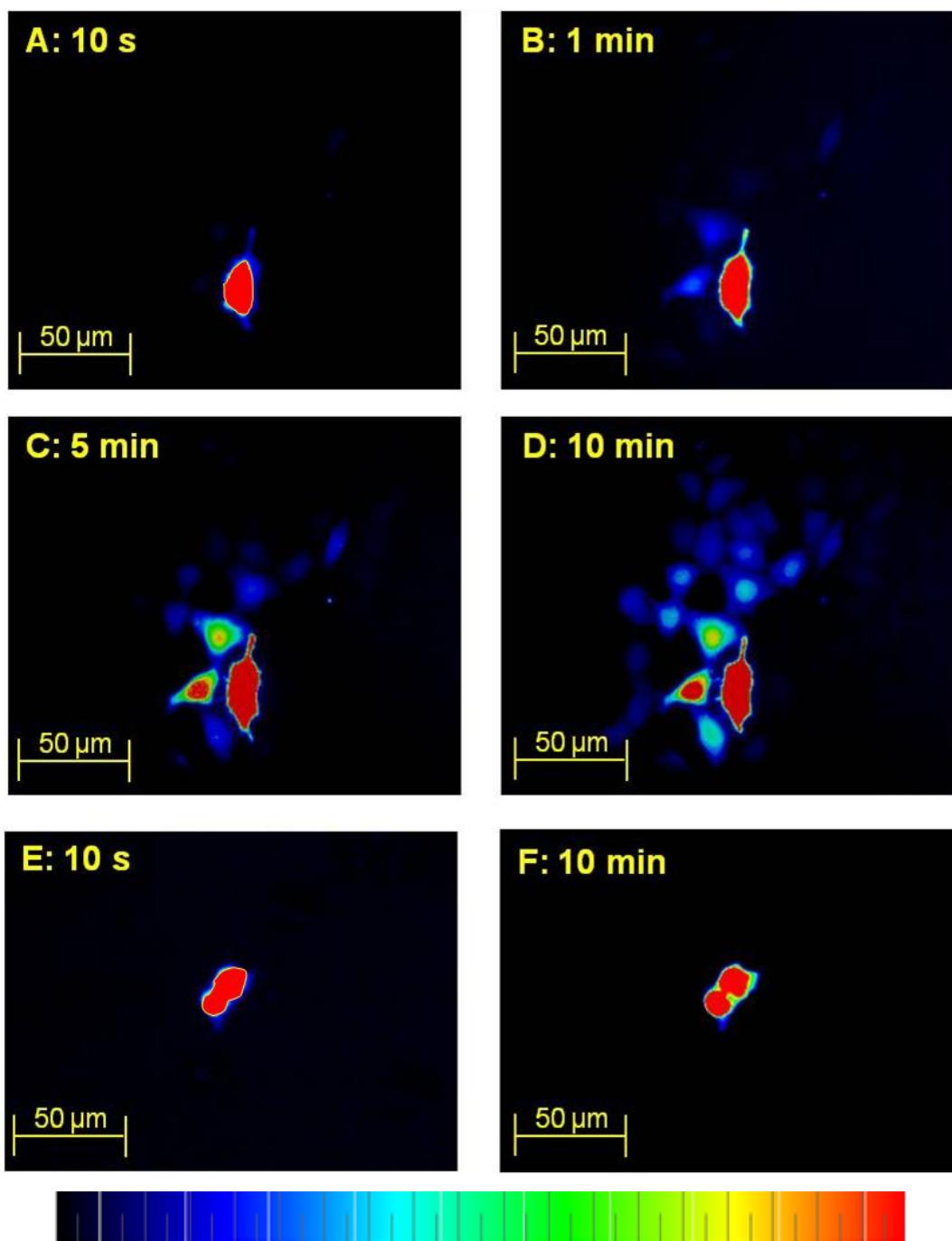
Abbildung 3-1

(A) Nach NO-Behandlung (2 μ M, 20 min) zeigte sich in HeLa Cx37-Zellen eine unveränderte Cx37-Protein-Expression (rabbit-anti Cx37) gegenüber unbehandelten HeLa Cx37-Zellen (control). HeLa WT-Zellen wiesen keine Cx37 Expression auf. (B) zeigt die GAPDH-Kontrolle (mouse-anti GAPDH). n=5

3.2. Funktionelle Gap Junction-Kopplung in HeLa Cx37-Zellen

3.2.1. Farbstoffausbreitung via Gap Junctions in HeLa Cx37-Cx43-Kokulturen

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sich ein gap-junction-gängiger Farbstoff Alexa Fluor 488 in HeLa Cx37 nur in geringem Ausmaß ausbreitet, weshalb der Nachweis einer funktionellen Zell-Zellkopplung über Cx37 an Kokulturen Hela Cx37 mit HeLa Cx43 geführt wurde. Zum erneuten Testen des Cx37-Kopplungsverhaltens wurden in dieser Arbeit Cx37-exprimierende HeLa-Zellen vor Anlegen der Ko-Kultur mit einer PKH-Anfärbung markiert, wohingegen Cx43 exprimierende Zellen ungefärbt blieben. Der Alexa Fluor 488 Farbstoff wurde in HeLa Cx37-Zellen injiziert, die Ausbreitung erfolgte auf benachbarte Cx43-exprimierende Zellen. Nach Injektion des Gap Junction-gängigen Farbstoffs Alexa Fluor 488 in eine HeLa Cx37-Zelle (A) konnte nach zehn Minuten eine Farbstoffausbreitung auf im Mittel 54% der direkt benachbarten „Erstkranzzellen“ nachgewiesen werden. Eine Anfärbung der „Erstkranzzellen“ erfolgte in der Regel bereits nach 40 Sekunden (B). Sekundär benachbarte Zellen („Zweitkranzzellen“) färbten sich nach durchschnittlich 3,5 Minuten an (C+D). Eine Anfärbung von Zellen, die keinen direkten oder indirekten Kontakt (sekundäre Zellen) zur initial injizierten Zelle hatten, wurde in diesen Versuchen nicht beobachtet. Die Farbstoffausbreitung auf direkt sowie indirekt benachbarte Hela Cx43 exprimierende Zellen nach primärer Injektion des Farbstoffs in eine Cx37 exprimierende Zelle war mit der Farbstoffausbreitung in Hela Cx43-Monokulturen vergleichbar (vergleiche Abbildung 3-3). In Cx-defizienten HeLa-WT Kulturen breitete sich der Gap Junction-gängige Farbstoff nicht auf Nachbarzellen aus (E+F).

**Abbildung 3-2**

Der Anstieg des Farbstoffsignals ist als Farbumschlag von blau (basale Konzentration), über türkis, grün, gelb, orange bis nach rot (höchste Konzentration) kodiert. Dunkle oder schwarze Areale sind nicht zwingend zellfrei, sondern sind Bereiche mit fehlendem Farbstoffsignal. Nach primärer Injektion des Farbstoffs Alexa Fluor 488 in eine Cx37-exprimierende HeLa-Zelle zeigt sich zunächst ein eindeutiger Farbstoffnachweis in der primär injizierten Zelle (A). Nach einer Minute färbt sich bereits ein Teil der primär benachbarten Zellen an. (B) Nach 5 bzw. 10 Minuten ist eine weitere Farbstoffausbreitung auch auf die indirekt benachbarte Zellen (C und D) nachweisbar. Nach Farbstoffinjektion in eine Hela WT-Zelle (E) ohne Gap junctions erfolgt auch nach 10 Minuten Beobachtungsdauer keine Farbstoffausbreitung auf angrenzende Zellen (F). 2 Kulturen, n=8.

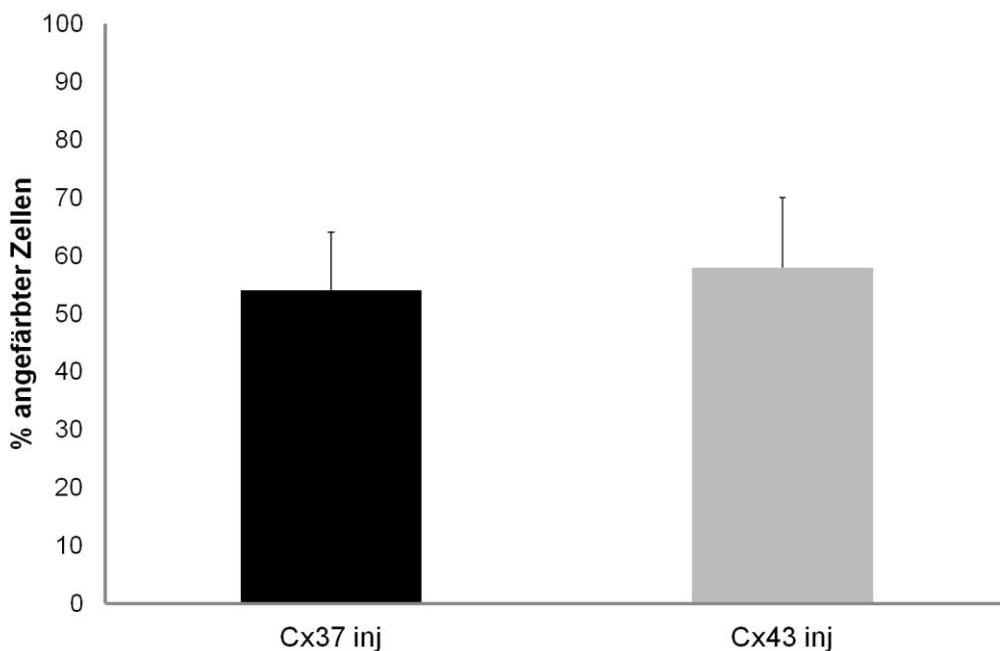


Abbildung 3-3

Farbstoffausbreitung von Alexa Fluor 488 in HeLa Cx37/Cx43 Kokulturen bzw. HeLa Cx43-Monokulturen. Nach primärer Injektion des Farbstoffs in eine Cx37-exprimierende Zelle (Cx37 inj) ist die Farbstoffausbreitung nach 10 Minuten auf angrenzende HeLaCx43-Zellen (circa 54% der Zellen im Gesichtsfeld fluoreszieren) mit der Farbstoffausbreitung in HeLa Cx43-Monokulturen (Cx43 inj) vergleichbar (circa 58% der Zellen im Gesichtsfeld fluoreszieren). 2 Kulturen, n= 8.

3.2.2. Calciumwellenausbreitung in HeLa Cx37-Cx43-Monokulturen

In HeLa Cx37- bzw. Cx43-Monokulturen wurde jeweils eine Zelle mechanisch stimuliert. Dies führte in der stimulierten Zelle zu einem sofortigen Calciumanstieg (Ratio: Amplitude Cx37 initial mechanisch stimuliert $0,45 \pm 0,32$, Ratio: Amplitude Cx43 initial mechanisch stimuliert $0,57 \pm 0,27$). Unter Kontrollbedingungen breitete sich nach mechanischer Stimulation einer Cx37-Zelle das Calciumsignal auf ca. 57% der benachbarten „Erstkanzzellen“ und ca. 13 % der Zweitkranzzellen aus. Nach Stimulation einer Cx43-Zelle zeigte sich ein Calciumanstieg in ca. 70% der Erstkanzzellen (*: p < 0,05), wohingegen die Anzahl der antwortenden Zweitkranzzellen mit den Cx37-Zellen mit ca. 15 % vergleichbar war (n=17). Nach primär mechanischer Stimulation bestand also bereits vor NO Behandlung ein signifikanter Unterschied in der Zellkopplung zwischen Cx37 und Cx43-HeLa-Kulturen in den Erstkanzzellen, nicht jedoch in den Zweitkranzzellen.

Unter NO-Behandlung änderte sich die Calciumamplitude der primär stimulierten Zelle nicht (Ratio: Amplitude Cx37 initial mechanisch stimuliert + NO: $0,55 \pm 0,25$; Ratio: Amplitude Cx43 initial mechanisch stimuliert + NO: $0,57 \pm 0,13$, n=17). Jedoch kam es nach mechanischer Stimulation einer HeLa Cx37-Zelle unter NO zu einer statistisch signifikanten Reduktion der mit einem Calcium-Anstieg antwortenden „Erstkranzzellen“ um 33%, sowie zu einer statistisch signifikanten Reduktion der mit einem Calciumanstieg reagierenden „Zweitkranzzellen“ um 85%. Im Gegensatz dazu ließ sich nach mechanischer Stimulation einer HeLa Cx43-Zelle kein signifikanter Unterschied der Calciumsignalausbreitung vor und nach NO-Vorbehandlung beobachten.

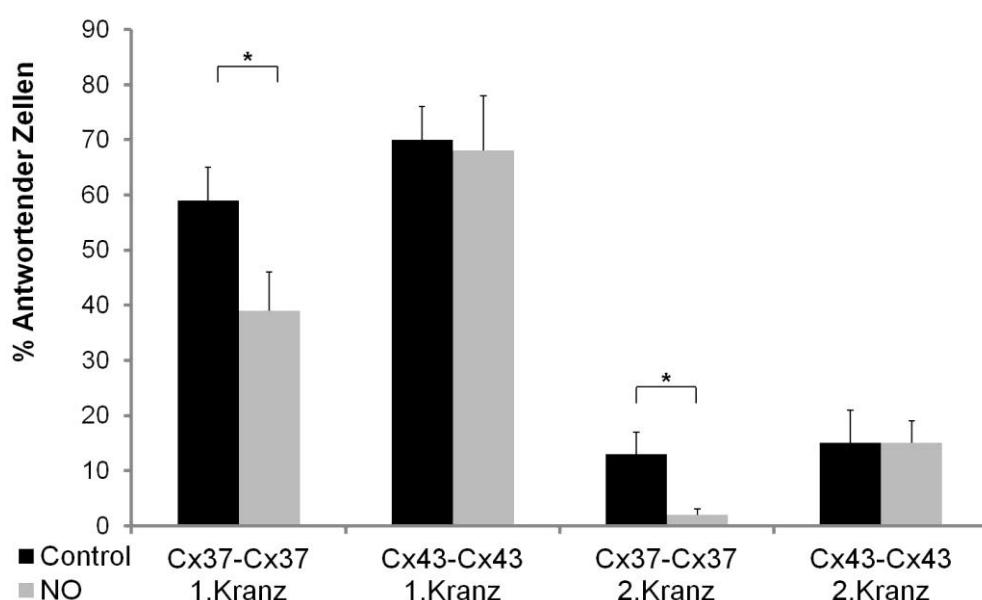


Abbildung 3-4

Calciumsignalausbreitung in HeLa Cx37 bzw.Cx43-Monokulturen nach mechanischer Stimulation. In HeLa Cx37-Kulturen kam es nach NO-Vorbehandlung zu einem signifikanten Abfall ($p<0,05$ *) der Calcium Ausbreitung (= Prozentsatz der mit einem Calcium Anstieg antwortenden Zellen im ersten und zweiten Kranz), während in HeLa Cx43-Kulturen nach Stimulation die Zahl antwortender Zellen nach NO-Behandlung unverändert blieb. 3 Kulturen; n=17.

3.3. Calciumwellenausbreitung in HUVEC

3.3.1. Mechanische Stimulation und Ausbreitung des Calciumsignals in HUVEC/HUVMSC

Nach mechanischer Stimulation einer einzelnen HUVEC (A) ließ sich mit einer Zeitverzögerung von weniger als 500 ms ein Calciumanstieg in dieser Zelle beobachten (B). Direkt im Anschluss breitete sich ein Calciumsignal entlang der Zellausläufer der initial stimulierten Zelle (C) zu deren unmittelbaren Nachbarzellen aus, die wiederum als „Erstkranzzellen“ definiert wurden (D). Mit einer zeitlichen Verzögerung von durchschnittlich 4 bis 5 Sekunden stieg im Anschluss auch der intrazelluläre Calciumspiegel in „Zweitkranzzellen“ an, die keinen unmittelbaren Kontakt zur initial stimulierten Zelle aufwiesen (E und F). Die Zeitverzögerung hing in erster Linie von der Distanz zur initial stimulierten Zelle ab. Im Mittel umgaben die mechanisch stimulierte Zelle 5 Erstkranzzellen und 8 Zweitkranzzellen ($n=18$).

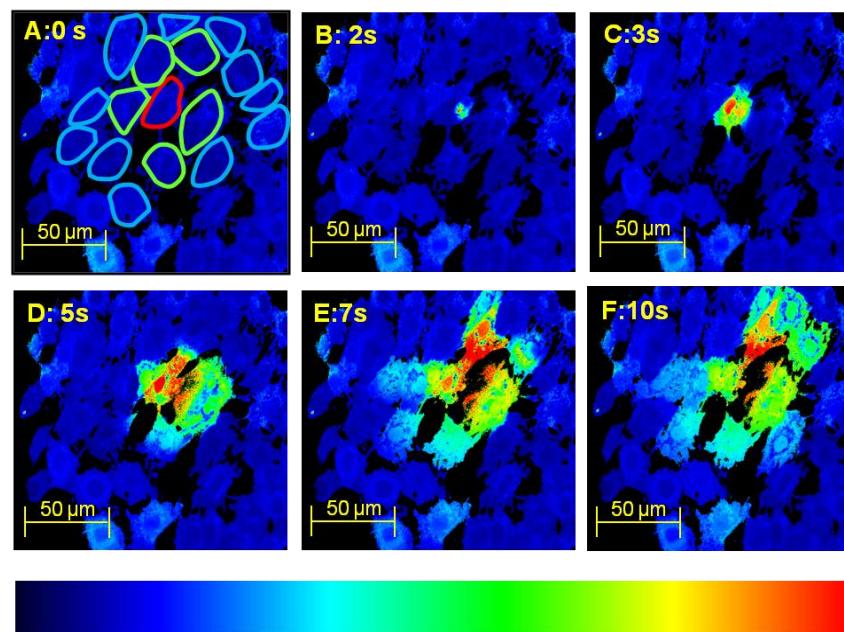


Abbildung 3-5

Der Anstieg der Calciumkonzentration ist als Farbumschlag von blau (basale Konzentration), über türkis, grün, gelb, orange bis nach rot (höchste Konzentration) kodiert. Dunkle oder schwarze Areale sind nicht zwingend zellfrei, sondern sind Bereiche mit sehr niedrigem Calciumsignal. Gezeigt ist die Ausbreitung einer Calciumwelle nach initialer mechanischer Stimulation einer Einzelzelle. Rot umrahmt (keine exakten Zellgrenzen dargestellt) ist die primär mechanisch stimulierte Zelle, grün bzw. blau umrahmt sind die Erstkranz- bzw. Zweitkranzzellen. Nach mechanischer Stimulation kam es zu einem Anstieg des Calciumspiegels in der mechanisch stimulierten Initialzelle (B +C). Zeitlich versetzt antworten die Zellen des ersten (grün) bzw. zweiten Kranzes (blau).

