

Extrazelluläres ATP schützt humane Endothelzellen vor Ischämie-induzierter Apoptose

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Daniel Urban

aus Balingen

Gießen 2010

Aus dem Physiologischen Institut
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

1. Gutachter: PD Dr. Thomas Noll

2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus T. Preissner

Tag der Disputation: 15.12.2010

Inhaltsverzeichnis

A	Verzeichnis der Abkürzungen	VI
B	Verzeichnis der Abbildungen	IX
C	Verzeichnis der Tabellen	XI
1.	Einleitung	1
1.1	Das Endothel – Aufgaben und Bedeutung	2
1.2	Apoptose	3
1.3	Die Rolle von extrazellulärem ATP als Signalmolekül	9
1.4	Die Bedeutung anti-apoptotischer Signalwege	13
1.5	Fragestellung	16
2.	Material	17
2.1	Chemikalien	17
2.1.1	Häufig verwendete Chemikalien	17
2.1.2	Agonisten und Inhibitoren	18
2.1.3	RNA-Interferenz	19
2.1.4	Molekulargewichtsmarker	19
2.1.5	Primär-Antikörper	19
2.1.6	Sekundär-Antikörper	19
2.1.7	Verwendete Kits	20
2.2	Geräte und Laborbedarf	21
2.2.1	Zellkultur	21
2.2.2	Gelelektrophorese	21
2.2.3	Sonstige Geräte	21
2.2.4	Verbrauchsmaterialien	22
2.2.5	Auswertung	22

3.	Methoden	23
3.1	Experimenteller Aufbau	23
3.2	Zellbiologische Methoden	24
3.2.1	Gewinnung von Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene	24
3.2.2	Anlegen der Primärkultur	25
3.2.3	Anlegen der Versuchsschalen	26
3.2.4	Bestimmung der ATP-Konzentration	26
3.2.5	Messung der LDH-Aktivität	27
3.2.6	RNA-Interferenz	28
3.3	Proteinbiochemische Methoden	29
3.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
3.3.2	Western Blot	32
3.3.3	Immundetektion	33
3.3.4	Immunzytochemie	35
3.4	Statistische Auswertung	36
4.	Ergebnisse	37
4.1	Ischämie-induzierte Apoptose in humanen Endothelzellen	38
4.2	ATP-Freisetzung aus humanen Endothelzellen während Ischämie	39
4.3	Bedeutung von Connexin43-Halbkanälen für die ATP-Freisetzung während Ischämie	41
4.3.1	Nachweis von Connexin43 in humanen Endothelzellen	41
4.3.2	Herunterregulation von Connexin43	42
4.3.3	Connexin43-abhängige ATP-Freisetzung während Ischämie	43
4.4	Wirkung von ATP auf die Ischämie-induzierte Caspase 3-Aktivierung	44
4.5	Bedeutung von Purinrezeptoren für die Vermittlung des anti-apoptotischen Effekts von extrazellulärem ATP	48
4.6	Identifikation des für den anti-apoptotischen Effekt verantwortlichen P2-Rezeptor-Subtyps.	50
4.7	Rolle intrazellulärer Signalwege bei der P2Y ₂ -Rezeptor-vermittelten anti-apoptotischen Wirkung von extrazellulärem ATP	54
4.7.1	Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt	54
4.7.2	Hemmung des MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalwegs	55

5.	Diskussion	59
5.1	Simulierte Ischämie führt zu einer Connexin43-abhängigen ATP-Freisetzung aus humanen Endothelzellen	59
5.2	Extrazelluläres ATP wirkt der Ischämie-induzierten Apoptose humaner Endothelzellen durch Aktivierung von P2-Rezeptoren entgegen	60
5.3	Die anti-apoptotische Wirkung von ATP ist auf eine Stimulation von P2Y ₂ -Rezeptoren zurückzuführen	62
5.4	Die anti-apoptotische Wirkung von ATP wird durch gleichzeitige Aktivierung des MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalwegs vermittelt . . .	63
5.5	Schlussfolgerung und Ausblick	66
6.	Zusammenfassung	69
7.	Summary	70
8.	Literaturverzeichnis	71
9.	Erklärung	81
10.	Danksagung	82

A Verzeichnis der Abkürzungen

AA	Acrylamid
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AIF	Apoptosis-inducing factor
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ANOVA	Analysis of variance
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bcl-2	B-cell-lymphoma-2
BisAA	Bis-Acrylamid
BSA	Bovine Serum Albumin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	Cyclisches Adenosin-5'-monophosphat
Caspase	Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Proteasen
CCD	Charge coupled device
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cx	Connexin
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECGS	Endothelial cell growth supplement
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular regulated kinase
FasL	Fas Ligand
FCS	Fetal calf serum
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H ₂ O	Wasser

HBSS	Hank's buffered salt solution
HCl	Salzsäure
HRP	Horseradish peroxidase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
Ig	Immunglobulin
IP ₃	Inositoltriphosphat
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LDH	Lactatdehydrogenase
LSM	Laser scanning microscope
mAk	Monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MI	Myokardinfarkt
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	Messenger RNA
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-Hydroeen
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
P2R	P2-Rezeptor
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
pAk	Polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphate buffered saline
PCI	Perkutane Katheterintervention
PDK1	Phosphoinositide dependent kinase
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C

Po ₂	Sauerstoffpartialdruck
raf	Rapid accelerating fibrosarcoma
ras	Rapid accelerating sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Sodium dodecylsulfate
SEM	Standard error of the mean
siRNA	Short interfering RNA
t-Bid	Truncated-Bid
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF-R	Tumor necrosis factor receptor
TNF α	Tumor necrosis factor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/ml	Units/ml
UTP	Uridin-5'-triphosphat
VEGF	Vascular endothelial growth factor
$\alpha\beta$ -me-ATP	$\alpha\beta$ -methylen-Adenosin-5'-triphosphat

B Verzeichnis der Abbildungen

	Seite
Abb. 1.1:	Vergleich der morphologischen Veränderungen im Geschehen des nekrotischen und des apoptotischen Zelltods 4
Abb. 1.2:	Vereinfachte Darstellung des extrinsischen und des intrinsischen Signalwegs des apoptotischen Zelluntergangs 7
Abb. 1.3:	Vereinfachte Darstellung der Aktivierung des anti-apoptotisch wirksamen MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalwegs durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren 15
Abb. 3.1:	Schematische Darstellung der verwendeten Hypoxiekammer. . . 23
Abb. 3.2:	Darstellung der Luciferin/Luciferase-Reaktion 26
Abb. 3.3:	Aktivitätsmessung der Laktat-Dehydrogenase 27
Abb. 4.1:	Wirkung von simulierter Ischämie auf die endotheliale Caspase 3-Aktivierung 37
Abb. 4.2:	Ischämie-induzierte Aktivierung der endothelialen Caspase 3 . . 38
Abb. 4.3:	Ischämie-induzierte Freisetzung von ATP aus HUVEC 39
Abb. 4.4:	Messung der LDH-Aktivität nach 10-minütiger Ischämie 40
Abb. 4.5:	Expression von Connexin43 in HUVEC. 41
Abb. 4.6:	Hemmung der Connexin43-Expression in HUVEC durch RNA-Interferenz 42
Abb. 4.7:	Connexin43-abhängige ATP-Freisetzung während simulierter Ischämie. 43
Abb. 4.8:	Wirkung von extrazellulärem ATP auf die Ischämie-induzierte Caspase 3-Aktivierung in HUVEC 45
Abb. 4.9:	Einfluss von extrazellulärem ATP auf die Ischämie-induzierte Caspase 3-Aktivierung in HUVEC. 47
Abb. 4.10:	Rolle von Purinrezeptoren bei der Vermittlung des anti-apoptotischen Effekts von extrazellulärem ATP in HUVEC . . 49
Abb. 4.11:	Wirkung von Purinrezeptor-Agonisten auf die endotheliale Apoptose während simulierter Ischämie. 53
Abb. 4.12:	Phosphorylierung von ERK 1/2 und Akt nach ATP- oder UTP-Stimulation während simulierter Ischämie. 55

Abb. 4.13:	Hemmung des MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalwegs durch spezifische Inhibitoren.	56
Abb. 4.14:	Bedeutung des MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalwegs für die anti-apoptotische Wirkung von ATP während simulierter Ischämie.	57
Abb. 4.15:	Bedeutung des MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalwegs für die anti-apoptotische Wirkung von UTP während simulierter Ischämie.	58
Abb. 5.1:	Zusammenfassende Darstellung der Untersuchungsergebnisse. .	65

C Verzeichnis der Tabellen

	Seite
Tab. 1.1: P2-Rezeptoren in humanen Endothelzellen und deren Agonisten	11
Tab. 3.1: Sequenzen der verwendeten siRNA duplex	28
Tab. 3.2: Zusammensetzung der für die SDS-PAGE verwendeten Trenngele	31
Tab. 3.3: Zusammensetzung des für die SDS-PAGE verwendeten Sammelgels	31
Tab. 3.4: Zusammensetzung der für den Western Blot verwendeten Puffer	32
Tab. 3.5: Für den immunologische Nachweis verwendete Primär-Antikörper.	33
Tab. 3.6: Für den immunologische Nachweis verwendete Sekundär-Antikörper.	34
Tab. 3.7: Für den immunzytochemischen Nachweis verwendete Primär-Antikörper.	35
Tab. 3.8: Für den immunzytochemischen Nachweis verwendete Sekundär-Antikörper	36

1 Einleitung

Seit vielen Jahren führen Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die jährlich veröffentlichte Todesursachenstatistik des statistischen Bundesamtes an. Betrachtet man die zum Tode führenden Einzelerkrankungen, so nimmt der Tod durch Myokardinfarkt (MI) den zweiten Rang ein. Erfreulicherweise ist in den letzten Jahren jedoch ein stetiger Rückgang dieser Zahlen zu verzeichnen. Dies ist vor allem auf den breitflächigen Einsatz moderner Therapieverfahren, wie der perkutanen Katheterintervention (PCI) zurückzuführen (1). Die im Rahmen der PCI durchgeführte Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes ermöglicht die Reperfusion des infarzierten Herzgewebes. Paradoxe Weise führt diese lebensrettende Reperfusion zu einer weiteren Schädigung des Herzgewebes, die als Ischämie/Reperfusionsschaden bezeichnet wird (2). Eines der Probleme in Folge des Ischämie/Reperfusionsschadens ist der Verlust von intaktem Myokard und einer daraus resultierenden Reduktion der Herzleistung. Diesem Verlust liegt neben dem nekrotischen Zelltod ein durch Apoptose verursachter Zelluntergang zu Grunde (3). Bisher ist wenig über die Mechanismen bekannt, die zu diesem apoptotischen Zelluntergang führen. Aus Untersuchungen an Rattenherzen weiß man allerdings, dass den Endothelzellen eine besondere Bedeutung zukommt. Sie treten bereits während der Ischämie in die Apoptose ein und scheinen durch Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren den apoptotischen Tod des Myokards in der Reperusionsphase zu triggern (4, 5).

Vor diesem pathophysiologischen Hintergrund stand die Suche nach endogenen Mechanismen, die einer Ischämie-induzierten Apoptose endothelialer Zellen entgegenwirken, im Mittelpunkt dieser Arbeit. Die Identifikation solcher Mechanismen sollte dabei helfen, neue Konzepte für die Behandlung des Ischämie/Reperfusionsschadens zu entwickeln. Dabei wurde der Fokus auf das extrazelluläre Signalmolekül Adenosin-5'-triphosphat (ATP) gerichtet, das unter pathophysiologischen Bedingungen gesteigert von Endothelzellen freigesetzt wird (6, 7). Nach seiner Freisetzung reguliert ATP zahlreiche zelluläre Prozesse wie Proliferation und Migration auf parakrinem Wege (8, 9). Unbeantwortet ist bisher jedoch die Frage, welchen Einfluss ATP auf die Ischämie-induzierte Apoptose des Endothels hat. Da die molekulare Analyse dieser parakrinen ATP-Wirkung am isolierten Organ nicht möglich ist, wurde in der vorliegenden Arbeit ein *in vitro* Ischämie-Modell humaner Endothelzellen eingesetzt.

1.1 Das Endothel - Aufgaben und Bedeutung

Endothelzellen kleiden als einlagige, kontinuierliche Schicht Blut- und Lymphgefäße sowie das Herz aus. Aufgrund einer Oberfläche von 6000 - 8000 m², einer Zellzahl von etwa 6×10^{13} und einem durchschnittlichen Gewicht von 1,5 kg kann das Endothel durchaus als eigenständiges Organ betrachtet werden (10, 11). Lange wurde angenommen, dass das Endothel lediglich eine funktionslose Grenzschicht zwischen Lumen und Interstitium eines Gefäßes darstellt. Im Jahr 1980 konnten Furchgott und Zawadzki jedoch zeigen, dass Endothelzellen einen Stoff freisetzen, der zur Relaxierung glatter Gefäßmuskulatur führt und sie auf diese Weise den Gefäßtonus regulieren (12). Diese bahnbrechende Erkenntnis lenkte zunehmend die Aufmerksamkeit der Forschung auf das Endothel. Tatsächlich weiß man heute, dass Endothelzellen eine heterogene Zellpopulation darstellen, die in unterschiedlichen Gefäßprovinzen zahlreiche Aufgaben übernehmen (13, 14).

So spielen Endothelzellen neben der Regulation des Gefäßtonus eine wichtige Rolle im Geschehen von Gerinnung und Thrombolysen und sind an der Aufrechterhaltung der Hämostase unmittelbar beteiligt (15, 16). Endothelzellen besitzen außerdem die Fähigkeit sowohl akute als auch chronische Entzündungs- und Immunreaktionen zu modulieren und zu regulieren (7, 17). Sie sind darüber hinaus maßgeblich an der Entstehung neuer Gefäße, der Angiogenese, beteiligt (18, 19). Die zentrale Funktion des Endothels ist jedoch die Bildung einer semipermeablen Membran zwischen Intra- und Extravasalraum. Dabei reguliert es aktiv den Austausch von Flüssigkeiten, Hormonen, Ionen, Makromolekülen sowie Zellen und erhält auf diese Weise die Schrankenfunktion der Endothelzellschicht aufrecht (20, 21).

Um diese Fülle an Aufgaben wahrzunehmen, sind Endothelzellen mit einer Reihe von Eigenschaften und Fähigkeiten ausgestattet. Neben Wachstumsfaktoren wie dem *vascular endothelial growth factor (VEGF)*, werden vasoaktive Stoffe wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin sowie hämostatische Faktoren wie Plasminogen-Aktivator synthetisiert und nach entsprechendem Stimulus freigesetzt (22, 23, 7). Des Weiteren verfügen Endothelzellen über membranständige Enzymsysteme, die Einfluss auf die Konzentration vasoaktiver Substanzen im Blut nehmen (24). Und schließlich exprimieren Endothelzellen an ihrer Oberfläche Rezeptoren, wie beispielsweise Peptid- oder Purinrezeptoren (25, 26).

Durch diese Rezeptoren vermittelt, gelangen Signale des extrazellulären Raums ins Innere der Zelle und lösen rezeptorspezifische Reaktionen aus (27). Die Vielzahl an regulatorischen Funktionen des Endothels hat zur Folge, dass die Störung seiner Integrität an zahlreichen pathophysiologischen Prozessen des kardiovaskulären Systems beteiligt ist. Dies wird deutlich, wenn man bedenkt, dass den Volkskrankheiten wie Hypertonie, Schlaganfall oder Myokardinfarkt immer eine endotheliale Dysfunktion vorausgeht.

1.2 Apoptose

Der häufig auch als physiologischer Zelltod bezeichnete Prozess der Apoptose ist eine energieabhängige und programmierte Form des Zelluntergangs. Der Hauptunterschied zur Nekrose besteht darin, dass es bei der Apoptose zu keiner unkontrollierten Freisetzung von Zellorganellen und anderen zellulären Bestandteilen kommt. Daher fehlt die, für die Nekrose charakteristische, Entzündungsreaktion des umgebenden Gewebes. Vielmehr findet bei der Apoptose eine systematische Zerstörung und anschließende Phagozytose der Zelle statt (28). Dieser Vorgang ist eines der Schlüsselemente während der Entstehung von Organsystemen sowie bei der Aufrechterhaltung der Homöostase menschlicher Gewebe (29). Jedoch kann ein Ungleichgewicht im komplexen Zusammenspiel pro- und anti-apoptischer Faktoren schnell zu einer Reihe pathophysiologischer Veränderungen führen. Neben chronisch-entzündlichen Erkrankungen und der Tumorgenese spielt die Entwicklung eines solchen Ungleichgewichts auch im kardiovaskulären System eine wichtige Rolle (30, 31, 32).

Morphologie des apoptotischen Zelltods

Bereits 1842 beschrieb der in Giessen geborene Forscher Carl Vogt eine Form des natürlichen Zelltods während der Ontogenese der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricians*), der ohne erkennbare Entzündungsreaktion abläuft (33). Über ein Jahrhundert blieben Vogts Beobachtungen jedoch unbeachtet. Erst 1965, bei Untersuchungen des ischämischen Zelltodes in Hepatozyten, beobachtete John F.R. Kerr neben dem nekrotischen Zelltod, eine weitere Form des Zelltods.

Aufgrund der morphologischen Veränderungen der Zellen, bezeichnete er diesen Befund zunächst als schrumpfende Nekrose (34). In den darauffolgenden Jahren widmeten sich Kerr und seine Kollegen Wyllie und Currie der intensiven elektronenmikroskopischen Untersuchung dieses Phänomens. Sie stellten fest, dass zu Beginn der sogenannten schrumpfenden Nekrose sowohl Zelle als auch Kern schrumpfen und das nukleäre Chromatin kondensiert. In einer späteren Phase bricht der Kern auseinander und die Zelle verliert den Kontakt zu ihren Nachbarzellen. Von der noch intakten Membran schnüren sich membranumhüllte Zellbestandteile ab und die Zelle zerfällt. Die abgeschnürten Vesikel (*apoptotic bodies*) enthalten Zellorganellen und Kernfragmente. Sie werden von Makrophagen und Nachbarzellen phagozytiert (29). Um diese Beobachtungen zusammenzufassen und klar von der Nekrose abzugrenzen, führten Kerr und Kollegen das Konzept der Apoptose ein. Das Wort Apoptose, das sie dem Griechischen entlehnten, beschreibt das Abfallen welcher Blätter im Herbst (35).

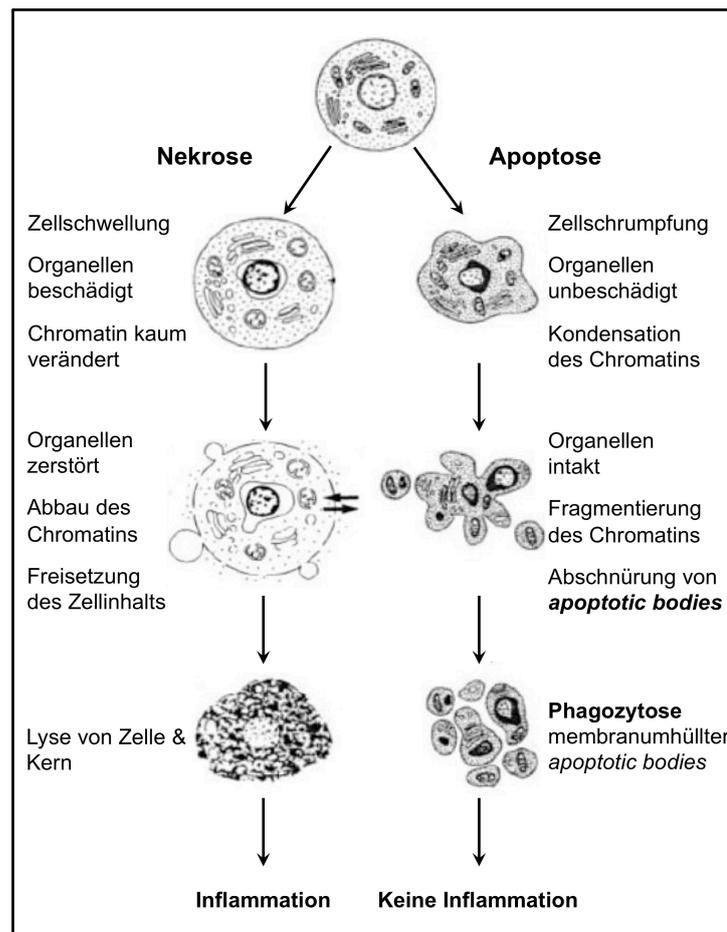


Abb. 1.1: Vergleich der morphologischen Veränderungen im Geschehen des nekrotischen und des apoptotischen Zelltods (modifiziert nach 28 & 29).

Signalwege der Apoptose

In den folgenden Jahrzehnten richtete sich die Forschung hauptsächlich auf die molekularen Mechanismen, die den morphologischen Veränderungen des apoptotischen Zelltods zu Grunde liegen. Krömer et al. konstatierten in den 1990er Jahren ein heute weitestgehend akzeptiertes, dreiphasiges Konzept des apoptotischen Zelltods, bestehend aus der Initiationsphase, der Effektorphase und der Degradationsphase (36).

Eine zentrale Funktion übernehmen dabei *Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Proteasen* (Caspasen) (37). Diese Caspasen liegen als inaktive Pro-Caspasen vor und werden vor ihrer Aktivierung in eine große (ca. 20 kDa) und eine kleine (ca. 10 kDa) Untereinheit gespalten. Anschließend lagern sich die Spaltprodukte in Form eines Heterotetramers zusammen und sind nun aktiv (38). Die aktivierten Caspasen sind in der Lage, eine Vielzahl intrazellulärer Substrate zu spalten. Zu diesen Substraten gehören, neben anderen Caspasen, Proteine der Signaltransduktion sowie des Zytoskeletts, deren gezielte Spaltung das Programm der Apoptose vorantreibt (39). Die momentan bekannten 12 Caspasen lassen sich in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe bilden die Caspasen 1, 4, 5, 11 und 12. Sie sind nicht am apoptotischen Geschehen beteiligt, sondern spielen v.a. bei inflammatorischen Prozessen eine Rolle. Die zweite Gruppe sind die Initiatorcaspasen 2, 8, 9 und 10. Diese leiten gemeinsam mit weiteren Faktoren die Apoptose ein und spalten schließlich die Effektorcaspasen 3, 6 und 7, die gemeinsam die dritte Gruppe bilden und zur Fragmentierung der nukleären DNA führen (40).

In der ersten Phase der Apoptose, der Initiationsphase, erfolgt die Aktivierung der Caspase-Kaskade. Diese Aktivierung kann auf zwei Wegen erfolgen (25, 41). Einerseits können intrazelluläre Reize, wie oxidativer Stress, DNA-Schädigung oder Wachstumsfaktorenmangel zu einer direkten, intrinsischen Schädigung der mitochondrialen Membran führen. Daraufhin werden pro-apoptotische Proteine des Intermembranspalts freigesetzt (42). Außer Cytochrom C werden auch die Pro-Caspase 2, 3 und 9, der *apoptosis-inducing factor* (AIF) sowie weitere pro-apoptotische Proteine in das Cytoplasma entlassen. Cytochrom C bildet gemeinsam mit dem *apoptotic protease activating factor 1* (Apaf-1) das Apoptosom. Das Apoptosom bindet die Initiatorprocaspase 9, die es durch Spaltung aktiviert (43).

Andererseits können extrazelluläre Reize wie Hitze, Sauerstoffmangel oder Strahlung eine rezeptorvermittelte, extrinsische Aktivierung der Apoptose einleiten. Hierbei kommt es zur Stimulation sogenannter Todesrezeptoren, die zur *tumor necrosis factor receptor gene superfamily (TNF-R)* gehören. Nach Bindung der entsprechenden Liganden, spalten diese Rezeptoren unmittelbar die Initiatorprocaspase 8 (29). Es existieren jedoch Zelltypen, darunter auch Endothelzellen, bei welchen diese direkte Aktivierung der Initiatorprocaspase 8 nicht ausreicht, um die Apoptose in Gang zu bringen. In diesen Zelltypen sorgt die Caspase 8 über eine Spaltung von Bid zum aktiven truncated-Bid (t-Bid) für eine zusätzliche, mitochondrial-vermittelte (Cytochrom C) Rekrutierung der Initiatorprocaspase 9 (44).

In der zweiten Phase der Apoptose spalten die Initiatorcaspase 8 bzw. 9 ihrerseits die Effektorprocaspasen 3, 6 und 7. Die aktiven Effektorcaspasen sind nun in der Lage, eine Vielzahl zytoplasmatischer Substrate zu spalten. Dazu zählen Proteine der Zellzyklusregulation, der Signaltransduktion, des DNA- und RNA-Metabolismus sowie des Zytoskeletts. Die Spaltung hat keine Zerstörung der Proteine zum Ziel, sondern vielmehr eine Aktivierung bzw. Inaktivierung bestimmter Elemente, im Sinne des apoptotischen Zelltods (45). Als gemeinsame Endstrecke des extrinsischen und des intrinsischen Aktivierungswegs spielt die Caspase 3 eine besondere Rolle, da sie eine Reihe apoptotischer Schlüsselemente spaltet. Dazu zählt die Spaltung des DNA-Fragmentierungsfaktors und der Caspase-aktivierten DNase I, die zur Fragmentierung der chromosomalen DNA führen (46, 47). Außerdem spaltet die Caspase 3 die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase und unterbindet dadurch wichtige DNA-Reparaturmechanismen (48).

Diese Ereignisse führen schließlich in die Degradationsphase, die dritte und letzte Phase der Apoptose. Als Folge der proteolytischen Aktivität der Caspasen zeigen sich nun die charakteristischen morphologischen Veränderungen: Schrumpfung der Zelle, Verdichtung des Zytoplasmas, Kondensation des Chromatins sowie Ausstülpungen der Kernmembran. Schließlich zerfällt die Zelle in membranumhüllte *apoptotic bodies* (34). Die Aktivierung der Caspase 3 stellt also einen irreversiblen Schritt im apoptotischen Programm dar (49, 50). Die anschließenden Prozesse führen innerhalb von Minuten zum Sterben der Zelle (51). Daher ist die Analyse der aktiven Caspase 3-Spaltprodukte (17 und 19 kDa) ein zuverlässiges Maß des apoptotischen Zelluntergangs.