Abbildung 3-6 zeigt den zeitlichen Verlauf des Calciumsanstiegs nach mechanischer Stimulation in der initialen Zelle (Linie rot) und in den „Erst-“ (Linien grün) bzw. „Zweitkranzzellen“ (Linien blau) in einer Zellkultur. Die Amplitude nahm vom ersten bis zweiten Kranz ab zudem reagierten die Erst- und Zweitkranzzellen später mit dem Calciumanstieg als die initiale Zelle. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur die Calciumwellenausbreitung auf den ersten und zweiten Kranz analysiert, obwohl in Einzelfällen auch eine Ausbreitung auf die noch weiter entfernten Zellkränze drei und vier ebenfalls zu beobachten war.

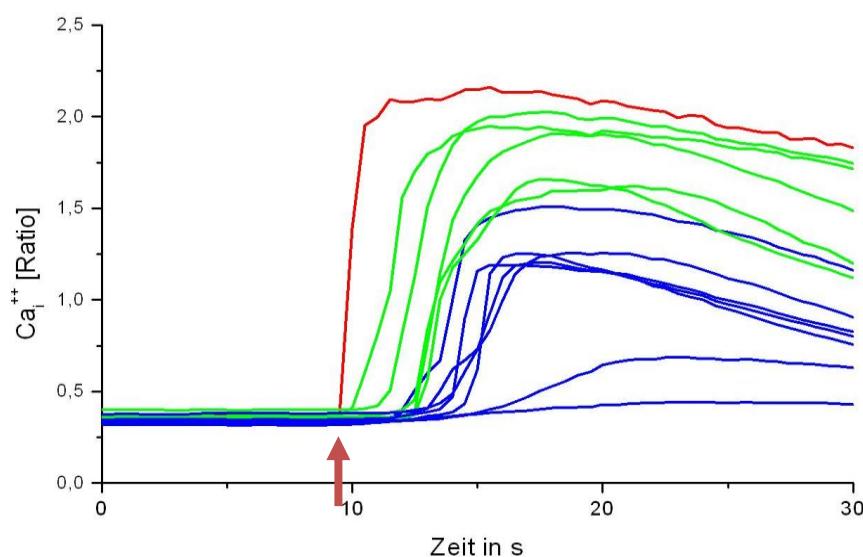


Abbildung 3-6

Gezeigt ist der typische mittlere zeitliche Verlauf des Calciumanstiegs nach mechanischer Stimulation einer Initialzelle (Linie rot) sowie in den Zellen des ersten (grün) und zweiten Kranzes (blau). Es zeigt sich ein deutlicher Abfall der Ca^{2+} -Amplitude der Zellen in den Erst- bzw. Zweitkranzzellen. Der rote Pfeil stellt den Zeitpunkt der mechanischen Stimulation dar. Die Kontrollzellen im ersten und zweiten Kranz antworteten zeitlich verzögert (Zunahme der Zellantwort Δt).

3.3.2. Effekte einer Blockade der Gap Junction-Kopplung mit Meclofensäure

Abbildung 3-7 zeigt die Calciumsignalausbreitung unter Meclofensäureblockade. Nach mechanischer Stimulation einer Einzelzelle (A: Zelle ini rot umrahmt) unterblieb die Signalausbreitung auf benachbarte „Erstkranzzellen“ (grün umrahmt), sowie „Zweitkranzzellen“ (blau umrahmt) nahezu vollständig, wohingegen die primär stimulierten Zelle ein eindeutiges Calciumsignal aufwies (B).

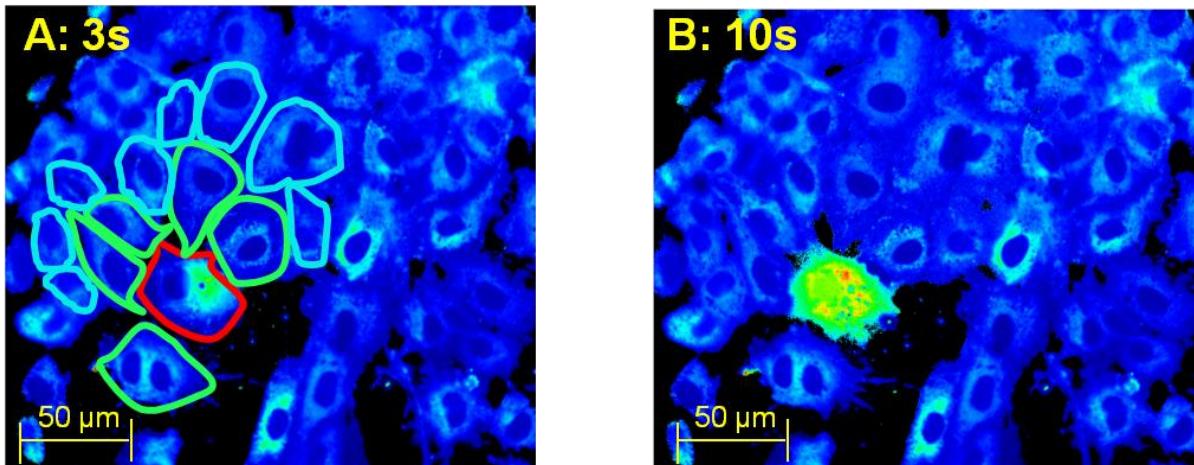
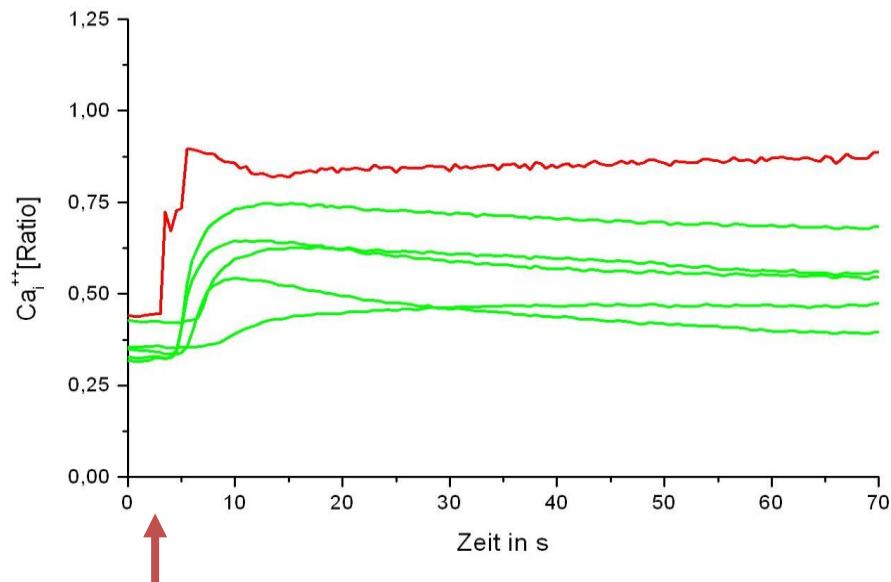
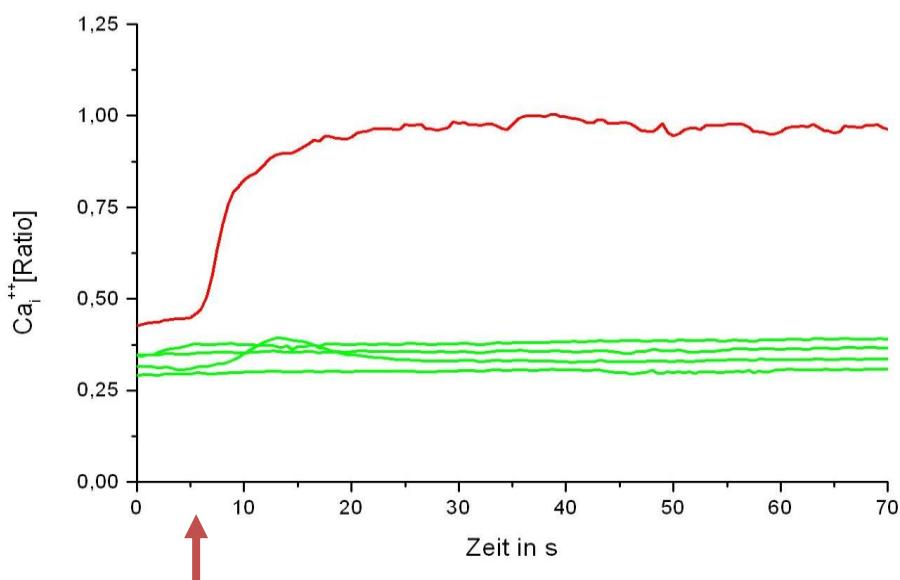


Abbildung 3-7

Calcium-Anstieg nach mechanischer Stimulation unter GJ-Blockade: Rot umrahmt zeigt sich die initial mechanisch stimulierte Zelle mit bereits leicht ansteigendem Calciumspiegel nach mechanischer Stimulation; grün umrahmt dargestellt sind die umgebenden Zellen des ersten Kranzes bzw. blau umrahmt die Zellen des zweiten Kranzes: Nach 20 s Versuchsdauer wies die initial stimulierte Zelle ein sehr deutliches Calciumsignal auf, wohingegen die Calciumwellenausbreitung auf die „Erst-“ (grün) und „Zweitkranzzellen“ (blau) ausblieb.

Abbildung 3-8 zeigt den zeitlichen Verlauf des Calciumanstieges dieses repräsentativen Versuchs nach mechanischer Stimulation unter Hemmung der Gap Junctions (B) bzw. unter Kontrollbedingungen (A). Nach Meclofensäurevorbehandlung zeigte sich ein deutlicher Calciumanstieg in der initial mechanisch stimulierten Zelle, der mit der unbehandelten Kontrolle vergleichbar war. Im konkreten Beispiel antwortete jedoch nur noch eine Zelle des ersten Kranzes nach Gap Junction-Blockade mit einem Calcium Anstieg.

A Kontrolle**B Meclofensäure****Abbildung 3-8**

Dargestellt ist der Calciumanstieg in HUVEC in einem repräsentativen Versuch nach mechanischer Stimulation ohne (A) und mit Gap Junction Blockade (B). Unter Meclofensäureblockade (B) antwortet die Mehrheit der Erstkranzzellen nicht, wohingegen sich eine deutliche Signalantwort der primär mechanisch stimulierten Zelle zeigte (Linie rot). Der rote Pfeil stellt den Zeitpunkt der mechanischen Stimulation dar. Die Kontrollzellen im ersten Kranz antworteten gering zeitlich verzögert mit hohem Calciumsignal (A).

Die Hemmung der Gap Junctions mit Meclofensäure führte in der Gesamtauswertung nach dem Calciumanstieg in der primär mechanisch stimulierten Zelle zu einer Reduktion der antwortenden Zellen auf 33% im ersten Kranz und <10% im zweiten Kranz (siehe Abbildung 3-9). Die Amplitude des Calciumanstiegs der initial mechanisch stimulierten Zelle war mit unbehandelten Kontrollzellen vergleichbar. In den noch antwortenden Zellen des ersten Kranzes zeigte sich jedoch eine signifikante Verzögerung des Signals, wohingegen keine signifikante Auswirkung auf die Amplitude des intrazellulären Signals zu verzeichnen war (Tabelle 3-1). Aufgrund der geringen Calciumwellenausbreitung auf die Zellen des zweiten Kranzes wurde der niedrige Anteil noch antwortender Zellen nicht in die Auswertung der übrigen Einzelparameter miteinbezogen.

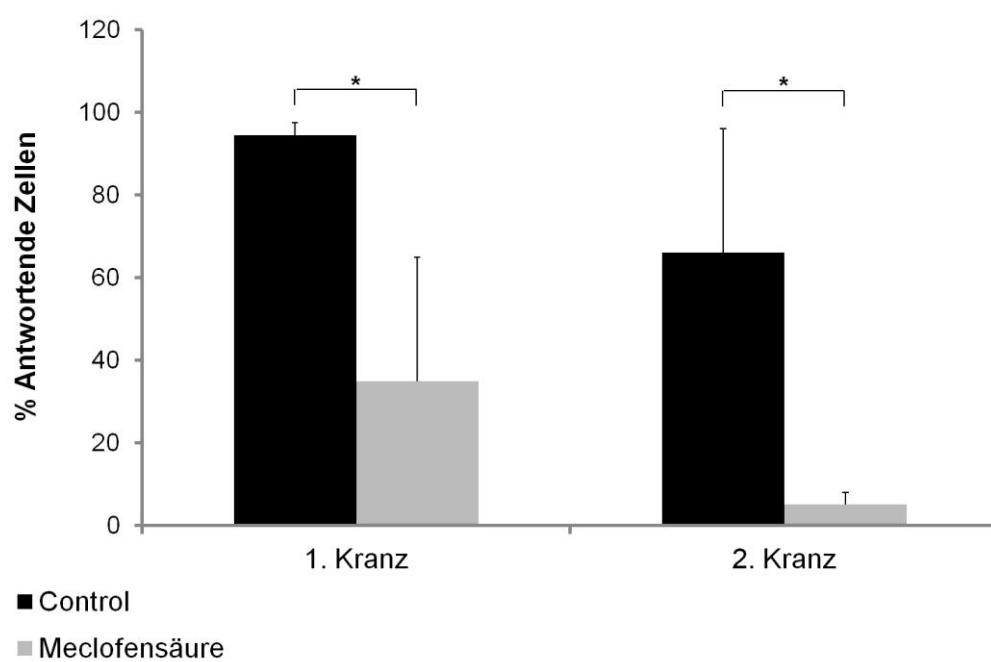


Abbildung 3-9

Nach Blockade der Gap Junctions mit Meclofensäure antworteten die Mehrheit der Erst- bzw. Zweitkranzzellen nicht mehr. 2 Versuchstage, 2 Kulturen, n=18, p<0,05 *.

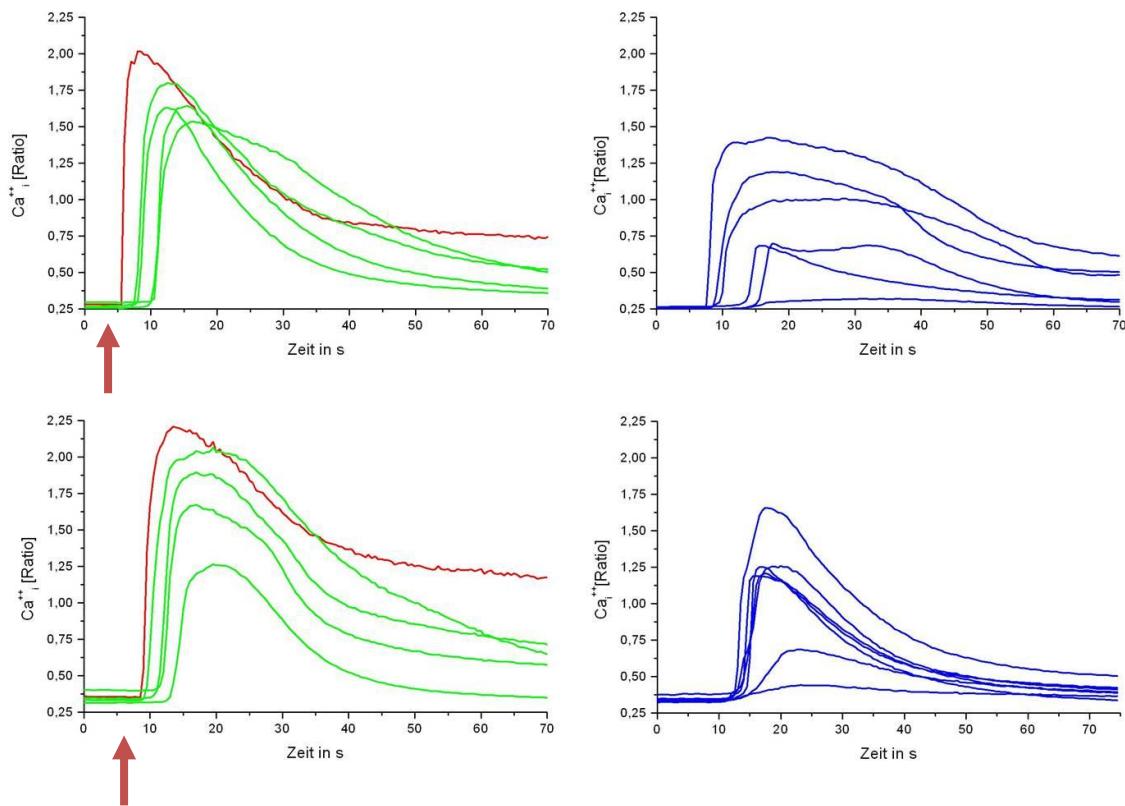
	Kontrolle 1.Kranz (MW ± STW)	Meclofensäure 1.Kranz (MW ± STW)
Ampl. Norm	51 ± 25	40 ± 37
Δ t in s	2,2 ± 1,7 *	2,9 ± 4,0 *

Tabelle 3-1

Effekt der Gap Junction Blockade in HUVEC nach mechanischer Stimulation auf die Calciumdynamik der noch antwortenden Zellen des ersten Kranzes. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der Zeitverzögerung bis zum Calciumanstieg in den Erstkranzzellen (Δt), $p < 0,05$ *, wohingegen die Amplitude (Amp. norm.) nicht signifikant verändert ist. 2 Versuchstage, 2 Kulturen, $n=18$;

3.3.3. Calciumwellenausbreitung in HUVEC nach Vorbehandlung mit dem exogenen NO-Donor SNAP

Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch der Calciumsignalausbreitung nach zusätzlicher Inkubation mit dem exogenen NO Donor SNAP (2 μ M/20 min) an der gleichen Zellpopulation. NO veränderte weder die Amplitude noch die Anzahl der reagierenden „Erst“ bzw „Zweitkranzzellen“

**Abbildung 3-10**

Durch die rote Linie dargestellt ist die Calciumantwort der primär mechanisch stimulierten Zelle unter Kontroll- bzw. NO-Bedingungen. Der rote Pfeil stellt den Zeitpunkt der mechanischen Stimulation der Initialzelle dar.

Durch die grünen bzw. blauen Linien ist der Calciumsignalverlauf in den Erst (grün)- bzw. Zweitkranzzellen (blau) abgebildet. Es zeigte sich nach NO-Behandlung kein signifikanter Effekt auf die Calciumwellenausbreitung.

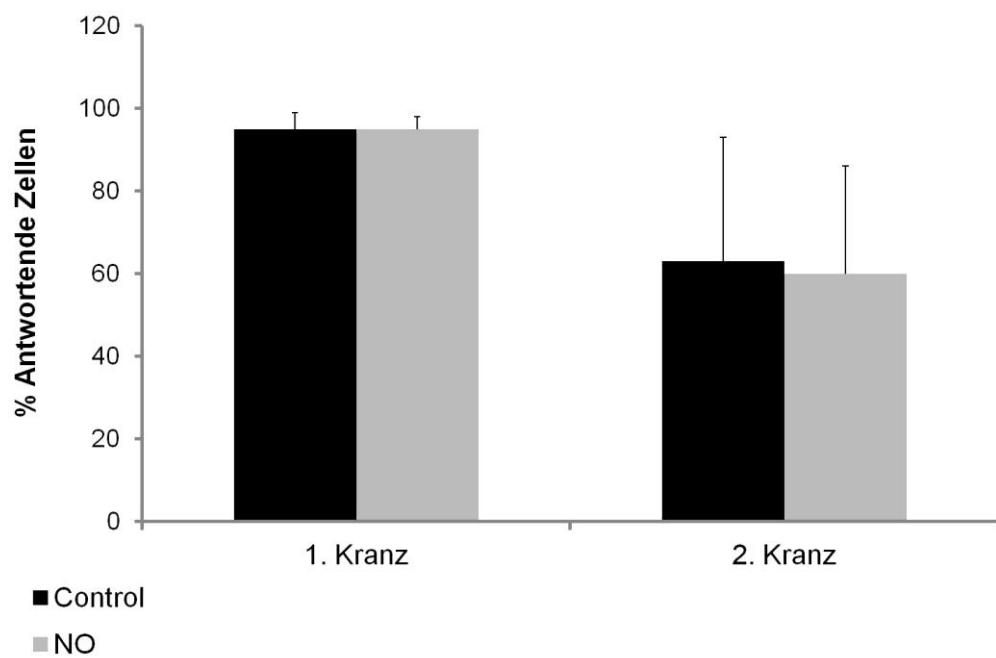
Eine Vorbehandlung mit dem NO-Donor SNAP zeigte in HUVEC im Gegensatz zu den HeLa Cx37-Zellen keinen Effekt auf die Calciumwellenausbreitung (siehe Abbildung 3-11, Tabelle 3-2). Sowohl die Zahl antwortender Zellen nach NO-Behandlung (Abbildung 3-11), wie auch die Amplitude waren gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe unverändert. Allerdings war nach NO-Behandlung eine Zunahme der zeitlichen Latenz bis zum Beginn eines Calciumanstiegs im ersten sowie zweiten Kranz zu beobachten (Abbildung 3-12). NO zeigte also in der Gesamtauswertung außer einer zeitlichen Verzögerung keinen signifikanten Effekt auf die Calciumsignalausbreitung in Endothelzellen.

	1.Kranz		2.Kranz	
	Kontrolle MW± STW	SNAP MW± STW	Kontrolle MW± STW	SNAP MW± STW
Ampl. Norm	40 ± 18	34 ± 11	24 ± 24	22 ± 13
Δ t in s	3,2 ± 2,10	4,2 ± 1,8 *	5,2 ± 2,9	7,2 ± 4,9 *

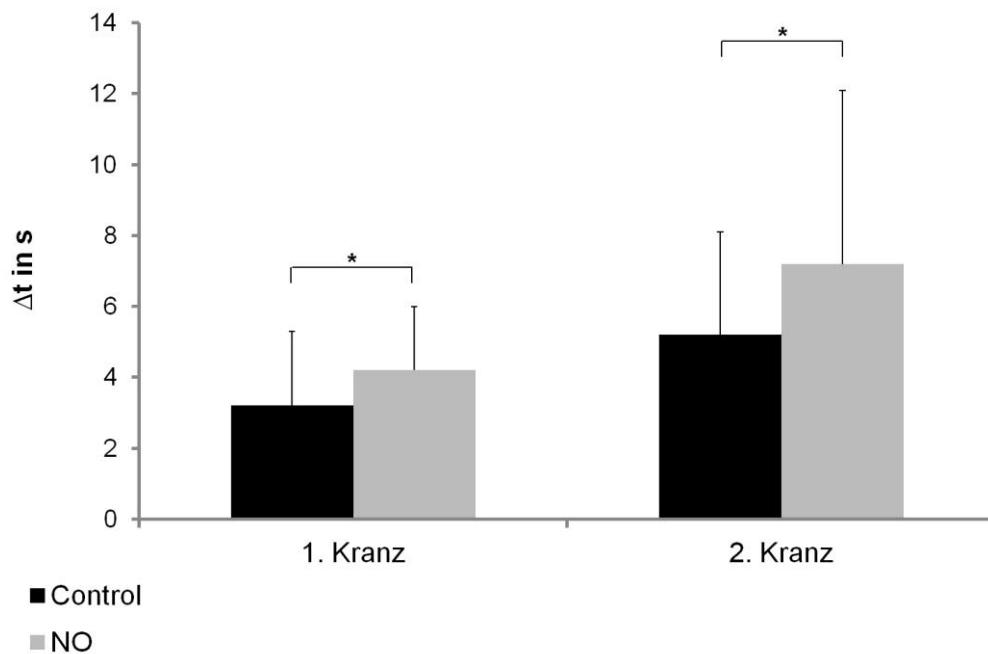
Tabelle 3-2

Calciumwellenausbreitung in HUVEC unter Kontroll- und NO-Bedingungen. NO zeigte in HUVEC abgesehen von einer Zunahme der Zeitverzögerung ($p<0,05^*$ gegen Kontrolle) keine signifikante Wirkung auf die Calciumwellenausbreitung.

Amplitude (Amp. Norm), Zeitverzögerung bis zum Fluoreszenzanstieg (Δt), 4 Kulturen, n=18.

**Abbildung 3-11**

Nach NO-Behandlung war die Anzahl der mit einem Calcium-Anstieg antwortenden Zellen im ersten und zweiten Kranz gegenüber der Kontrollgruppe nahezu gleich. 4 Kulturen, n=18.

**Abbildung 3-12**

Nach NO Behandlung war die Calciumsignalausbreitung auf angrenzende „Erst-“ und „Zweitkranzzellen“ zeitlich signifikant verzögert. 4 Kulturen, n=18.

3.3.4. Connexinexpression HUVEC nach Downregulation von Cx43 mittels small interference RNA

Eine Downregulation von Cx43 mittels si43_RNA wurde mit mehreren siRNAs durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die beste Hemmung der Cx43-Expression (um ca. 80 %) wurde mit si43_2 (target sequence: ATGCTTAGAGTGGACTATTAA) nach 24h Behandlung erzielt. Abbildung 3-13 zeigt einen repräsentativen Western Blot.

Die Downregulation durch siRNA wurde in allen Zellkulturen in denen die Calciumausbreitung untersucht wurde, kontrolliert. Eine Behandlung von HUVEC ausschließlich mit Kontroll-si-RNA (Ctrl_siRNA, target sequence: AATTCTCCGAACGTGTCACGT) führte zu keiner Cx43-Expressionsreduktion und die Cx43-Expression in diesen Zellen war mit der von unbehandelten HUVEC vergleichbar.

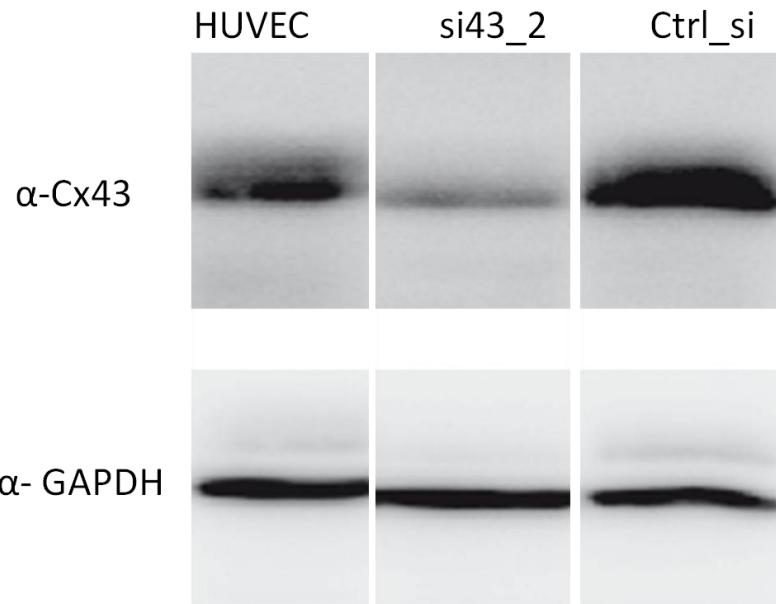


Abbildung 3-13

Im Western Blot (Bahnen aus 3 separaten blots) sieht man nach Vorbehandlung mit si43_RNA (si43_2) eine deutliche Reduktion der Cx43-Expression (>80%) gegenüber den unbehandelten bzw. mit Kontroll si_RNA vorbehandelten HUVEC (A). Die jeweilige GAPDH Kontrolle (B) dient der quantitativen Beurteilung der aufgetragenen Proteinmenge bzw. zur Normierung.

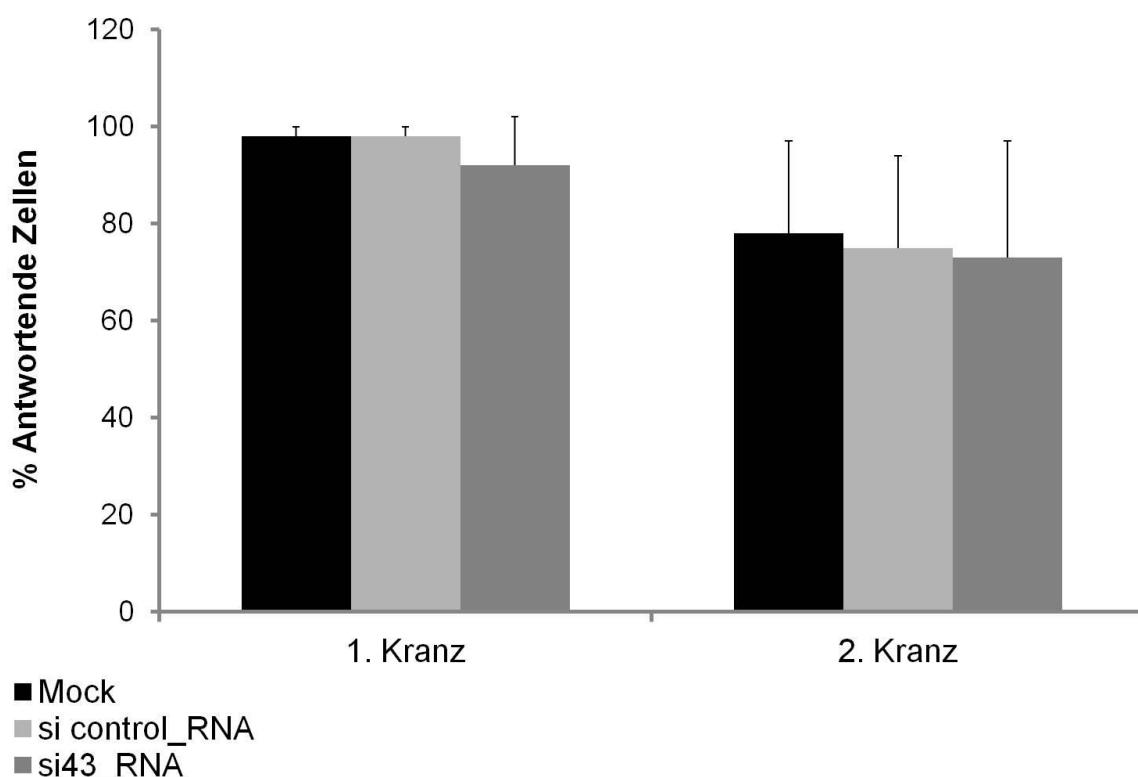
3.3.5. Effekt der Cx43 Suppression durch si-RNA auf die Calciumausbreitung in HUVEC

Weder nach Vorbehandlung der HUVEC mit dem bloßen Transfektionsreagenz (MOCK), noch mit Control-siRNA konnten hemmende Einflüsse auf die Calciumwellenausbreitung beobachtet werden (siehe Tabelle 3.3). Die Anzahl antwortender Zellen unterschied sich in Cx43-downregulierten HUVEC nicht von den in den Kontrollgruppen (Abbildung 3-14). Es bestanden auch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Amplitude und der Verzögerung des Calcium-Anstiegs in den Nachbarzellen (Tabelle 3-3). Insgesamt war also bezüglich der untersuchten Parameter kein Effekt der Downregulation von Cx43 auf die Calciumwellenausbreitung zu beobachten.

	1. Kranz			2.Kranz		
	Mock	Control – Si-RNA	Si43-RNA	Mock	Control-Si_RNA	Si43_RNA
	MW+STW	MW+STW	MW+STW	MW+ STW	MW+STW	MW+STW
Ampl.Norm	69 ± 20	64 ± 25	57 ± 30	32 ± 21	28 ± 19	20 ± 16
Δt in s	2,1 ± 1,1	1,9 ± 1,2	2,5 ± 1,8	3,5 ± 0,8	4,6 ± 2,2	4,3 ± 1,1

Tabelle 3-3

Die Calciumsignalausbreitung in HUVEC ist nach Vorbehandlung mit MOCK bzw. Control-si_RNA vergleichbar mit si43_RNA behandelten Zellen. Amplitude (Amp. norm.), Zeitverzögerung bis zum Fluoreszenzanstieg (Δt), 2 Kulturen, n=6.

**Abbildung 3-14**

Nach si_43 RNA Behandlung zeigte sich kein Kopplungshemmender Einfluss, gegenüber nur mit dem Transfektionsreagenz vorbehandelten HUVEC (= Mock Kontrolle) bzw. mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen (= si control_RNA). 2 Kulturen, n=6.

3.3.6. Calciumsignalausbreitung in HUVEC nach Suppression von Cx43 unter Vorbehandlung mit NO

Dargestellt ist ein Beispielversuch der Calciumwellenausbreitung in si43-behandelten Zellen mit und ohne NO. Nach mechanischer Stimulation zeigte sich in beiden Fällen ein eindeutiges Calciumsignal in der primär stimulierten Zelle. Nun verringerte jedoch NO deutlich die Anzahl der antwortenden „Erstkranz-“ und „Zweitkranzzellen“.

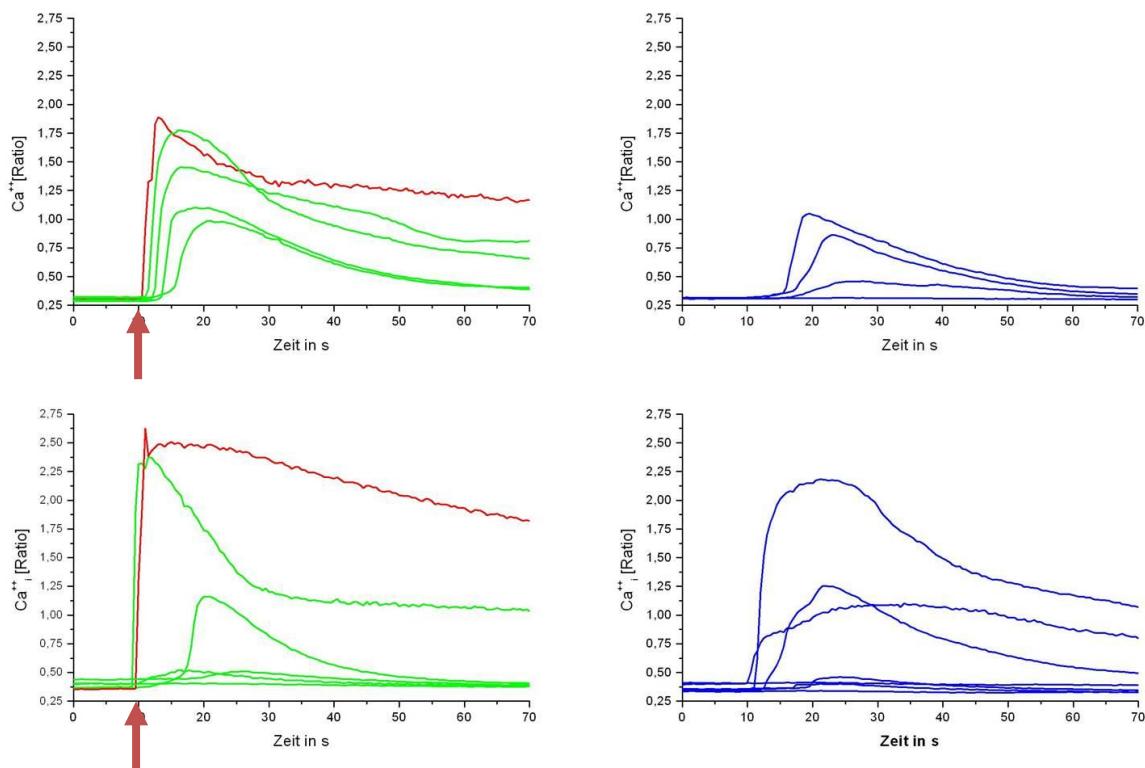
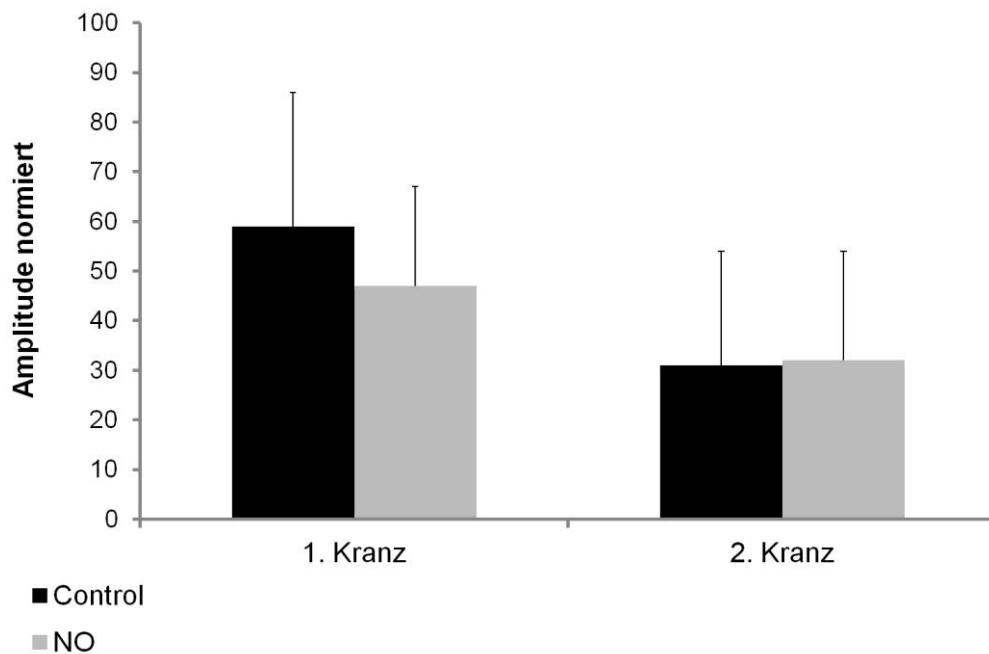