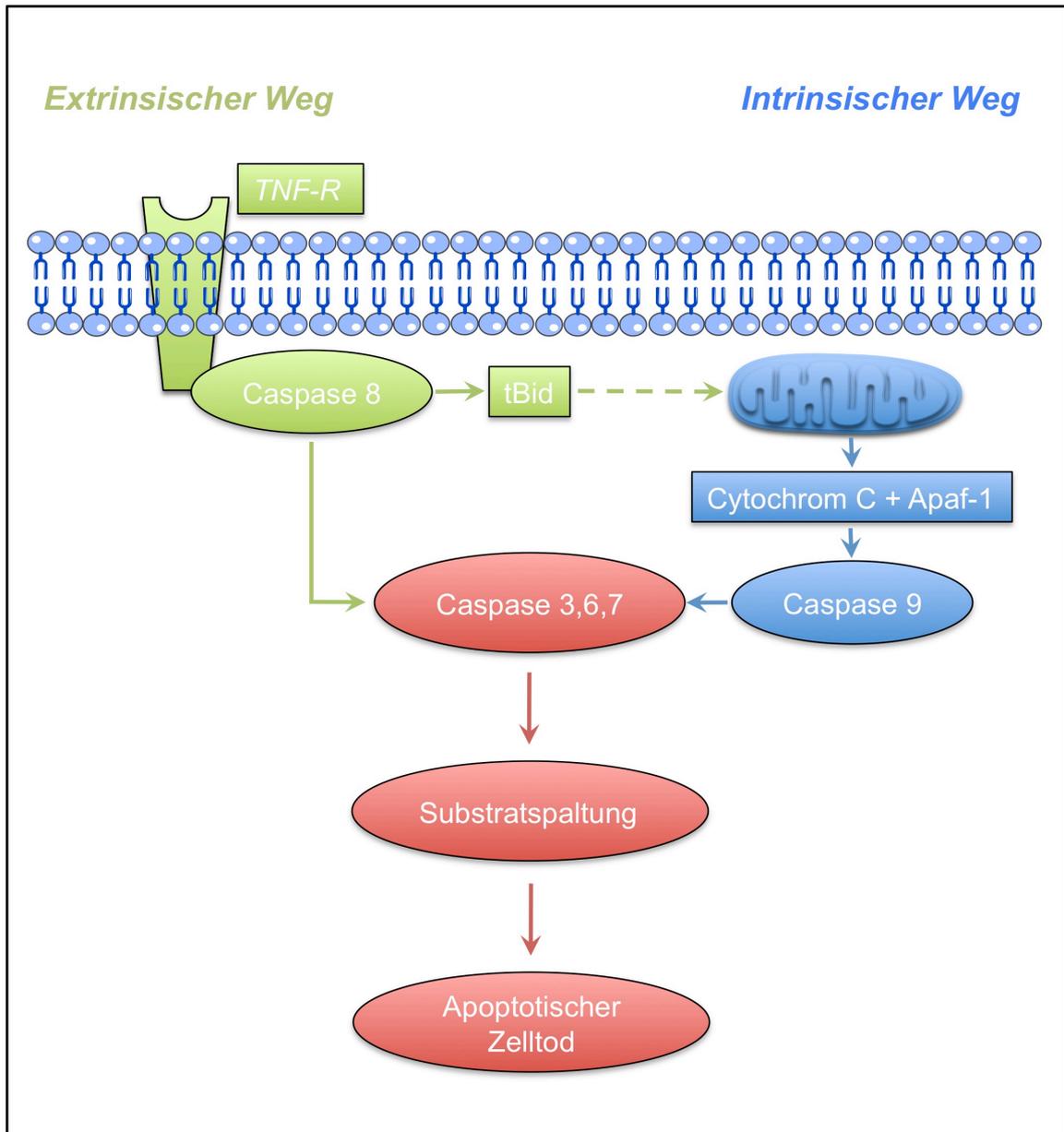


Abb. 1.2: Vereinfachte Darstellung des extrinsischen und des intrinsischen Signalwegs des apoptotischen Zelltods (Abkürzungen siehe Text).

Bedeutung der endothelialen Apoptose während Ischämie und Reperfusion

Arteriosklerotische Prozesse führen zu einer sukzessiven Stenosierung des Gefäßlumens, die schließlich einen akuten Verschluss des Gefäßes zur Folge haben kann. Die daraus resultierende Minderversorgung des Gewebes mit Sauerstoff (Hypoxie) und Nährstoffen wird als Ischämie bezeichnet. Diese führt zum progressiven Zelluntergang bis hin zum Verlust eines Organs. Daher ist eine schnelle Wiedereröffnung des betroffenen Gefäßes von essentieller Bedeutung, um das Überleben des Organs zu sichern.

Die erfolgreiche Reperfusion führt jedoch zu einer weiteren Schädigung des infarzierten Gewebes (52). Die Konsequenz des daraus resultierenden Ischämie/Reperfusionsschadens ist der Verlust funktionstüchtigen Myokards. Lange Zeit nahm man an, dass der Zelluntergang, den man im Infarktareal beobachten konnte ausschließlich auf nekrotischem Zelltod beruht. Heute ist jedoch unbestritten, dass neben der Nekrose auch der apoptotische Zelluntergang eine wichtige Rolle bei der Entstehung des myokardialen Ischämie/Reperfusionsschadens spielt (2, 53). Über die Mechanismen, die zu diesem apoptotischen Zelluntergang führen ist jedoch wenig bekannt.

Scarabelli et al. gelang es zu zeigen, dass den Endothelzellen eine entscheidende Bedeutung bei der Auslösung der myokardialen Apoptose zukommt. Sie beobachteten, dass während der Ischämie und der frühen Phase der Myokardreperfusion zunächst Endothelzellen in die Apoptose eintreten (4). Die Initiation der Apoptose erfolgte dabei durch die Caspase 9, also über den intrinsischen Weg. Erst in einer späteren Phase der Reperfusion konnten perivaskulär gelegene, apoptotische Kardiomyozyten beobachtet werden. Deren Apoptose wurde jedoch rezeptorvermittelt, das heißt über den extrinsischen Weg (Caspase 8), initiiert. Mit Fortschreiten der Reperusionsphase fanden sich zunehmend apoptotische Kardiomyozyten. Diese Beobachtungen führten Scarabelli et al. zu der Annahme, dass apoptotische Endothelzellen während der Ischämie und der frühen Phase der Reperfusion pro-apoptotische Mediatoren, wie $\text{TNF}\alpha$ oder FasL, ins Herzgewebe freisetzen und diese in Kardiomyozyten eine rezeptorvermittelte Apoptose auslösen (5). Das bedeutet im Umkehrschluss, dass eine Aktivierung anti-apoptotischer Mechanismen in Endothelzellen während Ischämie, eine Protektion des gesamten myokardialen Gewebes vor dem Ischämie/Reperfusionsschaden nach sich zieht.

1.3 Die Rolle von extrazellulärem ATP als Signalmolekül

Das 1929 von Karl Lohmann entdeckte ATP ist eine Substanz mit vielfältigen Aufgaben. Neben seiner essentiellen Funktion als universeller Energielieferant und Baustein der Ribonukleinsäure, spielt es eine wichtige Rolle als extrazelluläres Signalmolekül (54). Als solches wird es infolge mechanischer oder osmotischer Stimuli von Zellen freigesetzt. Nach seiner Freisetzung in den Extrazellulärraum wirkt es als auto- und parakrines Signalmolekül. Dabei entfaltet ATP sein regulatorisches Potential über die Bindung an Purinrezeptoren. Auf diese Weise kann es intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren bzw. inaktivieren, die eine wichtige Rolle bei der Regulation des zellulären Überlebens spielen.

Freisetzung von ATP aus Endothelzellen

Nahezu alle Körperzellen sind in der Lage, ATP freizusetzen. Die Art und Weise, wie das ATP in den Extrazellulärraum gelangt, ist jedoch Gegenstand kontroverser Diskussionen. Der Weg der Freisetzung scheint sowohl vom Stimulus als auch von der Zellart abhängig zu sein. Im Wesentlichen wurden fünf Mechanismen der ATP-Freisetzung beschrieben: (I) direkter Transport durch ATP-binding cassette- (ABC-) proteins, (II) Exozytose ATP-haltiger Vesikel, (III) Nukleosid Transporter, (IV) lytischer Zelltod, (V) Connexin-Halbkanäle (54). Studien aus unterschiedlichen Gefäßprovinzen konnten zeigen, dass die zuletzt genannten Connexin (Cx)-Halbkanäle von besonderer Bedeutung für die ATP-Freisetzung aus Endothelzellen sind (55, 56, 57).

Die Cx-Halbkanäle wurden zunächst nur als Bestandteile interzellulärer Kanäle, sogenannter *gap junction* beschrieben. Durch diese Kanäle tauschen die Zellen elektrische und chemische Signale in Form von Ionen, Wasser oder sogenannter *second messenger* aus und bilden so die Grundlage einer schnellen und gerichteten Kommunikation innerhalb eines Gewebeverbandes. Diese direkte Interaktion macht aus vielen Einzelzellen ein einheitlich agierendes Gewebe, das auf die stetig herrschenden physiologischen Veränderungen des Organismus reagieren und seinen Anforderungen gerecht werden kann (58). Mittlerweile sind mehr als 20 verschiedene Connexine bekannt, deren Molekulargewicht von 23 kDa bis 62 kDa reicht.

Nach diesem Molekulargewicht richtet sich die heute gebräuchliche Nomenklatur. Dabei setzt man hinter die Abkürzung Cx, das Molekulargewicht des Proteins. Das heißt, Cx23 steht für das Connexin, dessen Molekulargewicht 23 kDa beträgt (59, 60). Das am intensivsten untersuchte und folglich am besten verstandene Connexin ist das Cx43. Der Grund dafür ist, dass es in nahezu allen Geweben unseres Körpers vorkommt. Auch im kardiovaskulären System ist Cx43 neben den Cx37, Cx40 und Cx45 das vorherrschende Connexin (61, 62).

Da Connexine nur eine Halbwertszeit von wenigen Stunden besitzen, werden sie in den Zellen konstant synthetisiert und degradiert. Die Synthese der Connexine findet im endoplasmatischen Retikulum (ER) statt. Dort oder im trans-Golgi Netzwerk erfolgt nach der Synthese die Oligomerisierung zu Hexameren, den sogenannten Connexonen. Anschließend werden die Connexone in Vesikeln verpackt, über das Mikrotubulussystem der Zelle an die Zellmembran transportiert und dort als Halbkanäle, sogenannte *hemichannel*, integriert. Bevor es nun zur Bildung von *gap junction* mit der benachbarten Zelle kommt, scheinen die *hemichannel* frei innerhalb der Lipid-Doppelschicht der Zellmembran zu diffundieren (50).

Lange Zeit nahm man an, dass die Cx-Halbkanäle bis zu ihrer Vereinigung mit dem Cx-Halbkanal einer benachbarten Zelle zu *gap junction* im geschlossenen Zustand in der Lipidmembran diffundieren und keinerlei Funktion ausüben. Das schien plausibel, denn eine Öffnung der Kanäle hätte ein Leck der Zelle und somit deren Schädigung zur Folge. DeVries und Schwartz konnten jedoch zeigen, dass die Halbkanäle vor ihrer Vereinigung zu *gap junction* auch im geöffneten Zustand in der Zellmembran zu finden sind. In diesem Zustand bilden sie eine Verbindung zwischen dem Intra- und dem Extrazellulärraum und dienen dem Austausch von Molekülen (63).

In welchem Ausmaß Moleküle wie ATP aus Zellen freigesetzt werden, bestimmt die Leitfähigkeit bzw. Öffnungswahrscheinlichkeit der Halbkanäle. Diese wird durch den intrazellulären Calciumspiegel, mechanische und chemische Stimuli, den intrazellulären pH-Wert sowie den Zellmetabolismus beeinflusst. Die Mechanismen und Signalwege, die zu einer veränderten Leitfähigkeit der Kanäle führen, sind jedoch weitestgehend unverstanden (64).

Bedeutung membrangebundener Purinrezeptoren

Nach seiner Freisetzung in den Extrazellulärraum wirkt ATP als Signalmolekül, indem es membrangebundene Purinrezeptoren aktiviert. Diese Rezeptoren werden in P1- und P2-Rezeptoren unterteilt (65). Während P1-Rezeptoren durch Nukleoside (Adenosin) aktiviert werden, erfolgt die Aktivierung der P2-Rezeptoren durch Nukleotide (ATP). Funktionelle Unterschiede machten eine weitere Unterteilung der P2-Rezeptoren in P2X- und P2Y-Rezeptoren notwendig (66, 67). Die Familie der P2X-Rezeptoren besteht derzeit aus 7 Rezeptor-Subtypen (P2X₁₋₇), die als Ligand-gesteuerte Ionenkanäle fungieren. Die 8 Subtypen umfassende Familie der P2Y-Rezeptoren hingegen agieren als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) (68). Anhand ausführlicher mRNA- und Proteinanalysen konnten Wang et al. zeigen, dass humane Endothelzellen die metabotropen P2Y₁-, P2Y₂- und P2Y₁₁-Rezeptoren sowie den ionotropen P2X₄-Rezeptor exprimieren (69).

Jeder dieser Rezeptoren wird durch für ihn charakteristische Agonisten stimuliert. Zusätzlich zu den natürlich vorkommenden Nukleotiden wurden weitere P2-Rezeptor-Agonisten entwickelt. Der gezielte Einsatz dieser Agonisten im Rahmen pharmakologischer Ansätze hilft dabei, zu differenzieren, welcher der Rezeptoren für einen etwaigen Effekt verantwortlich ist. Die Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die in humanen Endothelzellen relevanten P2-Rezeptoren und deren Agonisten. Die in dieser Arbeit verwendeten Agonisten sind jeweils hervorgehoben.

Rezeptor	Agonisten
P2Y₁	MRS2365 > 2-MeSADP > ADP = ADPβS
P2Y₂	UTP ≥ ATP > INS37217 > Ap4A > ATPγS
P2Y₁₁	ATPγS = BzATP = ARC67085 > ATP
P2X₄	ATP ≥ 2-methylthio-ATP (1-100 μM) >> αβ-me-ATP (>300μM)

Tab. 1.1: P2-Rezeptoren in humanen Endothelzellen und deren Agonisten (modifiziert nach 70).

P2Y-Rezeptor-vermittelte Aktivierung intrazellulärer Signalwege

Als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind P2Y-Rezeptoren in der Lage, Signale der Umgebung ins Zellinnere weiterzuleiten. Nach Bindung eines Agonisten an der transmembranären Bindungsstelle kommt es zu einer Konformitätsänderung des Rezeptors, die den Austausch von GDP in GTP an der α -Untereinheit ermöglicht. Anschließend löst sich das G-Protein vom Rezeptor und zerfällt in eine α - und eine $\beta\gamma$ -Untereinheit. Derzeit sind vier unterschiedliche Klassen von $G\alpha$ -Untereinheiten bekannt: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$, und $G\alpha_{12}$ (71). Die von Endothelzellen exprimierten P2Y-Rezeptoren ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_{11}$) sind an ein $G\alpha_q$ -Protein gekoppelt und aktivieren die membranständige Phospholipase C (PLC) (72). Die PLC spaltet ihrerseits Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) (73). Das entstandene IP_3 löst sich aus der Zellmembran und diffundiert zum Endoplasmatischen Retikulum. Dort bindet es an IP_3 -Rezeptoren und bewirkt die Freisetzung von Ca^{2+} (74). DAG hingegen verbleibt in der Zellmembran gebunden und aktiviert zusammen mit zytosolischem Ca^{2+} die ebenfalls membrangebundene Proteinkinase C (75). Der $P2Y_{11}$ -Rezeptor ist zusätzlich noch an ein $G\alpha_s$ -Protein gekoppelt und kann so die Adenylatzyklase aktivieren. Dies hat einen Anstieg des *second messengers* cAMP zur Folge (76). Diese Prozesse führen schließlich zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege, die es den Zellen ermöglichen, sich veränderten Situationen anzupassen und adäquat auf extrazelluläre Reize zu reagieren.

1.4 Die Bedeutung anti-apoptotischer Signalwege

Die Regulation des zellulären Überlebens unterliegt einem komplexen Netzwerk unterschiedlicher Signalwege. Im kardiovaskulären System sind der MAPK/ERK-Signalweg und der PI3K/Akt-Signalweg entscheidend an dieser Regulation beteiligt (77).

MAPK/ERK-Signalweg

Die Proteinfamilie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) sind Serin/Threonin-Kinasen, die durch verschiedene extrazelluläre Stimuli aktiviert werden. Zur Familie der MAPK werden drei Signalwege gezählt: Der Signalweg der *extracellular-signal-regulated kinase* (ERK), der *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) sowie der *p38-MAPK* (78). Aufgrund seines anti-apoptotischen Potentials ist der MAPK/ERK-Signalweg von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit. Entsprechend ihres Molekulargewichts werden die extrazellulär regulierten Kinasen ERK 1 und ERK 2 auch als p44 und p42 bezeichnet. Die Aktivierung von ERK 1/2 erfolgt über eine dreistufige Kaskade von Phosphorylierungen. Nach der Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase (RTK) durch Wachstumsfaktoren kommt es zu Beginn dieser Kaskade zu einer Aktivierung des kleinen G-Proteins *ras* (rapid accelerating sarcoma). *Ras* führt anschließend zu einer Phosphorylierung der MAPK-Kinase-Kinase *raf* (rapid accelerating fibrosarcoma). *Raf* phosphoryliert seinerseits die MAPK-Kinase *MEK 1/2*, die dann schließlich ERK1/2 phosphoryliert und damit aktiviert (79, 80).

Neben dieser klassischen Aktivierung durch RTK sind auch G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCR) in der Lage, den MEK/ERK-Signalweg zu aktivieren. Dies geschieht auf zwei Wegen: Erstens besitzen GPCR die Fähigkeit, RTK mit Hilfe verschiedener Signalmoleküle zu transaktivieren und dadurch den *ras/raf/MEK/ERK*-Signalweg indirekt zu aktivieren. Zweitens können GPCR den MAPK/ERK-Signalweg direkt auf der Ebene von *raf* aktivieren. Dies geschieht je nach gekoppeltem G-Protein PKC- oder PKA-abhängig (81, 82). Nach seiner Phosphorylierung hat ERK 1/2 zwei Möglichkeiten in das apoptotische Geschehen einzugreifen. Einerseits kann ERK 1/2 in den Zellkern transloziert werden und dort als Transkriptionsfaktor anti-apoptotischer Proteine wirken (83).

Andererseits kann ERK 1/2 direkten Einfluss auf die Apoptose nehmen, indem sie durch gezielte Phosphorylierungen pro-apoptotische Proteine wie Bad oder Bax inaktiviert (84, 85).

PI3K/Akt-Signalweg

Neben dem MAPK/ERK-Signalweg ist die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) ein entscheidendes anti-apoptotisches Signalelement. Auch ihre Aktivierung kann durch RTK oder GPCR erfolgen (86, 87). Nach ihrer Aktivierung greift die PI3K durch gezielte Phosphorylierung intrazellulärer Moleküle in eine Vielzahl zellulärer Prozesse regulierend ein. Eines dieser Moleküle ist Phosphatidylinositol. Dieses bindet die Proteinkinase B, auch als Akt bezeichnet, und ermöglicht so deren Translokation an die Zellmembran. Dort erfolgt die Phosphorylierung von Akt durch die membranständige *phosphoinositide-dependent kinase* (PDK1) (88). Die aktivierte Akt ist nun in der Lage pro-apoptotische Proteine wie Bad, Bax oder die Pro-Caspase 9 zu phosphorylieren und damit zu inaktivieren (89, 90, 91). Darüber hinaus kann die aktivierte Akt, nach Translokation in den Nucleus, die Transkription pro-apoptotischer Faktoren unterdrücken (92).

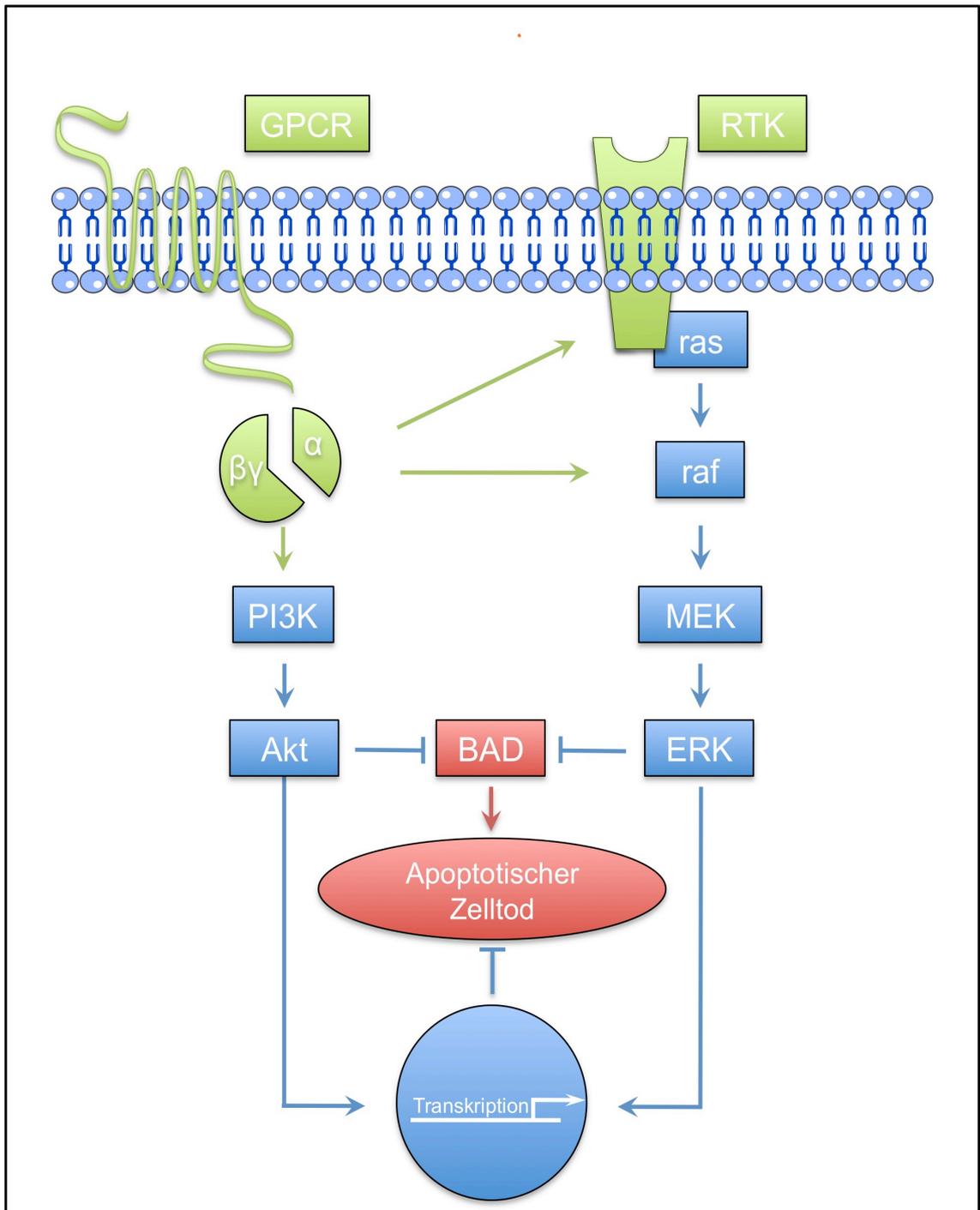


Abb. 1.3: Vereinfachte Darstellung der Aktivierung des anti-apoptotisch wirksamen MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalwegs durch G-Proteingekoppelte Rezeptoren (Abkürzungen siehe Text).

1.5 Fragestellung

Trotz großer Fortschritte in der Behandlung des akuten Myokardinfarkts ist das Hauptproblem nach wie vor der Verlust funktionstüchtigen Myokards während Ischämie und Reperfusion. Heute ist klar, dass für diesen Verlust neben der Nekrose auch der apoptotische Tod von Kardiomyozyten und Endothelzellen verantwortlich ist (3, 53). Bemerkenswert ist dabei, dass der apoptotische Zelluntergang der Kardiomyozyten während Reperfusion durch die Ischämie-induzierte Apoptose endothelialer Zellen getriggert wird (4, 5). Ziel dieser Arbeit war es daher, Mechanismen zu identifizieren, die der Progression dieser endothelialen Apoptose während Ischämie entgegenwirken, um daraus neue therapeutische Strategien für die Behandlung des Ischämie/Reperfusionsschadens abzuleiten.

Es ist bekannt, dass verschiedene pathophysiologische Stimuli wie Scherkräfte, Hyperämie oder Hypoxie zu einer Freisetzung von ATP aus Zellen des kardiovaskulären Systems führen (93, 94, 95). Nach seiner Freisetzung wirkt extrazelluläres ATP als parakrines Signalmolekül und entfaltet sein regulatorisches Potential über die Bindung an P2-Rezeptoren. Diese Befunde führten zu der zentralen Hypothese der vorliegenden Arbeit, dass Endothelzellen, die einer akuten Ischämie ausgesetzt sind, durch einen endogenen Mechanismus ATP freisetzen, das über P2-Rezeptoren vermittelt einen Prozess aktiviert, der dem apoptotischen Zelluntergang entgegenwirkt.

Um diese Hypothese zu prüfen wurden folgende Fragen gestellt:

- 1) Wird ATP während Ischämie aus humanen Endothelzellen freigesetzt?
- 2) Erfolgt die Freisetzung von ATP durch Cx43-Halbkanäle?
- 3) Wirkt extrazelluläres ATP der Entwicklung einer endothelialen Apoptose während Ischämie entgegen?
- 4) Welcher Rezeptor vermittelt den anti-apoptotischen Effekt von extrazellulärem ATP während Ischämie?
- 5) Welche Signalwege sind an der anti-apoptotischen Wirkung von extrazellulärem ATP beteiligt?