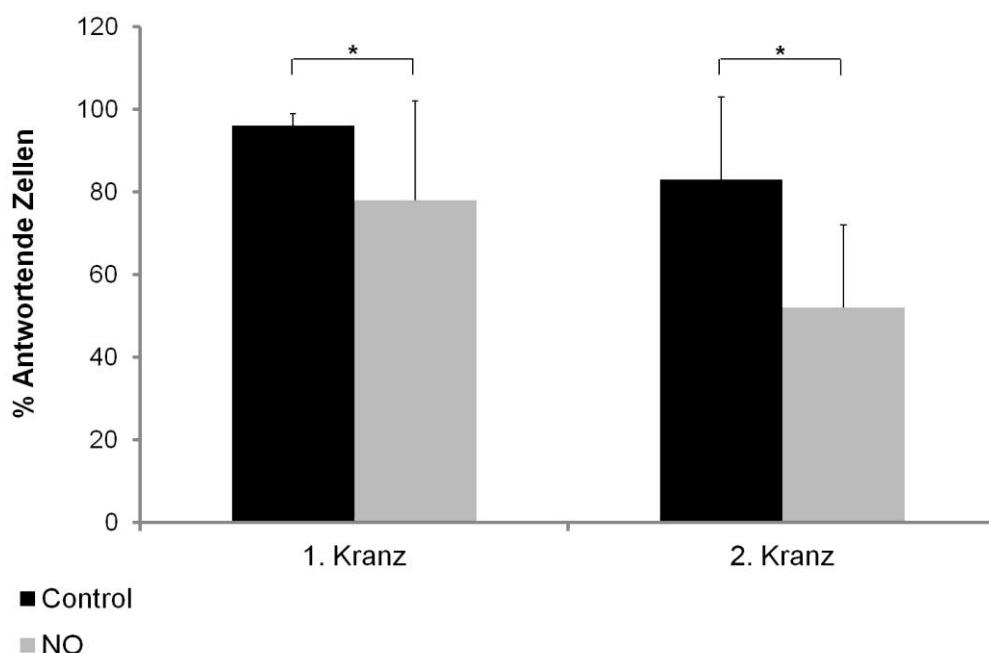
Abbildung 3-15

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des Calciumanstieges in der primär mechanisch stimulierten Zelle (Linie rot) sowie in den Zellen des ersten (grün) bzw. zweiten Kranzes (blau) nach Cx43-Downregulation. Durch den roten Pfeil dargestellt ist der Zeitpunkt der mechanischen Stimulation der Initialzelle. Nach Downregulation von Cx43 reduzierte NO den Anteil antwortender Zellen sowohl in den Zellen des ersten wie auch des zweiten Kranzes nun auch in Endothelzellen.

In der Gesamtauswertung kam es nach Vorbehandlung der HUVEC mit si43_RNA unter zusätzlicher Inkubation mit dem NO-Donor SNAP (SNAP 2 μ M, Behandlungs-dauer 15 min vor Beginn der Calciummessung) in erster Linie zu einer signifikanten Reduktion antwortender „Erst-“ bzw. „Zweitkranzzellen“ (siehe Abbildung 3-17). Die übrigen Auswertungsparameter waren nach NO-Behandlung nicht signifikant verändert (Abbildung 3-16, Tabelle 3-4).

**Abbildung 3-16**

Die Amplitude der noch reagierenden Zellen ist durch NO in HUVEC nach Downregulation von Cx43 nicht signifikant verändert. 3 Kulturen, 6 wells, n=21.

**Abbildung 3-17**

Nach Downregulation von Cx43 und NO-Behandlung zeigte sich eine signifikante Abnahme des Anteils antwortender Zellen von 96% auf 78% im ersten Kranz, sowie von 83% auf 52% im zweiten Kranz; 3 Kulturen, 6 wells, n=21; $p < 0,05^*$

	1.Kranz		2.Kranz	
	Kontrolle MW ± STW	SNAP MW ± STW	Kontrolle MW ± STW	SNAP MW ± STW
Ampl. Norm	59 ± 27	47 ± 21	31 ± 23	32 ± 22
Δ t in s	3,0 ± 0	3,0 ± 0	4,3 ± 0,3	4,0 ± 0,2

Tabelle 3-4

Nach NO-Behandlung zeigte sich in Cx43 downregulierten HUVEC kein Einfluss auf die Calcium-Amplitude (Amp. norm.), sowie die Zeitverzögerung bis zum Fluoreszenzanstieg (Δt) in den noch reagierenden Zellen. 3 Kulturen, 6 wells, n=21.

3.4. Myoendothiale Gap Junctions

3.4.1. Calciumwellenausbreitung in HUVSMC/HUVEC-Kokulturen

Untersuchungen zum Kopplungsverhalten von glatten Muskelzellen und Endothelzellen wurden in Kokulturen, die separat aus menschlichen Nabelschnüren gewonnen wurden, durchgeführt. Eine Unterscheidung zwischen Endothel- und glatten Muskelzellen war nach Anfärbung der HUVEC-Zellen mit dem Farbstoff PKH 26 eindeutig möglich.

Nach mechanischer Stimulation einer glatten Muskelzelle antworteten $93 \pm 6\%$ (n=21) der angrenzenden glatten Muskelzellen, sowie nach NO Behandlung $86 \pm 6\%$. Nach primärer Stimulation einer Endothelzelle antworteten $97 \pm 2\%$ (n=21), sowie nach NO-Behandlung $95 \pm 3\%$ der angrenzenden Endothelzellen.

Ein NO-Effekt auf die interzelluläre Calciumsignalausbreitung in homogenen Zellpopulationen (EC-EC, SMC-SMC) konnte also nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3-18 EC/EC, SMC/SMC). Betrachtete man jedoch die Calciumausbreitung zwischen Endothel und glatten Muskelzellen so zeigte sich dort unter NO nach Stimulation einer glatten Muskelzelle eine signifikante Abnahme der benachbarten Endothelzellen die mit einer Calciumantwort reagierten von 56% auf 20% (Abbildung 3-18, SMC/EC).

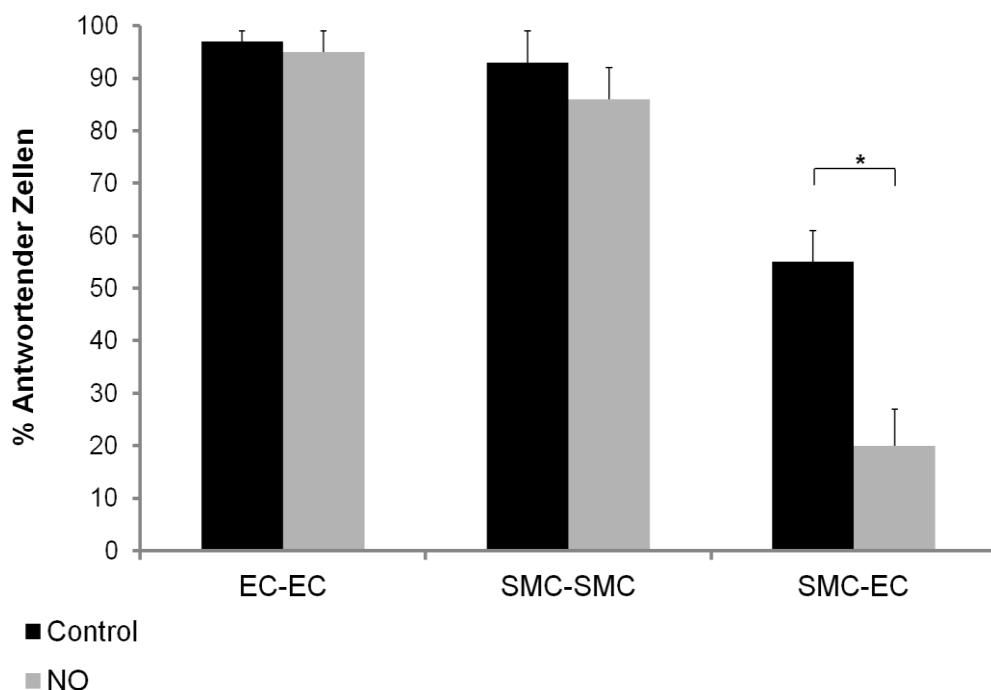
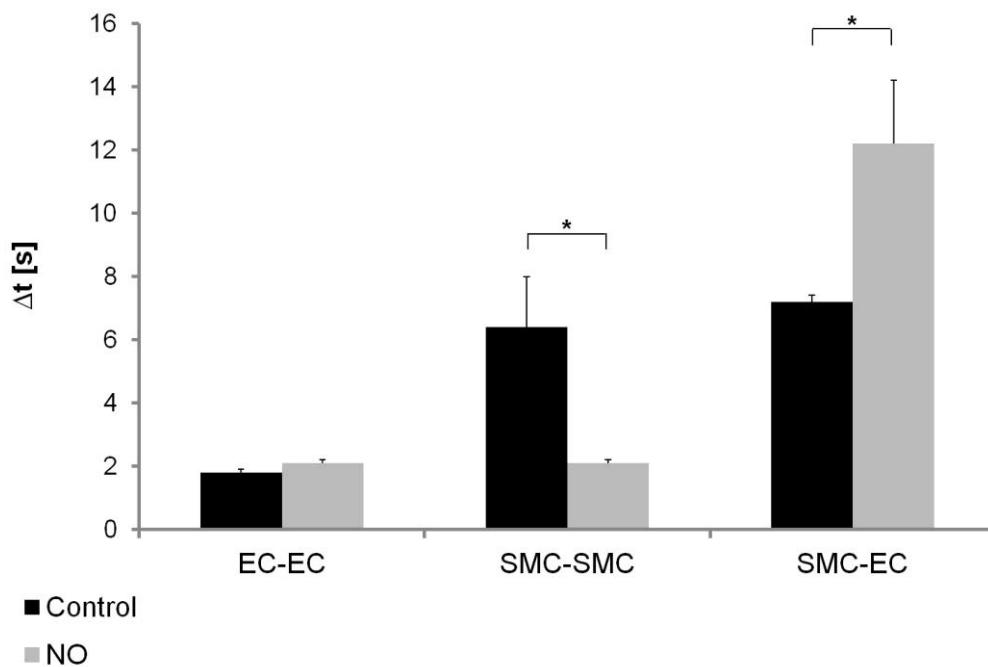
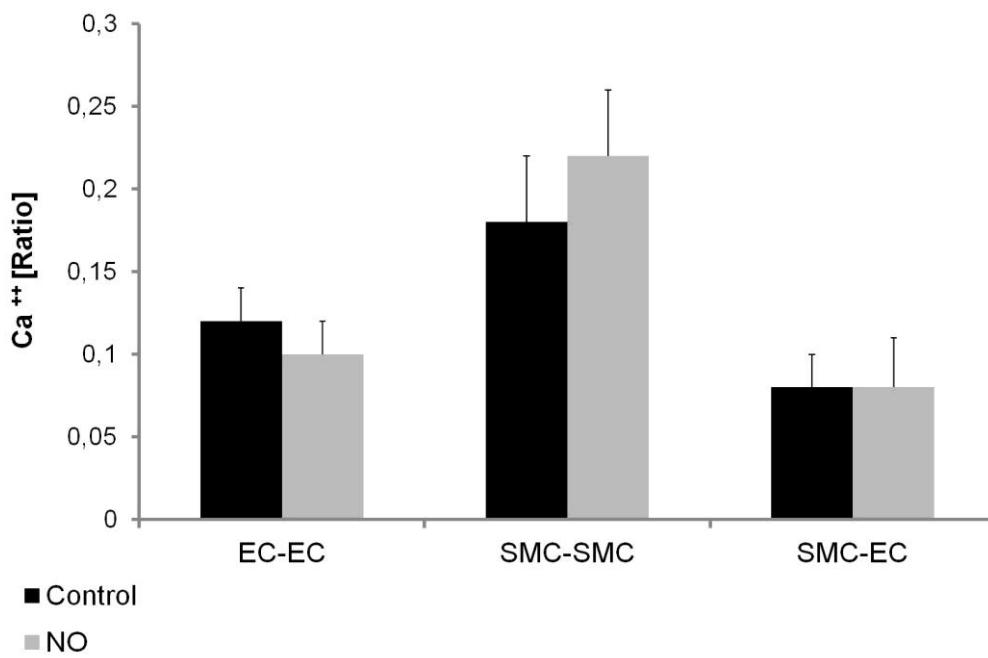


Abbildung 3-18

Calciumsignalausbreitung in HUVEC/HUVECM-Kokulturen nach mechanischer Stimulation von glatten Muskelzellen bzw. Endothelzellen. Die Inkubation mit NO reduziert die Calciumsignalausbreitung auf benachbarte Endothelzellen nach primärer Stimulation einer glatten Muskelzelle von 56 % (Kontrolle) auf 20% (NO). Die Kopplung zwischen Endothelzellen (EC-EC, con: 97±2%, NO: 95±4%) bzw. glatten Muskelzellen (SMC-SMC, con: 93±5%; NO: 86±6%) wurde durch NO nicht verändert. 8 Kulturen, 8 Wells, n=21, *p<0,05, SMC= glatte Muskelzelle; EC= Endothelzelle.

NO erhöhte auch den Zeitraum zwischen dem Calcium Anstieg in der stimulierten glatten Muskelzelle und dem Beginn des Calciumanstiegs in der benachbarten Endothelzelle um das 1,7-fache, was im deutlichen Gegensatz zu einem signifikanten Abfall der Zeitverzögerung um 65% für die Calciumausbreitung zwischen glatten Muskelzellen stand. Die NO-Inkubation hatte dagegen keinen Einfluss auf die Höhe des Calciumanstiegs in allen noch reagierenden Zellen gegenüber der Kontrolle.

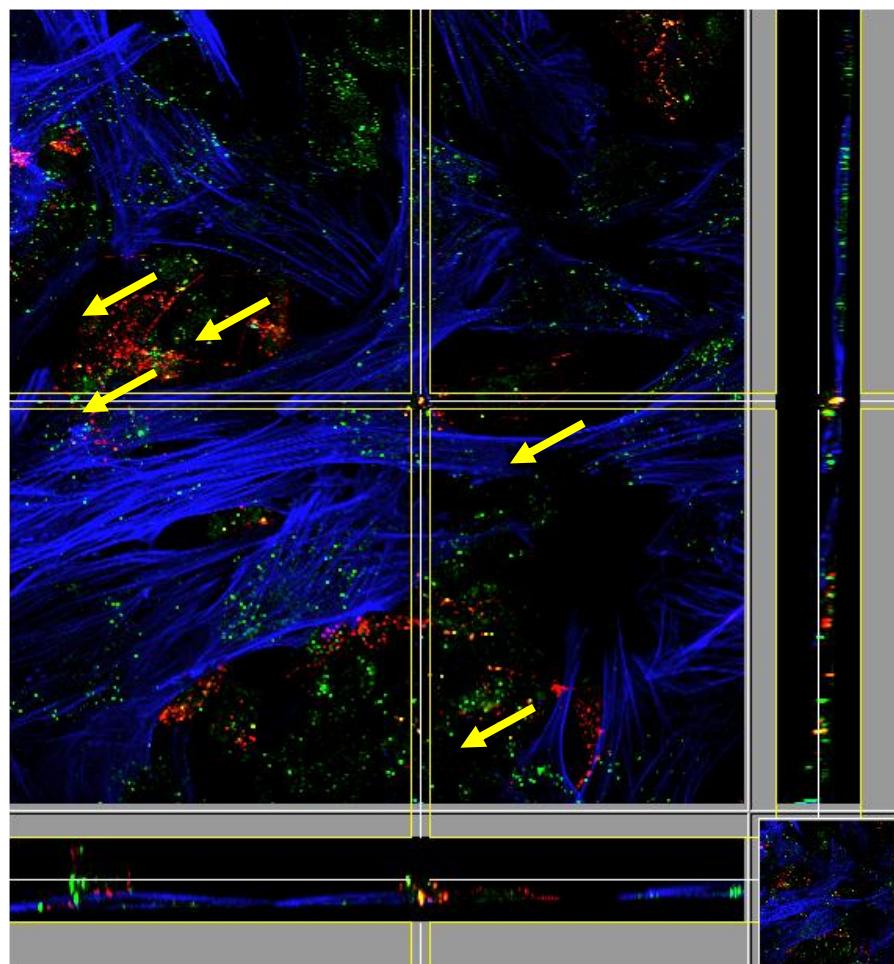
A**B****Abbildung 3-19**

(A) Es zeigte sich nach primärer Stimulation einer glatten Muskelzelle eine signifikante Abnahme der Zeitverzögerung bis zur Antwort der benachbarten glatten Muskelzelle (SMC-SMC) unter NO, wohingegen zwischen Endothel und glatten Muskelzellen (SMC-EC) die Zeitverzögerung unter NO signifikant zunahm, $p<0,05^*$. (B) Die Amplitude der noch reagierenden Zellen war nach zusätzlicher NO-Behandlung nicht statistisch signifikant verändert, 8 Kulturen, 8 wells, $n=21$;

3.4.2. Immunhistochemische Darstellung der Cx-Expression in Kokulturen von HUVECs/HUVECs

Gezeigt ist eine immunhistochemische Färbung von Cx in einer Kokultur von HUVECs/HUVECs (Anti-Cx37-AK (rot) und Anti-Cx43-AK (grün)). Zur besseren Identifikation der glatten Muskelzellen erfolgte zudem eine Anfärbung der glatten Muskelzellen mit einem Anti- α -smooth muscle Aktin-AK (blau).

Das endothelial exprimierte Cx37 war überwiegend an den Zellgrenzen zwischen Endothel und glatten Muskelzellen, also an myoendothelialen Kontaktzonen zu finden, wohingegen Cx43 (das sowohl in EC wie auch in SMC exprimiert wird) homogen in den Membranen sowohl von glatten Muskelzellen wie auch von Endothelzellen exprimiert war. Eine Anfärbung von Cx37 in glatten Muskelzellen im Zytosol oder perinuklear zeigte sich nicht.

**Abbildung 3-20**

Immunhistochemische Färbung einer HUVEC/HUVSMC Kokultur: Glatte Muskelzellen zeichnen sich durch die Anfärbung mit Aktin (Anti-Aktin-AK, blau) sowie Cx43 (grün) aus. Cx37 (rot) stellte sich überwiegend an myoendothelialen Gap Junctions, also an Kontaktstellen zwischen Endothel und glattem Muskel dar. Perinuklear sowie zytosolisch zeigte sich in glatten Muskelzellen keine Cx37-Expression. Durch die gelben Pfeile dargestellt ist die Anreicherung von Cx37 an myoendothelialen Kontaktzonen.

4. Diskussion

Connexine dienen als Kanalproteine der interzellulären Weitergabe von elektrischenn Signalen sowie von Ionen und kleinen Signal-Molekülen über Gap Juncitons. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob NO die Ausbreitung von Calciumsignalen über Gap Junctions die Cx37 enthalten, moduliert und ob dies auch in Endothelzellen eine Rolle spielt, die mehrere Connexine (Cx37, Cx40 und Cx43) gleichzeitig exprimieren.

Im Modellsystem der HeLa Zellen, in denen nur Cx37 exprimiert war [57], konnte in der Tat gezeigt werden, dass NO die Gap Junction abhängige Ausbreitung von Calcium-Signalen inhibiert. Dagegen zeigte sich in humanen Nabelschnur-endothelzellen (HUVEC, exprimieren Cx37, Cx40 und Cx43, [56]), nach NO-Behandlung diese interzelluläre Calciumwellenausbreitung gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe zwar verlangsamt aber ansonsten unverändert. Ein signifikanter NO-Effekt im Sinne einer reduzierten Signalweiterleitung ließ sich erst nach Downregulation von Cx43 in HUVEC nachweisen. Daraus lässt sich der Schluß ziehen, dass Cx43-haltige Gap Junctions den Hemm-Effekt von NO auf die Calciumausbreitung in Endothelzellen „kompensieren“ können. Es scheint zunächst ein Paradoxon zu sein, dass eine dezidierte NO-Wirkung in Endothelzellen funktionell kompensiert wird. In Bereichen, in denen die Expression von Cx37 im Vergleich zu Cx43 relativ hoch ist, kann diese Kompensation jedoch möglicherweise nicht stattfinden. Dies scheint nach unseren Befunden im Bereich der myoendothelialen Gap Junctions der Fall zu sein, denn dort wurde unter NO-Einfluss eine verminderde Calciumwellenausbreitung beobachtet.

Ausbreitung von interzellulären Calciumwellen als Signal- und Koordinations-mechanismus

Der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels stellt einen integralen Bestandteil vieler Signalwege in den Gefäßzellen der Mikrozirkulation dar. Ca^{2+} kann hierbei eine Vielzahl von Funktionen wahrnehmen. Als freies Ca^{2+} dient es als second messenger für die Aktivierung zahlreicher Enzyme, wie z.B die Ca^{2+} -Calmodulin abhängige eNOS, welche NO bildet [14,51]. Zudem kann freies Ca^{2+} der Aktivierung von

Ionenkanälen wie z.B calciumgesteuerter Kaliumkanäle dienen, über welche eine Hyperpolarisation in der glatten Muskelzelle ausgelöst wird [34,122]. Auch die Bildung von Eicosanoiden aus der Arachidonsäure im Endothel die als Vaso-regulatoren wirken, ist calciumabhängig.

Ca^{2+} dient im glatten Muskel der Tonusregulation. Nach dem Einströmen von Ca^{2+} aus dem Extra- in den Intrazellulärraum können sich bis zu 4 Moleküle Ca^{2+} an ein mol des Proteins Calmodulin binden, was u.a. der Aktivierung des Enzyms Myosinleichtkettenkinase dient. Durch Phosphorylierung der leichten Kette des Myosinmoleküls baut sich der Querbrückenzyklus auf, über welchen eine Vasokonstriktion des Gefäßes ausgelöst wird.

Interzelluläre Calciumwellen, die auf dem interzellulären Austausch von Calcium über gap junctions beruhen können, konnten in zahlreichen Organsystemen wie z.B auch in Gehirn, Leber, Retina und Cochlea [74,112] nachgewiesen werden; sie haben jedoch eine besonders hohe Bedeutung im Kreislaufsystem. Im vaskulären System dienen sie zum einen der einheitlichen, koordinierten Antwort auf einen Stimulus in der Mikrozirkulation, zum anderen sind sie aber bedeutsam für die lokale Regulation der Durchblutung sowie des Blutflusses [16,21]. Interzelluläre Calciumwellen konnten nicht nur unter in vivo Bedingungen [127,138], sondern auch auf Zellkulturebene in Endothelzellen [4] nachgewiesen werden und zeichnen sich gegenüber der elektrischen Signalausbreitung dadurch aus, dass sie stärker lokal begrenzt und deutlich langsamer sind. Auf diese Weise können sie in mehrfacher Hinsicht den Endothelverband im Sinne einer Koordination beeinflussen.

- 1) Interzelluläre Calciumwellen dienen der Vereinheitlichung und Verstärkung der Antwort auf humorale Stimuli. Durch die inhomogene Verteilung von ATP- sowie Histaminrezeptoren auf Endothelzellen kann durch die Ausbreitung interzellulärer Calciumwellen auf rezeptordefiziente Zellen, die primär nicht durch diese Substanzen erregt wurden, eine einheitliche Zellantwort des gesamten Zellverbandes erreicht werden [59].
- 2) Die Kommunikation von Endothelzellen über Gap Junctions in Form von interzellulären Calciumwellen kann zudem eine Verlängerung und Steigerung des ursprünglichen Signals in Endothelzellen bewirken [121].

3.) Zwischen glatten Muskelzellen und dem Endothel können Calciumwellen einen Rückkopplungsmechanismus darstellen, über welchen die Antwort glatter Muskelzellen auf verschiedene Vasokonstriktoren moduliert werden kann [27,69].

Für die Signalweiterleitung der initial mechanisch stimulierten Zelle auf deren Nachbarzellen konnte Paemeleire [92] für HeLa-Zellen zeigen, dass Calciumwellen sowohl über extra- wie auch intrazelluläre Wege zwischen benachbarten Zellen ausgetauscht werden können. Auch in Endothelzellen wird unter physiologischen Bedingungen beiden Wegen der Calciumwellenausbreitung eine hohe Bedeutung beigemessen [39]. Calciumwellen können sich dabei von der ursprünglich mechanisch stimulierten Zelle sowohl durch interzelluläre Signalübertragung über Gap Junctions [105], wie auch über die extrazelluläre Diffusion des second messengers ATP ausbreiten [41,44,85,92]. Im intakten Gefäß ist das auch über im Blut strömende Stimuli möglich [2].

Die Redundanz, die durch diese zwei grundverschiedenen Wege der Calciumwellenausbreitung entsteht, lässt sich als Hinweis für eine fundamentale Bedeutung von Calciumsignalen als Signalübertragungsweg zwischen benachbarten Zellen verstehen. Aufgrund der Tatsache, dass im Rahmen dieser Arbeit in erster Linie die Calciumsignalübermittlung über Gap Junction-Proteine von Interesse war, wurde die Calciumwellenausbreitung durch weitere Mediatoren wie ADP oder ATP blockiert. Hierzu wurden die Zellen vor Auslösung eines mechanischen Stimulus zusätzlich mit dem Enzym Apyrase inkubiert. Das Enzym Apyrase stellt hierbei eine ATP/ADPase dar, welche ATP in ADP+P, bzw. ADP in AMP+ 2P umwandelt und somit eine Bindung von ATP an extrazelluläre ATP-Rezeptoren verhindert [64,125]. Nach Durchführung unterschiedlicher Konzentrationsreihen für das Enzym Apyrase (50 U/ml) wurde eine Konzentration ausgewählt, die Wirkungen von extrazellulär appliziertem ATP (50 µmol/L) vollständig verhinderte. Auch in HeLa WT-Zellen konnte in Gegenwart von Apyrase keine Calciumwelle ausgelöst mehr werden wenn zusätzlich zur Hemmung der parakrinen Ausbreitung von ATP die Gap Junctions blockiert wurden. Somit ließ sich nachweisen, dass endogenes ATP durch Apyrase effektiv abgebaut wurde und unter unseren Messbedingungen keine Anteil an der Calciumwellenausbreitung hatte.

Modellrechnungen nach experimentellen Daten berechtigen zu der Annahme, dass die Ausbreitung von Calciumwellen über Gap Junctions auf der Diffusion von Calciumionen oder eines intrazellulären Signalmoleküls wie z.B. IP₃ durch Gap Junction Kanäle beruhen [79,90]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl IP₃ wie auch Ca²⁺ Gap Junction Kanäle passieren können, um in den benachbarten Zellen einen Calciumanstieg auszulösen [7,9,92,106]; die genaue Identifikation des Gap Junction passierenden Moleküls war aber nicht Fragestellung dieser Arbeit. Die gemessenen Werte der Zeitverzögerung bis zum Auftreten von Calciumsignalen in „Erstkranzzellen“ von gemittelt 3.4 s sowie in „Zweitkranzzellen“ von gemittelt 5.9 s bestätigen die Annahme der Diffusion und decken sich mit der Literatur, wenngleich die Diffusionsgeschwindigkeit teils in verschiedenen Zelltypen gemessen wurden [60,89,90].

Dass sich die in unseren Versuchen mechanisch ausgelösten Calciumwellen in der Tat über Gap Junctions ausbreiteten, konnte auch durch die Wirkungen von Meclofensäure nachgewiesen werden. Meclofensäure stellt hierbei einen Gap Junction-Blocker dar, welcher nicht spezifisch gegen ein einzelnes Connexin gerichtet ist [93]. Dies hat in HUVEC den Vorteil, dass die exprimierten Connexine Cx37, Cx40 sowie Cx43 gleichzeitig blockiert werden können, ohne dass ein Einsatz spezifischer Blocker für jedes einzelne Connexin notwendig wäre [67,81]. Die genaue Wirkweise von Meclofensäure ist bisher noch nicht ausreichend erforscht, ganz im Gegensatz zu den Connexin spezifischen Gap Junction-Blockern wie z.B Gap 26 und Gap 27, welche die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den beiden extrazellulären Schleifen von Cx43 bzw. Cx37 und Cx40 verhindern [31]. Wir haben uns dennoch für diesen Blocker entschieden, da dieser im Gegensatz zu den Alkoholen wie z.B. Oktanol bzw. Heptanol, Gap Junctions zwar weniger vollständig blockiert, dafür aber auch deutlich weniger zytotoxisch wirkt. Des Weiteren zeigt Meclofensäure gegenüber anderen Gap Junction-Blockern wie z.B. 18-β-GA, 2-APB und Mecloquin den Vorteil auf, leicht wasserlöslich zu sein [93]; damit wird der Einsatz des zusätzlich zytotoxisch wirkenden Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel, umgangen. Der Effekt der Meclofensäureblockade lässt sich zudem durch mehrmaliges Auswaschen wieder aufheben [93], so dass eine Kopplung der Gap Junctions nach Entfernung von Meclofensäure wieder nachweisbar war.

Die Blockade der Calciumausbreitung durch Meclofensäure beruhte nicht auf unspezifischen Effekten auf die Calciumreaktivität der initial stimulierten Zelle, da der

initiale Calciumanstieg sowie die Ausbreitung des Calciumsignals innerhalb der mechanisch stimulierten Zelle mit primär unbehandelten Zellen vergleichbar war. Nach Apyrasevorbehandlung zur Verhinderung einer extracellulären Calciumsignalweiterleitung über den ATP-Signalweg, sowie zusätzlicher Gap Junction-Blockade, wurde die Anzahl der auf das Calciumsignal antwortenden Erstkranzzellen zwar nicht vollständig, aber auf 33% reduziert. Auch andere Gap Junction-Blocker können als isoliert eingesetzte Substanzen Gap Junctions nicht vollständig hemmen; so beobachteten Stalmans und Himpens z. B., dass eine Gap Junction-Blockade in Retinazellen mit Halothan zu einer Signalblockade der interzellulären Calciumwellenausbreitung von lediglich 80% führte. Zusätzlich zeigte sich die Amplitude der auf das Signal noch reagierenden Zellen, ähnlich zu den in dieser Arbeit erhobenen Daten, als deutlich reduziert [118]. Die noch bestehende restliche Calciumwellenausbreitung kommt wohl nicht durch eine unvollständige Blockade von ATP durch das Enzym Apyrase zustande (s.o.) sondern eher auf einer auch unter Meclofensäure nicht vollständigen Gap Junction-Blockade oder auf einer mechanischen Mitstimulation der unmittelbar benachbarten Zellen [38]. Die Möglichkeit einer mechanischen Mitstimulation ist jedoch nicht sehr wahrscheinlich, da in HeLa Wildtyp-Zellen, welche mechanisch stimuliert wurden, keine Aktivität der Nachbarzellen nachgewiesen werden konnte, so dass die 33 % antwortenden „Erstkranzzellen“ eher für eine unvollständige Hemmung der Gap Junction-Kanäle sprechen.

Die mechanische Stimulation in Form einer kurzen Deformation der Zelloberfläche mittels einer Mikropipette stellt einen Einzelstimulus für eine Endothelzelle oder eine glatte Muskelzelle dar, welcher lokal in dieser Zelle einen Calciumanstieg auslöst, der durch Gap Junction-Kanäle über den gesamten Endothelverband bzw. den Verband glatter Muskelzellen weitergeleitet werden kann. Auch im Kreislaufsystem ist das vaskuläre Endothel einer kontinuierlichen mechanischen Stimulation durch Druck, Dehnung und durch die Wandschubspannung ausgesetzt [18]. In diesem Sinne stellt die hier verwendete mechanische Stimulation einen „physiologischen“ Stimulus dar. Durch die lokale mechanische Stimulation werden vermutlich TRP Kanäle in der Zellmembran geöffnet [25], so dass Calcium einströmt und vermutlich auch noch ein weiterer Anstieg über Ryanodin-Rezeptor-Stimulation und Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern möglich ist [139]. Sekundär kann der Calcium-Anstieg auch zu einer Aktivierung der PLC und damit von IP₃ führen [123]. Nachfolgend können

die second messenger Ca^{2+} oder auch IP_3 über Gap Junctions auf die Nachbarzellen übertragen werden [106]. Sowohl für Calcium als auch für IP_3 wurde eine entsprechende Permeabilität von Gap Junctions nachgewiesen [47,53,92,100].

Ca^{2+} und IP_3 unterscheiden sich deutlich bezüglich ihres Molekulargewichts, welches für Ca^{2+} 40 Da und für IP_3 420,0 Da beträgt. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass Molekülgröße und Oberflächenladung die Permeationsfähigkeit von Stoffen durch Gap Junctions entscheidend beeinflussen [78]. Das in einzelne Zellen eingebrachte Alexa Fluor 488 besitzt ein noch höheres Molekulargewicht von 570 Da, sowie eine negative Netto-Ladung von -1 . Daher ist sehr wahrscheinlich dass auch in unseren Versuchen IP_3 durch die Gap junctions ausgetauscht werden konnte und dass dieser Austausch ebenfalls durch NO reguliert wird.

Calciumwellenausbreitung in HUVEC

Mechanische Stimulation

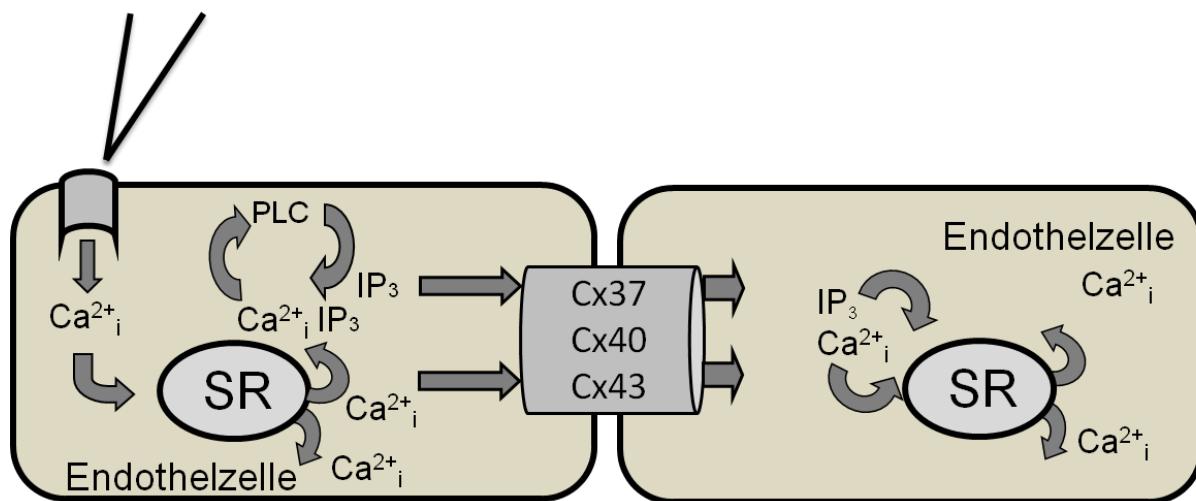


Abbildung 4-1

Interzelluläre Calciumwellenausbreitung einer initial mechanisch stimulierten Zelle auf deren Nachbarzelle. Über Gap Junction-Kanäle, welche die Connexine Cx37, Cx40 und Cx43 exprimieren, kann eine Weiterleitung des Calcium- bzw. IP_3 -Signals auf direkt sowie indirekt benachbarte Endothelzellen erfolgen.

Im Gegensatz zur chemischen Stimulation durch vasoaktive Substanzen wie z.B. Bradykinin oder Acetylcholin [13], bei welcher eine Reaktion gleichzeitig an vielen Stellen des gesamten Zellverbandes erfolgt, kann durch mechanische Stimulation die Reaktion der Erst- bzw. Zeitkranzzellen sowohl in Bezug auf den zeitlichen Verlauf wie auch auf das Ausmaß der Zellantwort wesentlich genauer beurteilt werden. Dies

war im Rahmen der vorliegenden Arbeit von großer Bedeutung. Nachteilig an der Technik der mechanischen Stimulation ist jedoch die mögliche Verletzung der Plasmamembran der initial stimulierten Zelle („Scraping“) [5]. In unseren Untersuchungen war der Calciumsignalverlauf nach mechanischer Stimulation der Initialzelle gekennzeichnet durch einen steilen Calciumanstieg, gefolgt von einem langsamen Calciumabfall; im Falle eines Scrapings war jedoch, ähnlich den von Gomes erhobenen Daten, ein sofortiger Abfall des Calciumspiegels in der mechanisch stimulierten Zelle zu verzeichnen [39]. Im Falle einer so diagnostizierten Beschädigung der Plasmazellmembran wurde der Einzelversuch abgebrochen.

NO reduziert die Permeabilität von Cx37 haltigen Gap Junctions für Calcium oder IP3

Als exogener NO Donor wurde S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP, 2 µm) verwendet, um standardisiert definierte exogen applizierte NO-Konzentrationen untersuchen zu können. Die Bildung von Peroxynitrit sowie endogenem NO wurde durch Abbau des Reaktionspartners O_2^- durch die Superoxid-dismutase (SOD) bzw. L-Nitro-L-Arginin (LNAME) so weit wie möglich ausgeschaltet.