2 Material

2.1 Chemikalien

2.1.1 Häufig verwendete Chemikalien

6-Aminohexansäure	Merck-Suchard, Hohenbrunn
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
APS	Serva, Heidelberg
Basic Fibroblast Factor	Promocell, Heidelberg
Benzonase [®]	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
BSA	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Carbogen [®]	Messer Griesheim, Krefeld
Collagenase	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
DTT	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
ECL-Lösung (= SuperSignal [®] West Pico Chemiluminescent Substrate)	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
EDTA-Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Endothelial Growth Medium Kit	Promocell, Heidelberg
Ethanol	Riedel de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
FCS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glycerol (99,5 %)	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
HBSS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt

Material

Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Fluka, Neu-Ulm
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel de Haën, Seelze
Milchpulver	Applichem, Darmstadt
Natriumchlorid (99,5 %)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenkarbonat	Merck, Darmstadt
Opti-MEM [®]	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Gibco BRL, Eggenstein
Ponceau S solution	Serva, Heidelberg
SDS	Serva, Heidelberg
Stickstoff (100%)	Air Liquid, Krefeld
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
TO-PRO [®] -3 iodide	Invitrogen, Karlsruhe
Tris	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin-EDTA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Amersham, Braunschweig
β-Mercaptopropandiol	Merck, Darmstadt

2.1.2 Agonisten und Inhibitoren

Adenosin-Desaminase	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Apyrase	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
ARL 67156	Tocris Bioscience, Bristol, UK
ATP	Roche Diagnostics, Mannheim
ATP _γ S	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
LY294002	Calbiochem, Bad Soden
MRS 2365	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Suramin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
UO126	Calbiochem, Bad Soden
UTP	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
αβ-me-ATP	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

Material

2.1.3 RNA-Interferenz

Jet SI-ENDO™	Eurogenetec, Köln
siRNA duplex	Eurogenetec, Köln

2.1.4 Molekulargewichtsmarker

SigmaMarker™, high range	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
SigmaMarker™, low range	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
PageRuler™	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.5 Primär-Antikörper

<i>Anti-Akt</i> , pAk, Kaninchen IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
<i>Anti-phospho-Akt (Ser473)</i> , mAk, Maus IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
<i>Anti-Cleaved Caspase-3 (Asp175)</i> , pAk Kaninchen IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
<i>Anti-Caspase 3 active</i> , pAk, Kaninchen IgG	R&D Systems, Minneapolis, USA
<i>Anti-Connexin43</i> , mAk, Maus IgG	Becton Dickinson, Heidelberg
<i>Anti-Connexin43</i> , mAk, Maus IgM	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
<i>Anti-p42/p44 MAPK (= Anti-ERK 1/2)</i> , pAK, Kaninchen IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
<i>Anti-phospho p42/p44 MAPK</i> , (= Anti-phospho-ERK 1/2), mAk, Maus IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
<i>Anti-Vinculin (hVIN-1)</i> , mAk, Maus IgG	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

2.1.6 Sekundär-Antikörper

<i>Anti-Kaninchen-IgG</i> (Alexa Fluor® 488)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Anti-Kaninchen-IgG</i> (Alexa Fluor® 633)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Anti-Kaninchen-IgG</i> (HRP-gekoppelt)	Amersham Bioscience, Freiburg
<i>Anti-Maus-IgG</i> (HRP-gekoppelt)	Amersham Bioscience, Freiburg
<i>Anti-Maus-IgM</i> (HRP-gekoppelt)	Zymed Laboratories, San Francisco, USA

2.1.7 Verwendete Kits

CytoTox-ONE™	Promega, Mannheim
<i>Homogeneous Membrane Integrity Assay</i>	
ENLITEN® ATP Assay System	Promega, Mannheim
ENLITEN® <i>rLuciferase/Luciferin Reagent</i>	Promega, Mannheim

Alle übrigen Chemikalien wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) bezogen. Diese Chemikalien waren stets von höchster erhaltlicher Qualität und wurden nach Angaben der Hersteller gelöst und gelagert.

2.2 Geräte und Laborbedarf

2.2.1 Zellkultur

Brutschrank (Cytoperm™)	Heraeus, Hanau
Gewebehacker	Harvard Apparatus, March-Hugstetten
Mikroskop (TMS-F)	Nikon, Düsseldorf
Neubauer-Zählkammer	Superior, Marienfeld
Perfusionsanlage	Eigenbau Werkstatt Physiologisches Institut der Justus-Liebig Universität
Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Sterilbank (Lamin Air® HBB 2472)	Heraeus, Hanau

2.2.2 Gelelektrophorese

Elektroblotkammern	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Elektrophoresekammern	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Hamiltonspritze (100 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Netzgeräte (EPS 3501 XL)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.2.3 Sonstige Geräte

Digitalkamera	ChemiDoc EQ System, Bio-Rad, München
Mikrotiterplatten-Reader (Infinite M200)	Tecan, Männedorf, Schweiz
Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizer	Techne, Burkhardtsdorf
Hypoxiekammer	Eigenbau Werkstatt Physiologisches Institut der Justus-Liebig Universität
Konfokales Mikroskop (LSM 510)	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Luminometer (TD 20/20)	Promega, Mannheim
Magnet-Heizrührer	IKA-Werke, Staufen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Schüttler (WT 12)	Biometra, Göttingen
Vortexer	IKA-Werke, Staufen
Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifuge (Biofuge 15R)	Heraeus, Hanau

2.2.4 Verbrauchsmaterialien

Deckplättchen	Menzel, Braunschweig Frickenhausen
Mikrotiterplatte (96 well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nitocellulosemembran	Millipore, Schwalbach
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Primaria-Zellkulturschalen	Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße (0,5/2 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen, 10 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Röhrchen, 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter (0,2 µm Porenweite)	Sartorius, Göttingen
Trockenpapier	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Zellkulturschalen)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellschaber	Becton Dickinson, Heidelberg

2.2.5 Auswertung

LSM 510	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mac OS 10.5	Apple Inc., Cupertino, USA
Microsoft Excel 2004	Microsoft Corp., Redmond, USA
Microsoft Windows XP	Microsoft Corp., Redmond, USA
Microsoft Word 2008	Microsoft Corp., Redmond, USA
Quantity One®	Molecular Dynamics, Krefeld
SPSS	SPSS Inc., Chicago, USA

3 Methoden

3.1 Experimenteller Aufbau

In vitro Ischämie-Modell

Konfluente Endothezellen der Nabelschnurvene wurden einer simulierten Ischämie ausgesetzt. Dazu wurden die Kulturschalen zunächst in eine Hypoxiekammer gesetzt (Abb. 3.1). Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch 1 ml (3,5 cm Schale) bzw. 3 ml (6 cm Schale) des Serum-freien Inkubationsmediums ersetzt. Nach einer 30-minütigen Ruhephase erfolgte dann die Begasung mit 100% N₂ für 2 Stunden bei 37°C. Polarografische Messungen zeigten, dass durch dieses Manöver der Po₂ innerhalb weniger Minuten auf Werte unter 10 mmHg reduziert wurde. Kontrollzellen wurden während derselben Zeit unter normoxen Bedingungen kultiviert.

Inkubationsmedium (pH 7,3)

HBSS (gebrauchsfertig)	x ml
CaCl ₂	1,3 mM
MgCl ₂	1,2 mM

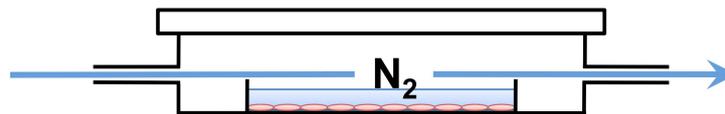


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der verwendeten Hypoxiekammer.

Pharmakologische Behandlung der Zellen

Der in dieser Arbeit eingesetzte MEK-Inhibitor UO126, der PI3K-Inhibitor LY294002 sowie der P2R-Antagonist Suramin wurden dem Medium 30 Minuten vor Beginn der simulierten Ischämie zugegeben und waren während des gesamten Experiments im Medium anwesend. Da UO126 und LY294002 die Lösung in DMSO erfordern, wurden in diesen Experimenten Kontrollen mit entsprechenden Mengen an DMSO angelegt. Der Ektonukleotidase-Inhibitor ARL 67156 sowie die P2R-Agonisten ATP, ATP_γS, αβ-me-ATP, MRS 2365 und UTP wurden jeweils zu Beginn der simulierten Ischämie zugegeben. Die eingesetzten Konzentrationen dieser Stoffe sind bei den jeweiligen Experimenten verzeichnet.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Gewinnung von Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Nabelschnüre wurden freundlicherweise von der Universitätsfrauenklinik Giessen zur Verfügung gestellt. Dort lagerten die Nabelschnüre nach der Entbindung in einem sterilen Gefäß bei 4°C. Innerhalb von 48 Stunden fand die Präparation der Nabelschnurvene nach Peters et al. statt (96). Dazu wurde nach der äußeren Reinigung der Nabelschnur auf beiden Seiten eine Knopfkanüle eingeführt und mit einem Dreiwegehahn verschlossen. Nach einer gründlichen Spülung mit HBSS erfolgte die Infusion einer Collagenaselösung. Diese verblieb für 20 Minuten bei 37°C in der Vene. Am Ende der Inkubationszeit wurde die Nabelschnurvene kraftvoll massiert, um eine Loslösung möglichst aller Endothelzellen zu erreichen. Die losgelösten Endothelzellen wurden in einem 50 ml Falcon Röhrchen aufgefangen und anschließend mit einer Mischung aus 20 ml HBSS und 1 ml FCS gespült, um die Collagenasereaktion zu stoppen. Schließlich wurden die Zellen für fünf Minuten bei 180 x g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte die Resuspension der gewonnenen Endothelzellen in 30 bis 50 ml des Anzuchtmediums.

Waschlösung

HBSS

Collagenaselösung

HBSS	x ml
Collagenase II, 293 Units/mg (wt/vol)	0,025 %
MgCl ₂	0,5 mM
CaCl ₂	1,5 mM

3.2.2 Anlegen der Primärkultur

Im Anschluss an die Gewinnung der Endothelzellen wurden jeweils 5 ml der Zellsuspension mäanderförmig auf Primariaschalen verteilt. Die Primariaschalen wurden nun bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach zwei Stunden fand eine gründliche Waschung der Primariaschalen mit HBSS statt. Dadurch sollten nicht angehaftete Endothelzellen, Erythrozyten und Fibroblasten aus den Kulturschalen beseitigt werden. Nach 24 Stunden wurden das Anzuchtmedium abgesaugt und die Primariaschalen erneut gewaschen, um Reste des Gentamycins zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen bis zum Erreichen der Konfluenz in Kulturmedium inkubiert.

Anzuchtmedium

Endothelial Cell Basal Medium	x ml
FCS (vol/vol)	10,0 %
Basic Fibroblast Factor (wt/vol)	1 ng/ml
ECGS/H (wt/vol)	0,4 %
Epidermal Growth Factor (wt/vol)	0,1 ng/ml
Hydrocortison (wt/vol)	0,1 %
Penicillin/Streptomycin-Lösung (vol/vol)	2,0 %
Gentamycin (vol/vol)	0,1 %

Kulturmedium

Endothelial Cell Basal Medium	x ml
FCS (vol/vol)	10,0 %
Basic Fibroblast Factor (wt/vol)	1 ng/ml
ECGS/H (wt/vol)	0,4 %
Epidermal Growth Factor (wt/vol)	0,1 ng/ml
Hydrocortison (wt/vol)	0,1 %
Penicillin/Streptomycin-Lösung (vol/vol)	2,0 %

3.2.3 Anlegen der Versuchsschalen

Bei subkonfluenten Primariaschalen wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen. Daraufhin wurden die Endothelzellen durch Zugabe einer Trypsin-EDTA-Lösung von der Primariaschale gelöst und in ein mit Kulturmedium befülltes 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Durch behutsames auf- und abpipettieren wurden die Zellen voneinander gelöst und im Anschluss mit Hilfe einer Neubauerkammer gezählt. Schließlich wurden etwa 2×10^4 Zellen pro cm^2 auf 3,5 cm bzw. 6 cm Schalen ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz etwa drei Tage kultiviert. 16 Stunden vor dem Experiment wurde das Serum auf 1% reduziert.

3.2.4 Bestimmung der ATP-Konzentration

Zur Messung der ATP-Freisetzung wurde die Luciferin/Luciferase-Reaktion des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (engl. *firefly*) genutzt. Bei dieser Reaktion setzt das Enzym Luciferase das Substrat D-Luciferin unter Verbrauch von ATP und Mg^{2+} zu Oxyluciferin, AMP, Pyrophosphat und CO_2 um. Die bei dieser Reaktion in Form von Licht frei werdende Energie kann mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden und verhält sich proportional zur ATP-Konzentration der Probe.

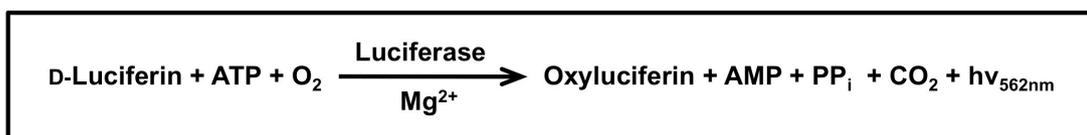


Abb. 3.2: Darstellung der Luciferin/Luciferase-Reaktion.

Im Anschluss an die Vorbereitung der Luciferin-Luciferase-Lösung nach Angaben des Herstellers erfolgte die Sammlung der Proben. Dazu wurden direkt nach einem Experiment 270 μl des Überstandes einer Versuchsschale abgenommen, in ein Reaktionsgefäß (2ml) überführt und bis zur Messung auf Eis gelagert. Nach Sammlung aller Versuchsproben eines Experiments, wurden jeweils 80 μl der Luciferin-Luciferase-Lösung und 80 μl des Überstandes einer Schale in ein frisches Reaktionsgefäß (2ml) pipettiert und mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers kurz vermischt. Daraufhin erfolgte die Messung der Lichtemission mittels eines Luminometers. Zur Einschätzung der ATP-Konzentration wurden die gewonnenen Messwerte mit einer zuvor erstellten ATP-Standard-Messkurve verglichen.

3.2.5 Messung der LDH-Aktivität

Zytotoxische Prozesse zerstören die Integrität der zellulären Membranen und führen so zu einer Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile in den Extrazellulär- raum. Einer dieser Bestandteile ist die Laktat-Dehydrogenase (LDH), ein Enzym, das sich durch zwei Eigenschaften auszeichnet. Erstens ist es im Extrazellulär- raum stabil und unterliegt nicht einer sofortigen Degradation. Zweitens zeigt die LDH auch nach der Freisetzung noch ihre enzymatische Aktivität und katalysiert die Oxidation von Lactat zu Pyruvat. Für diese Reaktion benötigt die LDH das Koenzym NAD^+ , das zu NADH reduziert wird. Das vermehrt anfallende NADH kann nun diagnostisch genutzt werden, indem es als Koenzym in einer weiteren Reaktion die Reduktion von Resazurin in den Fluoreszenzfarbstoff Resorufin katalysiert. Das bei dieser Reaktion frei werdende Licht kann photometrisch gemessen werden und verhält sich direkt proportional zur Aktivität der LDH.

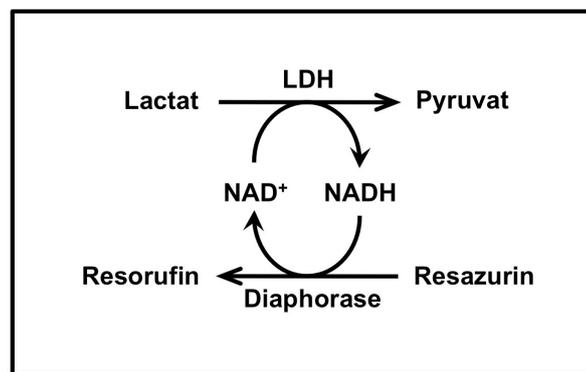


Abb. 3.3: Aktivitätsmessung der Laktat-Dehydrogenase

Vor der Messung der LDH-Aktivität erfolgte die Vorbereitung des CytoTox-ONE™-Reagenz nach Angaben des Herstellers. Zur Gewinnung der Proben wurden direkt im Anschluss an die Experimente jeweils 350 μl des Überstands aus den Kulturschalen abgenommen und in Reaktionsgefäße (1 ml) überführt. Nach Sammlung aller Proben wurden je 100 μl einer Proben in ein well einer 96-well- Mikrotiterplatte pipettiert und für 30 Minuten auf Raumtemperatur äquilibriert. Daraufhin wurden 100 μl des CytoTox-ONE™-Reagenz pro well zugefügt und für 10 Minuten inkubiert. Dann wurden 50 μl einer gebrauchsfertigen Stopplösung zugegeben, die Proben kurz geschüttelt und zur photometrischen Messung in den Mikrotiterplatten-Reader gegeben. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die vor der Messung mit 9% Triton X-100 lysiert wurden.

3.2.6 RNA-Interferenz

Mittels der RNA-Interferenz (RNAi) ist es möglich, Gene sequenzspezifisch stillzulegen. Dazu werden Zellen mit synthetischen doppelsträngigen *short interfering RNAs* (siRNA duplex) transfiziert, die in der Lage sind, die homologe Ziel-RNA abzubauen (97). In der vorliegenden Arbeit wurde die Technik der RNAi genutzt, um Connexin43 gezielt herunterzuregulieren. Die für diese Versuche benötigten Zellen wurden in Kulturmedium angezüchtet und bei einer Konfluenz von ca. 60-70% mit siRNA (100µM) transfiziert. Dazu wurden zunächst 2 Lösungen vorbereitet. Die *Lösung A* enthielt 2µl bzw. 4µl des siRNA duplex gelöst in 100µl des Transfektionsmediums (Opti-MEM®). Die *Lösung B* enthielt 2 µl des Transfektionsmittels (Jet SI-ENDO™) gelöst in 100 µl des Transfektionsmediums. Nun wurde die *Lösung A* in die *Lösung B* pipettiert, vorsichtig mit einem Vortex-Schüttler für 10 s gemischt und anschließend für 30 Minuten inkubiert. In dieser Zeit wurde das Kulturmedium der Zellen abgesaugt und nach einmaliger Waschung (HBSS) durch 800 µl des Transfektionsmediums ersetzt. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Mixtur aus *Lösung A* und *B* tropfenweise in die Kulturschalen pipettiert und die Zellen für vier Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch 2 ml des Kulturmediums ersetzt. Nach weiteren 20 Stunden wurden die transfizierten Zellen auf ihren Gehalt an Cx43 untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche siRNA Sequenzen gegen humanes Cx43 getestet, die von der Firma Eurogentec konstruiert und hergestellt wurden. Kontrollen wurden mit einem unspezifischen siRNA duplex transfiziert.

siRNA duplex	Sequenz
Cx43.1	<i>Sense</i> : GGUGGACUGUUUCCUCUCU-dTdT <i>Antisense</i> : AGAGAGGAAACAGUCCACC-dTdT
Cx43.2	<i>Sense</i> : CCAUCUUCAUCAUCUUCAU -dTdT <i>Antisense</i> : AUGAAGAUGAUGAAGAUGG -dTdT
Cx43.3	<i>Sense</i> : GUAUCCUCUUCAAGUCUAU -dTdT <i>Antisense</i> : AUAGACUUGAAGAGGAUAC -dTdT

Tab. 3.1: Sequenzen der verwendeten siRNA duplex.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE erlaubt die Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld. Dazu werden die Zellen zunächst mittels eines auf den Schweizer Biologen Lämmli zurückgehenden Puffers lysiert (98). Das in diesem Lysis-Puffer enthaltene Natrium-Dodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Tensid und überlagert nach Bindung der freiwerdenden Proteine deren Eigenladung. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes gelingt es nun, die einheitlich negativ geladenen Proteine in einem Polyacrylamid-Gel ihrer Größe nach aufzutrennen.

Probengewinnung

Kurz vor Ende eines Experiments wurde der Lysis-Puffer um 10mM DTT ergänzt und auf 95°C erhitzt. Direkt im Anschluss an das Experiment wurde das Medium aus den Kulturschalen abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 190 µl Lysis-Puffer lysiert. Nach Zugabe von 50U/ml Benzonase[®] und 2mM MgSO₄ wurden die Kulturschalen für ca. 15 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend konnten Zellen mit einem Einmalschaber von den Kulturschalen gelöst und in Reaktionsgefäße (1,5 ml) überführt werden. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben nun für 10 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend entweder umgehend weiter verarbeitet oder bei -20°C gelagert.

Lysis-Puffer (pH 6,8)

Tris	62,5 mM
SDS (wt/vol)	2 %
Glycin (vol/vol)	10 %
β-Mercaptoethanol (vol/vol)	5 %
Bromphenolblau (wt/vol)	0,1 %

Gelelektrophorese

Zunächst wurden alle für den Aufbau der Gelelektrophorese-Kammer benötigten Materialien mit 70% Ethanol gereinigt und entfettet. Das Polyacrylamid-Gel wurde in einen Spalt zwischen zwei Glasplatten gegossen, der seitlich durch 1mm dicke *Spacer* und nach unten durch einen 1mm starken Silikonschlauch begrenzt wurde. Zur Abdichtung des Spalts wurde der Gummischlauch unter Zug auch entlang der *Spacer* gespannt. Anschließend wurden die Glasplatten mit Hilfe von Klammern auf der vertikalen Gelkammer befestigt. Nun wurde die Trenngellösung luftblasenfrei in den Spalt gegossen und mit *Aqua bidest.* überschichtet. Im Anschluss an die zweistündige Polymerisation wurde das *Aqua bidest.* entfernt, die Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen und ein Profilformer eingesetzt. Nach weiteren 30 Minuten wurde der Silikonschlauch gelöst, die Gelkammer in ein Gefäß mit Laufpuffer gestellt und zusätzlich von oben mit Laufpuffer gefüllt. Nun wurde der Profilformer entfernt und die Proben konnten in die entstandenen Taschen geladen werden. Daraufhin wurde das elektrische Feld einer konstanten Spannung von 40V angelegt und die Gelelektrophorese bei Raumtemperatur über Nacht durchgeführt. Mit Hilfe eines zusätzlich geladenen farbmarkierten Molekulargewichtsmarkers war es möglich, den Gellauf am darauffolgenden Tag rechtzeitig zu stoppen.

Je nach Größe des untersuchten Proteins wurden 10%-ige oder 12,5%-ige Trenngele verwendet. Die untenstehenden Angaben beziehen sich jeweils auf eine Menge, die zur Herstellung von zwei Gelen benötigt wurde.

Trenngel	10 %	12,5 %
AA/Bis AA (30/1); 30% (wt/vol)	13,6 ml	17,0 ml
Trenngelpuffer	9,5 ml	9,5 ml
Aqua bidest.	13,8 ml	9,8 ml
SDS 10% (wt/vol)	400 µl	400 µl
TEMED	30 µl	30 µl
APS 10% (wt/vol)	400 µl	400 µl

Tab. 3.2: Zusammensetzung der für die SDS-PAGE verwendeten Trenngele.

Trenngelpuffer (pH 8,8)

Tris/HCl 1,5 M

Sammelgel	6 %
AA/Bis AA (30/1); 30% (wt/vol)	4 ml
Sammelgelpuffer	5 ml
Aqua bidest.	10,4 ml
SDS 10% (wt/vol)	200 µl
TEMED	25 µl
APS 10% (wt/vol)	250 µl

Tab. 3.3: Zusammensetzung des für die SDS-PAGE verwendeten Sammelgels.

Sammelgelpuffer (pH 6,8)

Tris/HCl 0,5 M

Laufpuffer

Glycin 192 mM
 Tris/HCl 24,6 mM
 SDS 3,5 mM

3.3.2 Western Blot

Mittels Western Blot werden die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine geeignete Membran (z.B. Nitrocellulose) transferiert. Dazu wird ein elektrisches Feld senkrecht an das Gel angelegt, in dem die negativ geladenen Proteine auf die Membran wandern und auf dessen Oberfläche durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken fixiert werden. Auf diese Weise bleibt das Muster der Proteinbanden erhalten und es entsteht eine exakte Kopie des Gels, die nun der Detektion durch Antikörper-Bindung zugänglich ist.

Zum Proteintransfer wurde in der vorliegenden Arbeit das *Semi-Dry-Blotting-Verfahren* nach Kyhse-Andersen genutzt (99). Dazu wurden zunächst 9 Filterpapiere sowie eine Nitrocellulosemembran entsprechend der Größe des Polyacrylamid-Gels zugeschnitten. Anschließend wurden je drei der Filterpapiere für 10 Minuten in Anodenpuffer A, Anodenpuffer B oder Kathodenpuffer geschwenkt. Die Nitrocellulosemembran wurde in Anodenpuffer B geschwenkt. Danach wurden die Filterpapiere aus Anodenpuffer A auf die angefeuchtete Anode aufgebracht. Darauf folgten die Filterpapiere aus Anodenpuffer B sowie die Nitrocellulosemembran. Jetzt konnte das Polyacrylamidgel auf die Membran gelegt werden. Schließlich folgten die in Kathodenpuffer geschwenkten Filterpapiere und die angefeuchtete Kathode. Zur Übertragung der Proteine wurde nun eine konstante Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 90 Minuten bei Raumtemperatur angelegt.

	pH	Tris/HCl	Methanol (vol/vol)	6-Amino-hexansäure
Anodenpuffer A	10,4	30 mM	20 %	-
Anodenpuffer B	10,4	300 mM	20 %	-
Kathodenpuffer	9,4	25 mM	20 %	40 mM

Tab. 3.4: Zusammensetzung der für den Western Blot verwendeten Puffer.