Daher erlauben die hier durchgeföhrten Versuche auch keine Aussage darüber, ob der beobachtete NO-Effekt bereits bei den niedrigeren endogenen NO-Konzentrationen bzw. der basalen NO-Produktion in Endothelzellen eine Rolle spielt, oder erst, wenn die NO-Produktion stimuliert ist. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass NO selektiven Einfluss auf einzelne exprimierte Connexine nimmt. Um diese Effekte isoliert prüfen zu können, verwendeten wir in dieser Arbeit als Modellsystem zunächst humane epithelialen Cervix Carcinoma Zellen („HeLa Zellen = Henrietta Lacks Zellen), eine Zelllinie, die in ihrer Wildtypform keine Connexine exprimiert. Diese Zellen wurden von Herrn Prof. Willecke (Bonn) stabil mit Cx37- oder Cx43 transfiziert und uns zur Verfügung gestellt [29]. Ein Vorteil dieses Modellsystems war, dass die molekularen und funktionellen Eigenschaften einzelner Connexine, anders als in HUVECs, isoliert überprüft werden konnten. Es zeigte sich, dass die funktionelle Kopplung für Alexa Fluor 488 in Hela Cx37 Monokulturen sehr schlecht ist, für Calciumsignale aber ausreichend ist, so dass die Calciumsignalausbreitung in Monokulturen aus HeLaCx37 oder HeLaCx43 Zellen untersucht werden konnte. Die beste Farbstoffausbreitung zeigte sich in HeLa Cx37-HeLa Cx43-Kokulturen, wo sich

Cx37 zusammen mit Cx43 in heterotypen Gap Junctions auch für Alexa Fura488 als gut koppelnd erwies (Abbildung 3-3). Heterotype Gap Junction Kanäle aus Cx37 und Cx43 sind überdies möglicherweise ein Modell für myoendothiale Gap Junctions, wenn man davon ausgeht, dass Cx37 normalerweise nur im Endothel, nicht aber im glatten Muskel, exprimiert wird. Nach Farbstoffinjektion (Alexa Fluor 488) in HeLa-WT Zellen blieb die interzelluläre Signalweiterleitung sowohl für Alexa als auch für Calcium vollständig aus, was beweist, dass die hier untersuchte Signalausbreitung Gap Junction-abhängig erfolgte.

NO zeigte sich als selektiver Hemmer von Cx37 enthaltenden Gap Junctions, da bei reinen Cx43 Gap Junctions (im Modellsystem HeLa-Zelle) kein Hemmeffekt auf die Calciumweiterleitung beobachtet wurde; in HeLa Cx37-Zellen trat jedoch eine signifikante Reduktion der Calciumwellenausbreitung auf (vergleiche Abbildung 3-4). Die Hemmeffekte von NO erstreckten sich damit auch auf den Transfer so kleiner Moleküle wie Calcium und IP₃ und nicht nur auf große Farbstoffmoleküle, wie dies von uns bereits früher gezeigt wurde. Die genaue Wirkung von NO an Cx37 ist derzeit noch unbekannt, jedoch konnte bereits früher nachgewiesen werden, dass es sich um einen cGMP- und cAMP-unabhängigen Mechanismus handelt [56,57]. Eine Erklärung für die unterschiedliche Gap Junction-Permeabilität nach NO-Behandlung ist unter Umständen eine durch NO induzierte Konformationsänderung des Gap Junction-Kanals, welche durch eine mögliche Abwandlung der Tertiärstruktur die Porenweite für Gap Junction-gängige Stoffe so ändert, dass je nach Größe, Molekulargewicht oder Ladung des Mediators eine unterschiedliche Gap Junction Permeabilität herbeigeführt wird [88]. Möglicherweise kommt es auch zu einer Konformationsänderung des Gap Junction-Kanals im Sinne des „Ball and chain“-Modells, wobei der C-Terminus die Pore beeinflusst und sich die Permeabilitäten für die second messenger Calcium bzw. insbesondere IP₃, welches ein deutlich höheres Molekulargewicht als Calcium aufweist, reduzieren. Eine Aufklärung des Wirkmechanismus von NO war jedoch nicht Ziel dieser Arbeit.

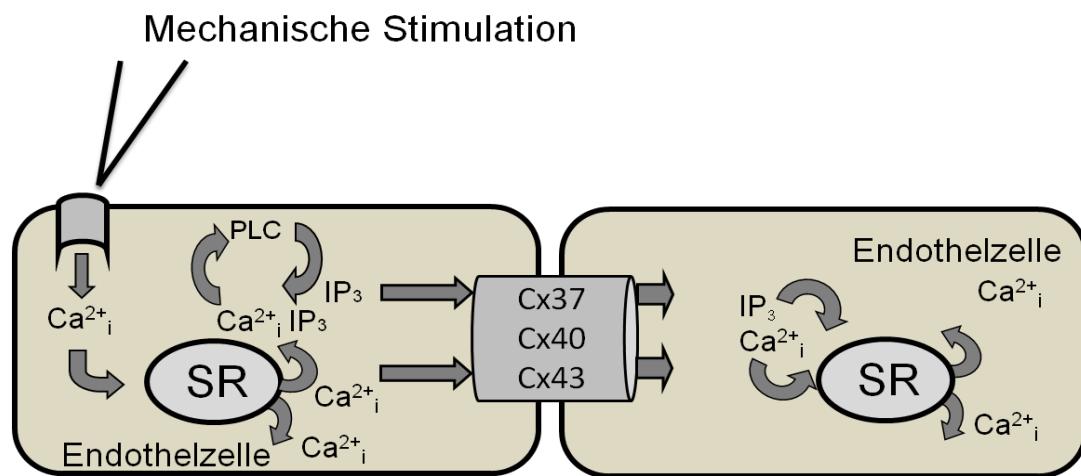
In HeLa Cx37-Cx43-Kokulturen hemmte NO die Farbstoffausbreitung nur, wenn Cx37-exprimierende Zellen beteiligt waren. Im Gegensatz dazu ergab sich keine Änderung der Zellkopplung nach primärer Farbstoffinjektion in eine Cx43-exprimierende Zelle, die nur von Cx43 exprimierenden Zellen umgeben war [57].

Aufgrund dieser Tatsache ist davon auszugehen, dass NO nach Farbstoffinjektion die Gap Junction-Kopplung über Cx37, nicht aber über Cx43 modifiziert [57]. Noch deutlicher wird der selektive Einfluss von NO auf HeLa Cx37-bzw. HeLa Cx43-Monokulturen, wo sich die Calciumwellenausbreitung auf Cx37-exprimierende „Erst“ - bzw. „Zweitkranzzellen“ signifikant reduziert zeigte, wohingegen sich kein NO-Effekt auf Cx43 nachweisen ließ.

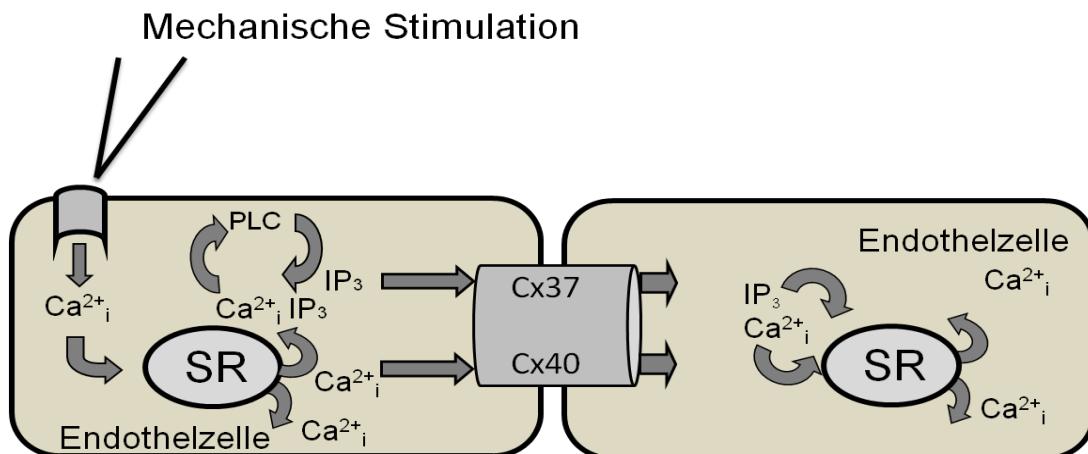
Bereits früher wurden in unserer Arbeitsgruppe NO-Effekte auf die Gap Junction abhängige Zell-Kommunikation in Endothelzellen untersucht [48,56,57]. Übereinstimmend mit der Literatur konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in HUVEC die Connexine Cx37, Cx40 sowie Cx43 exprimiert werden [19,23], wobei Cx43 in kultivierten Endothelzellen das vorwiegend exprimierte Connexin darstellt [126,128]. Für Gap Junction-Kanäle, die aus verschiedenen Connexinen bestehen ist bereits beschrieben, dass Gap Junction-Kanäle für elektrische bzw. chemische Signale eine sehr unterschiedliche Permeabilität aufweisen [40] können. Nach Farbstoffinjektion in HUVEC konnte in der Tat nach NO-Behandlung eine signifikante Reduktion der Zellkopplung nachgewiesen werden [57], wenn als Indikator Alexa Fluor 488 verwendet wurde. Im Gegensatz zu oben genannten Ergebnissen zeigte sich in der vorliegenden Arbeit jedoch kein primärer NO-Effekt auf die interzelluläre Ausbreitung von Calciumwellen in HUVECs. Hieraus lässt sich folgern, dass entweder die Permeabilität für Ca^{2+} bzw. IP_3 , im Vergleich zu dem Farbstoff Alexa Fluor 488 nicht durch NO verändert wird oder Ca^{2+} bzw. IP_3 zusätzlich durch andere Gap Junction Kanäle permeieren, als solche, die unter Beteiligung von Cx37 gebildet werden. In einer Arbeit aus der eigenen Arbeitsgruppe wurde beschrieben, dass nach Histaminstimulation Calciumwellen hervorgerufen werden, welche über eine nähere Distanz über den second messenger Ca^{2+} , über weitere Distanzen jedoch durch IP_3 weitergeleitet werden [59]. Der Grund hierfür liegt unter Umständen in der kurzen Halbwertszeit des Calciums im Cytosol, welches sehr schnell gepuffert, bzw. von Proteinen gebunden wird. Für IP_3 hingegen ist eine deutliche längere Halbwertszeit beschrieben, was eine längere Diffusionsstrecke ermöglicht [47]. Unabhängig davon, ob Ca^{2+} -Ionen bzw. IP_3 -Moleküle zur interzellulären Calciumwellenausbreitung via Gap Junctions in direkt bzw. indirekt benachbarte Zellen gelangen, weisen beide im Vergleich zum Farbstoff Alexa Fluor 488 ein geringeres Molekulargewicht auf.

Nach Downregulation von Cx43 war tatsächlich auch in HUVEC eine Hemmwirkung von NO zu beobachten. Dieser Befund lässt sich am ehesten so interpretieren, dass durch die Wegnahme eines Teils der normalerweise für den NO-unabhängigen Calciumaustausch zur Verfügung stehenden Gap Junction Kanäle (nämlich weitgehend die, die Cx43 enthalten) nun der Austausch präferentiell über Gap Junction Kanäle erfolgen musste, die Cx37 enthalten. Unter diesen Bedingungen wurde nun die NO-Hemmung Wirkung auf Cx37 enthaltende Kanäle (wie bereits im Modellsystem HeLa Zellen nachgewiesen) sichtbar und für den Austausch von Calcium (oder IP_3) zwischen den Zellen, also die Calciumwelle, funktionell relevant.

(A) Calciumwellenausbreitung in HUVEC



(B) Calciumwellenausbreitung in HUVEC nach Downregulation von Cx43



(C) Calciumwellenausbreitung in HUVEC nach Downregulation von Cx43 unter zusätzlicher NO-Vorbehandlung

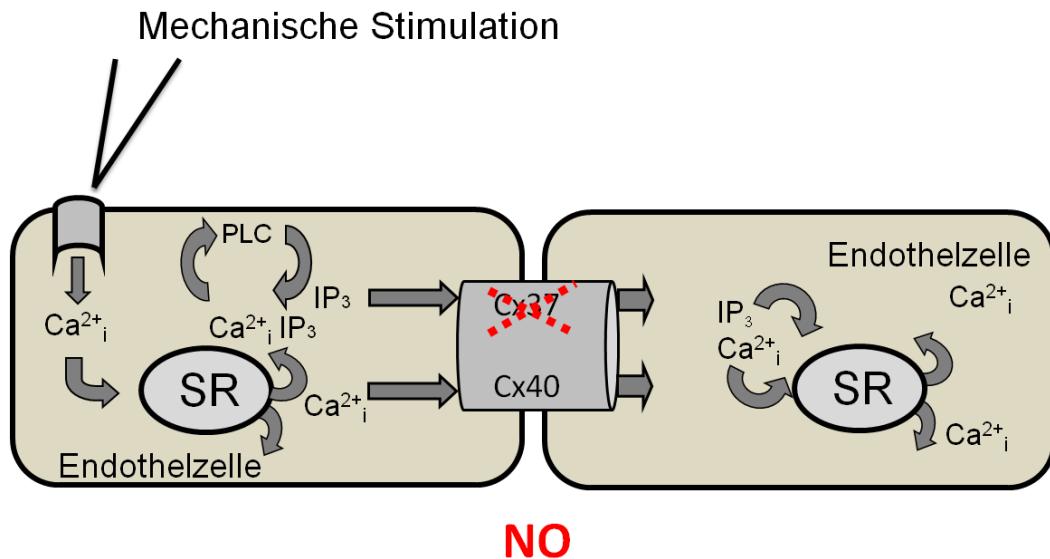


Abbildung 4-2

HUVEC nach mechanischer Stimulation:

- (A) Nach mechanischer Stimulation einer Endothelzelle kommt es zum initialen Anstieg von Calcium und IP_3 in der stimulierten Zelle. Dieses Calciumsignal wird über Cx37-, Cx40- bzw. Cx43-exprimierende Gap Junctions fortgeleitet.
- (B) Nach Downregulation von Cx43 breitet sich das Calciumsignal über Cx37- und Cx40 exprimierende Gap Junctions auf Nachbarzellen aus.
- (C) Nach zusätzlicher NO-Behandlung ist die Signalweiterleitung zwischen benachbarten Endothelzellen signifikant reduziert. Dieser Effekt beruht auf einem kopplungshemmenden Einfluss von NO auf Cx37.

Es ist unwahrscheinlich, dass die nun zu beobachtete Hemmwirkung auf einer absoluten Zunahme der Cx37-Expression beruht, da die NO Effekte akut auftraten und sowohl der Einbau von zusätzlichem Cx37 in die Membran als auch die zusätzliche Bildung von Cx37 wesentlich mehr Zeit in Anspruch genommen hätten. Wang et al. konnten nach Downregulation von Cx43 in humanen Aortenendothelzellen mittels si43_RNA 5.5 Stunden nach der Transfektion eine Steigerung der Cx37-mRNA und Cx40-mRNA-Expression feststellen. In unseren Versuchen war naturgemäß weder im Western Blot noch in der Immunhistochemie eine kompensatorische Steigerung der Cx37- bzw. Cx40-Expression auf Proteinebene zu beobachten [130].

Frühere Untersuchungen in unserem Labor schließen auch mit großer Sicherheit aus, dass die beobachteten NO-Hemmwirkungen auf das ebenfalls im Endothel exprimierte Cx40 zurückgehen könnten. Nach längerer NO-Vorbehandlung kommt es sogar zu einem verstärkten Einbau von Cx40 in die Membran und cAMP/Phosphodiesterase-abhängig zu einer Steigerung der De-Novo Proteinsynthese von Cx40. Funktionell würde sich dies in einer verstärkten Gap Junction-Kopplung zwischen benachbarten Cx40-exprimierenden Zellen [48,56] auswirken. Diese Ergebnisse sind jedoch nur als Langzeiteffekt einer NO-Behandlung zu erwarten, da die beschriebenen Modifikationen im Sinne einer Steigerung erst Stunden nach NO-Behandlung nachgewiesen werden konnten. Im Gegensatz dazu wurden in dieser Arbeit die Zellen vor Anfärbung, Zelllyse und Farbstoffinjektion bzw. mechanischer Stimulation nur 20 Minuten mit NO vorbehandelt, was die Möglichkeit einer post-translationalen Modifikation von NO an Cx37 wahrscheinlich macht. Änderung der Gap Junction-Stabilität und der Kanaleigenschaften können außer durch Phosphorylierung auch durch Nitrosylierung von Proteinen am C-Terminus der Connexine erfolgen [62,70-72,117]. Eine posttranskriptionale Modifikation im Sinne einer S-Nitrosylierung an Cx43 durch NO ist auch für Cx43 beschrieben [119]. Diese Modifikation, wenn sie denn auch bei unseren Experimenten auftrat, (diese wurde nicht untersucht), hatte sowohl in HeLa Zellen als auch in Endothelzellen keine messbaren Auswirkungen auf die Ausbreitung des Calciumsignals unter unseren Versuchsbedingungen.

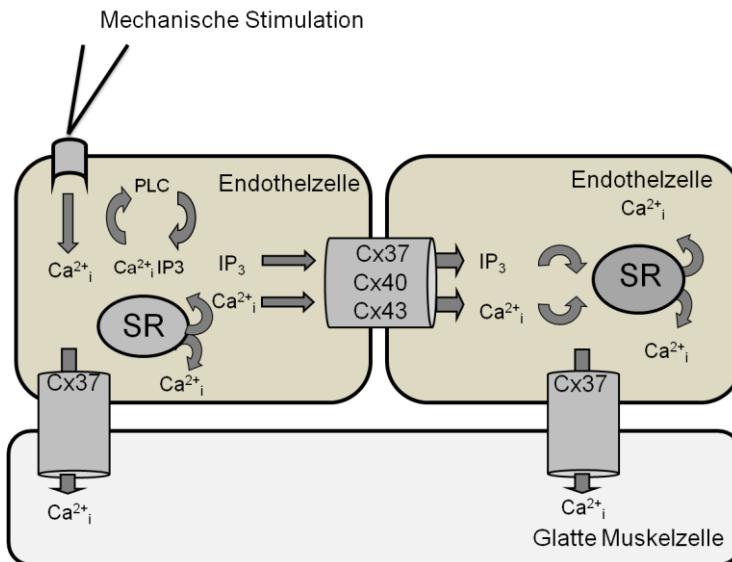
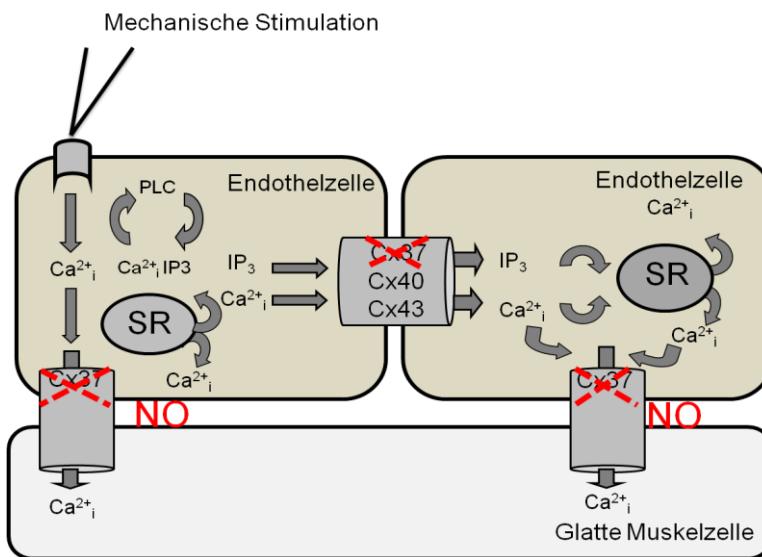
Zelluläre Lokalisation der Cx37-Modulationseffekte

Der Befund, dass NO Cx37-abhängig auch in Endothelzellen die Ausbreitung von Calciumsignalen hemmt, dies aber bei gleichzeitiger Expression von Cx43 nicht oder nur im Sinne einer geringfügigen Verzögerung sichtbar ist, wirft die Frage auf, welche funktionelle Bedeutung ein solcher Mechanismus im Endothel denn haben sollte. Eine mögliche Antwort darauf ist, dass der Mechanismus zwar nicht in der ganzen Zelle, wohl aber in besonderen Zellkompartimenten eine Rolle spielt. Ein solches Kompartiment könnten die Kontaktzonen von Endothel- und glatten Muskelzellen - also myoendothiale Junctions darstellen. Dafür spricht, dass NO die Calciumwellenausbreitung in der Kokultur selektiv zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen hemmte während es keinen hemmenden Effekt auf die Calciumausbreitung zwischen Endothelzellen oder glatten Muskelzellen allein hatte.

Parallel hierzu ließ sich immunhistochemisch nachweisen, dass endotheliales Cx37 besonders stark an Zellgrenzen zwischen Endothel- und glatten Muskelzellen, d.h. überwiegend an myoendothelialen Gap Junctions exprimiert war.

Die heterozelluläre Kommunikation von Endothelzellen mit glatten Muskelzellen in myoendothelialen Junctions moduliert die Gefäßfunktion in vielerlei Aspekten, wie z.B. hinsichtlich Gefäßtonuskontrolle (vor allem über EDHF [83]), Blutdruckregulation [37], Proliferation glatter Muskelzellen [3], Angiogenese [46] oder Gefäßdilatation bei erhöhter Wandschubspannung [103]. Es konnte gezeigt werden, dass hierfür sowohl parakrine Mechanismen als auch die elektrische Signalweiterleitung über Gap Junctions eine bedeutende Rolle spielen [108]. Wie bereits weiter oben dargestellt, ermöglichen myoendothiale Gap Junctions auch eine Feedbackkontrolle zwischen Gefäßmuskel- und Endothelzellen. Ein Anstieg des Calciums in den glatten Muskelzellen führt dort zu einer Kontraktion, der nachfolgende Gap Junction abhängige Anstieg des Calciums auch in den benachbarten Endothelzellen begrenzt jedoch über die vermehrte Synthese von NO, Prostacyclin sowie EDHF diese Kontraktion [27,28]. Inwieweit Cx37 hier eine Rolle spielt, wurde hierbei nicht untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Kopplung von Endothelzellen mit glatten Muskelzellen durch NO signifikant gehemmt wird, während NO keinen Einfluß auf die Kopplung im Endothel oder zwischen den Muskelzellen hat. Analog den von Isakson nach chemischer Stimulation erhobenen Daten ist wiederum davon auszugehen dass second messenger Calcium und IP₃ Gap Junctions zwischen beiden Zelltypen passieren können [53]. Bei einer durch NO deutlich eingeschränkten Permeabilität der Calciumionen bzw. des IP₃ über myoendothiale Gap Junctions ist zu erwarten, dass es bei einem Calcium- und NO-Anstieg in einer stimulierten Endothelzelle nicht – oder nur in einem verringerten Ausmaß - zu einem sekundären Anstieg des Calciumspiegels in der glatten Muskelzelle kommt, was einer kontraproduktiven Vasokonstriktion entspricht, die dem vasodilatorischen Effekt von NO entgegenwirken würde. Zudem wird durch die Hemmung der myoendothelialen Kopplung verhindert, dass Ca²⁺ aus dem Endothel verloren geht sondern im Endothel erhalten bleibt und die endotheliale Antwort somit verstärkt.

(A) Calciumwellenausbreitung in myoendothelialen Gap Junctions:**(B) Calciumwellenausbreitung in myoendothelialen Gap Junctions nach NO-Behandlung:****Abbildung 4-3****Calciumwellenausbreitung nach mechanischer Stimulation in myoendothelialen Kokulturen:**

(A) Nach mechanischer Stimulation zeigt sich eine Calciumwellenausbreitung auf direkt sowie indirekt benachbarte glatte Muskel- sowie Endothelzellen über die second messenger IP₃ bzw. Calcium. Der Signalaustausch zwischen benachbarten Endothelzellen erfolgt über Cx37, Cx40 und Cx43, wohingegen die Kommunikation der Endothelzelle mit der glatten Muskelzelle vorwiegend über Cx37- und Cx43-exprimierende Gap Junctions geschieht (endogenes NO hier inhibiert).

(B) Nach zusätzlicher exogener NO-Behandlung zeigt sich eine deutlich reduzierte Calciumwellenausbreitung über myoendothiale Gap Junctions (mutmaßlich über einen verstärkten NO-Effekt auf Cx37) was einen kontraproduktiven Ca²⁺-Anstieg in der SMC verhindert.

Unsere *in vitro* Untersuchungen können keinen Aufschluss darüber ergeben, ob unter pathophysiologischen Bedingungen eine so große Reduktion der vaskulären Cx43-Expression auftreten kann, so dass auch im Endothel selbst eine Hemmwirkung auf die Calciumsignalausbreitung auftritt. Die Expression einzelner Connexine in Gap Junctions ist jedoch ein dynamischer Prozess, dessen Dysregulation mit der Entstehung diverser Krankheiten in Verbindung gebracht wird [66,86,133]. Diesbezüglich wird in der Literatur beschrieben, dass sich die Expression von Gap Junctions im Endothel unter Einwirkung kardiovaskulärer Risikofaktoren wie z.B. Hypertonus, Diabetes, Nikotinabusus sowie Hyperlipidämie deutlich vermindert, so dass davon auszugehen ist, dass die Downregulation einzelner Connexine, wie z.B. von Cx43, zum Wirkungsspektrum von Risikofaktoren gehören kann [130]. Umgekehrt wird aber von einigen Autoren durch die Downregulation von Cx43 die verstärkte Entstehung einer Arteriosklerose, eines Hypertonus [137] sowie des Diabetes mellitus [109] postuliert, so dass eine Minderung der Connexinexpression in großen Gefäßen pathogenetische Bedeutung haben könnte.

Auch für Cx37 ist eine pathophysiologische Rolle bei der Entstehung von Gefäßkrankheiten bekannt: Auf genetischer Ebene konnte für Cx37 ein Genpolymorphismus nachgewiesen werden, der mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit (KHK) einhergeht [8,15,50,133]. Besonders für Patienten, die bereits in jungem Alter zwischen 35 und 45 Jahren eine KHK entwickeln, spielen nicht modifizierbare Faktoren, wie die genetische Vorbelaustellung, eine bedeutende Rolle. Für Cx37 wurde im Speziellen nachgewiesen, dass ein Basenaustausch an der Position 1019 (Thymin gegen Cytosin) für die Aminosäure Serin anstatt Prolin kodiert und dieser mit einer erhöhten Inzidenz der KHK einhergeht [133]. Weitere modifizierbare Risikofaktoren wie Hypertonus, Diabetes mellitus, Body Mass Index oder eine Hypercholesterinämie stehen jedoch in keinem Zusammenhang mit dem Cx37-Genpolymorphismus. Es wird vermutet, dass auf molekularer Ebene der Aminosäureaustausch Serin gegen Prolin mit einer veränderten Proteintertiärstruktur von Cx37 einhergeht und möglicherweise dessen Funktion im Gap Junction-Kanal beeinflusst wird. Prolinreste im C-Terminus bewirken in der Tertiärstruktur Biegungen bzw. Knicke, welche durch den Basenaustausch unter Umständen verloren gehen könnten. Auch die noch

unbekannte Regulation von Cx37 durch NO könnte nach dem Basenaustausch verändert sein, woraufhin sich gerade im Hinblick auf die Kommunikation von Endothelzellen mit glatten Muskelzellen spezifische Veränderungen ergeben [133].

Cx37 wird auch in Monozyten und Makrophagen exprimiert, die in den frühen Phasen der Arteriosklerose eine bedeutende Rolle spielen [134]. Während der Arterioskleroseentstehung werden Blutmonozyten von chemotaktischen Faktoren angezogen, zu Stellen endothelialer Dysfunktionen gelockt und nach der Transmigration durch das Endothel in der Intima zu einer Proliferation, das heißt, zur Ausreifung zu Makrophagen und zur Lipidakkumulation angeregt [33]. In spezifisch Cx37-defizienten Mäusen konnten nach Gabe einer cholesterinreichen Diät vermehrt arteriosklerotische Plaques in der Aorta nachgewiesen werden [134]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression von Cx37-Halbkanälen in Monozyten und Makrophagen die Adhäsionsfähigkeit von Leukocyten deutlich minimiert. Dieser antiadhäsive Effekt wird durch Ausschüttung von ATP in den Extrazellulärraum gesteuert [134]. Inwieweit hier auch die beschriebene Modifikation von Cx37 durch NO eine Rolle spielt, müssen jedoch erst weitere Untersuchungen zeigen.

5. Zusammenfassung

Eine effektive Regulation der Gewebedurchblutung erfordert eine Koordination der Reaktion einzelner Gefäßzellen bzw. verschiedener Gefäßabschnitte. Der zur Koordination erforderliche interzelluläre Signalaustausch kann zumindest teilweise über Gap Junction-Kanäle erfolgen, die als interzelluläre Verbindungen den Austausch von elektrischen und chemischen Signalstoffen zwischen benachbarten Zellen ermöglichen. Dieser Austausch kann über die Modulation der Permeabilität von Gap Junction-Kanälen reguliert werden. Aus Untersuchungen an Modellzellen (HeLa-Zellen) war bereits bekannt dass NO eine solche Modulatorwirkung ausübt, wenn die Gap Junctions nur Connexin 37 (Cx37) enthalten während kein Effekt von NO auf Gap Junctions zu beobachtet war, wenn Gap Junctions aus Cx43 oder Cx40 gebildet wurden. Da Endothelzellen normalerweise alle drei Connexine exprimieren, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, inwieweit NO in diesen Zellen überhaupt eine nachweisbare Wirkung auf die Gap Junction Permeabilität und damit auf den Signalaustausch entfaltet. Als Modell des Signalaustauschs wurde die Ausbreitung von Calciumwellen jeweils zwischen Endothelzellen oder glatten Muskelzellen allein oder zwischen beiden Zelltypen untersucht.

Nach Auslösung von interzellulären Calciumwellen als Folge einer mechanischen Stimulation von einzelnen Zellen konnte zunächst gezeigt werden, dass die interzelluläre Ausbreitung von Calcium unter den gewählten Versuchsbedingungen über Gap Junctions-erfolgte. Im Gegensatz zum Modellsystem der HeLa Zellen, in denen nur Cx37 exprimiert war, zeigte NO in den Endothelzellen (humane Nabelschnur, alle drei Connexine exprimiert) abgesehen von einer geringgradigen Verzögerung keinen Hemmeffekt auf die Gap Junction-abhängige Ausbreitung von Calcium-Signalen. Wurde jedoch Cx43 durch Behandlung mit siRNA herunterreguliert, führte NO auch in den Endothelzellen zu einer Hemmung der interzellulären Calciumwellenausbreitung.

Auch in intakten Endothelzellen, die mit glatten Muskelzellen kokultiviert wurden, ließ sich bei genauerer Analyse ein Hemmeffekt von NO nachweisen. Dieser war jedoch auf die Zellbereiche beschränkt, in denen Endothelzellen und glatte Muskelzellen unmittelbar benachbart waren (myoendothiale Junctions). In diesen myoendo-

thelialen Gap Junctions, fanden wir auf der Endothelseite immunhistochemisch überwiegend Cx37 exprimiert. Aufgrund dieser präferentiellen Lokalisation von Cx37 scheint daher NO eine besondere Rolle bei der Modulation des Calciumaustauschs (und potentiell auch anderer Signalmoleküle wie IP₃ oder cyclische Nukleotide) zu spielen. Die Kontrolle des Calciumaustauschs könnte funktionell eine calciumabhängige glattmuskuläre Kontraktion bei Endothelstimulation verhindern und somit die endothelabhängige Dilatation verstärken. Diese bisher unbekannte NO-Wirkung auf Cx37-exprimierende Gap Junctions könnte einen weiteren Mechanismus der Gefäßtonusregulation darstellen.

6. Literaturverzeichnis

1. Ausubel. Current protocols in Molecular Biology. Curr. Protoc. 1997.
2. Bagher P., Davis M.J. & Segal S.S. Visualizing calcium responses to acetylcholine convection along endothelium of arteriolar networks in Cx40BAC-GCaMP2 transgenic mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011;301:794-802.
3. Bennett MR. In stent-stenosis: pathology bad implications for the development of drug eluting stents. Heart 2003;89:218-224.
4. Beny J.L., Koenigsberger M. & Sauser R. Role of myoendothelial communication on arterial vasomotion. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006;291:2036-2038.
5. Berra-Romani R. et al. Ca²⁺ signaling in injured in situ endothelium of rat aorta. Cell Calcium 2008;44:298-308.
6. Beyer E.C., Reed K.E., Westphale E.M., Kanter H.L. & Larson D.M. Molecular cloning and expression of rat connexin 40, a gap junction protein expressed in vascular smooth muscle. J Membr Biol 1992;127:69-76.
7. Blomstrand F et al. 5-Hydroxytryptamine and glutamate modulate velocity and extent of intercellular calcium signalling in hippocampal astroglial cells in primary cultures. Neuroscience 1999;88:1241-1253.
8. Boerma M. et al. A genetic polymorphism in Cx 37 as a prognostic marker for atherosclerosis plaque development. J. of Internal Medicine, 1999, 246, 211-218.
9. Boitano S. Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. Science 1992;258:292-295.
10. Bolanos J.P & Medina J.M. Induction of nitric oxide synthase inhibits gap junction permeability in cultured astrocytes. J Neurochem 1996;66:2091-2099.
11. Breman R.S., Martin P.E.M., Evans W.H. & Griffith T.M. Relative contribution of NO and gap junctional communication to endothelium dependent relaxations of rabbit resistance arteries vary vessel size. Microvascular Research 2001, 63, 115-128.
12. Bruzzone R., White T.W. & Paul D.L. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. Eur J Biochem 1996;238:1-27.
13. Buchan K.W. Bradykinin induces elevations of cytosolic calcium through mobilization of intracellular and extracellular pools in bovine aortic endothelial cells. Br J Pharmacol 1991;102:35-40.

14. Busse R. & Mülsch A. Calcium dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. FEBS Lett 1990;265:133-136.
15. Chanson M. & Kwak B. Connexin 37: a potential modifier gene of inflammatory disease. J Mol Med 2007;85:787-795.
16. Christ G.J., Spray D.C., el-Sabban M., Moore LK & Brink PR. Gap junctions in vascular tissues. Evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotor tone. Circ Res 1996;79:631-646.
17. Cottrell G.T, Wu Y. & Burt Y.M. Cx40 and Cx43 expression ratio influences heteromeric/heterotypic gap junction channel properties. Am J Physiol Cell Physiol 2002;282:C1469-C1482.
18. Davies P.F. How do vascular endothelial cells respond to blood flow? News Physiol Sci 1989;4:22-25.
19. de Wit C. Closing the gap at hot spots. Circ Res 2007;100 (7):931-933.
20. de Wit C., Bolz S. & Pohl U. Interaction of endothelial autacoids in microvascular control. Z Kardiol 2000; 89, 113-116.
21. de Wit C. & Griffith T.M. Connexins and gap junctions in the EDHF phenomenon and conducted vasomotor responses. Pflugers Arch 2010;459:897-914.
22. de Wit C., Roos C., Bolz S. & Pohl U. Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion. Physiol genomics 2003;13, 169-177.
23. de Wit C. et al. Impaired conduction of vasodilation along arterioles in Connexin 40 deficient mice. Circ Res 2000;86, 649-655.
24. Decard B.F. & Bolz S. Einfluss von Sphingosin-1-Phosphat Phosphohydrolase 1 (SPP1) und modulatorische Veränderungen der Sphingosinkinase (Sk1) Aktivität auf den mikrovaskulären Tonus von isolierten Widerstandsarterien. 2010;37-37.
25. Di A & Malik AB. TRP channels and the control of vascular function. Curr Opin Pharmacol 2010;285:127-132.
26. Dora K.A. Intercellular calcium signalling :the artery wall. Cell and developmental biology 2001;12:27-35.
27. Dora K.A, Doyle M.P. & Duling B.R. Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles. Proc Natl. Acad. Sci. 1997;94:6529-6534.
28. Dora KA. An indirect influence of phenylephrine on the release of endothelium derived vasodilators of small mesenteric arteries. 2000;129:381-387.

29. Elfgang C. et al. Specific Permeability and selective formation of gap junction channels in connexin transfected Hela cells. *The Journal of Cell Biology* 1995;129:805-817.
30. Evans W.H., De Vuyst E. & Leybaert L. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem J.* 2006; 397, 1-14.
31. Evans W.H. & Leybaert L. Mimetic peptides as blockers of connexin channel-facilitated intercellular communication. *Cell Commun Adhes* 2007;14:265-273.
32. Evans W.H. & Martin P.E.M. Gap junctions: structure and function. *Mol Membr Biol* 2002;19:121-136.
33. Fan J. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2003;10:63-71.
34. Feletou M & Valhoutte PM. Endothelium dependent hyperpolarisation of vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin* 2000;21:1-18.
35. Figueroa X.F. & Duling B.R. Gap junctions in the control of vascular function. *Antioxidants and Redox signaling* 2009;11:1-16.
36. Figueroa X.F., Isakson B.E. & Duling B.R. Connexins: Gaps in our knowledge of vascular function. *Physiology (Bethesda)* 2004;19:277-284.
37. Figueroa X.F., Isakson B.E. & Duling B.R. Vascular gap junctions in hypertension. *Hypertension* 2006;48:804-811.
38. Follonier L., Schaub S., Meister J.J. & Hinz B. Myofibroblast communication is controlled by intercellular mechanical coupling. *J Cell Sci* 2008;121:3305-3316.
39. Gomes P., Srinivas S.P., Vereecke J. & Himpens B. ATP-dependent paracrine intercellular communication in cultured bovine corneal endothelial cells. *IOVS* 2005;46:104-113.
40. Gong X.Q. & Nicholson B.J. Size selectivity between gap junction channels composed of different connexins. *Cell Commun and Adhesion* 2001;8:187-192.
41. Guthrie P.B. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J. Cell Sci.* 1999;119:520-528.
42. Haefliger J.A, Nicod P. & Meda P. Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovasc Res* 2004;62:345-356.
43. Hansen M. Intercellular calcium signaling induced by extracellular adenosine 5'-triphosphate and mechanical stimulation in airway epithelial cells. *J. Cell Sci.* 1993;106:995-1004.
44. Hassinger T.D. An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996;93:13268-13273.