Im Anschluss an den Western Blot wurde das Polyacrylamidgel verworfen und die Nitrocellulosemembran kurz in Aqua bidest. geschwenkt, um eventuelle Gel- und Pufferrückstände zu entfernen. Daraufhin erfolgte die reversible Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceaurot-Färbung, die den vollständigen Proteintransfer sicherstellen sollte.

3.3.3 Immundetektion

Nach erfolgreichem Transfer auf die Nitrocellulosemembran wurden die Proteine mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran zunächst mit TBS-Puffer gewaschen, um Rückstände der Ponceaurotfärbung zu entfernen. Anschließend wurde die Membran für 60 Minuten in 5% Milchpulver/TBS-Puffer oder in 3% Rinderserumalbumin/TBS-Puffer (BSA, *bovine serum albumin*) geschwenkt, um freie Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran zu blockieren und die unspezifischen Bindungen des Antikörpers zu reduzieren. Daraufhin wurde die Membran kurz mit TBS-Puffer gewaschen und mit einem ersten Antikörper (Primär-Antikörper) über Nacht bei 4°C inkubiert. Dieser Primär-Antikörper richtete sich gegen ein Epitop des nachzuweisenden Proteins und wurde in 5% Milchpulver/TBS-Puffer bzw. 3% BSA/TBS-Puffer verdünnt. Der Antikörperlösung wurden 0,1% Tween-20 zugegeben.

TBS-Puffer (pH 7,4)

	mM
Tris/HCl	10
NaCl	150

Primär-Antikörper	Verdünnung	Antikörper-Lösung
Anti-Akt	1:1000	3% BSA/TBS-Puffer
Anti-phospho-Akt	1:1000	3% BSA/TBS-Puffer
Anti-Cleaved Caspase 3	1:1000	5% Milchpulver/TBS-Puffer
Anti-Connexin43	1:2000	3% BSA/TBS-Puffer
Anti-ERK 1/2	1:2000	5% Milchpulver/TBS-Puffer
Anti-phospho-ERK 1/2	1:2000	5% Milchpulver/TBS-Puffer
Anti-Vinculin	1:2000	3% BSA/TBS-Puffer

Tab. 3.5: Für den immunologische Nachweis verwendete Primär-Antikörper.

Im Anschluss an die nächtliche Inkubation wurde der Primär-Antikörper abgenommen und die Membran dreimal 10 Minuten mit TBS-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Primär-Antikörper zu entfernen. Zur Detektion des Antigen-Antikörper-Komplex, wurde die Nitrocellulosemembran nun mit einem zweiten Antikörper (Sekundär-Antikörper) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Sekundär-Antikörper richtete sich einerseits gegen den entsprechenden Primär-Antikörper und war andererseits an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt (HRP-gekoppelt, *horseradish peroxidase*).

Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Antikörper-Lösung
Anti-Kaninchen IgG	1:2000	3% BSA/TBS-Puffer
Anti-Maus-IgG	1:2000	3% BSA/TBS-Puffer
Anti-Maus IgM	1:2000	3% BSA/TBS-Puffer

Tab. 3.6: Für den immunologische Nachweis verwendete Sekundär-Antikörper.

Nach einstündiger Inkubation wurde die Membran erneut dreimal 10 Minuten in TBS-Puffer gewaschen und stand nun für den enzymatischen Protein-Nachweis zur Verfügung. Dazu wurde die Membran zunächst für zwei Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss in einer ECL-Lösung inkubiert. Bei der dadurch in Gang gesetzten Reaktion wurde der in der ECL-Lösung enthaltene Stoff Luminol durch die Peroxidase der Sekundär-Antikörper oxidiert. Diese Chemilumineszenzreaktion führte zur Freisetzung von Licht, das mit einer Digitalkamera zunächst detektiert und anschließend mit Hilfe des Softwareprogramms Quantity One[®] quantifiziert werden konnte.

3.3.4 Immunzytochemie

Die Immunzytochemie ist eine Methode, die basierend auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion eine fluoreszenzmikroskopische Darstellung zellulärer Proteine ermöglicht. Für diesen Nachweis wurden die Endothelzellen auf Deckgläsern kultiviert und direkt im Anschluss an das Experiment für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS-Puffer fixiert. Die nachfolgende achtminütige Inkubation der Zellen mit 0,1% Triton X-100 in PBS-Puffer führte zur Permeabilisierung der Zellmembran und ermöglichte den Antikörpern auch intrazellulär gelegene Antigene zu erkennen. Zur Reduktion unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Zellen nach der Permeabilisierung eine Stunde mit 5% BSA in PBS-Puffer blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit einem spezifisch gegen ein Epitop des gesuchten Proteins gerichteten Primär-Antikörpers über Nacht bei 4°C.

PBS-Puffer (pH 7,4)

	mM
NaCl	137
KCl	2,7
KH ₂ PO ₄	1,7
Na ₂ HPO ₄	10

Primär-Antikörper	Verdünnung	Antikörper-Lösung
Anti-Caspase 3 active	1:200	5% BSA/PBS-Puffer
Anti-Connexin43	1:400	5% BSA/PBS-Puffer

Tab. 3.7: Für den immunzytochemischen Nachweis verwendete Primär-Antikörper.

Am darauffolgenden Tag wurde der Primär-Antikörper abgenommen und die Zellen dreimal 10 Minuten mit PBS-Puffer gewaschen, um unspezifische Rückstände des Antikörpers zu entfernen. Darauf folgte die einstündige Inkubation der Zellen mit dem entsprechenden Sekundär-Antikörper unter Lichtausschluss.

Im Gegensatz zum immunologischen Nachweis nach SDS-Page/Western Blot sind an die Sekundär-Antikörper jedoch keine Peroxidasen sondern, fluoreszierende Stoffe, sogenannte Fluorochrome gekoppelt. Diese besitzen die Eigenschaft nach Bestrahlung mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt zu werden und die dabei freiwerdende Energie in Form von Licht abzugeben. Die Antikörper-Lösung enthielt neben dem Sekundär-Antikörper auch den Fluoreszenzfarbstoff *TO-PRO[®]3-iodid* (Konzentration 1:500), durch den die Zellkerne angefärbt wurden.

Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Antikörper-Lösung	Anregungsspektrum
Anti-Kaninchen-IgG	1:400	5% BSA/PBS-Puffer	488 nM
Anti-Kaninchen-IgG	1:400	5% BSA/PBS-Puffer	633 nM

Tab. 3.8: Für den immunzytochemischen Nachweis verwendete Sekundär-Antikörper.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen dreimal 10 Minuten mit PBS gewaschen, um Rückstände des Sekundär-Antikörpers zu entfernen. Schließlich konnten die Deckgläser mit 10 µl des Eindeckmediums (PBS/Glycerol im Verhältnis 1:1) luftblasenfrei auf den Objektträger aufgebracht werden und standen nun für die fluoreszenzmikroskopische Analyse zur Verfügung. Dazu wurden die Fluorochrome durch den Argon-Laser (488 nM) bzw. den Helium-Neon-Laser (633 nM) eines konfokalen Laser-Raster Mikroskops (LSM 510[®]) angeregt. Aus dem detektierten Licht errechnete ein eingebundener Computer schließlich die Bilder, die mit Hilfe des dazugehörigen Softwareprogramms LSM 510[®] weiterverarbeitet wurden.

3.4 Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus n Experimenten unterschiedlicher Zellpräparation angegeben. Der Vergleich der Mittelwerte zwischen Gruppen wurde mit der *ONE-Way Analysis of Variance* (ANOVA) durchgeführt, gefolgt von einem Student-Newman-Keul Post-Hoc-Test. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Ischämie-induzierte Apoptose in humanen Endothelzellen

Zunächst sollte geprüft werden, ob es im gewählten *in vitro* Ischämie-Modell zu einer Induktion des apoptotischen Zelltods kommt. Dazu wurden die aktiven Spaltprodukte der Caspase 3 (17 und 19 kDa) im Anschluss an eine zweistündige simulierte Ischämie immunzytochemisch untersucht. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte, dass sich nach der simulierten Ischämie deutlich mehr Caspase 3-positive Zellen in den Zellschichten fanden, als in den normoxen Kontrollen (Abb. 4.1).

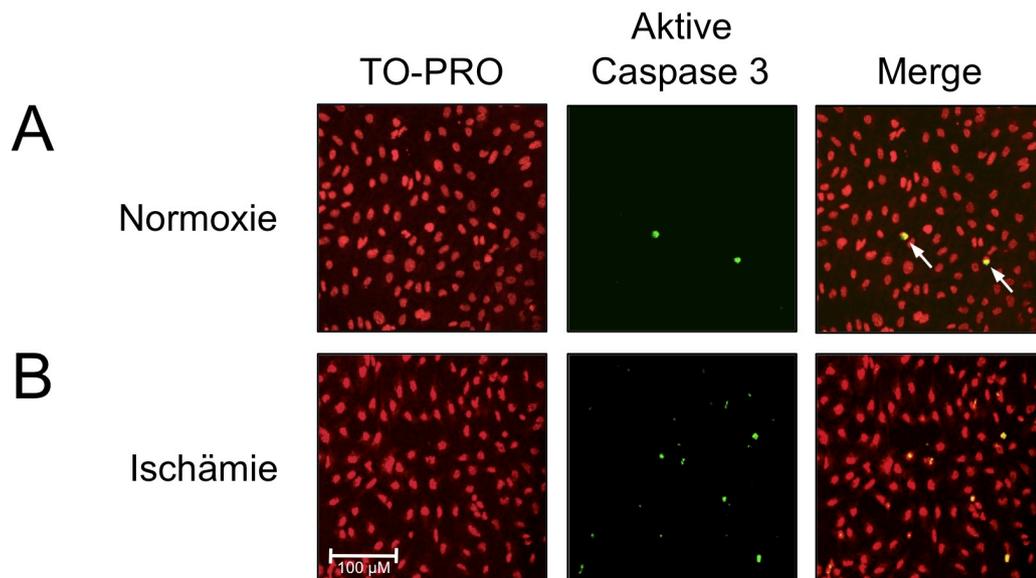


Abb. 4.1: Wirkung von simulierter Ischämie auf die endotheliale Caspase 3-Aktivierung. HUVEC wurden einer zweistündigen simulierten Ischämie ausgesetzt. Die Kontrollgruppe wurde für die gleiche Zeit unter normoxen Bedingungen kultiviert. Dargestellt sind repräsentative immunzytochemische Färbungen der aktiven Caspase 3-Spaltprodukte nach **(A)** Normoxie und **(B)** Ischämie. Die Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff *TO-PRO*[®]*3-iodide* (TO-PRO) dargestellt. Die Überlagerung von *TO-PRO*[®]*3-iodide* und aktiver Caspase 3 (Merge) zeigt die intrazelluläre Lokalisation der aktiven Caspase 3-Spaltprodukte (Pfeile).

In einem weiteren Schritt wurde die Aktivierung der Caspase 3 mittels Western Blot nachgewiesen. Dazu wurde die aktive Caspase 3 mit einem spezifischen Antikörper gegen die Spaltprodukte der Größe 17 kDa und 19 kDa dargestellt. Als Ladungskontrolle diente das Zytoskelettprotein Vinculin. Analog zur immunzytochemischen Untersuchung zeigte die Western Blot Analyse einen deutlichen Anstieg der aktiven Caspase 3-Spaltprodukte nach zweistündiger simulierter Ischämie.

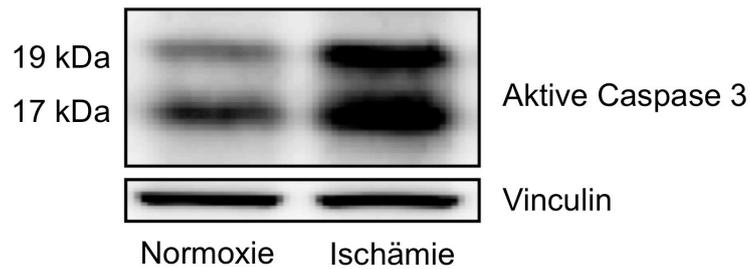


Abb. 4.2: Ischämie-induzierte Aktivierung der endothelialen Caspase 3. HUVEC wurden einer zweistündigen Ischämie ausgesetzt. Die Kontrollgruppe wurde für dieselbe Zeit unter normoxen Bedingungen kultiviert. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot der aktiven Caspase 3-Spaltprodukte nach Normoxie bzw. Ischämie. Als Ladungskontrolle diente Vinculin.

4.2 ATP-Freisetzung aus humanen Endothelzellen während Ischämie

Unter pathophysiologischen Bedingungen wie Hypoxie oder auf das Endothel wirkenden Scherkräften kommt es zu einer Freisetzung von ATP aus Zellen des kardiovaskulären Systems (93, 94). Daher sollte nun untersucht werden, ob humane Endothelzellen als Reaktion auf eine simulierte Ischämie ATP freisetzen. Dazu wurde die ATP-Konzentration zu verschiedenen Zeitpunkten der Ischämie im Kulturüberstand der Endothelzellen mittels der Luciferin/Luciferase-Reaktion bestimmt. Wie die Abb. 4.3 darstellt, zeigte sich bereits nach 10-minütiger Ischämie ein $2,3 \pm 0,4$ -facher Anstieg der ATP-Konzentration im Überstand. Nach 30-minütiger Ischämie befanden sich die Werte wieder auf dem Ausgangsniveau.

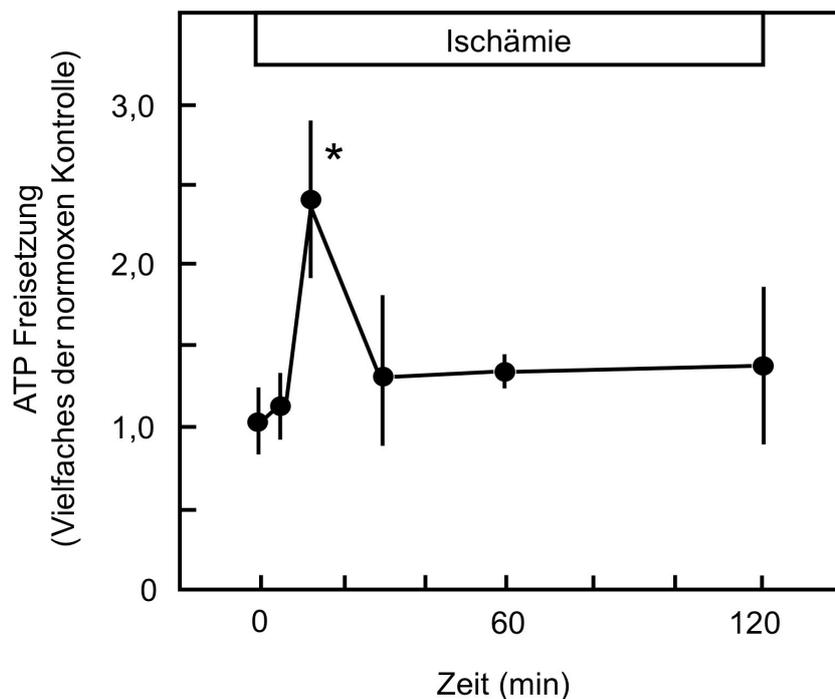


Abb. 4.3: Ischämie-induzierte Freisetzung von ATP aus HUVEC. HUVEC wurden einer zweistündigen simulierten Ischämie ausgesetzt. Die ATP-Konzentration im Kulturüberstand wurde an den angezeigten Zeitpunkten mittels der Luciferin/Luciferase-Reaktion bestimmt. Die dargestellten Werte repräsentieren die ATP-Konzentration während Ischämie als Vielfaches der normoxen Kontrolle. Die normoxen Werte des jeweiligen Messpunktes wurden gleich 1 gesetzt und sind nicht abgebildet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus mindestens $n=5$ Experimenten von 3 unabhängigen Zellpräparationen, * $P<0.05$ vs. Zeitpunkt 0. Minute.

Es ist bekannt, dass neben einer spontanen Freisetzung von ATP auch der Untergang von Zellen, infolge zytolytischer Prozesse, einen Anstieg der ATP-Konzentration zur Folge haben kann. Um auszuschließen, dass der hier beobachtete Anstieg der ATP-Konzentration nach 10-minütiger Ischämie Folge einer Zytolyse war, wurde die LDH-Aktivität im Medium zu diesem Zeitpunkt gemessen. Die Abb. 4.4 zeigt, dass es infolge der Ischämie zu keiner Steigerung der LDH-Aktivität im Kulturüberstand kam.

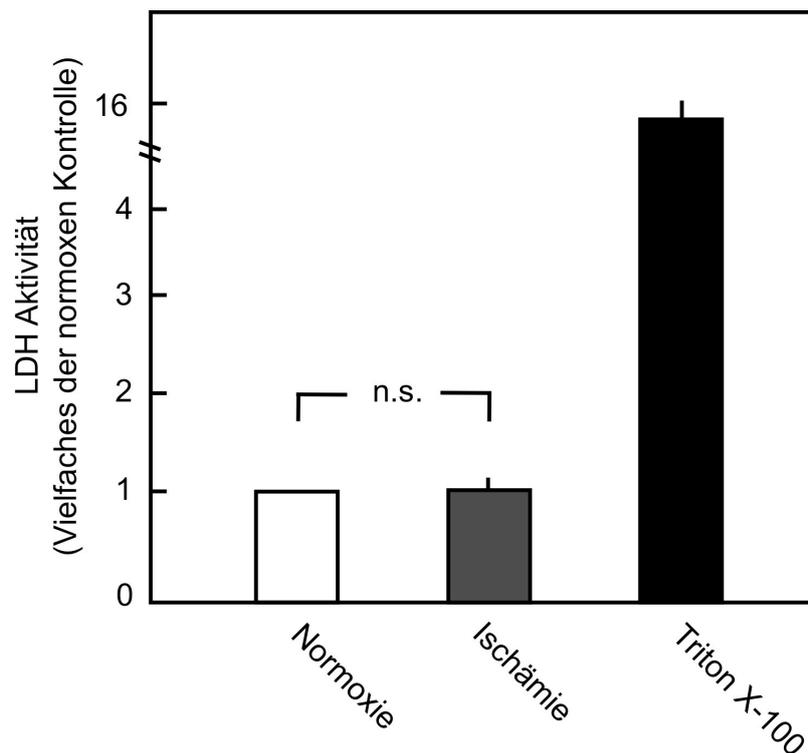


Abb. 4.4: Messung der LDH-Aktivität nach 10-minütiger Ischämie. HUVEC wurden einer 10-minütigen Ischämie ausgesetzt. Anschließend wurde die LDH-Aktivität im Überstand bestimmt. Kontrollen wurden für die gleiche Zeit unter normoxen Bedingungen kultiviert. Als positive Kontrolle wurden Zellen mit Triton X-100 lysiert. Die Werte der normoxen Kontrolle wurden gleich 1 gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus n=4 Experimenten, n.s. = keine signifikante Änderung.

4.3 Bedeutung von Connexin43-Halbkanälen für die ATP-Freisetzung während Ischämie

Connexin43-Halbkanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von ATP aus Zellen des kardiovaskulären Systems (Kap. 1.3.1). Daher galt es in den folgenden Experimenten die Frage zu klären, ob auch der Ischämie-induzierten ATP-Freisetzung aus humanen Endothelzellen ein Connexin-abhängiger Mechanismus zu Grunde liegt.

4.3.1 Nachweis von Connexin43 in humanen Endothelzellen

Zuerst sollte geprüft werden, ob die in den Experimenten eingesetzten Primärkulturen humaner Endothelzellen die Cx43-Isoform exprimieren. Dazu wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit einem spezifischen Anti-Cx43 Antikörper inkubiert. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung in Abb. 4.5 A zeigt, dass Cx43 besonders im Bereich der Zell-Zell-Grenzen, aber auch über die gesamte Zelloberfläche verteilt zu finden war. Entsprechend gelang der Nachweis von Cx43 mittels Western Blot. Der repräsentative Western Blot in Abb. 4.5 B zeigt drei Banden: die untere Bande (NP) entspricht der nicht-phosphorylierten Form des Cx43, wohingegen die mittlere (P1) und die obere Bande (P2) phosphorylierte Formen des Cx43 darstellen.

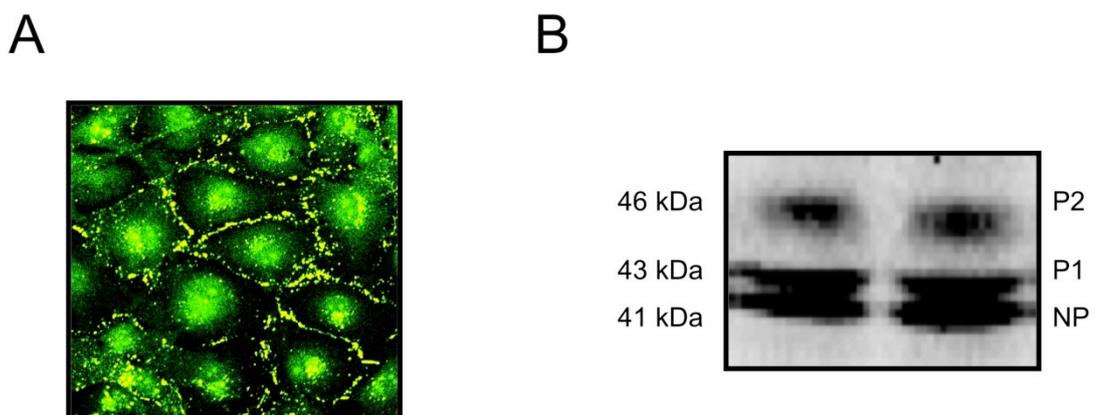


Abb. 4.5: Expression von Connexin43 in HUVEC. (A) Repräsentative immunzytochemische Färbung von HUVEC mit einem spezifischen Anti-Cx43 Antikörper. Cx43 ist im Bereich der Zellgrenzen sowie über die gesamte Zelloberfläche verteilt anzutreffen. **(B)** Repräsentativer Western Blot von Cx43 in HUVEC. Ein Teil des Cx43 liegt in phosphorylierter (P1 und P2), ein anderer Teil in nicht-phosphorylierter Form (NP) vor.

4.3.2 Herunterregulation von Connexin43

Um die Bedeutung dieser Cx43-Halbkanäle im Rahmen der Ischämie-induzierten ATP-Freisetzung zu untersuchen, wurde die Cx43-Expression mittels RNA-Interferenz (RNAi) gehemmt. Dazu wurden drei unterschiedliche Sequenzen *short interfering RNA* (siRNA duplex) gegen humanes Cx43 getestet (siCx43.1-3). Als negativ-Kontrolle diente eine unspezifische siRNA (siKtr). Die drei Sequenzen der siRNA gegen Cx43 sowie die Kontroll-siRNA wurden jeweils in zwei Konzentrationen getestet. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen auf ihren Cx43-Gehalt hin untersucht. Der repräsentative Western Blot in Abb. 4.6 zeigt die sequenz- und konzentrationsabhängige Herunterregulation von Cx43. Für die folgenden Experimente wurden 2 µl der Sequenz siCx43.2 eingesetzt.

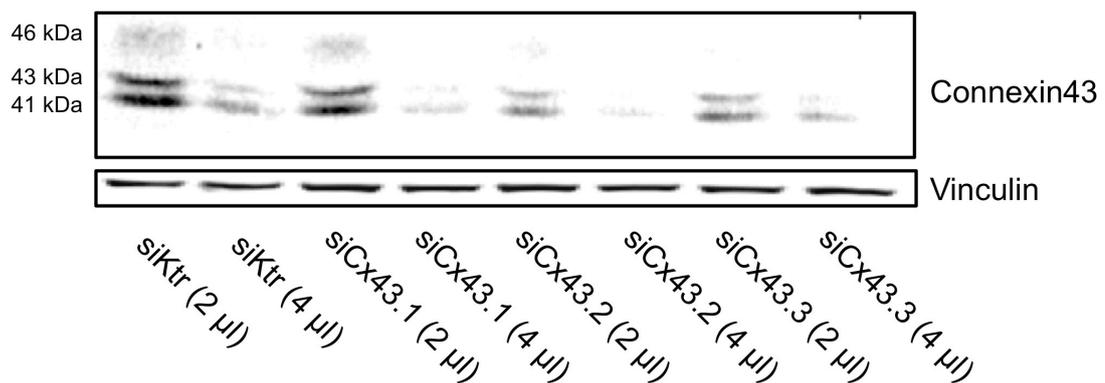


Abb. 4.6: Hemmung der Connexin43-Expression in HUVEC durch RNA-Interferenz. Bei einer Konfluenz von ca. 60% wurden HUVEC mit siRNA duplex transfiziert. Es wurden eine unspezifische Kontroll-siRNA (siKtr) bzw. drei Sequenzen einer siRNA gegen humanes Cx43 (siCx43.1-3) getestet. Als Transfektionsvehikel diente Jet SI-ENDO™. Nach einer 24-stündigen Transfektionsphase wurde Cx43 gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Cx43-Proteinmenge mittels Western Blot analysiert. Als Ladungskontrolle diente Vinculin.

4.3.3 Connexin43-abhängige ATP-Freisetzung während Ischämie

Nach erfolgreicher Transfektion wurden die Zellen einer 10-minütigen Ischämie ausgesetzt und die ATP-Konzentration im Überstand bestimmt. Bei Endothelzellen, die mit unspezifischer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, zeigte sich ein $2,1 \pm 0,2$ -facher Anstieg der ATP-Konzentration (Abb. 4.7). Im Gegensatz dazu stieg die ATP-Konzentration im Kulturüberstand Cx43-verarmter Endothelzellen infolge der Ischämie nicht signifikant an.

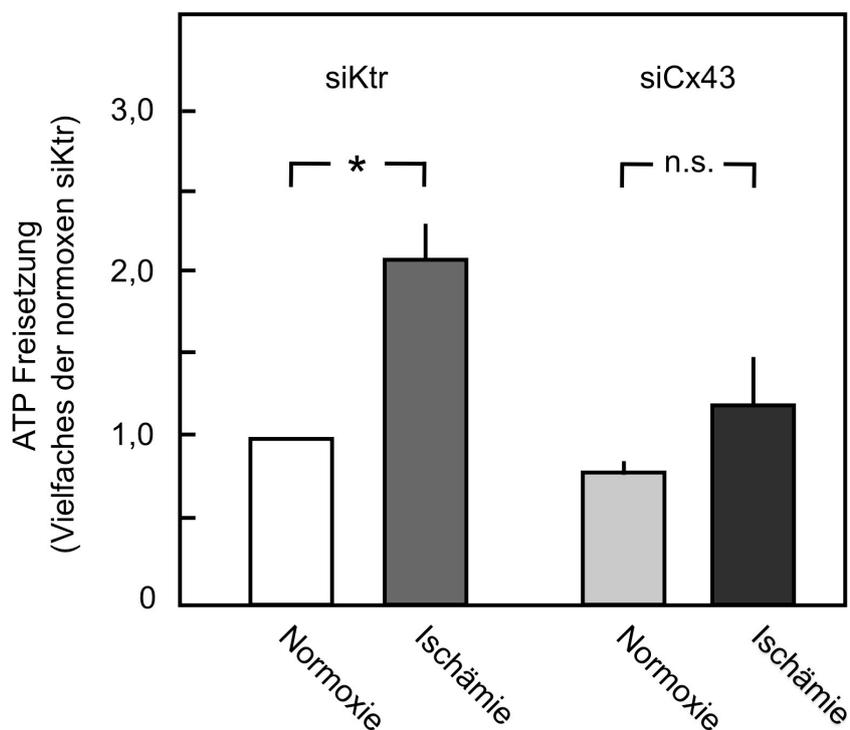


Abb. 4.7: Connexin43-abhängige ATP-Freisetzung während simulierter Ischämie. HUVEC wurden mit Kontroll-siRNA (siKtr) bzw. spezifischer siRNA gegen Cx43 (siCx43) transfiziert. Nach erfolgter Transfektion wurden die Endothelzellen einer 10-minütigen Ischämie ausgesetzt. Kontrollen wurden für die gleiche Zeit unter normoxen Bedingungen kultiviert. Anschließend wurde die ATP-Konzentration im Überstand mit Hilfe der Luciferin/Luciferase-Reaktion bestimmt. Die ATP-Konzentration im Überstand von normoxen siKtr-transfizierten HUVEC wurde gleich 1 gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus mindestens $n=5$ Experimenten von 3 unabhängigen Zellpräparationen. * $P < 0,05$, n.s. = keine signifikante Änderung.

4.4 Wirkung von ATP auf die Ischämie-induzierte Caspase 3-Aktivierung

Nach seiner Freisetzung übt ATP seine Funktion als Signalmolekül durch Bindung an Purinrezeptoren aus. Ein komplexes Netzwerk gelöster und membrangebundener Ectonukleotidasen (Ekto-ATPasen) beendet diese Wirkung durch gezielten Abbau des extrazellulären ATP (100). Während die CD39/Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase die Hydrolyse von extrazellulärem ATP zu ADP sowie von ADP zu AMP katalysiert, ermöglicht die CD73/Ekto-5'-Nukleotidase die Hydrolyse von AMP zu Adenosin (101, 102). Zur Untersuchung der Wirkung des freigesetzten ATP auf die Ischämie-induzierte Apoptose wurde dieses physiologische Prinzip genutzt.

Dazu wurde zunächst die Hydrolyse des extrazellulären ATP während Ischämie durch Zugabe der löslichen Ekto-ATPase Apyrase gesteigert und die Wirkung des freigesetzten ATP dadurch vermindert. Gleichzeitig wurde dem Medium Adenosin-Desaminase zugegeben, um das durch die verstärkte ATP-Hydrolyse vermehrt anfallende Adenosin abzubauen. Im Anschluss an die zweistündige Ischämie wurden die aktiven Spaltprodukte der Caspase 3 fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Abb. 4.8 B zeigt, dass die Steigerung des ATP-Abbaus durch Apyrase während Ischämie zu einer deutlichen Zunahme Caspase 3-positiver Zellen führte (4.8 A).

In einem nächsten Schritt wurde die Hydrolyse des extrazellulären ATP gehemmt. Dazu wurde dem Medium zu Beginn der Ischämie der Ectonucleotidase-Inhibitor ARL 67156 zugegeben. Diese Hemmung bewirkte eine deutliche Reduktion der aktiven Caspase 3-Spaltprodukte (4.8 C).

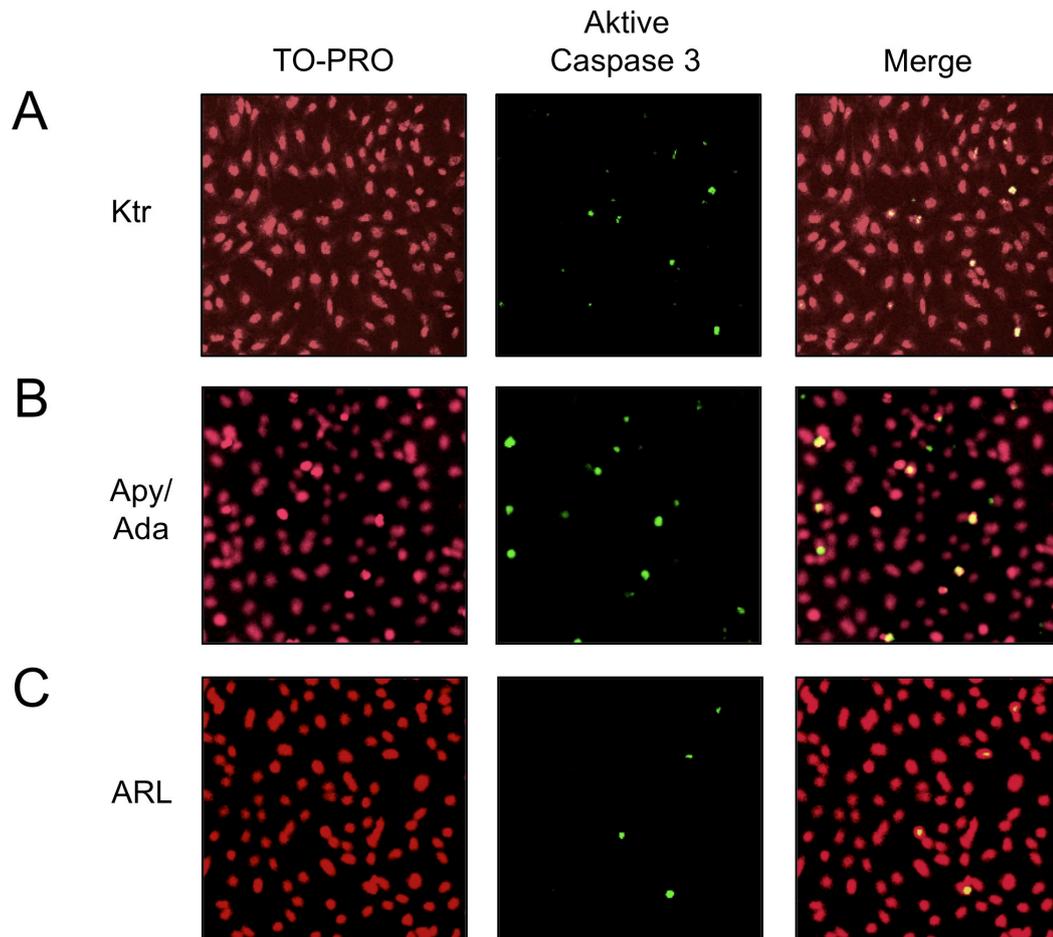


Abb. 4.8: Wirkung von extrazellulärem ATP auf die Ischämie-induzierte Caspase 3-Aktivierung in HUVEC. HUVEC wurden (A) einer zweistündigen Ischämie alleine, (B) in Gegenwart des ATP-abbauenden Enzyms Apyrase und des Adenosin-abbauenden Enzyms Adenosin-Desaminase (je 1U/ml) oder (C) des Ectonucleotidase-Hemmstoffs ARL 67156 (100 μ M). Abgebildet sind repräsentative immunzyto-chemische Bilder der aktiven Caspase 3-Spaltprodukte, die Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff *TO-PRO*[®]3-iodide (TO-PRO) dargestellt. Die Überlagerung von TO-PRO und aktiver Caspase 3 (Merge) zeigt die intrazelluläre Lokalisation der aktiven Caspase 3 Spaltprodukte.

Im folgenden Schritt wurde die Caspase 3-Aktivität über die Bildung ihrer proteolytischen Spaltprodukte mittels Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot semiquantitativ analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Steigerung des ATP-Abbaus durch Apyrase eine Zunahme der Caspase 3-Aktivität um $42 \pm 14\%$, verglichen mit der ischämischen Kontrolle, bewirkt. Die Hemmung des extrazellulären ATP-Abbaus durch ARL 67156 hingegen, führte zu einer Reduktion der Caspase 3-Aktivität um $22 \pm 6\%$.

Schließlich wurde geprüft, ob dieses endogene anti-apoptotische Prinzip auch durch exogene Zugabe von ATP, im Sinne einer gezielten pharmakologischen Intervention, gestärkt werden kann. Dazu wurde dem Medium zu Beginn der Ischämie ATP zugegeben. Die Abb. 4.9 zeigt, dass durch dieses Manöver die aktiven Caspase 3-Spaltprodukte um $45 \pm 10\%$ reduziert wurden.

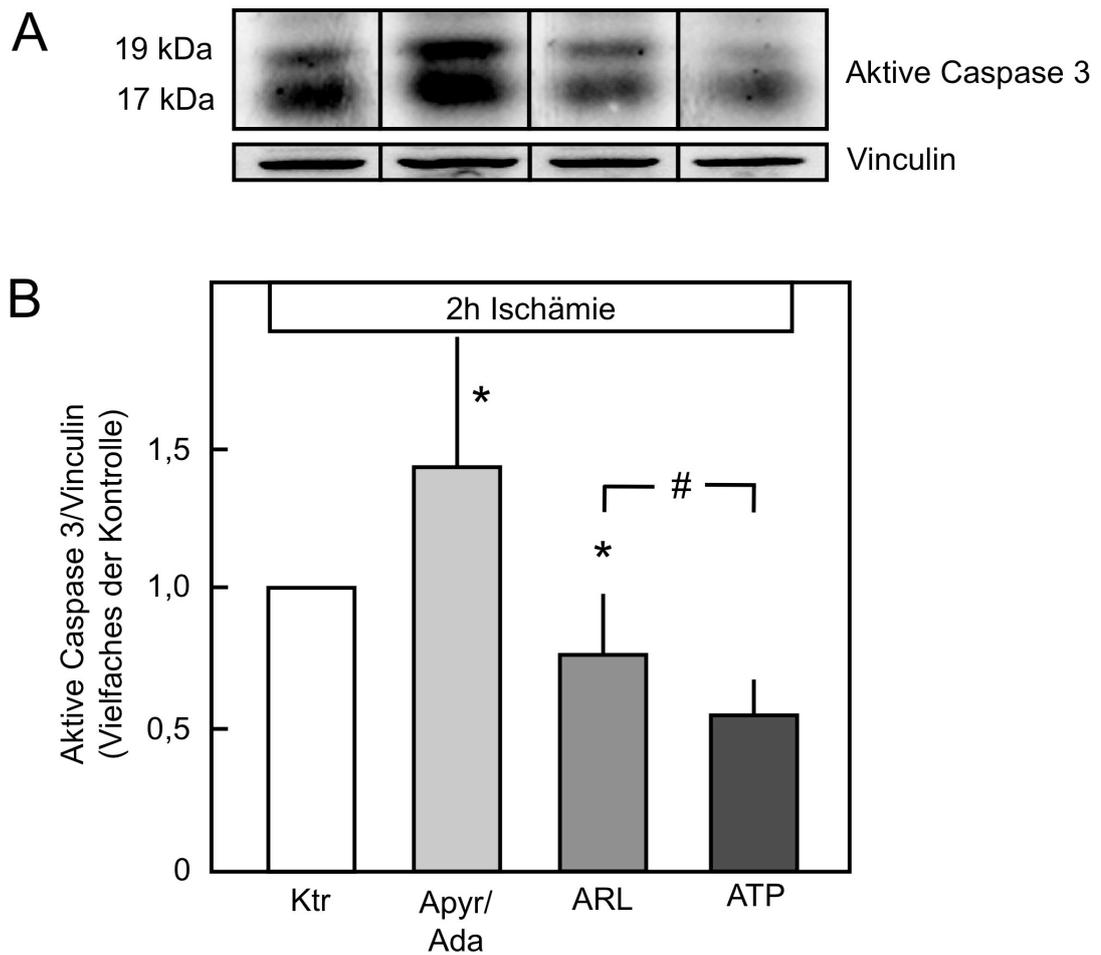


Abb. 4.9: Einfluss von extrazellulärem ATP auf die Ischämie-induzierte Caspase 3-Aktivierung in HUVEC. HUVEC wurden einer zweistündigen Ischämie alleine (Ktr), in Gegenwart des ATP-abbauenden Enzyms Apyrase und des Adenosin-abbauenden Enzyms Adenosin-Desaminase (Apyr/Ada; jeweils 1U/ml), des Ectonucleotidase-Hemmstoffs ARL 67156 (ARL, 100 μ M) oder in Gegenwart von exogen zugegebenem ATP (ATP, 10 μ M) ausgesetzt. **(A)** Repräsentative Western Blot Bilder der aktiven Caspase 3-Spaltprodukte sowie von Vinculin. **(B)** Densitometrische Auswertung der Aktiven Caspase 3 im Verhältnis zu Vinculin. Das Caspase 3/Vinculin-Verhältnis der ischämischen Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus mindestens n=5 Experimenten von 3 unabhängigen Zellpräparationen. *P<0,05 gegenüber der Ktr, #P<0,05.

4.5 Bedeutung von Purinrezeptoren für die Vermittlung des anti-apoptotischen Effekts von extrazellulärem ATP

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das während Ischämie freigesetzte ATP der Entwicklung des apoptotischen Zelltods entgegenwirkt, sollte nun geprüft werden, ob der anti-apoptotische Effekt des freigesetzten ATP über P2-Rezeptoren (P2R) vermittelt wird. Dazu wurde erneut der ATP-Abbau mit Hilfe des Ectonucleotidase-Inhibitors ARL 67156 gehemmt. Zusätzlich wurden bei einem Teil der Zellen die P2-Rezeptoren durch den unspezifischen P2R-Antagonist Suramin blockiert. Abb. 4.10 zeigt, dass die Hemmung des ATP-Abbaus analog zu den Ergebnissen aus Kapitel 4.4 die Aktivität der Caspase 3 reduziert. Wurden die P2-Rezeptoren jedoch während der Ischämie blockiert, konnte keine signifikante Reduktion der Caspase 3-Aktivität mehr beobachtet werden.

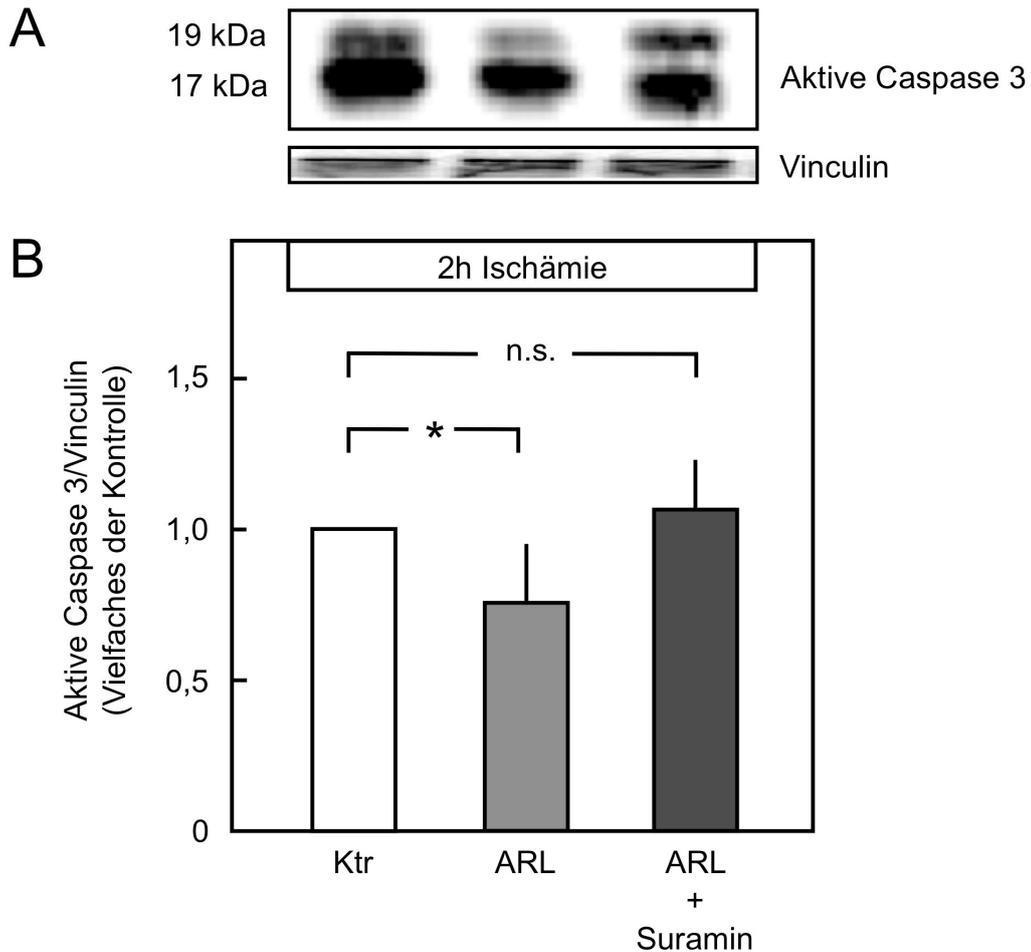
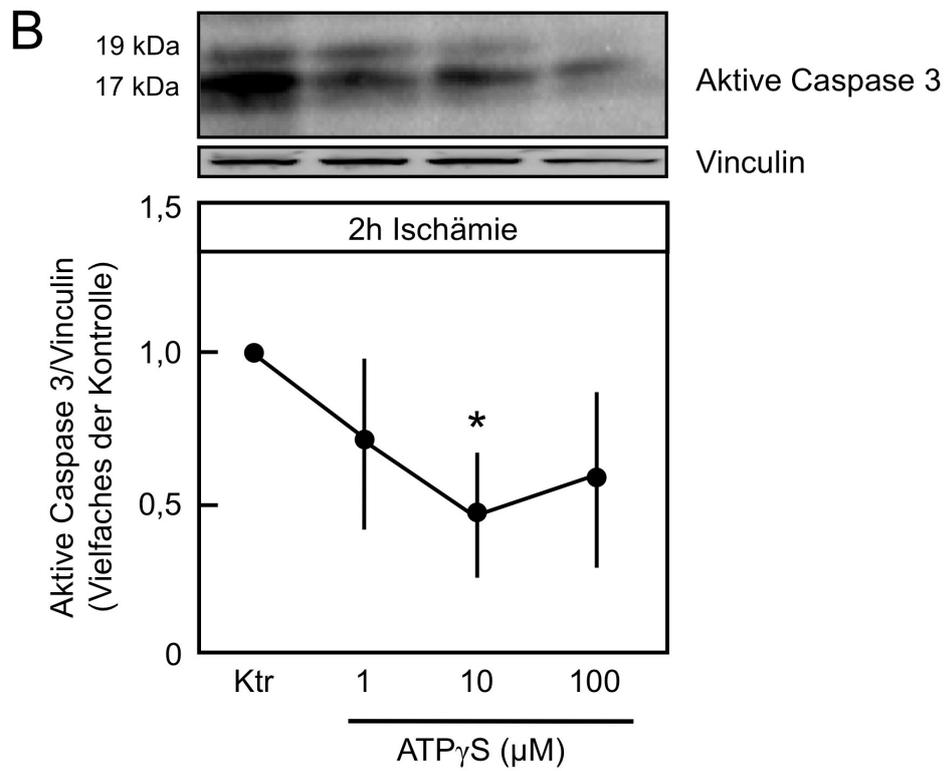
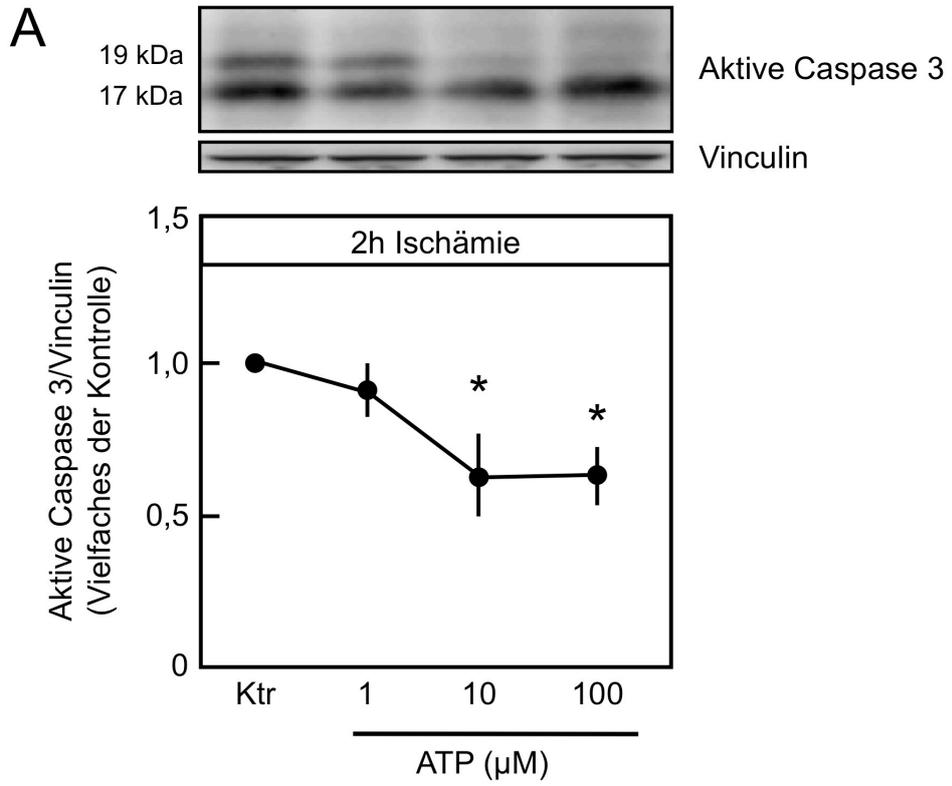


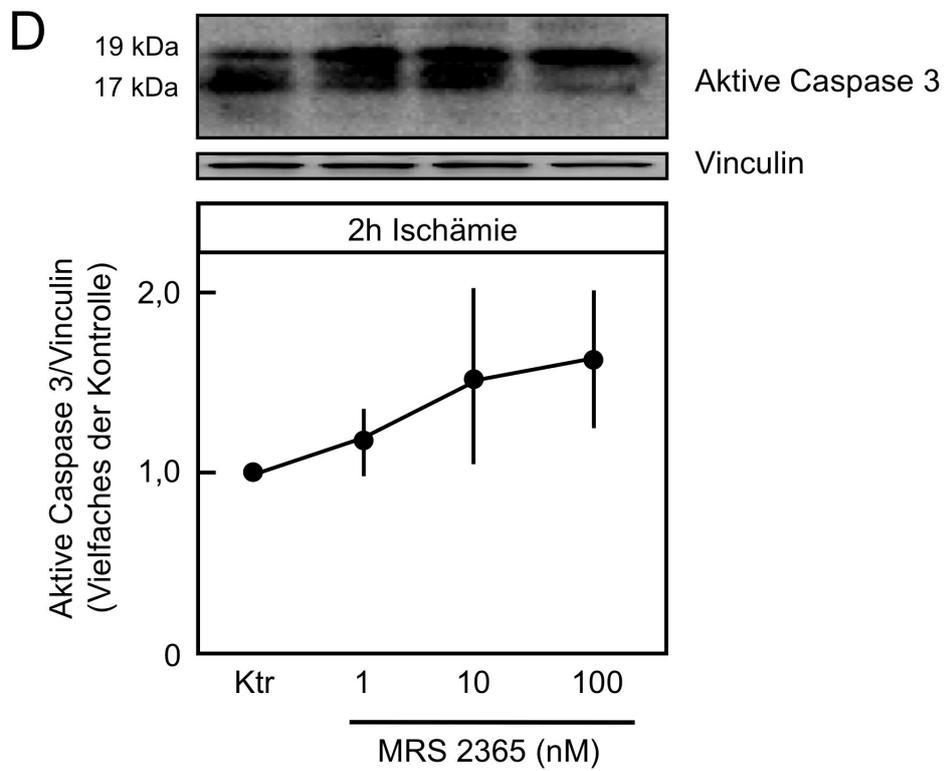
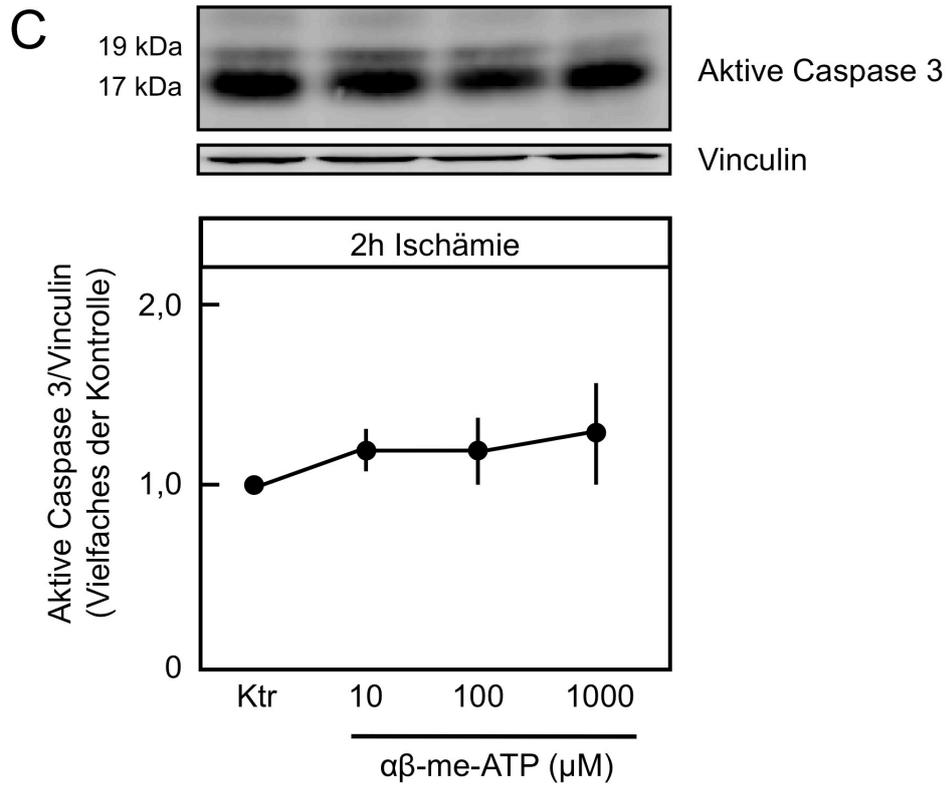
Abb. 4.10: Rolle von Purinrezeptoren bei der Vermittlung des anti-apoptotischen Effekts von extrazellulärem ATP in HUVEC. HUVEC wurden einer zweistündigen Ischämie alleine (Ktr) oder in Gegenwart des Ectonucleotidase-Hemmers ARL 67156 (ARL, 100 μ M) ausgesetzt. Ein Teil der Zellen wurde 30 Minuten vor Ischämie mit dem unspezifischen P2-Rezeptor-Antagonist Suramin inkubiert (ARL+Suramin, jeweils 100 μ M). **(A)** Repräsentativer Western Blot der aktiven Caspase 3-Spaltprodukte sowie von Vinculin. **(B)** Densitometrische Auswertung der Aktiven Caspase 3 im Verhältnis zu Vinculin. Das Caspase 3/Vinculin-Verhältnis der ischämischen Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus mindestens n=3 Experimenten von 3 unabhängigen Zellpräparationen. *P<0,05, n.s. = keine signifikante Änderung.

4.6 Identifikation des für den anti-apoptotischen Effekt verantwortlichen P2-Rezeptor-Subtyps

Die Kenntnis, dass der endogene anti-apoptotische Effekt des freigesetzten ATP durch exogene Zugabe von ATP verstärkt werden konnte, wurde nun zur Identifikation des verantwortlichen P2-Rezeptor-Subtyps experimentell genutzt. Im Rahmen eines pharmakologischen Ansatzes wurden dem Medium zu Beginn der Ischämie unterschiedliche P2R-Agonisten zugegeben. Nach zweistündiger Ischämie wurde die Aktivität der Caspase 3 mittels Western Blot analysiert und die Wirkung des jeweiligen P2R-Agonisten mit der des ATP verglichen. Die Auswahl der Agonisten richtete sich dabei nach der in Tabelle 1.1 beschriebenen P2R-Expression humaner Endothelzellen. Die P2R-Agonisten wurden in drei Konzentrationen getestet.

Als Ausgangspunkt wurden zunächst die pan-spezifischen P2R-Agonisten ATP (Abb. 4.11 A) sowie sein nicht-hydrolysierbares Analogon ATP γ S (Abb. 4.11 B) getestet. Die Analyse der aktiven Caspase 3-Spaltprodukte zeigte, dass die Gegenwart beider Agonisten bereits bei einer Konzentration von 10 μ M zu einer signifikanten Reduktion der aktiven Caspase 3-Spaltprodukte führte. Durch die Zugabe von $\alpha\beta$ -me-ATP, einem P2X-Rezeptoragonisten (Abb. 4.11 C), konnte die Caspase 3-Aktivität nach Ischämie jedoch ebenso wenig gesenkt werden, wie durch MRS2365, einem P2Y₁-Rezeptoragonisten (Abb. 4.11 D). Zugabe von UTP dagegen, ein spezifischer P2Y₂-Rezeptoragonist, reduzierte die Caspase 3-Aktivität signifikant. Diese Wirkung von UTP auf die Ischämie-induzierte Caspase 3-Aktivierung in HUVEC war dem Ausmaß nach mit der äquimolaren Mengen an ATP vergleichbar (Abb.4.11 E).





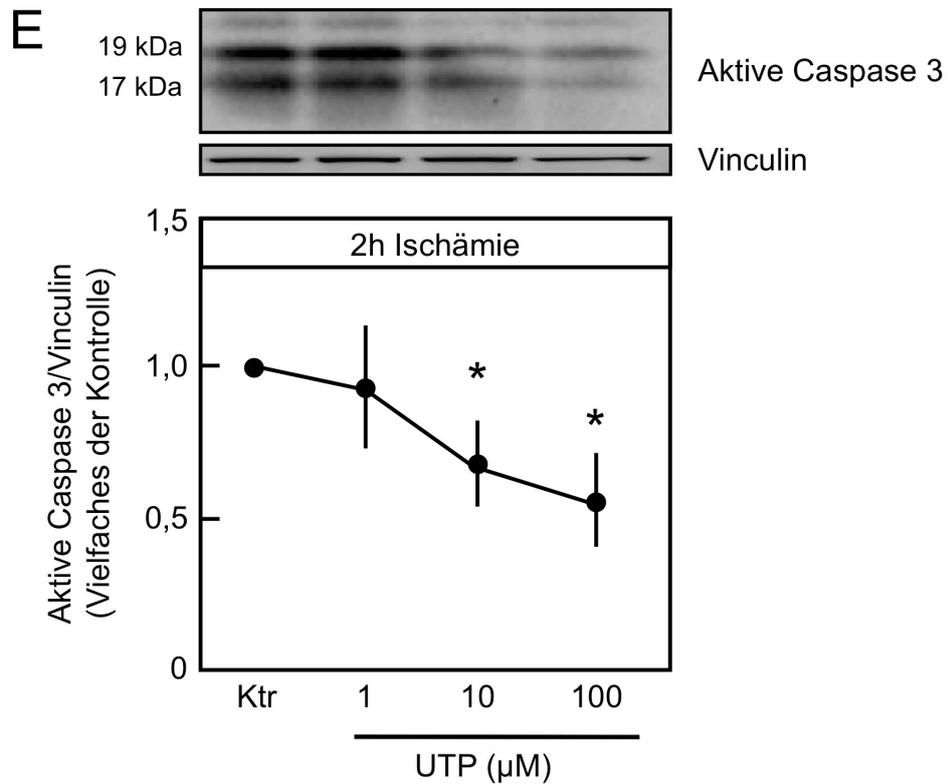


Abb. 4.11: Wirkung von Purinrezeptor-Agonisten auf die endotheliale Apoptose während simulierter Ischämie. HUVEC wurden einer zweistündigen Ischämie alleine (Ktr) sowie in Gegenwart von **(A)** ATP, **(B)** ATP γ S, **(C)** $\alpha\beta$ -me-ATP, **(D)** MRS 2365 oder **(E)** UTP ausgesetzt. Abgebildet sind in den Abbildungen jeweils **(oben)** repräsentative Western Blots der aktiven Caspase 3-Spaltprodukte. Vinculin diente als Ladungskontrolle; **(unten)** densitometrische Auswertung der Aktiven Caspase 3 im Verhältnis zu Vinculin. Das Caspase 3/Vinculin-Verhältnis der ischämischen Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus mindestens n=3 Experimenten von 3 unabhängigen Zellpräparationen. *P<0,05 gegenüber der Ktr.

4.7 Rolle intrazellulärer Signalwege bei der P2Y₂-Rezeptor-vermittelten anti-apoptotischen Wirkung von extrazellulärem ATP

P2Y₂-Rezeptoren sind über G-Proteine an eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege gekoppelt. Für die Regulation des zellulären Überlebens sind der MEK/ERK- und der PI3K/Akt-Signalweg von besonderer Relevanz. Die Bedeutung dieser Signalwege für die durch P2Y₂-Rezeptoren vermittelte, anti-apoptotische Wirkung von extrazellulärem ATP wurde im Folgenden analysiert. Dazu wurden die Ergebnisse des pharmakologischen Ansatzes aus Kap. 4.5 genutzt und die Effekte des pan-spezifischen P2R-Agonisten ATP mit denen des spezifischen P2Y₂-Agonisten UTP verglichen.

4.7.1 Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt

Zunächst wurde die Aktivität des MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalwegs nach ATP bzw. UTP-Stimulation während Ischämie untersucht. Dazu wurde dem Medium mit Beginn der Ischämie entweder ATP oder UTP zugegeben und anschließend die Phosphorylierung von ERK 1/2 und Akt zu verschiedenen Zeitpunkten der Ischämie untersucht. Als Kontrolle wurde auf derselben Membran jeweils Gesamt-ERK 1/2 bzw. Gesamt-Akt bestimmt.

Die repräsentativen Western Blots in Abb. 4.12 zeigen, dass sowohl die Zugabe von ATP (Abb. 4.12 A) als auch die Zugabe des spezifischen P2Y₂-Agonisten UTP (Abb. 4.12 B) zu einer deutlichen Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK 1/2 und Akt führten. Der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung macht deutlich, dass es sich bei dieser Aktivierung um einen kurzfristigen Effekt von ATP und UTP zu Beginn der Ischämie handelte.

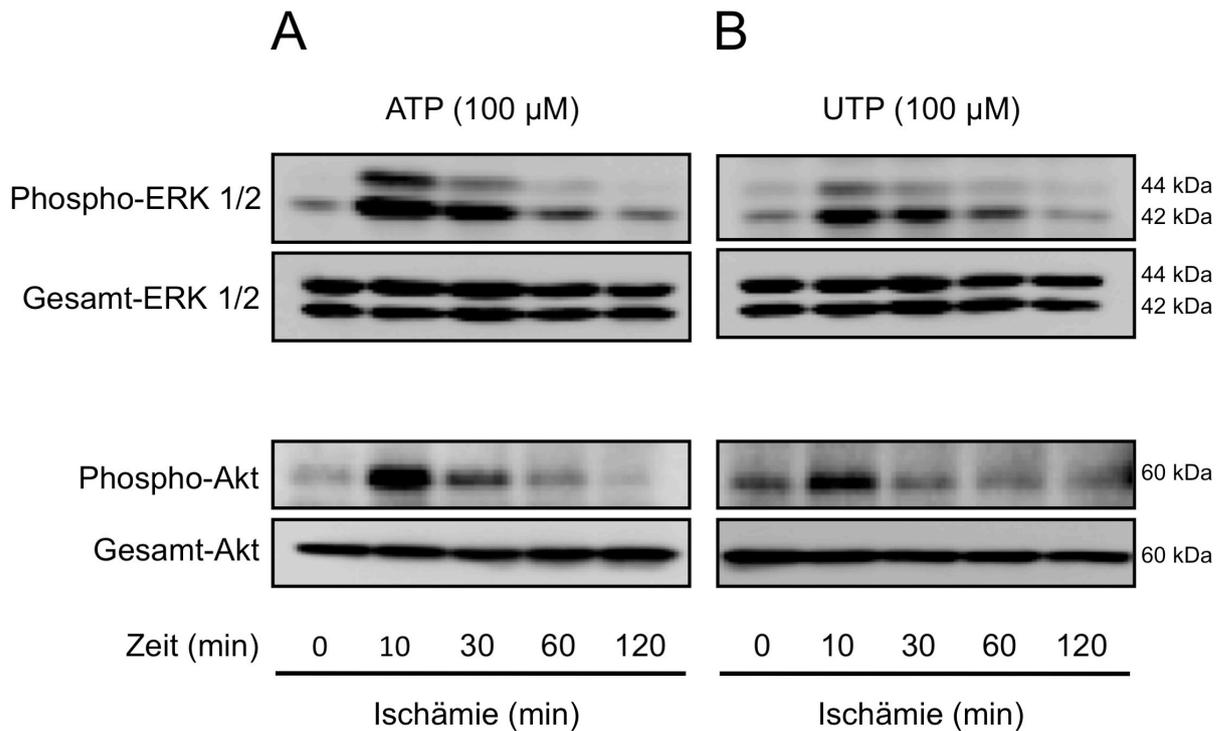


Abb. 4.12: Phosphorylierung von ERK 1/2 und Akt nach ATP- oder UTP-Stimulation während simulierter Ischämie. HUVEC wurden einer Ischämie ausgesetzt und entweder **(A)** mit dem pan-spezifischen P2R-Agonist ATP (100 μM) oder **(B)** dem spezifischen P2Y₂-Agonist UTP (100 μM) stimuliert. Abgebildet sind repräsentative Western Blot Bilder, die die Phosphorylierung von ERK 1/2 (Phospho-ERK 1/2) und Akt (Phospho-Akt) zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Ischämie zeigen. Als Kontrolle diente die anschließende Analyse des jeweiligen Gesamtproteins.

4.7.2 Hemmung des MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalwegs

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die durch P2Y₂-Rezeptoren vermittelte Aktivierung des MEK/ERK- bzw. des PI3K/Akt-Signalwegs für den anti-apoptischen Effekt von extrazellulärem ATP verantwortlich ist. Dazu wurde den Endothelzellen der P2R-Agonist ATP bzw. UTP zugegeben. Ein Teil der Zellen wurde zusätzlich mit spezifischen Hemmstoffen prä-inkubiert.

Zunächst wurde geprüft, ob die eingesetzten Hemmstoffe in der Lage sind, die Phosphorylierung der Signalwege effektiv zu inhibieren. Dazu wurden HUVEC einer 10-minütigen Ischämie ausgesetzt. Ein Teil der Zellen wurde 30 Minuten vor Ischämie mit dem MEK-Inhibitor UO126 oder dem PI3K-Inhibitor LY294002 inkubiert. Mit Beginn der Ischämie wurde dem Medium entweder ATP oder UTP zugegeben.

Anschließend wurde die Phosphorylierung mit Hilfe des Western Blots analysiert. In Übereinstimmung mit den vorausgegangenen Experimenten hatte sowohl die Zugabe des pan-spezifischen P2R-Agonisten ATP als auch die Zugabe des P2Y₂-Agonisten UTP einen klaren Anstieg der Phosphorylierung von ERK 1/2 während Ischämie zur Folge. Diese Phosphorylierung konnte durch Zugabe des MEK-Inhibitors UO126 effektiv unterbunden werden, nicht jedoch durch Zugabe des PI3K-Inhibitors LY294002. Ebenso führte die Zugabe von ATP bzw. UTP zu einem deutlichen Anstieg der Akt-Phosphorylierung. Während diese Phosphorylierung durch Zugabe des PI3K-Inhibitors LY294002 verhindert werden konnte, hatte der MEK-Inhibitor UO126 keinen Einfluss auf die Akt-Phosphorylierung.

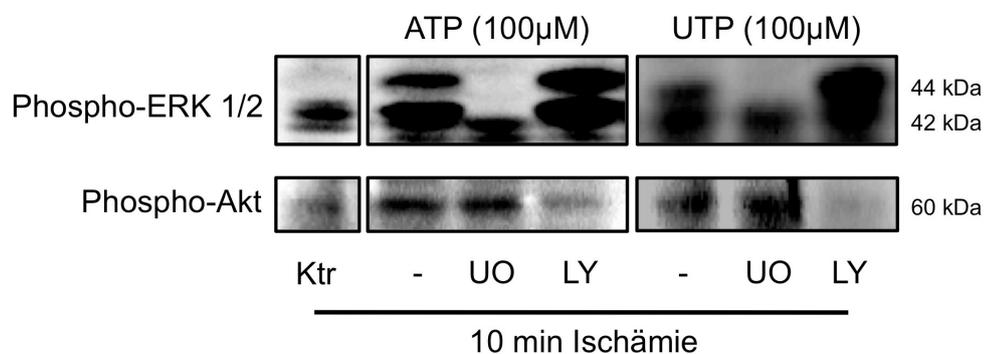


Abb. 4.13: Hemmung des MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalwegs durch spezifische Inhibitoren. HUVEC wurden einer 10-minütigen Ischämie entweder alleine (Ktr) oder in Gegenwart des pan-spezifischen P2R-Agonist ATP (100 µM) bzw. des spezifischen P2Y₂-Agonist UTP (100 µM) ausgesetzt. Ein Teil der Zellen wurde 30 Minuten vor Ischämie mit dem spezifischen MEK-Inhibitor UO126 (UO; 10µM) oder dem PI3K-Inhibitor LY294002 (LY; 10µM) inkubiert. Abgebildet sind repräsentative Western Blot Bilder, die die Phosphorylierung von ERK 1/2 (Phospho-ERK 1/2) und Akt (Phospho-Akt) zeigen.

Abschließend wurde der Einfluss dieser Signalwege auf die Ischämie-induzierte Apoptose untersucht. Dazu wurden die Zellen einer zweistündigen Ischämie ausgesetzt und währenddessen entweder mit ATP oder UTP stimuliert. Ein Teil der Zellen wurde zusätzlich mit UO126 bzw. LY294002 prä-inkubiert. Nach der Ischämie erfolgte die Analyse der aktiven Caspase 3-Spaltprodukte mittels Western Blot.

Die Zugabe von ATP reduzierte die aktiven Caspase 3-Spaltprodukte nach Ischämie um $45 \pm 6\%$. Die Blockade des MEK/ERK-Signalwegs durch UO126 hob die anti-apoptotische Wirkung von ATP ebenso auf, wie die Blockade des PI3K/Akt-Signalwegs durch LY294002 (Abb 4.14).

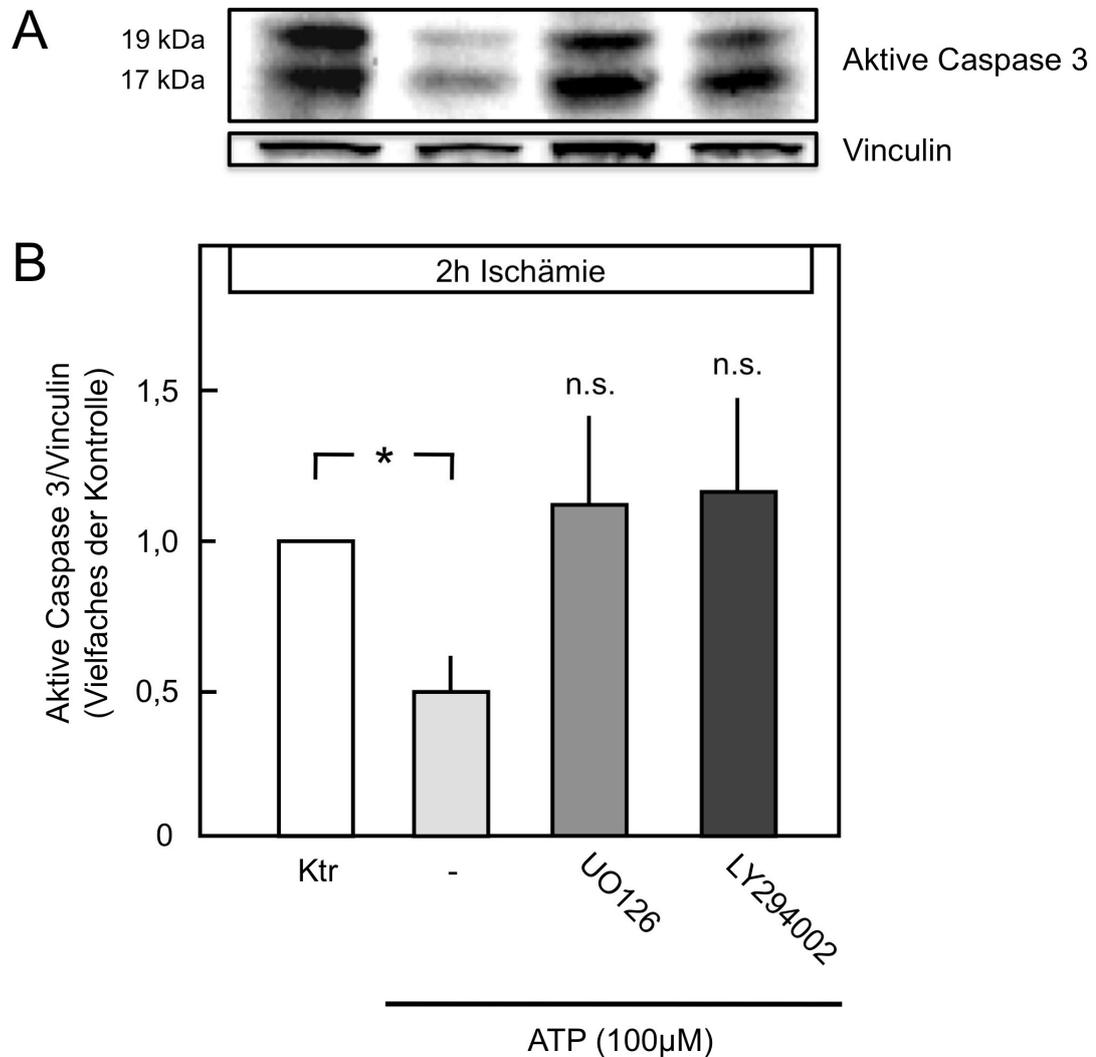


Abb. 4.14: Bedeutung des MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalwegs für die anti-apoptotische Wirkung von ATP während simulierter Ischämie. HUVEC wurden 30 Minuten vor Ischämie mit dem MEK-Inhibitor UO126 (10μM) oder dem PI3K-Inhibitor LY294002 (10μM) inkubiert. Zu Beginn der Ischämie wurde einem Teil der Zellen 100 μM des pan-spezifischen P2R-Agonisten ATP zugegeben. **(A)** Repräsentativer Western Blot der aktiven Caspase 3-Spaltprodukte sowie von Vinculin. **(B)** Densitometrische Auswertung der Aktiven Caspase 3 im Verhältnis zu Vinculin. Das Caspase 3/Vinculin-Verhältnis der ischämischen Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus mindestens $n=3$ Experimenten von 3 unabhängigen Zellpräparationen. * $P < 0,05$, n.s. = keine signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle.

Entsprechend hatte die spezifische Stimulation von P2Y₂-Rezeptoren durch UTP (100µM) eine 45±5%-ige Reduktion der Caspase 3-Aktivität zur Folge. Die Blockade des MEK/ERK-Signalwegs durch UO126 bzw. des PI3K/Akt-Signalwegs durch LY294002 beseitigte auch in diesem Fall den anti-apoptotischen Effekt der P2Y₂-Rezeptor Stimulation (Abb. 4.15).

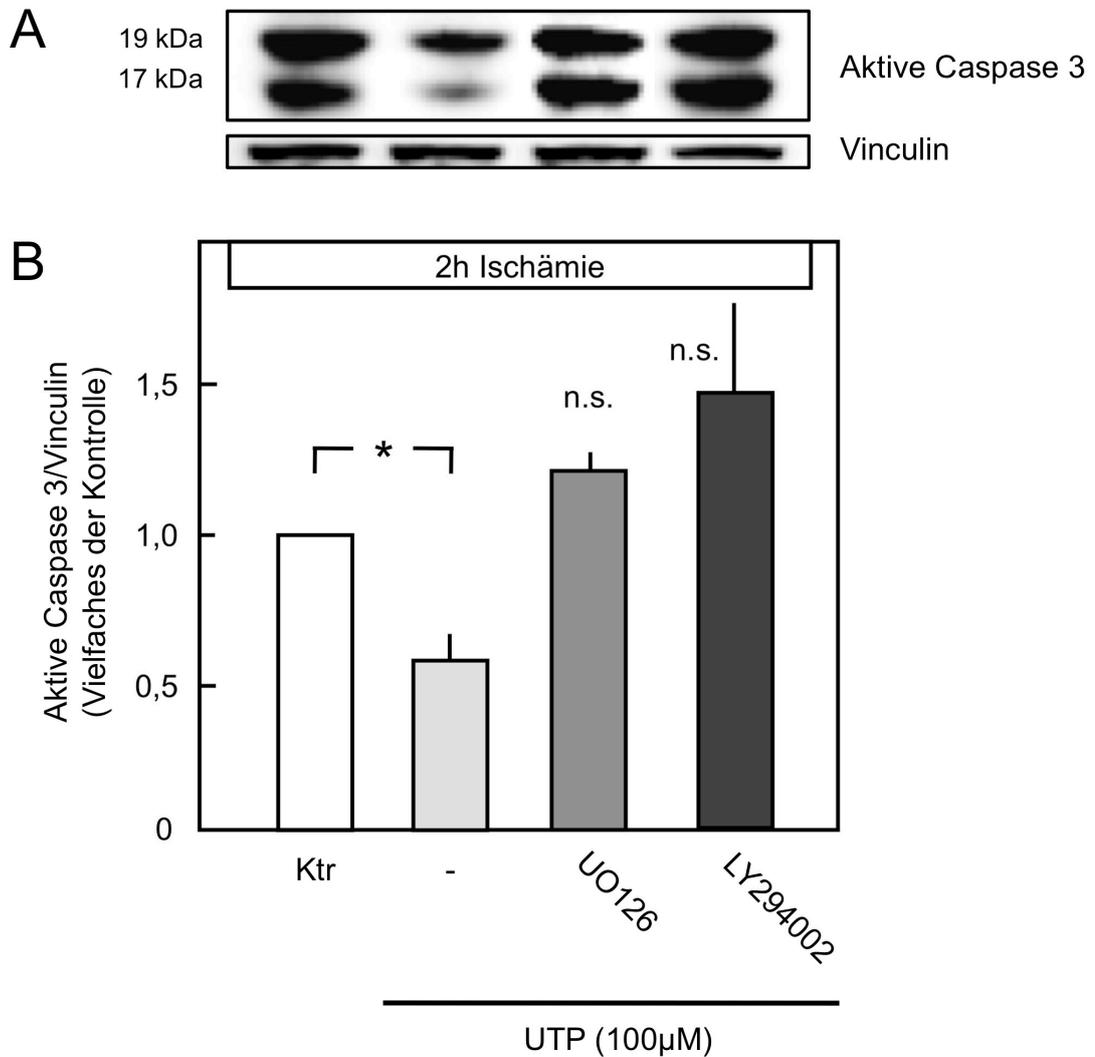


Abb. 4.15: Bedeutung des MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalwegs für die anti-apoptotische Wirkung von UTP während simulierter Ischämie. HUVEC wurden 30 Minuten vor Ischämie mit dem MEK-Inhibitor UO126 (10µM) oder dem PI3K-Inhibitor LY294002 (10µM) inkubiert. Zu Beginn der Ischämie wurde einem Teil der Zellen 100 µM des P2Y₂-Agonisten UTP zugegeben. **(A)** Repräsentativer Western Blot der aktiven Caspase 3-Spaltprodukte sowie von Vinculin. **(B)** Densitometrische Auswertung der Aktiven Caspase 3 im Verhältnis zu Vinculin. Das Caspase 3/Vinculin-Verhältnis der ischämischen Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM aus mindestens n=3 Experimenten von 3 unabhängigen Zellpräparationen. *P<0,05, n.s. = keine signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle.

5 Diskussion

Die Zerstörung der endothelialen Integrität durch Ischämie-induzierte Apoptose spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung des myokardialen Ischämie/Reperfusionsschadens (4, 5). Ziel dieser Arbeit war es daher, endogene Mechanismen humaner Endothelzellen zu identifizieren, die der Entwicklung einer Apoptose während Ischämie entgegenwirken, um daraus neue therapeutische Strategien abzuleiten. Im Zentrum der Arbeit stand dabei das extrazelluläre Signalmolekül ATP das von Zellen des kardiovaskulären Systems während Ischämie/Reperfusion freigesetzt wird (103, 104).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen im Einzelnen:

- 1) Humane Endothelzellen setzten ATP infolge einer Ischämie frei.
- 2) Die ATP-Freisetzung infolge Ischämie ist ein Cx43-abhängiger Prozess.
- 3) Das freigesetzte ATP reduziert die Ischämie-induzierte Apoptose.
- 4) Der anti-apoptotische Effekt des extrazellulären ATP wird durch Aktivierung von P2Y₂-Rezeptoren vermittelt.
- 5) Der P2Y₂-Rezeptor-abhängige Schutz vor Ischämie-induzierter Apoptose wird durch die simultane Aktivierung des MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalwegs vermittelt.

5.1 Simulierte Ischämie führt zu einer Connexin43-abhängigen ATP-Freisetzung aus humanen Endothelzellen

Es ist bekannt, dass Zellen infolge pathophysiologischer Stimuli das Signalmolekül ATP freisetzen. Dazu nutzen sie unterschiedliche Mechanismen, deren Bedeutung kontrovers diskutiert wird (54). Neuere Studien haben gezeigt, dass vor allem Cx43-Halbkanäle eine wichtige Rolle bei der physiologischen Freisetzung von ATP spielen (60).

In Experimenten der vorliegenden Arbeit stieg die ATP-Konzentration im Überstand humaner Endothelzellen bereits nach wenigen Minuten einer simulierten Ischämie um mehr als das Doppelte an.

Gleichzeitig fand sich kein Anstieg der LDH-Aktivität, so dass eine Zytolyse als Ursache des kurzfristigen ATP-Anstiegs ausgeschlossen werden konnte. Vielmehr scheint es sich bei der hier beobachteten Freisetzung des ATP um einen physiologischen Mechanismus des Endothels infolge eines akuten Sauerstoffmangels zu handeln, der auch von Gerasimovskaya et al. in Endothelzellen der Lungenstrombahn beobachtet wurde (94).

Die anschließend durchgeführte immunzytochemische Analyse zeigte, dass humane Endothelzellen sowohl im Bereich der Zell-Zell-Grenzen als auch über die gesamte Zelloberfläche verteilt Cx43 exprimieren. Der gezielte Einsatz der RNA-Interferenz ermöglichte es, Cx43 effektiv herunterzuregulieren. Die Connexin43-verarmten Zellen waren nicht in der Lage, die ATP-Freisetzung infolge einer simulierten Ischämie zu steigern. Das zeigt, dass die initiale ATP-Freisetzung aus humanen Endothelzellen während Ischämie ein Cx43-abhängiger Prozess ist. Diese Beobachtungen stimmen mit den Untersuchungen an Endothelzellen verschiedener Gefäßprovinzen überein, die einheitlich feststellen, dass die endotheliale ATP-Freisetzung durch Cx43-Halbkanäle erfolgt (55, 56, 57).

5.2 Extrazelluläres ATP wirkt der Ischämie-induzierten Apoptose humaner Endothelzellen durch Aktivierung von P2-Rezeptoren entgegen

Nach seiner Freisetzung wirkt extrazelluläres ATP durch Bindung an Purinrezeptoren als regulatorisches Signalmolekül. Seine Wirkung wird beendet, indem es durch gelöste und membrangebundene Ektonukleotidasen (Ekto-ATPasen) abgebaut wird (100, 101). Die Steigerung dieses physiologischen Abbaus durch Zugabe der löslichen Ekto-ATPase Apyrase während Ischämie führte in der vorliegenden Arbeit zu einem signifikanten Anstieg der Apoptose. Wurde der physiologische ATP-Abbau hingegen durch den Ektonukleotidase-Inhibitor ARL 67156 gehemmt, hatte dies eine klare Reduktion apoptotischer Zellen zur Folge. Die Blockade der P2-Rezeptoren durch Suramin hob diese Reduktion auf.

Das zeigt, dass das von humanen Endothelzellen in Reaktion auf eine simulierte Ischämie freigesetzte ATP einen P2-Rezeptor-vermittelten, anti-apoptotischen Mechanismus aktiviert. Dieser ist nicht in der Lage, die Ischämie-induzierte Apoptose gänzlich zu verhindern, er wirkt ihr aber entschieden entgegen. Weitere Experimente zeigten, dass dieser endogene anti-apoptotische Effekt durch die exogene Zugabe von ATP, im Sinne einer pharmakologischen Intervention, gestärkt werden kann.

Damit entsprechen diese Ergebnisse den Befunden neuerer Studien, die auf das anti-apoptotische Potential des ATP hinweisen. So gelang sowohl Arthur et al. als auch Chen et al. der Nachweis, dass extrazelluläres ATP Neuronen vor dem apoptotischen Zelluntergang schützt (105, 106). Ebenso bestätigen Untersuchungen an neutrophilen Granulozyten die anti-apoptotische Wirkung des extrazellulären ATP (107). Dabei verweisen diese Arbeiten übereinstimmend auf die wichtige Bedeutung der P2Y-Rezeptoren für die Vermittlung dieses anti-apoptotischen Effekts.

Im Gegensatz dazu stehen Befunde die eine pro-apoptotische Wirkung von extrazellulärem ATP konstatieren. Diese konträre Wirkung des ATP ist vermutlich auf zwei Faktoren zurückzuführen. Erstens hängt die ATP-Wirkung ganz entscheidend davon ab, welche P2-Rezeptor-Subtypen die untersuchten Zellen exprimieren. Es ist demonstriert worden, dass die anti-apoptotische Wirkung von extrazellulärem ATP in erster Linie durch metabotrope P2Y-Rezeptoren vermittelt wird, während pro-apoptotische Effekte durch ionotrope P2X-Rezeptoren ausgelöst werden (108). Im letzteren Fall scheint insbesondere der P2X7-Rezeptor eine wichtige Rolle zu spielen. Denn in unterschiedlichen Zelltypen konnte dieser Rezeptor als ein Vermittler der ATP-induzierten Apoptose identifiziert werden (109, 110).

Zweitens ist bedeutsam, in welcher Konzentration ATP in den jeweiligen Untersuchungen eingesetzt wurde. Es hat sich gezeigt, dass vor allem hohe Konzentrationen von extrazellulärem ATP, das heißt im millimolaren Bereich, zu einer Induktion der Apoptose führen (111, 112).

5.3 Die anti-apoptotische Wirkung von ATP ist auf eine Stimulation von P2Y₂-Rezeptoren zurückzuführen

Humane Endothelzellen exprimieren P2X₄-, P2Y₁-, P2Y₂- und P2Y₁₁-Rezeptoren (69). Ein Ziel dieser Arbeit war es, Hinweise zu gewinnen, welcher dieser P2-Rezeptor-Subtypen den anti-apoptotischen Effekt des extrazellulären ATP vermittelt.

Aus den vorausgehenden Experimenten war bereits bekannt, dass der endogene anti-apoptotische Effekt des freigesetzten ATP durch die exogene Zugabe von ATP verstärkt werden kann. Diese Kenntnis wurde nun in einem pharmakologischen Ansatz genutzt, in dessen Rahmen die konzentrationsabhängige Wirkung verschiedener P2R-Agonisten auf die Ischämie-induzierte Apoptose analysiert wurde. Als Ausgangspunkt dieser Untersuchungen diente die Testung des pan-spezifischen P2R-Agonisten ATP in drei Konzentrationen. In Übereinstimmung mit den zuvor erhobenen Befunden führte die exogene Zugabe von ATP zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Caspase 3-Aktivität. In den nachfolgenden Experimenten wurden nun die Effekte der einzelnen P2R-Agonisten mit denen des ATP verglichen. Dabei zeigte sich, dass weder der P2X-Agonist $\alpha\beta$ -me-ATP, noch der P2Y₁-Agonist MRS 2365 die Ischämie-induzierte Apoptose reduzierte. Das nicht-hydrolysierbare ATP-Analogon ATP γ S hingegen konnte die Caspase 3-Aktivität signifikant senken. Da ATP γ S in der Lage ist sowohl P2Y₁₁- als auch P2Y₂-Rezeptoren zu aktivieren, wurde in einem weiteren Ansatz UTP getestet. Die Zugabe des spezifischen P2Y₂-Agonisten UTP reduzierte die aktiven Caspase-3 Spaltprodukte nach zweistündiger Ischämie wie äquimolare Mengen an ATP. Diese äquipotente Wirkung von ATP und UTP auf die Ischämie-induzierte Apoptose lässt darauf schließen, dass der anti-apoptotische Effekt des extrazellulären ATP durch P2Y₂-Rezeptoren vermittelt wird.

Unterstützt wird diese These durch Daten, die aus Untersuchungen an neuronalen Zellen stammen. Anhand von Knock-out-Modellen konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die anti-apoptotische Wirkung von extrazellulärem ATP auf eine Vermittlung durch P2Y₂-Rezeptoren zurückzuführen ist (105).

5.4 Die anti-apoptotische Wirkung von ATP wird durch gleichzeitige Aktivierung des MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalwegs vermittelt

Eine Fülle von Untersuchungen zeigt, dass dem MEK/ERK- und dem PI3K/Akt-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Regulation des zellulären Überlebens zukommt. Diese Signalwege können durch direkte Inaktivierung pro-apoptotischer Signalelemente und durch verstärkte Transkription anti-apoptotischer Proteine der Entwicklung einer Apoptose entgegenwirken. Es ist bekannt, dass ATP nach Bindung an endotheliale P2Y-Rezeptoren in der Lage ist sowohl den MEK/ERK-Signalweg als auch den PI3K/Akt-Signalweg zu aktivieren (113, 114). Jedoch ist unklar, welche Bedeutung dieser Aktivierung im Rahmen des apoptotischen Untergangs endothelialer Zellen zukommt. Daher wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob der P2Y₂-Rezeptor-abhängige Schutz vor Ischämie-induzierter Apoptose durch eine Aktivierung des MEK/ERK- bzw. des PI3K/Akt-Signalwegs vermittelt wird.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde der bereits zuvor effizient eingesetzte pharmakologische Ansatz genutzt, indem die Effekte des pan-spezifischen P2R-Agonisten ATP mit denen des spezifischen P2Y₂-Agonisten UTP verglichen wurden. Dabei zeigte sich, dass sowohl ATP als auch UTP zu einer kurzfristigen und in ihrem zeitlichen Verlauf identischen Aktivierung des MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalwegs führten. Die Blockade dieser Aktivierung durch Einsatz spezifischer Inhibitoren hatte zur Folge, dass weder ATP noch UTP in der Lage waren, die Apoptose signifikant zu senken. Das bedeutet, dass der durch P2Y₂-Rezeptoren vermittelte Schutz vor Apoptose eine gleichzeitige Aktivierung des MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalwegs erfordert.

Das genaue Zusammenspiel der beiden Signalwege konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht gezeigt werden. Klar ist, dass die beiden Signalwege unabhängig voneinander aktiviert werden, denn weder hatte die Blockade des MEK/ERK-Signalwegs durch UO126 einen Einfluss auf die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs, noch zeigte die Zugabe von LY294002 einen Wirkung auf die Aktivierung des MEK/ERK-Signalwegs. Aber trotz der unabhängigen Aktivierung reichte die Blockade eines der beiden Signalwege aus, die durch den P2Y₂-Rezeptor vermittelte anti-apoptotische Wirkung des extrazellulären ATP aufzuheben. Daraus folgt, dass ein Zusammenwirken beider Signalwege erforderlich ist, um eine effektive Reduktion der Ischämie-induzierten Apoptose zu erreichen.

Studien der letzten Jahre weisen darauf hin, dass dieses synergetische Wirkprinzip des MEK/ERK-Signalwegs und des PI3K/Akt-Signalwegs nicht nur in humanen Endothelzellen eine Voraussetzung ist, um einen ausreichenden Schutz vor apoptotischem Zelluntergang zu gewährleisten. Auch in Untersuchungen an Kardiomyozyten, an Zellen des Knochenstoffwechsels sowie an hämatopoetischen Zellen wurde ein Zusammenwirken dieser Signalwege im Schutz vor Apoptose beobachtet (115, 116, 117). Und obgleich die molekularen Grundlagen dieses Phänomens nicht endgültig verstanden sind, scheint neben der gemeinsamen Inaktivierung pro-apoptotischer Proteine vor allem die additive Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie des *cAMP response element-binding protein (CREB)* von entscheidender Bedeutung zu sein (115).

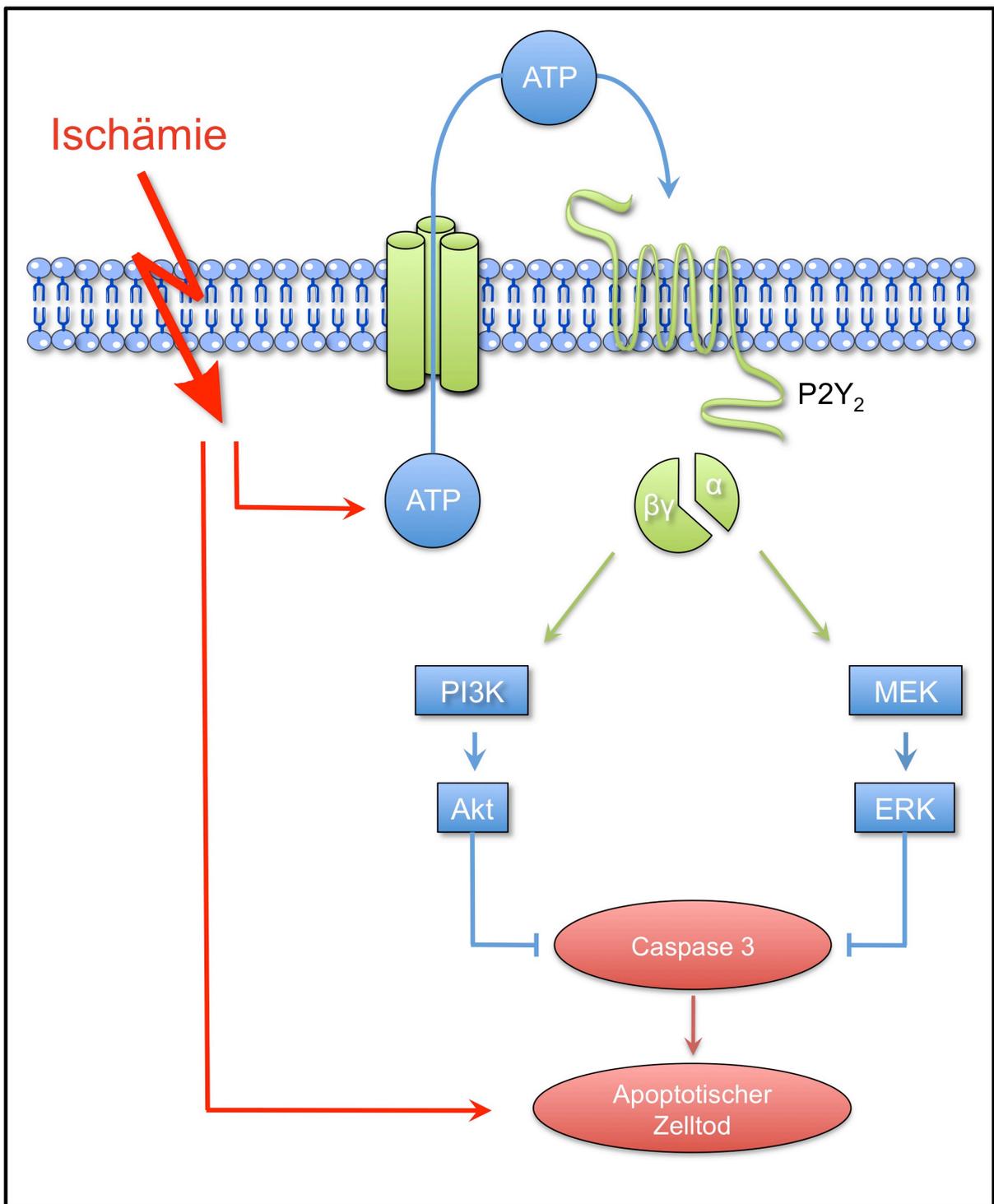


Abb. 5.1: Zusammenfassende Darstellung der Untersuchungsergebnisse. Werden humane Endothelzellen einer simulierten Ischämie ausgesetzt, reagieren sie darauf mit einer Connexin43-abhängigen ATP-Freisetzung. Das initial freigesetzte ATP aktiviert in der Folge einen endogenen Mechanismus, der einer Progression der durch die Ischämie induzierten Apoptose entgegenwirkt. Dieser Selbstschutzmehanismus wird durch P2Y₂-Rezeptoren vermittelt und erfordert die gleichzeitige Aktivierung des MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalwegs.

5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Time is muscle lautet die Antwort auf die Frage nach der zentralen Botschaft im Rahmen der Therapie des akuten Koronarsyndroms (ACS). Das bedeutet nicht weniger, als dass mit jeder Minute, die der Herzmuskel in der Ischämie verbringt, ein Teil unersetzlichen Myokards verloren geht (118). Daher ist das Hauptziel bei der Behandlung des ACS die schnellstmögliche Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßabschnitts mit konsekutiver Reperfusion des infarzierten Gewebes. Obwohl die Zeit von der Aufnahme des Patienten bis zur perkutanen Katheterintervention in den letzten Jahren reduziert werden konnte vergehen immer noch mehr als anderthalb Stunden bis zur lebensrettenden Reperfusion (119). In dieser Zeit wird der betroffene Abschnitt des Herzmuskels weder mit genügend Sauerstoff, noch mit ausreichenden Nährstoffen versorgt. Die Folge ist das sukzessive Absterben lebenswichtiger Herzmuskelzellen durch nekrotischen und apoptotischen Zelltod (3). Folglich ist das primäre Ziel, die Zeit bis zur Reperfusion weiter zu reduzieren. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass trotz aller Anstrengungen in diese Richtung immer eine gewisse Vorlaufzeit für Diagnostik und Vorbereitung der perkutanen Katheterintervention notwendig sein wird. Daher besteht ein weiteres Ziel darin, neue Strategien zu entwickeln, die es möglich machen, die Zeit bis zur endgültigen Reperfusion effektiv zu nutzen und dem Verlust funktionstüchtigen Myokards schon in der Ischämiephase entgegenzuwirken. Als ein Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapiestrategien bietet sich die Ischämie-induzierte Apoptose des Endothels an, denn Studien weisen darauf hin, dass die Zerstörung seiner Integrität ein wichtiger Trigger des apoptotischen Zelluntergangs der Kardiomyozyten in der Reperfusionsphase ist (4, 5).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beschreiben einen neuen Mechanismus, mittels dessen sich Endothelzellen der Progression einer Ischämie-induzierten Apoptose entgegenstellen. Dazu setzen sie zu Beginn der Ischämie in einem Cx43-abhängigen Prozess das extrazelluläre Signalmolekül ATP frei, das anschließend durch Aktivierung von P2-Rezeptoren einen anti-apoptotischen Mechanismus in Gang setzt. Mit Hilfe eines pharmakologischen Ansatzes gelang es, den P2Y₂-Rezeptor als Mediator dieses protektiven Effekts zu identifizieren. Weitere Untersuchungen zeigten, dass der P2Y₂-Rezeptor-vermittelte Schutz vor Apoptose eine simultane Aktivierung des MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalwegs erfordert.

Damit bietet dieser erstmalig beschriebene endotheliale Selbstschutzmechanismus wenigstens drei Ansatzpunkte, die sich therapeutisch nutzen lassen. Der erste Ansatzpunkt einer therapeutischen Intervention ist die Forcierung der Cx43-abhängigen ATP-Freisetzung während Ischämie. Mit dem *antiarrhythmic peptide 10* (AAP10) steht bereits ein Stoff zur Verfügung, der in der Lage ist die Leitfähigkeit von Cx43 in gap junction zu erhöhen (120). Vor Kurzem wurde gezeigt, dass AAP10 auch die Leitfähigkeit von Cx43-Halbkanälen beeinflusst und zu einer signifikanten Erhöhung der ATP-Freisetzung führt (121). Allerdings ist dabei zu bedenken, dass die erhöhte Leitfähigkeit der Cx43-Halbkanäle nicht nur eine verstärkte ATP-Freisetzung während Ischämie ermöglicht, sondern auch einen vermehrten Austausch anderer Moleküle zur Folge hat. Vor allem das sich dadurch einstellende Ionenungleichgewicht ist ein kritischer Faktor im Rahmen des Ischämie/Reperfusionsschadens (122, 123).

Eine zweiter Ansatzpunkt der therapeutischen Nutzung des endogenen anti-apoptischen Mechanismus der humanen Endothelzellen besteht darin, den Abbau des extrazellulären ATP zu hemmen. Dies könnte durch gezielten Einsatz von Ektonukleotidase-Inhibitoren während Ischämie erreicht werden. Jedoch birgt dieser Eingriff in das fein regulierte Netzwerk der Ektonukleotidasen das Problem in sich, dass wichtige ATP-Metaboliten wie ADP oder Adenosin, die ihrerseits Aufgaben als regulatorische Signalmoleküle wahrnehmen, fehlen.

Der dritte Ansatzpunkt, den Selbstschutzmechanismus der humanen Endothelzellen während Ischämie zu nutzen, zielt auf den in dieser Arbeit identifizierten anti-apoptisch wirksamen P2Y₂-Rezeptor ab. Eine spezifische Stimulation dieses Rezeptors hätte im Gegensatz zu den beiden erst genannten Therapieoptionen zwei Vorteile. Erstens beugt die spezifische Stimulation von P2Y₂-Rezeptoren potentiell unerwünschten Effekten vor, die durch Bindung des pan-spezifischen P2-Agonisten ATP und seiner Metaboliten an andere Purinrezeptoren ausgelöst werden könnten. Und zweitens ermöglicht die exogene Gabe definierter Mengen eines P2Y₂-Agonisten eine bessere Steuerbarkeit der Therapie. Denn eines der Hauptprobleme der bloßen Nutzung des endogen freigesetzten ATP liegt in den individuellen Schwankungen des therapeutisch verfügbaren ATP.

Die klinische Tragweite dieses therapeutischen Ansatzes wird deutlich, wenn man bedenkt, dass die gezielte Nutzung des purinergen Systems bereits heute fester Bestandteil der Therapie des akuten Koronarsyndroms ist (124).

Das Medikament Clopidogrel entfaltet sein therapeutisches Potential, indem es gezielt die thrombozytären P2Y₁₂-Rezeptoren blockiert und dadurch die ADP-abhängige Thrombozytenaggregation hemmt. Bis zu einer klinischen Nutzung des P2Y₂-Rezeptors in der Therapie des Ischämie/Reperfusionsschadens ist allerdings noch ein weiter und ungewisser Weg zurückzulegen. Ein erster Schritt auf diesem Weg wird es sein, an isoliert perfundierten Herzen zu zeigen, dass die durch P2Y₂-Rezeptoren vermittelte Aufrechterhaltung der endothelialen Integrität durch Reduktion der Ischämie-induzierten Apoptose tatsächlich einen Schutz des Gesamtmyokards vor dem Ischämie/Reperfusionsschaden nach sich zieht. Gelingt dieser Nachweis, soll in einem nächsten Schritt die Übertragbarkeit dieser neuen Therapiestrategie auf ein *in vivo* Infarktmodell geprüft werden. Dabei wird neben der Analyse von Apoptose und Infarktgröße der Einfluss der P2Y₂-Rezeptoren auf weitere Parameter wie myokardiale Ödembildung, linksventrikulärer Füllungsdruck, Ejektionsfraktion und Mortalität im Mittelpunkt stehen. Diese Untersuchungen werden entscheidend dazu beitragen, die klinische Relevanz der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse beurteilen zu können.

6 Zusammenfassung

Die Zerstörung der endothelialen Integrität durch Ischämie-induzierte Apoptose ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung des Ischämie/Reperfusionsschadens. Ziel dieser Arbeit war daher die Identifikation endogener Mechanismen endothelialer Zellen, die der Progression des apoptotischen Zelluntergangs während Ischämie entgegenwirken, um daraus neue therapeutische Konzepte abzuleiten. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand dabei die Frage, welchen Einfluss das während Ischämie/Reperfusion vermehrt freigesetzte Signalmolekül ATP auf die endotheliale Apoptose hat.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden kultivierte Endothelzellen einer zweistündigen Ischämie ausgesetzt, die eine Caspase 3-abhängige Apoptose auslöste. Zu Beginn der simulierten Ischämie fand sich ein kurzfristiger Anstieg der ATP-Freisetzung. Durch gezielten Einsatz der RNA-Interferenz konnte gezeigt werden, dass diese initiale ATP-Freisetzung ein Cx43-abhängiger Prozess ist. Während der gesteigerte Abbau des freigesetzten ATP durch Zugabe der löslichen Ekto-ATPase Apyrase einen Anstieg der Ischämie-induzierten Apoptose nach sich zog, bewirkte die Hemmung des endogenen ATP-Abbaus durch Einsatz des Ektonukleotidase-Inhibitors ARL 67156 eine signifikante Reduktion des apoptotischen Zelluntergangs. Dieser endogene anti-apoptotische Effekt konnte durch die exogene Zugabe von ATP während simulierter Ischämie verstärkt werden. Im Rahmen eines pharmakologischen Ansatzes zeigte der spezifische P2Y₂-Agonist UTP eine dem ATP äquipotente Wirkung auf die Ischämie-induzierte Apoptose. Die Aktivierung der P2Y₂-Rezeptoren durch ATP/UTP bewirkte eine simultane Phosphorylierung von ERK 1/2 sowie von Akt zu Beginn der Ischämie. Entsprechend führte die Blockade dieser Signalwege durch den spezifischen MEK-Inhibitor UO126 bzw. durch den PI3K-Inhibitor LY294002 zu einer Beseitigung der anti-apoptotischen Wirkung von ATP/UTP.

Damit präsentiert die vorliegende Arbeit einen neuen anti-apoptotischen Mechanismus humaner Endothelzellen, der auf einer durch P2Y₂-Rezeptoren vermittelten Aktivierung des MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalwegs beruht. Die gezielte Aktivierung dieses protektiven Mechanismus könnte eine neue therapeutische Strategie in der Behandlung des Ischämie/Reperfusionsschadens darstellen.

7 Summary

The disruption of endothelial integrity by ischemia-induced apoptosis plays a crucial role in the development of ischemia/reperfusion injury. The present study aims to identify the endogenous mechanism by which endothelial cells counteract the progression of apoptotic cell death during ischemia. Although it was shown that the signaling molecule, ATP is released from cells of the cardiovascular system in response to acute ischemia, its effect on ischemia-induced apoptosis of endothelial cells is not yet clear. Here, it was hypothesized that extracellular ATP that is released from endothelial cells during ischemia activates an endogenous anti-apoptotic mechanism.

To test this hypothesis, cultured human endothelial cells were exposed to two hours of simulated ischemia to induce a stable rate of caspase 3-dependant apoptosis. A transient increase of extracellular ATP was observed at the beginning of Ischemia. Use of specific siRNA revealed that this initial release of ATP is a Connexin43-dependant process. The enhanced degradation of extracellular ATP by addition of the soluble ecto-ATPase Apyrase during ischemia increased apoptotic cell death. In contrast, the inhibition of endogenous ATP-degradation by adding the ectonucleotidase-inhibitor ARL 67156 significantly reduced ischemia-induced apoptosis. This endogenous anti-apoptotic effect could be potentiated by exogenous addition of ATP during simulated ischemia. By using a pharmacological approach it was shown the addition of the specific P2Y₂-agonist UTP during ischemia could mimic the protective effect of ATP. Activation of P2Y₂-receptors by ATP/UTP during ischemia led to a significant increase in ERK1/2- and Akt-phosphorylation, Accordingly, the inhibition of MEK/ERK by UO126 and PI3K/Akt by LY294002 abolished the anti-apoptotic effect of ATP/UTP.

Thus, the present study shows a new anti-apoptotic mechanism in human endothelial cells that occurs via a P2Y₂-receptor mediated activation of MEK/ERK- and PI3K/Akt-signaling pathway. Targeted activation of this protective mechanism could represent a novel therapeutic strategy in the treatment of the ischemia/reperfusion injury.

8 Literaturverzeichnis

- 1 **Zylka-Menhorn V (2008)**. Kardiologie: In Deutschland sinkt Zahl der Herztoten. *Dtsch Arztebl* 105 (15): A-760.
- 2 **Piper HM, García-Dorado D, Ovize M (1998)**. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovascular research* 38 (2): 291-300.
- 3 **Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM (1997)**. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 95 (2): 320-3.
- 4 **Scarabelli T, Stephanou A, Rayment N, Pasini E, Comini L, Curello S, Ferrari R, Knight R, Latchman D (2001)**. Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 104 (3): 253-6.
- 5 **Scarabelli T, Stephanou A, Pasini E, Comini L, Raddino R, Knight R, Latchman D (2002)**. Different signaling pathways induce apoptosis in endothelial cells and cardiac myocytes during ischemia/reperfusion injury. *Circulation research* 90 (6): 745-8.
- 6 **Bodin P, Burnstock G (1998)**. Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society* 47 (8): 351-4.
- 7 **Bodin P, Burnstock G (2001)**. Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular. *Journal of cardiovascular pharmacology* 38 (6): 900-8.
- 8 **Burnstock G (2002)**. Purinergic Signaling and Vascular Cell Proliferation and Death. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22 (3): 364-373.
- 9 **Shen J, Dicorleto P (2008)**. ADP Stimulates Human Endothelial Cell Migration via P2Y1 Nucleotide Receptor-Mediated Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *Circulation research* 102 (4): 448-456.
- 10 **Bassenge E (1996)**. Endothelial function in different organs. *Progress in cardiovascular diseases* 39 (3): 209-28.
- 11 **Nawroth P, Lasch HG (1999)**. Vaskuläre Medizin systematisch. *UNI-MED Verlag AG, Bremen*.
- 12 **Furchgott R, Zawadzki J (1980)**. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 (5789): 373-6.
- 13 **Plendl J, Sinowatz F, Auerbach R (1992)**. The heterogeneity of the vascular endothelium. *Anatomia, histologia, embryologia* 21 (3): 256-62.
- 14 **Pries A, Kuebler W (2006)**. Normal endothelium. *Handbook of experimental pharmacology* (176 Pt 1): 1-40.

- 15 Stern D, Kaiser E, Nawroth P (1988).** Regulation of the coagulation system by vascular endothelial cells. *Haemostasis* 18 (4-6): 202-14.
- 16 Sumpio B, Riley J, Dardik A (2002).** Cells in focus: endothelial cell. *The international journal of biochemistry & cell biology* 34 (12): 1508-12.
- 17 Pober J, Sessa W (2007).** Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature reviews Immunology* 7 (10): 803-15.
- 18 Folkman J, Shing Y (1992).** Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. *Advances in experimental medicine and biology* 313: 355-64.
- 19 Conway E, Collen D, Carmeliet P (2001).** Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular research* 49 (3): 507-21.
- 20 Van Hinsbergh W (1997).** Endothelial permeability for macromolecules. Mechanistic aspects of pathophysiological modulation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17 (6): 1018-23.
- 21 Stevens T, Garcia J, Shasby D, Bhattacharya J, Malik A (2000).** Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 279 (3): L419-22.
- 22 Leung D, Cachianes G, Kuang W, Goeddel D, Ferrara N (1989).** Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246 (4935): 1306-9.
- 23 Busse R, Hecker M, Fleming I (1994).** Control of nitric oxide and prostacyclin synthesis in endothelial cells. *Arzneimittel-Forschung* 44 (3A): 392-6.
- 24 Noll G, Lüscher T (1998).** Comparative pharmacological properties among calcium channel blockers: T-channel versus L-channel blockade. *Cardiology* 89 Suppl 1: 10-5.
- 25 Mione M, Ralevic V, Burnstock G (1990).** Peptides and vasomotor mechanisms. *Pharmacology & therapeutics* 46 (3): 429-68.
- 26 Boeynaems J, Pearson J (1990).** P2 purinoceptors on vascular endothelial cells: physiological significance and transduction mechanisms. *Trends in pharmacological sciences* 11 (1): 34-7.
- 27 Vanhoutte P, Mombouli J (1996).** Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Progress in cardiovascular diseases* 39 (3): 229-38.
- 28 Van Cruchten S, Van Den Broeck W (2002).** Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia, histologia, embryologia* 31 (4): 214-23.

- 29 Kerr J, Wyllie A, Currie A (1972).** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26 (4): 239-57.
- 30 Dimmeler S, Zeiher A (2000).** Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circulation research* 87 (6): 434-9.
- 31 Kang P, Izumo S (2000).** Apoptosis and heart failure: A critical review of the literature. *Circulation research* 86 (11): 1107-13.
- 32 Walsh K, Smith R, Kim H (2000).** Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. *Circulation research* 87 (3): 184-8.
- 33 Vogt C (1842).** Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). *Jent & Gassman, Solothurn*.
- 34 Kerr J (1965).** A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *The Journal of pathology and bacteriology* 90 (2): 419-35.
- 35 Kerr J (2002).** History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182: 471-4.
- 36 Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssière J, Mignotte B (1995).** The biochemistry of programmed cell death. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (13): 1277-87.
- 37 Alnemri E, Livingston D, Nicholson D, Salvesen G, Thornberry N, Wong W, Yuan J (1996).** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87 (2): 171.
- 38 Miller D (1997).** The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Seminars in immunology* 9 (1): 35-49.
- 39 Kidd V (1998).** Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annual review of physiology* 60: 533-73.
- 40 Slee E, Adrain C, Martin S (1999).** Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell death and differentiation* 6 (11): 1067-74.
- 41 Kroemer G, Zamzami N, Susin S (1997).** Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology today* 18 (1): 44-51.
- 42 Bernardi P (1999).** Mitochondria in muscle cell death. *Italian journal of neurological sciences* 20 (6): 395-400.
- 43 Loeffler M, Kroemer G (2000).** The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Experimental cell research* 256 (1): 19-26.

- 44 Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998).** Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94 (4): 481-90.
- 45 Chang H, Yang X (2000).** Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 64 (4): 821-46.
- 46 Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997).** DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89 (2): 175-84.
- 47 Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1997).** A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391 (6662): 43-50.
- 48 Lindahl T, Satoh M, Poirier G, Klungland A (1995).** Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends in biochemical sciences* 20 (10): 405-11.
- 49 Chang L, Putcha G, Deshmukh M, Johnson E (2002).** Mitochondrial involvement in the point of no return in neuronal apoptosis. *Biochimie* 84 (2-3): 223-31.
- 50 Rehm M, Dussmann H, Janicke R, Tavaré J, Kogel D, Prehn J (2002).** Single-cell fluorescence resonance energy transfer analysis demonstrates that caspase activation during apoptosis is a rapid process. Role of caspase-3. *The Journal of biological chemistry* 277 (27): 24506-14.
- 51 Tyas L, Brophy V, Pope A, Rivett A, Tavaré J (2000).** Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. *EMBO reports* 1 (3): 266-70.
- 52 Rodríguez-Sinovas A, Abdallah Y, Piper HM, García-Dorado D (2007).** Reperfusion injury as a therapeutic challenge in patients with acute myocardial infarction. *Heart failure reviews* 12 (3-4): 207-16.
- 53 Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P (1996).** Apoptotic and necrotic cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 74 (1): 86-107.
- 54 Novak I (2003).** ATP as a signaling molecule: the exocrine focus. *News in physiological sciences* 18: 12-7.
- 55 Gomes P, Srinivas S, Van Driessche W, Vereecke J, Himpens B (2005).** ATP release through connexin hemichannels in corneal endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 46 (4): 1208-18.
- 56 Faigle M, Seessle J, Zug S, El Kasmi K, Eltzschig H (2008).** ATP release from vascular endothelia occurs across Cx43 hemichannels and is attenuated during hypoxia. *PLoS ONE* 3 (7): e2801.

- 57 Braet K, Aspeslagh S, Vandamme W, Willecke K, Martin P, Evans W, Leybaert L (2003).** Pharmacological sensitivity of ATP release triggered by photoliberation of inositol-1,4,5-trisphosphate and zero extracellular calcium in brain endothelial cells. *Journal of cellular physiology* 197 (2): 205-13.
- 58 Kumar N, Gilula N (1996).** The gap junction communication channel. *Cell* 84 (3): 381-8.
- 59 Laird D (2006).** Life cycle of connexins in health and disease. *The Biochemical journal* 394 (Pt 3): 527-43.
- 60 Goodenough D, Goliger J, Paul D (1996).** Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annual review of biochemistry* 65: 475-502.
- 61 Van Rijen H, van Kempen M, Analbers L, Rook M, van Ginneken A, Gros D, Jongasma HJ (1997).** Gap junctions in human umbilical cord endothelial cells contain multiple connexins. *The American journal of physiology* 272 (1 Pt 1): C117-30.
- 62 Söhl G, Willecke K (2004).** Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular research* 62 (2): 228-32.
- 63 DeVries S, Schwartz E (1992).** Hemi-gap-junction channels in solitary horizontal cells of the catfish retina. *The Journal of physiology* 445: 201-30.
- 64 Rodríguez-Sinovas A, Cabestrero A, López D, Torre I, Morente M, Abellán A, Miró E, Ruiz-Meana M, García-Dorado D (2007).** The modulatory effects of connexin 43 on cell death/survival beyond cell coupling. *Progress in biophysics and molecular biology* 94 (1-2): 219-32.
- 65 Burnstock G (1978).** A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In: Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach, Straub R.W., Bolis L. (Hrsg.), *Raven Press, New York*, 107-118.
- 66 Burnstock G, Kennedy C (1985).** Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *General pharmacology* 16 (5): 433-40.
- 67 Abbracchio M, Burnstock G (1994).** Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacology & therapeutics* 64 (3): 445-75.
- 68 Burnstock G (2007).** Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and molecular life sciences CMLS* 64 (12): 1471-83.
- 69 Wang L, Karlsson L, Moses S, Hultgårdh-Nilsson A, Andersson M, Borna C, Gudbjartsson T, Jern S, Erlinge D (2002).** P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells. *Journal of cardiovascular pharmacology* 40 (6): 841-53.
- 70 Kügelken I (2008).** Pharmacology of mammalian P2X- and P2Y-receptors. *Biotrend Reviews* 3: 1-12.

- 71 Costanzi S, Mamedova L, Gao ZG, Jacobson K (2004).** Architecture of P2Y nucleotide receptors: structural comparison based on sequence analysis, mutagenesis, and homology modeling. *Journal of medicinal chemistry* 47 (22): 5393-404.
- 72 Erb L, Liao Z, Seye C, Weisman G (2006).** P2 receptors: intracellular signaling. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 452 (5): 552-62.
- 73 Smrcka A, Hepler J, Brown K, Sternweis P (1991).** Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* 251 (4995): 804-7.
- 74 Bootman M, Berridge M (1995).** The elemental principles of calcium signaling. *Cell* 83 (5): 675-8.
- 75 Newton A (1997).** Regulation of protein kinase C. *Current opinion in cell biology* 9 (2): 161-7.
- 76 Erb L, Liao Z, Seye C, Weisman G (2006).** P2 receptors: intracellular signaling. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 452 (5): 552-62.
- 77 Hausenloy D, Yellon D (2004).** New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovascular research* 61 (3): 448-60.
- 78 Strnisková M, Barancík M, Ravingerová T (2002).** Mitogen-activated protein kinases and their role in regulation of cellular processes. *General physiology and biophysics* 21 (3): 231-55.
- 79 Cobb M, Goldsmith E (1995).** How MAP kinases are regulated. *The Journal of biological chemistry* 270 (25): 14843-6.
- 80 English J, Pearson G, Wilsbacher J, Swantek J, Karandikar M, Xu S, Cobb MH (1999).** New insights into the control of MAP kinase pathways. *Experimental cell research* 253 (1): 255-70.
- 81 Sugden P, Clerk A (1997).** Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cellular Signalling* 9 (5): 337-51.
- 82 Liebmann C (2001).** Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cellular Signalling* 13 (11): 777-85.
- 83 Bonni A, Brunet A, West A, Datta S, Takasu M, Greenberg M (1999).** Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286 (5443): 1358-62.
- 84 Fang X, Yu S, Eder A, Mao M, Bast R, Boyd D, Mills GB (1999).** Regulation of BAD phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene* 18 (48): 6635-40.

- 85 Scheid M, Schubert K, Duronio V (1999).** Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *The Journal of biological chemistry* 274 (43): 31108-13.
- 86 Radeff-Huang J, Seasholtz T, Matteo R, Brown J (2004).** G protein mediated signaling pathways in lysophospholipid induced cell proliferation and survival. *Journal of cellular biochemistry* 92 (5): 949-66.
- 87 Oudit GY, Penninger JM (2009).** Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN. *Cardiovasc Res.* 82 (2): 250-60.
- 88 Duronio V (2008).** The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *The Biochemical journal* 415 (3): 333-44.
- 89 Datta S, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997).** Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91 (2): 231-41.
- 90 Yamaguchi, H, Wang H (2001).** The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene* 20 (53): 7779-86.
- 91 Cardone M, Roy N, Stennicke H, Salvesen G, Franke T, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998).** Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282 (5392): 1318-21.
- 92 Brunet A, Bonni A, Zigmond M, Lin M, Juo P, Hu L, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999).** Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96 (6): 857-68.
- 93 Bodin P, Burnstock G (2001).** Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular. *Journal of cardiovascular pharmacology* 38 (6): 900-8.
- 94 Gerasimovskaya E, Ahmad S, White C, Jones P, Carpenter T, Stenmark K (2002).** Extracellular ATP is an autocrine/paracrine regulator of hypoxia-induced adventitial fibroblast growth. Signaling through extracellular signal-regulated kinase-1/2 and the Egr-1 transcription factor. *The Journal of biological chemistry* 277 (47): 44638-50.
- 95 Ahmad S, Ahmad A, McConville G, Schneider B, Allen C, Manzer R, Mason RJ, White CW (2005).** Lung epithelial cells release ATP during ozone exposure: signaling for cell survival. *Free radical biology & medicine* 39 (2): 213-26.
- 96 Peters S, Reis A, Noll T (2005).** Preparation of Endothelial Cells from Micro- and Macrovascular Origin. *Berlin: Springer Verlag.*
- 97 Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001).** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 (6836): 494-8.

- 98 Laemmli U (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680-5.
- 99 Kyhse-Andersen J (1984).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of biochemical and biophysical methods* 10 (3-4): 203-9.
- 100 Gordon E, Pearson J, Slakey L (1986).** The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by cultured endothelial cells from pig aorta. Feed-forward inhibition of adenosine production at the cell surface. *The Journal of biological chemistry* 261 (33): 15496-507.
- 101 Kaczmarek E, Koziak K, Sévigny J, Siegel J, Anrather J, Beaudoin A, Bach FH, Robson SC (1996).** Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *The Journal of biological chemistry* 271 (51): 33116-22.
- 102 Zimmermann H (2000).** Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 362 (4-5): 299-309.
- 103 Clemens M, Forrester T (1981).** Appearance of adenosine triphosphate in the coronary sinus effluent from isolated working rat heart in response to hypoxia. *The Journal of physiology* 312: 143-58.
- 104 Erlinge D, Harnek J, van Heusden C, Olivecrona G, Jern S, Lazarowski E (2005).** Uridine triphosphate (UTP) is released during cardiac ischemia. *International journal of cardiology* 100 (3): 427-33.
- 105 Arthur D, Georgi S, Akassoglou K, Insel P (2006).** Inhibition of apoptosis by P2Y2 receptor activation: novel pathways for neuronal survival. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 26 (14): 3798-804.
- 106 Chen HH, Schock S, Xu J, Safarpour F, Thompson C, Stewart A (2007).** Extracellular ATP-dependent upregulation of the transcription cofactor LMO4 promotes neuron survival from hypoxia. *Experimental cell research* 313 (14): 3106-16.
- 107 Vaughan K, Stokes L, Prince L, Marriott H, Meis S, Kassack M, Bingle CD, Sabroe I, Surprenant A, Whyte MKB (2007).** Inhibition of Neutrophil Apoptosis by ATP Is Mediated by the P2Y11 Receptor. *Journal of immunology* 179 (12): 8544-53.
- 108 Di Virgilio F, Chiozzi P, Falzoni S, Ferrari D, Sanz J, Venketaraman V, Baricordi OR (1998).** Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell death and differentiation* 5 (3): 191-9.
- 109 Noguchi T, Ishii K, Fukutomi H, Naguro I, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H (2008).** Requirement of reactive oxygen species-dependent activation of ASK1-p38 MAPK pathway for extracellular ATP-induced apoptosis in macrophage. *The Journal of biological chemistry* 283 (12): 7657-65.

- 110 Lépine S, Le Stunff H, Lakatos B, Sulpice J, Giraud F (2006).** ATP-induced apoptosis of thymocytes is mediated by activation of P2 X 7 receptor and involves de novo ceramide synthesis and mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* 1761 (1): 73-82.
- 111 Tai CJ, Chang SJ, Chien LY, Leung P, Tzeng CR (2005).** Adenosine triphosphate induces activation of caspase-3 in apoptosis of human granulosa-luteal cells. *Endocrine journal* 52 (3): 327-35.
- 112 Coutinho-Silva R, Stahl L, Cheung KK, de Campos N, de Oliveira Souza C, Ojcius D, Burnstock G (2005).** P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 288 (5): G1024-35.
- 113 Montiel M, de la Blanca E, Jiménez E (2006).** P2Y receptors activate MAPK/ERK through a pathway involving PI3K/PDK1/PKC-zeta in human vein endothelial cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 18 (1-3): 123-34.
- 114 Huwiler A, Rölz W, Dorsch S, Ren S, Pfeilschifter J (2002).** Extracellular ATP and UTP activate the protein kinase B/Akt cascade via the P2Y(2) purinoceptor in renal mesangial cells. *British journal of pharmacology* 136 (4): 520-9.
- 115 Mehrhof F, Müller F, Bergmann M, Li P, Wang Y, Schmitz W, Dietz R, von Harsdorf R (2001).** In cardiomyocyte hypoxia, insulin-like growth factor-I-induced antiapoptotic signaling requires phosphatidylinositol-3-OH-kinase-dependent and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein. *Circulation* 104 (17): 2088-94.
- 116 Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas S, Kousteni S (2005).** Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *The Journal of biological chemistry* 280 (50): 41342-51.
- 117 Shelton J, Steelman L, Lee J, Knapp S, Blalock W, Moye P, Franklin RA, Pohnert SC, Mirza AM, McMahon M, McCubrey JA (2003).** Effects of the RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signal transduction pathways on the abrogation of cytokine-dependence and prevention of apoptosis in hematopoietic cells. *Oncogene* 22 (16): 2478-92.
- 118 Gibson C, de Lemos J, Antman E and the TIMI Study Group. (2004).** Time is muscle in primary PCI: the strength of the evidence grows. *European heart journal* 25 (12): 1001-2.

- 119 De Luca G, van 't Hof A, de Boer MJ, Ottervanger J, Hoorntje J, Gosselink A, Dambrink JE, Zijlstra F, Suryapranata H (2004).** Time-to-treatment significantly affects the extent of ST-segment resolution and myocardial blush in patients with acute myocardial infarction treated by primary angioplasty. *European heart journal* 25 (12): 1009-13.
- 120 Weng S, Lauven M, Schaefer T, Polontchouk L, Grover R, Dhein S (2002).** Pharmacological modification of gap junction coupling by an antiarrhythmic peptide via protein kinase C activation. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (9): 1114-6.
- 121 Clarke T, Williams O, Martin P, Evans W (2009).** ATP release by cardiac myocytes in a simulated ischaemia model: inhibition by a connexin mimetic and enhancement by an antiarrhythmic peptide. *European journal of pharmacology* 605 (1-3): 9-14.
- 122 Shintani-Ishida K, Uemura K, Yoshida KI (2007).** Hemichannels in cardiomyocytes open transiently during ischemia and contribute to reperfusion injury following brief ischemia. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 293 (3): H1714-20.
- 123 John S, Kondo R, Wang S, Goldhaber J, Weiss J (1999).** Connexin-43 hemichannels opened by metabolic inhibition. *The Journal of biological chemistry* 274 (1): 236-40.
- 124 Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V et al. (2008).** Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *European heart journal* 29 (23): 2909-45.

9 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Daniel Urban

10 Danksagung

Mein erster Dank gilt PD Dr. Thomas Noll für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit. Besonders danke ich ihm für die fundierte wissenschaftliche Ausbildung, die er mir im Rahmen des Graduiertenkollegs 534 ermöglichte.

Prof. Dr. Dr. Hans-Michael Piper, der während des Erstellens dieser Arbeit Direktor des Physiologischen Instituts Giessen und Sprecher des Graduiertenkollegs 534 war, danke ich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 534 und für die Bereitstellung eines optimal eingerichteten Arbeitsplatzes.

Dr. Frauke Härtel möchte ich dafür danken, dass sie ihr fachliches Wissen jederzeit mit mir teilte und dadurch wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein besonderer Dank gilt den Technischen Assistenten Anna Reis, Annika Krautwurst und Hermann Holzträger, die mir mit großem Engagement und methodischer Kompetenz stets zur Seite standen.

Herrn Otto Becker und dem Team der Werkstatt des Physiologischen Instituts Giessen danke ich für ihre schnelle und stets einwandfreie Umsetzung der technischen Aspekte dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich den Doktoranden und meinen Freunden der AG Noll und des Graduiertenkollegs 534 für die gemeinsame Zeit des Lernens und Lebens. Namentlich bedanke ich mich bei Marion Holl, Krishnaveni Gadiraju, Philipp Stieger und Dominik Schuler, deren fachliche und persönliche Ratschläge mir eine große Hilfe waren und sind.

Meiner Familie möchte ich für die fortwährende Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit danken. Vor allem meine Eltern haben meinen Werdegang in vielerlei Hinsicht geprägt und gefördert. Ein besonderer Dank gilt meinem Vater für die bis zuletzt ausdauernde und gründliche Korrektur dieser Arbeit.

Gewidmet ist diese Arbeit meiner Frau Linda, die mir durch ihren uneingeschränkten Rückhalt und ihr bedingungsloses Vertrauen die Kraft gab und gibt, gesetzte Ziele zu erreichen und neue Ziele zu stecken.