45. Heberlein K.R., Straub A.C. & Isakson B.E.The myoendothelial junction: breaking through the matrix.*Microcirculation* 2009;16:307-322.
46. Heydarkhan-Hagvall S et al.Co-culture of endothelial cells and smooth muscle cells affects gene expression of angiogenic factors.*J Cell Biochem* 2003;89:1250-1259.
47. Hofer T., Politi A. & Heinrich R.Intercellular Ca 2+ wave propagation through gap junctional Ca2+ diffusion; a theoretical study.*Biophys* 2001;80:75-87.
48. Hoffmann A., Gloe T., Pohl U. & Zahler S. Nitric oxide enhances de novo formation of endothelial gap junctions. *Cardiovascular research* 2003;60,421-430.
49. Humphrey J.D.Vascular adaptation and mechanical homeostasis at tissue, cellular and subcellular levels.*Cell Biochemistry and Biophysics* 2008;50:53-78
50. Hung I., Chou Y., Liu H-F., Shang S-C. & Tsai C-H. connexin 37 gene polymorphism and coronary artery disease in Taiwan.*Internal journal of cardiology* 2001;81, 251-255.
51. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Bryns RE & Chaudhuri G.Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.*Natl Acad Sci USA* 1987;84:9265-9269.
52. Isakson B.E & Duling B.R.Heterocellular contact at the myoendothelial junction influences gap junction organization.*Circ.Res.* 2005;97:44-51.
53. Isakson B.E., Ramos S.I. & Duling B.R.Calcium and IP3 mediated signaling across the myoendothelial junction.*Circ Res.* 2007;100:246-254.
54. Jaffe E.A.Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria.*J.Clin Invest* 1973;52:2745-2756.
55. Jorgensen NR.ATP-and gap junction dependent intercellular calcium signaling in osteoblastic cells.*J Cell Biol* 1997;139:497-506.
56. Kameritsch P. Opposing effects of nitric oxide on different connexins expressed in the vascular system. *Cell communication and adhesion* 2003;10, 305-309.
57. Kameritsch P. et al. Nitric oxide specifically reduces the permeability of Cx 37 containing gap junctions to small molecules. *J. cell physiol.* 2004;203, 233-242.
58. Kameritsch P., Pogoda K. & Pohl U.Channel-independent influence of connexin 43 on cell migration.*Biochim Biophys Acta* 2012;1818, S.1993-2001.
59. Kameritsch P., Pogoda K., Ritter A., Münzing S & Pohl U.Gap junctional communication controls the overall endothelial calcium response to vasoactive agonists.*Cardiovasc.Res.* 2012;93(3):508-515.

60. Kang M. & Othmer HG.Spatiotemporal characteristics of calcium dynamics in astrocytes.CHAOS 2009;19:037116-1-037116-21.
61. KilarSKI W.M., Dupont E. & Coppen S.Identification of two further gap junctional proteins, connexin 40 and connexin 45, in human myometrial smooth muscle cells at term.Eur J Cell Biol 1998;75:1-8.
62. King T.J. & Lampe PD.Temporal regulation of connexin phosphorylation in embryonic and adult tissues.Biochim Biophys Acta 2005;1791:24-35.
63. Klinke R & Silbernagel S.Das Kreislaufsystem.Lehrbuch der Physiologie 2003;4:146-188.
64. Komoszynski M. & Wojtczak A.Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1) function and relationship to ATPases.Biochim Biophys Acra 1996;1310 (2):233-241.
65. Krüger O. et al. Altered dye diffusion and upregulation of Connexin 37 in mouse aortic endothelium deficient in Connexin 40. J vasc res 2002;39, 160-172.
66. Kwak B., Mulhaupt F., Veillard N., Gros & ach F. Altered expression of vascular connexin expression in atherosclerotic plaques. Arterioscler Thromb Vasc Biol.2002; 13, 225-230.
67. Kwak BR & Jongsma HJ.Selective inhibition of gap junction channel activity by synthetic peptides.Am J Physiol 1999;516:679-685.
68. Laemmli U.K.Cleavage of strucural proeins during the assembly of the head of bacteriophage T4.Nature 1970;227:680-685.
69. LamboleY M. et al.Evidence for signalling via gap junctions from smooth muscle to endothelial cells in rat mesenteric arteries: possible implcation of a second messenger.Cell Calcium 2005;37:311-320.
70. Lampe PD & Lau AF.Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins.Arch. Biochem. Biophys 2000;384:205-215.
71. Lampe PD & Lauf AF.The effect of connexin phosphorylation on gap junctional communication.Int.J.Biochem Cell Biol 2004;36:1171-1186.
72. Lau A.F et al.Regulation of connexin 43 function by activated tyrosine protein kinases.J Bioenerg.Biomembranes 1996;28:359-368.
74. Leybaert L & Sanderson MJ.Intercellular Ca (2+) waves: mechanisms and function.Physiol Rev 2012;92:1359-1392.
75. Liao Y, Day KH, Damon DN & Duling BR.Endothelial cell specific knockout of connexin 43 causes hypotension and bradycardia in mice.Acad Sci USA 98:9989-9994.

76. Lin R., Warn-Carmer B.J., Kurata W.E. & Lau A.F.v-Src phosphorylation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication.J Cell Biol 2001;154:815-827.
77. Little T.L., Beyer E.C. & Duling B.R.Connexin 43 and connexin 40 gap junctional proteins are present in arteriolar smooth muscle and endothelium in vivo.Am J Physiol 1995;268:729-739.
78. Little T.L., Xia J. & Duling B.R.Dye tracers define differential endothelial and smooth muscle coupling patterns within the arteriolar wall.Circ.Res. 1995;76:498-504.
79. Long J, Junkin M, Wong P.K, Hoying J & Deymier P.Calcium waves propagation in networks of endothelial cells: Model-based theoretical and experimental study.PLOS Computational biology 2012;8:1-14.
80. Lu C. & Mc Mahon D.G.Modulation of hybrid bass retinal gap junction channel gating by nitric oxide.J Physiol 1997;499:689-699.
81. Matchkov VV et al.Analysis of effects on connexin-mimetic peptides in rat-mesenteric small arteries.Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006;291:357-367.
82. Mc Kinnon R.L et al.Reduction of electrical coupling between microvascular endothelial cells by NO depends on connexin 37.Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009;297:93-101.
83. Mc Sherry IN et al.A role of heterocellular coupling and EETs in dilation of rat cremaster arteries.Microcirculation 2006;13:119-130.
84. Meininger G.A, Zawieja D.C, Falcone J.C, Hill A.M & Davey J.P.Calcium measurement in isolated arterioles during myogenic and agonist stimulation.Am.J.Physiol 1991;261:950-959.
85. Moerenhout M., Himpens B. & Vereecke J.Intercellular communication upon mechanical stimulation of CPAE- endothelial cells is mediated by nucleotides.Cell Calcium 2001;29:125-136.
86. Morel S. et al.Endothelial specific deletion of the gap junction protein connexin 43 reduces arteriosclerosis in mice.Circulation 2008;118:S_473.
87. Moreno A. & Lau A.F.Gap junction channel gating modulated through protein phosphorylation.Progress in Biophysics and Molecular Biology 2007;94:107-119.
88. Morley G.E., Taffet S.M. & Delmar M.Intramolecular interactions mediate pH regulation of connexin 43 channels.Biophys J 1996;70:1294-1302.
89. Newman EA.Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Müller cells.Neurosci 2001;21:2215-2223.
90. Nihei OK, Campos de Carvalho AC, Spray DC, Savino W & Alves LA.A novel form of cellular communication among thymic epithelial cells: intercellular calcium wave propagation.Am J Physiol Cell Physiol 2003;285:C1304-C1313.

91. Nilius B., Droogmans G. & Wondergem R. Transient receptor potential channels in endothelium: solving the calcium entry puzzle ? *Endothelium* 2003;10:5-15.
92. Paemeleire K. et al. Intercellular Calcium waves in HeLa cells expressing GFP-labeled Connexin 43, 32 or 26. *Molecular Biology of the Cell* 2000;11:1815-1827.
93. Pan F. Screening of gap junction antagonists on dye coupling in the rabbit retina. *Vis Neurosci.* 2007;24(4):609-618.
94. Retamal M.A., Yin S., Altenberg G.A. & Reuss L. Modulation of Cx46 hemichannel by nitric oxide. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296:1356-1363.
95. Retamal M.A., Cortes C.J., Reuss L., Bennett M.V. & Saez J.C. S-nitrosylation and permeation through connexin 43 hemichannels in astrocytes. Induction by oxidant stress and reversal by reducing agents. *Proc. Natl Acad Sci* 2006;103:4475-4480.
96. Robb-Gaspers L.D. Coordination of Calcium signaling by intercellular propagation of calcium waves in the intact liver. *J.Biol.Chem* 1995;270:8102-8107.
97. Rodenwaldt B., Pohl U. & de Wit C. Endogenous and exogenous NO attenuates conduction of vasoconstrictions along arterioles in the microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:2341-2348.
98. Roh C.R., Heo J.H., Yang S.H. & Bae D.S. Regulation of connexin 43 by nitric oxide in primary uterine myocytes from term pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:434-440.
99. Rohen J.H. & Lütjen-Drecoll E. Funktionelle Embryologie: die Entwicklung der Funktionssysteme des menschlichen Organismus. Schattauer Verlag; Auflage: 4 2011;71-71.
100. Rottingen J.A. & Iversen J.G. Ruled by waves ? Intracellular and intercellular calcium signalling. *Acta Physiol Scand* 2000;169:203-219.
101. Rummery N., Hickey H., Mc.Gurc G. & Hill C. Connexin 37 is the major connexin expressed in the media of caudal artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22, 1427-1432.
102. Saez J.C., Berthoud V.M., Branes M.C., Martinez A.D. & Beyer E.C. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and function. *Physiol Rev* 2003;83:1359-1400.
103. Sakamoto N, Ohashi T & Sato M. Effect of fluid shear stress on migration of vascular smooth muscle cells in cocultured model. *Ann Biomed Eng.* 2006;34:408-415.
104. Sanderson M.J. Mechanical stimulation and intercellular communication increases intracellular Calcium in epithelial cells. *Cell Regul.* 1990;1:585-596.

105. Sanderson M.J. Intercellular calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Ciba Found Symposium* 1995;188:175-189.
106. Sanderson M.J., Charles A.C., Boitano S. & Dirksen E.R. Mechanism and function of intercellular calcium signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1994;98:173-187.
107. Sandow S.L., Goto K., Rummery N.M. & Hill C.E. Developmental changes in myoendothelial gap junction mediated vasodilator activity in the rat saphenous artery. *J Physiol* 2004;556:875-886.
108. Sandow SL & Hill CE. Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses. *Circ Res* 2000;86:341-346.
109. Sato T, Haimovici R, Kao R, Li AF & Roy S. Downregulation of Connexin43 expression by high glucose reduces gap junction activity in microvascular endothelial cells. *Diabetes* 2002;51:1565-1571.
110. Secomb T.W. Theoretical models for regulation of blood flow. *Microcirculation* 2008;15:765-775.
111. Segal SS. Cell to cell communication coordinates blood flow control. *Hypertension* 1994;23:1113-1120.
112. Simard M, Arcuino G, Takano T, Liu QS & Nedergaard M. Signaling at the gliovascular interface. *J Neurosci* 2003;23:9254-9262.
113. Simon A. & Goodenough D. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol* 1998;8:477-483.
114. Simon A. & Mc Whorter A. Decreased intercellular dye transfer and downregulation of non ablated connexins in aortic endothelium deficient in connexin 37 or connexin 40. *Journal of Cell Science* 2003;116:2223-2236.
115. Simon A.M. & Mc Whorter A.R. Vascular abnormalities in mice lacking the endothelial gap junction proteins connexin 37 and connexin 40. *Developmental biology* 2002;251:206-220.
116. Sohl G. & Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res*. 62:228-232.
117. Solan J.L. & Lampe P.D. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochimica and Biophysica Acta* 2005;1711:154-163.
118. Stalmans P. & Himpens B. Confocal imaging of calcium signaling in cultured rat retinal pigment epithelial cells during mechanical and pharmacologic stimulation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1997;38:176-187.

119. Straub A.C et al.Compartmentalized Connexin 43 S-Nitrosylation/Denitrosylation regulates heterocellular communication in the vessel wall.Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011;31:399-407.
120. Straub A.C et al.Endothelial cell expression of hemoglobin alpha regulates nitric oxide signalling.Nature 2012;491:473-477.
121. Tallini Y.N. et al.Propagated endothelial calcium waves and arteriolar dilation in vivo: measurements in Cx40BAC GCaMP2 transgenic mice.Circ Res 2007;101:1300-1309.
122. Taylor MS et al.Altered expression of small conductance Ca²⁺ activated K+(SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure.Circ Res 2003;93:124-131.
123. Thodeti CK et al.TRPV4 channels mediate cyclic strain-induced endothelial cell reorientation through integrin to integrin signaling.Circ Res 2009;104:1123-1130.
124. Tiruppathi C., Ahmmmed G.U., Vogel S.M. & Malik A.B.Ca 2+ signalling, TRP channels and endothelial permeability.Microcirculation 2006;13:693-708.
125. Toma I. et al.Connexin 40 and ATP-dependent intercellular calcium wave in renal glomerular endothelial cells.Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2008;294:1769-1776.
126. Tsai CH, Yeh HI, Tian TY, Lu CS & Ko YS.Down-regulating effect of nicotine on connexin43 gap junctions in human umbilical vein endothelial cells is attenuated by statins.Eur J Cell Biol 2004;82:589-595.
127. Uhrenholt T.R., Schjerning J., Vanhoutte P.M., Jensen B.L. & Skott O.Intercellular calcium signaling and nitric oxide feedback during constriction of rabbit renal afferent arterioles.Am J Physiol Renal Physiol 2007;292:1124-1131.
128. van Rijen H.V.M., van Kempen M.J.A., Postma S & Jongsma H.J.Tumour necrosis factor alpha alters the expression of connexin43, connexin40 and connexin 37 in human umbilical vein endothelial cells.Cytokine 1998;10:258-264.
129. Walker D.L., Vacha S.J., Kirby M.L. & Lo C.W.Connexin 43 deficiency causes dysregulation of coronary vasculogenesis.Dev. Biol 2005;284:479-498.
130. Wang H.H. et al.Activation of endothelial cells to pathological status by down-regulation of Connexin 43.Cardiovasc Res 2008;79:509-518.
131. Warn-Carmer B.J. et al.Characterization of the mitogen activated protein kinase phosphorylation sites on the connexin 43 gap junction protein.J Biol Chem 1996;271:3779-3786.
132. White T.W. & Bruzzone R.Multiple connexin proteins in single intercellular channels: connexin compatibility and functional consequences.J Bioenerg Biomembr 1996;28:339-350.

133. Wong C., Christen T., Pfenniger A., James R.W. & Kwak B.R. Do allelic variants of the connexin 37 1019 gene polymorphism differentially predict for coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2007;191:355-361.
134. Wong C. et al. Connexin 37 protects against atherosclerosis by regulating monocyte adhesion. *Nature Medicine* 2006;8,950-954 (2006).
135. Yashiro Y. & Duling B.R. Integrated calcium signaling between smooth muscle and endothelium of resistance vessels. *Circ. Res* 2000;87:1048-1054.
136. Yashiro Y. & Duling B.R. Participation of intracellular calcium stores in arteriolar conducted responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H65-H73.
137. Yeh HI et al. Reduced expression of endothelial connexins 43 and 37 in hypertensive rats after 7-day carvediol treatment. *Am J Hypertens* 2006;19:129-135.
138. Ying X., Minamiya Y., Fu C. & Bhattacharya J. Calcium waves in lung capillary endothelium. *Circ. Res.* 1996;79:898-908.
139. Ziegelstein RC, Spurgeon HA & Pili R.A functional ryanodine receptor sensitive intracellular Ca²⁺ store is present in vascular endothelial cells. *Circ Res* 1994;74:151-156.
140. Zimmermann B. The mechanism mediating regenerative intercellular Calcium waves in the blowery salivary gland. *EMBO J.* 1999;18:3222-3231.

Danksagung:

In erster Linie möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Ulrich Pohl und meiner Betreuerin Dr. Petra Kameritsch für die Überlassung des Themas meiner Dissertation und die Anleitung und Betreuung während der experimentellen Arbeit bedanken.

Herrn Professor Pohls Anregungen und Kritik während der experimentellen Phase haben sehr zur späteren Qualität der Arbeit beigetragen. Zudem haben sich die Erfahrungen, die ich bei meiner Teilnahme im Rahmen des FoeFoLe Projekts, in regelmäßigen Journal-Clubs und der Teilnahme an Kongressen, sowie als studentische Hilfskraft in Physiologiepraktika sammeln konnte, auch in meiner Ausbildung als klinisch tätige Ärztin als sehr hilfreich erwiesen.

Den medizinisch technischen Assistenten unserer Arbeitsgruppe Frau Silvia Münzing, Frau Ulrike Wilhelm-Forster, Sabine D`Avis, Dorothee Gössel und Katarzyna Stefanowski danke ich für die gründliche Einarbeitung in die experimentellen Methoden sowie die Bereitstellung bzw. Versorgung von Zellen, wenn für mich die Zeit parallel zum Studium etwas zu knapp war.

Besonders möchte ich mich auch bei meinen Mitdoktoranden Angela Ritter, Theres Hennig und Stefan Wallner für die praktischen Vorschläge zur Umsetzung des Projekts bedanken.

Mein letzter Dank gilt meiner Familie und meinem Ehemann, welche durch ihre liebevolle Unterstützung einen wesentlichen Teil zu dieser Arbeit beigetragen hat.

Eidesstattliche Versicherung

Pintsch Monika

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Cx37-abhängige Calciumsignalausbreitung durch myoendotheliale Gap Junctions

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin