

**Wirkung der metabolischen Hemmung
auf die zytosolische Calciumkonzentration
von Endothelzellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von
Bert Bosche
aus Vechta**

Gießen 2003

**Aus dem Physiologischen Institut
Direktor: Prof. Dr. Dr. H. M. Piper
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Gutachter: PD Dr. Noll

Gutachter: Prof. Dr. Tillmanns

Tag der Disputation: 09.10.2003

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN

1. EINLEITUNG

1.1 Das Endothel

1.2 Endotheliale Permeabilitätsänderungen unter pathophysiologischen Bedingungen

1.3 Die Rolle des zytosolischen Calciums für die endotheliale Schrankenfunktion

1.4 Ziele der Arbeit

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

2.2 Zellkultur makrovaskulärer Endothelzellen

2.3 Bestimmung des zellulären ATP-Gehalts

2.4 Bestimmung der zytosolischen Calciumkonzentration

2.5 Proteinbestimmung

2.6 Experimentelle Protokolle

2.7 Statistische Methoden

3. ERGEBNISSE

3.1 Einfluss von 2-Desoxyglucose und Natriumzyanid auf den zellulären ATP-Gehalt und die zytosolische Calciumkonzentration

3.2 Einfluss von 2-Desoxyglucose und Natriumzyanid auf den zellulären ATP-Gehalt in Gegenwart und Abwesenheit von Pyruvat oder Glucose

3.3 Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von 2-Desoxyglucose auf die zytosolische Calciumkonzentration

3.4 Einfluss von 2-Desoxyglucose auf die zytosolische Calciumkonzentration in Gegenwart und Abwesenheit von Pyruvat

3.5 Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Natriumzyanid auf die zytosolische Calciumkonzentration

3.6 Einfluss von Natriumcyanid auf die zytosolische Calciumkonzentration in Gegenwart und Abwesenheit von Glucose

3.7 Metabolische Inhibition bei frisch isolierten aortalen Endothelzellen

3.8 Einfluss von Lithiumionen auf die 2-DG-induzierte Zunahme der zytosolischen Calciumkonzentration

3.9 Einfluss von Xestospongine C auf die 2-DG-induzierte Zunahme der zytosolischen Calciumkonzentration

4. DISKUSSION

4.1 Hauptbefunde

4.2 Metabolische Hemmung mitochondrialer und glykolytischer ATP-Synthese und ihr Einfluss auf die endotheliale Calciumhomöostase

4.3 Unterschiedliche Empfindlichkeit der zytosolischen Calciumkonzentration auf die Hemmung der einzelnen ATP-bereitstellenden Systeme

4.4 Zellkultur-bedingte Einflüsse auf die Calciumhomöostase

4.5 Mechanismus der Ca^{2+} -Freisetzung des Endoplasmatischen Retikulums

4.6 Pathophysiologische Relevanz des Mechanismus

4.7 Schlussfolgerung

5. ZUSAMMENFASSUNG

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abkürzungen

[Ca ²⁺] _i	zytosolische freie Calciumionenkonzentration
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
° C	Grad Celsius
2-DG	2-Desoxy-D-glucose (im Text 2-Desoxyglucose)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
Ca ²⁺	zweiwertige(s) Calciumion(en)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endothelzelle(n)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(-β-aminoethylenether)-N,N,N,N-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fura 2	1-(2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy)-2- 2'-anino-5'-methylphenoxy)-ethan-N,N,N,N-tetraazetsäure- natriumsalz
Fura 2 AM	Pentaazetoxymethyl-ester von Fura 2
g	Erdbeschleunigung: 9,81 m/s ²
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (high-performance liquid chromatographie)
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IU	internationale Einheiten (international Units)
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
M	mol/l
M 199	Medium 199
MW	Mittelwert
NaCN	Natriumcyanid
NCS	Neugeborenen Kälberserum (new born calf serum)
P	Signifikanzniveau

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate-buffered saline)
PCA	Perchlorsäure
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodezylsulfat
TBAS	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
XeC	Xestospongin C

1. Einleitung

1.1 Das Endothel

Bereits 1660 entdeckte der Italiener Marcello Malpighi die winzigen Kapillaren, die Arterien und Venen verbinden und fand damit das fehlende Verbindungsglied in der von Harveys 1603 postulierten Theorie des kontinuierlichen Blutkreislaufs (Duin und Sutcliffe, 1992). Seit jener Zeit ist der strukturelle Aufbau der Kapillarwand von wissenschaftlichem Interesse. Die Möglichkeit der Endothelzellisolierung und Kultivierung in den siebziger Jahren (Jaffe, 1973) war ein wesentlicher Schritt für das Verständnis der Funktion auf biochemischer Ebene. Analysen kultivierter Endothelzellen erlaubten Einblicke in die Zellfunktion unabhängig von Einflüssen benachbarter Gewebezellen. Einerseits durch die neuen Erkenntnisse der komplexen Funktionen der Endothelzellen und andererseits aufgrund der geschätzten Gewebsmasse innerhalb des menschlichen Organismus von einem kg und mehr (Just, 1994; Simionescu, 1988) geht man heute dazu über, die Endothelzellen in ihrer Gesamtheit als Organ – das Endothel – zu interpretieren.

Die Barrierefunktion zwischen strömendem Blut und Gewebe galt lange als einzige Aufgabe des Endothels. Daneben war die Interaktion mit dem strömenden Blut, d.h. gerinnungshemmende und fibrinolytische Eigenschaften bei intakter Zellschicht, sowie gerinnungsfördernde Eigenschaften bei gestörter Gewebsintegrität bekannt. Erst in neuerer Zeit werden die außerordentliche Vielfältigkeit der verschiedenen Funktionen des Endothels und ihre klinische Bedeutung verstanden. Die Endothelzellen sind wesentlich an der Regulierung des Vasotonus beteiligt (Pohl, 1994; Zeither, 1994), sie nehmen Einfluss auf die Zusammensetzung der Basalmembran, vermitteln immunologische Prozesse (Cotran, 1987), verfügen über einen kontraktilen Apparat (Curry, 1992) und sind an der Angiogenese beteiligt (Jaffe, 1985).

Das Endothel bildet prinzipiell eine Schranke zwischen Blut und Gewebe. Seine Barrierefunktion ist nur teilweise verstanden. Im Blut befindliche Substanzen können diese Barriere auf zwei Wegen überwinden, einerseits transzellulär, also direkt durch die Zelle hindurch und andererseits parazellulär, d.h. durch interendotheliale Spalträume. Beispielsubstanzen für transzelluläre Passage sind Wasser und andere kleine sowohl hydro- als auch lipophile Moleküle wie Anästhesiegase oder Harnstoff.

Sie durchwandern die Endothelzellschicht passiv per diffusionem. Makromoleküle können auch transzellulär in zytoplasmatischen Vesikeln zwischen Gefäßlumen und Interstitium transportiert werden (Simionescu, 1988). Parazelluläre Permeabilität für große Moleküle tritt auf, wenn Endothelzellen durch diverse Stimuli aktiviert werden und es zur Spaltbildung zwischen benachbarten Zellen kommt.

1.2 Endotheliale Permeabilitätsänderungen unter pathophysiologischen Bedingungen

Über die physiologische Varianz hinaus kann sich die Permeabilität unter pathophysiologischen Bedingungen verändern. Ursachen hierfür können einerseits extrinsische, d.h. nicht endotheliale, oder intrinsische, endotheliale Faktoren sein. Die Bedingungen der akuten oder chronischen Entzündung sind für diesen Aspekt am häufigsten untersucht und am besten verstanden. So konnte schon vor über 30 Jahren herausgefunden werden, dass Entzündungsmediatoren beispielsweise Histamin oder Serotonin eine deutliche Permeabilitätserhöhung durch interendotheliale Spaltenbildung verursachen (Majno und Palade, 1961). Dieser dadurch freigegebene parazelluläre Weg ermöglicht Makromolekülen, wie z.B. Albumin den Übertritt ins subendotheliale Gewebe und führt somit letztendlich zu einem intersitiellen Ödem. Weitere extrinsische Faktoren sind Sauerstoffradikale, die durch aktivierte Granulozyten u.a. während Reperfusion nach Ischämie freigesetzt werden. (Arndt, 1991, Lucchesi, 1994). Zu den exogenen Faktoren, die die endotheliale Schrankenfunktion herabsetzen, gehört auch Adenosin, das aus energieverarmenden Herzmuskelzellen freigesetzt wird (Watanabe, 1992). Eine intrinsische Ursache für den Verlust der Barrierefunktion stellt die Energieverarmung der Endothelzellen selbst dar (Hyslop, 1988; Unno, 1996; Watanabe, 1991). Endothelzellen, wie alle übrigen Säugetierzellen, decken ihren ATP-Bedarf über die mitochondriale Atmung und die Glykolyse (Abb. 1.1). Die Glykolyse ist mit den Membranen des endoplasmatischen Retikulums assoziiert. Im Gegensatz zur Mehrzahl der tierischen Zellen spielt die glykolytische ATP-Synthese in Endothelzellen eine besondere Rolle. Man konnte zeigen, dass Endothelzellen unter Hypoxie ihren ATP-Bedarf vollständig über die anaerobe Glykolyse decken können (Krützfeldt, 1990; Mertens, 1990). Trotzdem reagieren Endothelzellen bereits auf eine partielle metabolische Hemmung, wie sie

z.B. unter Ischämie ausgelöst werden kann, mit einem Versagen der endothelialen Schrankenfunktion. Es konnte gezeigt werden, dass dabei der Änderung der zytosolischen Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) eine wesentliche Rolle zukommt (Noll 1995).

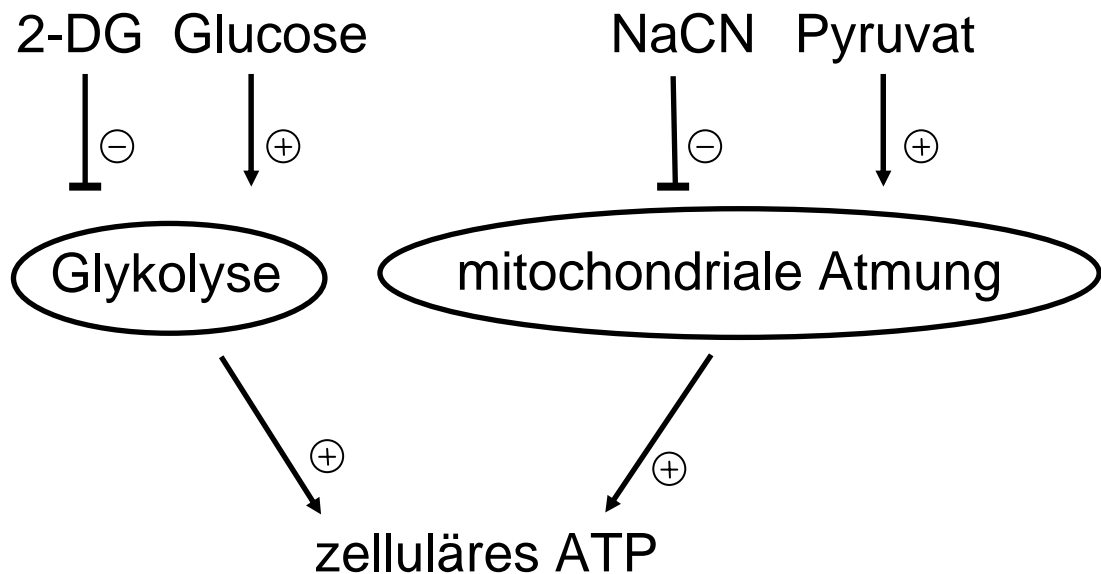


Abbildung 1.1. Die zwei Wege der ATP-Bereitstellung in Endothelzellen und Substanzen, die diese beeinflussen können. Die Glykolyse kann durch 2-Desoxyglucose (2-DG) gehemmt und durch Glucose gesteigert werden. Die mitochondriale Atmung kann durch Natriumcyanid (NaCN) gehemmt und durch Pyruvat gesteigert werden.

1.3 Die Rolle des zytosolischen Calciums für die endotheliale Schrankenfunktion

Die Homöostase der zytosolischen freien Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) wird in Endothelzellen, wie auch in allen anderen Zellen aktiv in engen Grenzen gehalten. Durch mechanische Kräfte z.B. Schubspannung (Ando, 1988; Shen, 1992), aber auch durch verschiedene Mediatoren steigt die $[Ca^{2+}]_i$ an (Carson, 1989; Garcia, 1995; Jaffe, 1987). Diese wird durch den Inositoltrisphosphat-sensitiven Calcium-Freisetzungsmechanismus des Endoplasmatischen Retikulums (ER) vermittelt. Die

Rückkehr zur basalen $[Ca^{2+}]_i$ erreicht die Endothelzelle durch die ATP-abhängige Ca^{2+} -Rückspeicherung ins ER und den Auswärtstransport über die Plasmamembran. Unter pathophysiologischen Bedingungen wie z.B. Hypoxie bzw. Ischämie könnte sich aufgrund des Energieverlusts ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ entwickeln (Arnould, 1992). Dieser triggert eine Reihe von Zellfunktionen: (i) Die parazelluläre Permeabilität wird u.a. durch die Calcium-abhängige Aktivierung des kontraktilen Apparats der Endothelzellen gesteigert (Curry, 1992). (ii) Es kommt zur Desorganisation des Cytoskeletts und der Zell-Zell-Kontakte, welches ebenfalls die parazelluläre Permeabilität erhöht (Kuhne, 1993; Muhs, 1997). (iii) Ferner wird die Syntheserate vasoaktiver Autakoide, wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO), Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF), Prostazyklin (PGI_2) und Endothelin (ET-1) erhöht (Busse, 1993; Furchgott, 1992; Newby, 1990).

Anders als z.B. Kardiomyozyten (Ladilov, 1997) reagieren Endothelzellen äußerst rasch auf Energieverlust mit einem biphasischen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (Noll, 1995). Dieselben Untersuchungen zeigen, dass der Ca^{2+} -Anstieg primär aufgrund einer endogenen Entspeicherung beruht und dass sich daran ein langsamer Calciumeinstrom über die Plasmamembran anschließt. Die Störung der Ca^{2+} -Homöostase und deren Folgen für die endotheliale Schrankenfunktion sind dabei zunächst vollständig reversibel. Unklar ist der Mechanismus der endogenen Ca^{2+} -Freisetzung. Wie bereits erwähnt könnte sie einerseits auf einer Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER beruhen. Hierbei könnten die Inositoltriphosphat- (IP_3) und/oder Ryanodin-abhängige Ca^{2+} -Kanäle des ER eine Rolle spielen. Ferner könnte der Ca^{2+} -Anstieg auch durch eine verminderte Aufnahme in das ER verursacht werden. Die Hemmung der Ca^{2+} -ATPasen des ER wäre in diesem Fall für die Wirkung verantwortlich. Die intrazellulären Verhältnisse an der Membran des ER sind schematisch in der Abbildung 1.2 wiedergegeben.

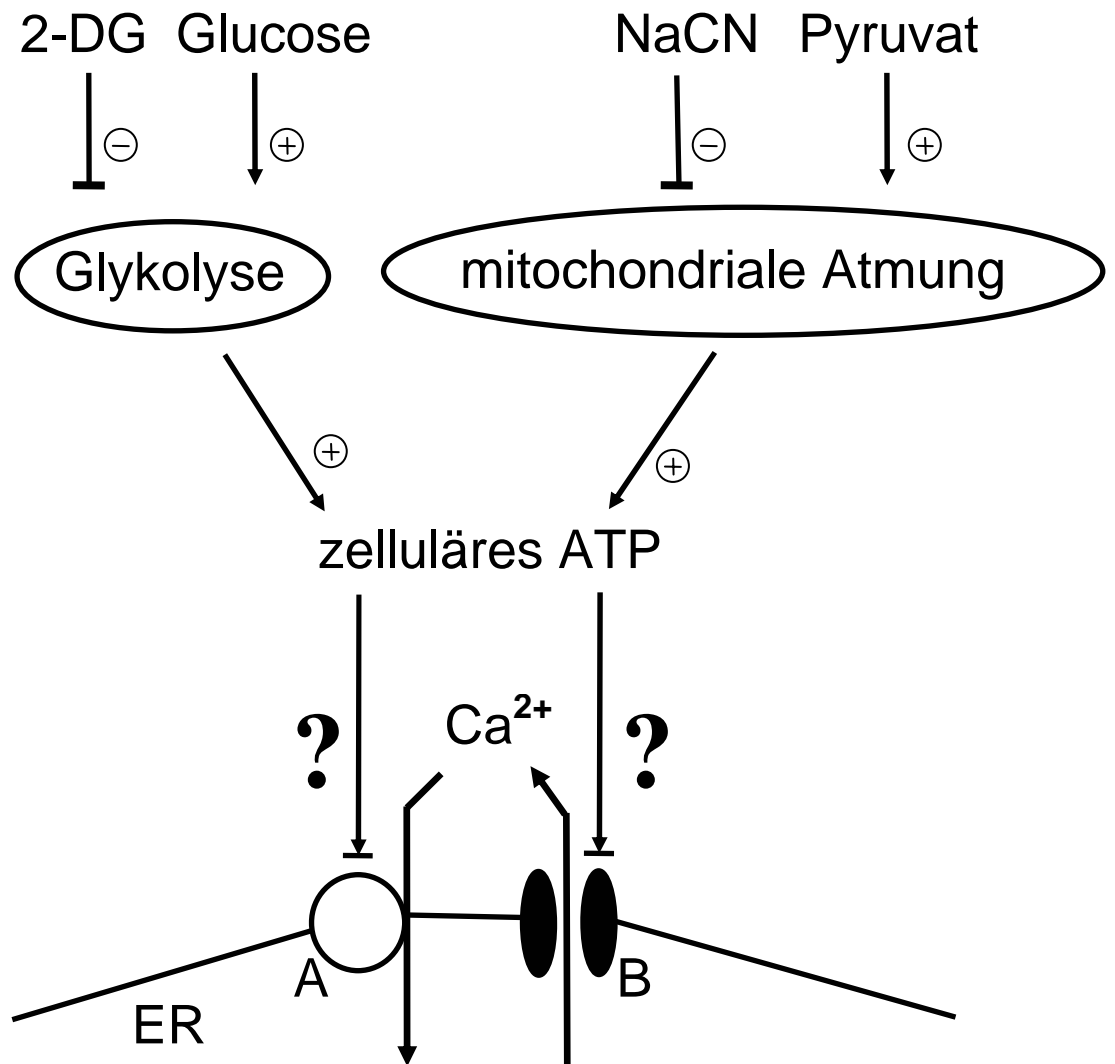


Abbildung 1.2. Möglicher Einfluss von ATP auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Endothelzellen. Der genaue Mechanismus, über den eine ATP-Abnahme die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration erhöht, ist bisher unklar. In ihren Kapazitäten gedrosselte Ca^{2+} -ATPasen (A) des Endoplasmatischen Retikulums (ER) könnten dafür verantwortlich sein, dass die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration steigt. Ebenso könnten aber auch IP_3 -abhängige Ca^{2+} -Kanäle (B) des ER eine Rolle spielen, indem sie sich öffnen und Ca^{2+} aus dem ER ins Zytosol austreten kann.

1.4 Ziele der Arbeit

Der Mechanismus, der bei metabolischer Inhibition die plötzliche initiale Ca^{2+} -Freisetzung aus den endogenen Speichern der Endothelzelle hervorruft, ist nur teilweise verstanden. Im Hinblick auf seine pathophysiologische Bedeutung besteht großes Interesse, ihn näher zu charakterisieren. In der vorliegenden Arbeit wird dieser Mechanismus der endogenen Calciumfreisetzung analysiert. Im Einzelnen wurden folgende Fragen geklärt:

1. Besteht generell ein Zusammenhang zwischen dem zellulären ATP-Gehalt und dem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration? Beruht die Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration auf einer Entleerung endogener Speichern oder gelangt das Ca^{2+} über die Plasmamembran ins Zytosol der Zelle?
2. Lösen die Hemmung von glykolytischer und/oder mitochondrialer ATP-Bereitstellung quantitative unterschiedliche Effekte auf den zellulären ATP-Gehalt aus? Wie wirkt sich die alleinige Hemmung von glykolytischer oder mitochondrialer ATP-Bereitstellung auf die zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration aus?
3. Sind die metabolischen Effekte auf die Ca^{2+} -Homöostase durch die Zellkulturbedingung verursacht?
4. Beruht der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf einer Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum. Wenn ja, über welchen Freisetzungsmechanismus erfolgt die Entspeicherung des Endoplasmatischen Retikulums?

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an frisch isolierten (nicht passagierten) und an kultivierten (1. Passage) aortalen Schweineendothelzellen durchgeführt. Dabei wurde die glykolytische ATP-Synthese durch 2-Desoxy-D-glycose (2-DG) und die mitochondriale ATP-Produktion durch Natriumcyanid (NaCN) gehemmt.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

Chemikalien und Seren

Im Folgenden werden die verwendeten Stoffe und Substanzen mit ihrer jeweiligen Bezugsquelle bzw. Lieferfirma aufgeführt. Alle benutzten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad, bester verfügbarer Qualität und wurden nach den Herstellerangaben aufbewahrt und gelöst.

ATP, HEPES und Pyruvat	Boehringer GmbH Mannheim, Deutschland
2-DG und DMSO	Sigma-Aldrich Deisenhofen, Deutschland
Ionomycin und Xestospongin C	Calbiochem Bad Soden, Deutschland
Fura 2 AM	Molecular Probes Eugene OR, USA
Kaliumdihydrogenphosphat und Tetrabutylammoniumhydrogensulfat	Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz
NaOH und Phenolrot	Roth GmbH & Co. Karlsruhe, Deutschland
NCS, Penicillin-Streptomycin, M 199 und Trypsin-EDTA	GIBCO Life Technologies Eggenstein, Deutschland

Acetonitril, Glucose, NaCN, Perchloroessigsäure und alle anderen verwendeten Chemikalien wurde von der Firma Merck Darmstadt, Deutschland bezogen.

Puffer und Kulturmedien

Das in den Experimenten dieser Arbeit eingesetzte NCS wurde vor Zusatz in Kulturmedien und Inkubationsmedien 10 min bei 60° C hitzeinaktiviert. Das verwendete CaCl₂ wurde kurz vor Gebrauch dem HEPES-Puffer hinzugefügt.

Primärmedium:

M 199 mit Earles Salz,
20 % (v/v) Neugeborenen Kälberserum
250 IU/ml Penicillin,
250 µg/ml Streptomycin,

Kulturmedium:

M 199 mit Earles Salz,
20 % (v/v) Neugeborenen Kälberserum,
100 IU/ml Penicillin,
100 µg/ml Streptomycin,

HEPES-Puffer (pH 7,4; sterilfiltriert):

125 mM NaCl,
2,6 mM KCl,
1,2 mM MgSO₄,
1,2 mM KH₂PO₄,
25 mM HEPES
1 mM CaCl₂

calciumfreier HEPES-EDTA-Puffer (pH 7,4; sterilfiltriert):

125 mM NaCl,
2,6 mM KCl,
1,2 mM MgSO₄,
1,2 mM KH₂PO₄,
25 mM HEPES,
1 mM EDTA

Beladungsmedium:

M 199 mit Earles Salz,
5 % (v/v) Neugeborenen Kälberserum
2,5 µm Fura 2 AM
< 0,1% (v/v) DMSO

Inkubationsmedium:

HEPES-Puffer s.o.,
2 % (v/v) Neugeborenen Kälberserum

Geräte

Brutschrank: Cytoperm Heraeus Hanau, Deutschland
ELISA-Reader: Typ Mr 7000 Dynatech Guernsey Chanel Is., UK

HPLC System: Merck Darmstadt, Deutschland
 Steuereinheit: L-5000 LC Controller
 Probengeber: AS-4000 Intelligent Auto Sampler
 Pumpe: 655 A-11 Liquid Chromatograph
 Detektor: 655 A Variable Wavelength UV Monitor
 Integrator: D-2500 Chromato-Integrator
 Trennsäule: Hibar Li Chro Chart

Imaging-System:
 Fluoreszenzmikroskop: IX 70 Olympus Hamburg, Deutschland
 Kamera: U-CMT Olympus Hamburg, Deutschland
 Interface: ITC-16 Instrutech Long Island NY, USA
 Computer: PC IBM kompatibel
 Software: Tillvision V3.3 T.I.L.L. Photonic Martinsried,
 Deutschland

Kultur-Einwegartikel:
 Petri-Schalen: Typ Falcon 3001-4 Bacton & Dickinson
 Heidelberg, Deutschland
 Suspensionsgefäße: Typ „Blue Max“ Falcon 2030 Bacton &
 Dickinson Heidelberg, Deutschland
 Mikrotiterplatten: Typ Falcon 3910 Bacton & Dickinson
 Heidelberg, Deutschland

Lichtmikroskop: TMS-F Nikon Tokio, Japan

pH-Meter:	WTW Weilheim i. OB., Deutschland
Proben- und Schalentemperatur:	Dri-Block Techne Cambridge, UK
Scheibenfilter:	Disc Filter HA (d = 0,45 µm) Millipore Bedford, USA
Sterilbank:	Lamin Air HBB 2472 Heraeus Hanau, Deutschland
Vakuumpumpe:	VAC 30 Heraeus Hanau, Deutschland
Wasserdemineralisationssystem:	Milli-Q UF Plus Millipore Bedford, USA
Zentrifugen:	Biofuge 13, 15 R, Megafuge 2.0 Heraeus Hanau, Deutschland

2.2 Zellkultur makrovaskulärer Endothelzellen

Alle Arbeitsschritte zur Zellkultivierung wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

Die Isolierung und Kultur makrovaskulärer aortaler Endothelzellen des Schweins erfolgten nach einer bereits etablierten Methode (Piper, 1990). Die Pars descendens der Aorta des Schweins wurde unmittelbar nach dem Schlachten der Tiere im Schlachthof entnommen und in 0,9 prozentiger NaCl-Lösung zum Labor transportiert. Dort wurde das noch verbliebene Bindegewebe entfernt. Die einzelnen Aorten wurden in Längsrichtung aufgeschnitten und unter leichter Spannung auf einer Unterlage fixiert. Nach zweimaligem Spülen mit NaCl-Lösung (0,9 %) wurden die Endothelzellen mit Hilfe eines sterilen Skalpell von der Gefäßinnenfläche vorsichtig abgeschabt und in Medium 199 überführt. Die Zellsuspension wurde anschließend für 10 min bei 150 g zentrifugiert. Danach wurden die sedimentierten Zellen anschließend im Primärmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nach vorsichtigem Mischen in einer Zelldichte von 10^6 Zellen pro 100-mm-Petri-Schale ausplattiert und im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach zwei Tagen wurde das Primärmedium durch ein Kulturmedium ersetzt. Im weiteren Verlauf wurde das Kulturmedium zur Nahrung der Zellen alle zwei Tage gewechselt. Nach etwa fünf bis sieben Tagen formierten sich die Endothelzellen zu konfluenten Monolayern und konnten dann im weiteren passagiert und subkultiviert werden. Dazu wurde das Kulturmedium kurzfristig abgesaugt und die Kulturen wurden zweimal mit HEPES-

EDTA-Puffer gewaschen. Mit 5 ml Trysin-EDTA-Lösung wurden die Zellen für 10 min bei 37° C im CO₂-freien Brutschrank inkubiert, was zur Vereinzelung und Ablösung der Zellen führte. Um die Zellvereinzelung zusätzlich zu verbessern, wurde die Zellsuspension mehrfach mit einer sterilen Pipette auf- und abpipettiert. Die Trypsinisierung wurde mit der Zugabe von etwa 20 ml Kulturmedium gestoppt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Je nach experimentellem Ansatz wurden die Endothelzellen entweder auf sterilen Glasplättchen (Durchmesser 25 mm), die sich in Petri-Schalen befanden, oder in den Petri-Schalen selbst (Falcon Nr. 3001) mit einer Dichte von 7×10^4 Zellen / cm² ausplattiert und für vier Tage kultiviert.

Diese konfluenten Zellschichten wurden anschließend bei den verschiedenen Experimenten eingesetzt. In einigen speziellen Experimenten wurden primäre adhärenzte (nicht passagierte) Endothelzellen für die Versuche verwendet.

2.3 Bestimmung des zellulären ATP-Gehalts

Der zelluläre ATP-Gehalt der Endothelzellen wurde mittels „High-Performance-Liquid-Chromatographie“ (HPLC) nach der Methode von Jüngling und Kammermeier (1980) bestimmt. Dazu wurden die Endothelzellen 45 min im Medium 199 (supplementiert mit 5% (v/v) NCS) bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden sie in 1 ml calciumhaltigen HEPES-Puffer analog zur beschriebenen Calcium-Messung (siehe: 2.4) bei einer Temperatur von 35° C inkubiert.

Alle folgenden hier beschriebenen Arbeitsschritte wurden bei einer Temperatur von 4° C durchgeführt. Nach Absaugen des Inkubationsmediums wurden die Endothelzellen mit 300 µl 0,6 M PCA versetzt. Anschließend wurden die Endothelzellen mit einem Gummispatel vom Schalenboden gelöst und in Eppendorf-Gefäße überführt. Die Proben wurden bei 13000 g für eine min zentrifugiert. Das Sediment wurde für die Proteinbestimmung (siehe 2.5) verwahrt. Der Überstand wurde in eisgekühlte Eppendorf-Gefäße überführt und mit 3 µl alkalischer Phenolrotlösung (0,5% [w/v] Phenolrot, alkalisiert durch 3 N KOH) versetzt. Mit Hilfe des Phenolrots (Farbumschlag von farblos über gelb nach blassorange-rosa) wurden die Proben unter Mischen im Vortex mit 2 M K₂CO₃-Lösung bis zum Farbumschlag neutralisiert. Anschließend wurden die Proben bei 13000 g für 1,5 min zentrifugiert und der

Überstand für die ATP-Bestimmung in die dafür vorgesehenen Probengefäße der HPLC überführt.

Die Trennung von ATP, ADP und AMP erfolgte mittels „reversed phase“ Flüssigkeitschromatographie. Das Ionenpaar-Reagenz bestand aus 11,3 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAS) und 61 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) in Phosphatpuffer (pH 5,8). Als unpolares Eluationsmedium wurde Acetonitril in einem linearen Gradienten von 8 – 30 % verwendet. Die ATP-Konzentration im Eluat wurde mit einem UV-Durchflussphotometer bei einer Wellenlänge von 254 nm bestimmt. Als ATP-Standard dienten Lösungen definierter ATP-Konzentration. Die ATP-Mengen wurden auf das Gesamtprotein der Zellen bezogen. Dabei entspricht 100% einem ATP-Gehalt von $17,6 \pm 1,1$ nmol/mg Protein. Angegeben ist der ATP-Gehalt in % bezogen auf die Kontrolle.

2.4 Bestimmung der zytosolischen Calciumkonzentration

Die zytosolische freie Calciumionenkonzentration wurde mit Hilfe des Ca^{2+} -Indikators Fura 2 fluoreszenzphotometrisch bestimmt.

Konfluente endotheliale Monolayer, die auf runden Glasplättchen (Durchmesser 25 mm) kultiviert worden waren, wurden in Dunkelheit für 45 min bei 20° C (im Medium 199 plus 5 % (v/v) hitzeinaktiviertem Neugeborenen Kälberserum) mit 2,5 μM des zellpermeablen Acetoxymethylesters von Fura 2 (Fura 2 AM) beladen. Um anschließend die Hydrolyse zu ermöglichen, wurden nach einem Auswaschschritt die Zellen für 20 min bei 35° C in substratfreiem HEPES-Puffer mit 2 % (v/v) hitzeinaktiviertem Neugeborenen Kälberserum vor Beginn der Messung belassen. Anschließend wurden die Glasplättchen mit der auf ihnen befindlichen Monolayer in eine temperaturkontrollierte Inkubationskammer überführt. Diese wurde dann auf dem Kreuztisch eines Fluoreszenzmikroskops (Typ: IX 70 Olympus Hamburg) fixiert. Während des Versuchs bestand das Inkubationsmedium ebenfalls aus substratfreiem HEPES-Puffer mit 2 % NCS.

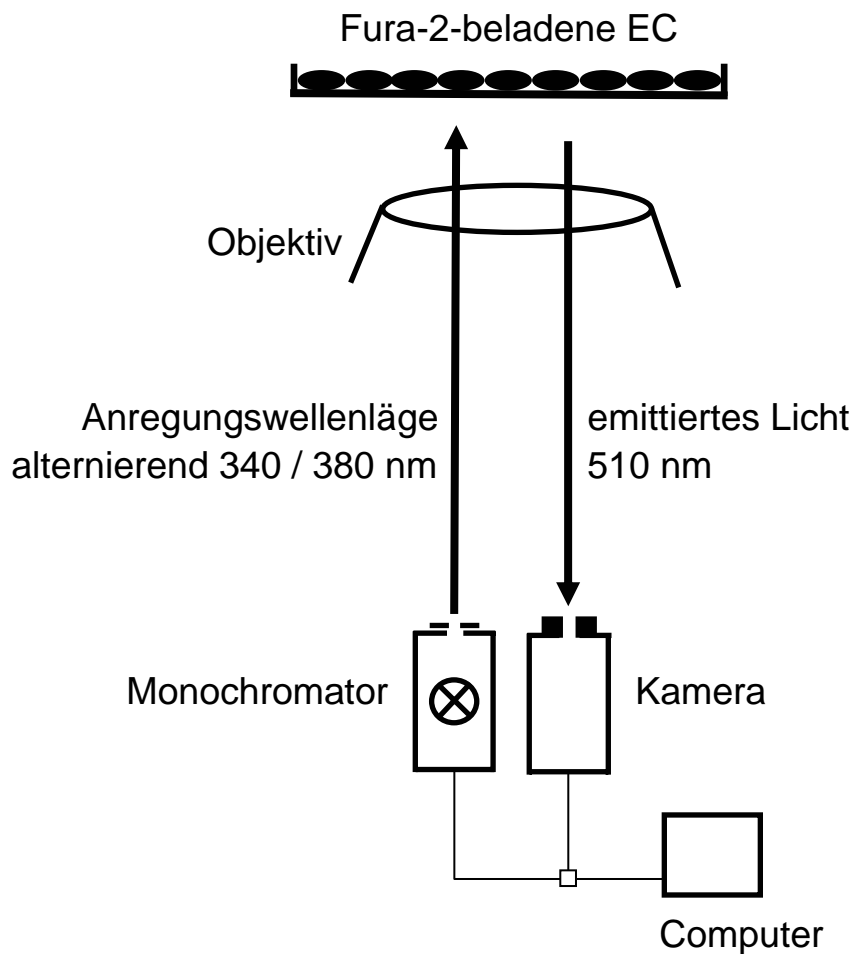


Abbildung 2.1. Schematische Darstellung der Ca^{2+} -Messung. Der Monochromator erzeugt abwechselnd monochromatisches Licht der Wellenlänge 340 und 380 nm. Dieses Anregungslicht trifft auf die mit Fura 2 beladenen Endothelzellen (EC). Für jedes Anregungszeitintervall wird emittiertes Licht der Wellenlänge 510 nm detektiert. Aus diesen zwei Werten wird das Verhältnis (Ratio) gebildet, welches proportional zur $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist.

Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde unter Verwendung des „Till Photonic Imaging-System“ (T.I.L.L. Photonic GmbH Martinsried, Deutschland) analysiert. Die Anregungswellenlänge alternierte zwischen 340 und 380 nm (Bandbreite 2 nm). Das emittierte Licht wurde bei 510 nm (Bandbreite 5 nm) detektiert und durch Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz korrigiert. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 2.1 schematisch dargestellt. Die Fluoreszenzintensität beider Anregungswellenlängen wurde in 6-Sekunden-Intervallen gemessen. Für die Experimente wurde diese über eine Minute

gemittelt. Die Fluoreszenz wurde in Anlehnung an die von Grynkiewicz beschriebene Methode kalibriert (Grynkiewicz, 1985). Zur Bestimmung des Fluoreszenzmaximums (R_{\max}) wurden die Endothelzellen in Gegenwart von 3 mM Ca^{2+} und einem Ionophor (5 μM Ionomycin), der die Zellmembran für Calciumione durchlässig macht, inkubiert. Um das Minimum (R_{\min}) der Fluoreszenz zu ermitteln, wurden die Zellen in Gegenwart von 5 mM EGTA inkubiert. Die zytosolisch freie Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) wurde wie folgt berechnet:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D \times \beta \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

K_D bedeutet hier die Dissoziationskonstante von Fura 2, β ist das Verhältnis der Fluoreszenzen bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm Ionomycin-behandelter Zellen in Gegenwart von 5 mM EGTA oder 3 mM Ca^{2+} (Li, 1987). Aufgrund der vergleichbaren Ergebnisse der kultivierten (1. Passage) und der frisch adhären (nicht passagierten) Endothelzellen wurde auf die Kalibrierung der zweit genannten Zellaufbereitung verzichtet. Die Fura-2-Fluoreszenzratio ist für diese Experimente angegeben.

2.5 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Dazu wurden die durch PCA gefällten Proteine in 2 ml 1 N NaOH plus 0,01% (w/v) Sodiumdodezylsulfat (SDS) bei 37° C gelöst. Anschließend wurden 5 μl der Lösung mit 200 μl des „Bradford-Reagenz“ (0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 5% (v/v) Ethanol und 10% (v/v) Phosphorsäure (85%ig)) gemischt. Danach wurde die Extinktion der Proteine bei 595 nm in einem ELISA-Reader bestimmt. Als Standard dienten Rinderserumalbuminlösungen definierter Proteinkonzentration (0,0 - 1,0 mg/ml).

2.6 Experimentelle Protokolle

Die Untersuchungen zur zytosolischen Calciumkonzentration und des zellulären ATP-Gehalts der Endothelzellen wurden unter identischen Inkubationsbedingungen durchgeführt. Während der Experimente wurden die Endothelzellen mit substratfreiem HEPES-Puffer inkubiert. Zur Hemmung der glykolytischen ATP-Synthese wurden die Endothelzellen in Gegenwart von 2-Desoxyglucose in Konzentrationen zwischen 2,5 – 10 mM inkubiert. Für die Hemmung der mitochondrialen Energiebereitstellung wurden die Zellen mit Natriumzyanid in Konzentrationen zwischen 1 – 5 mM inkubiert.

In einigen Experimenten wurden Endothelzellen für 20 min mit Pyruvat (5 mM) oder Glucose (10 mM) in Kontakt gebracht. Die anderen Substanzen wurden jeweils wie im Ergebnisteil angegeben eingesetzt. Die Stocklösungen von Ionomycin und Xestospongin C wurden in DMSO hergestellt. Die Volumina beider Stocklösungen wurden so in den Experimenten eingesetzt, dass die DMSO-Konzentration im Ansatz immer $< 0,1\%$ (vol/vol) war. Die gleichen Endkonzentrationen an DMSO wurden auch zu allen entsprechenden Kontrollexperimenten jeweils zur entsprechenden Zeit zugegeben. Die Stocklösungen aller anderen Substanzen wurden in substratfreiem HEPES-Puffer hergestellt. Entsprechende Volumina dieser Lösung wurden zu den Zellen gegeben. Die Kontrollen enthielten identische Mengen an substratfreiem HEPES-Puffer.

2.7 Statistische Methoden

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben und wurden aus wenigstens drei unabhängigen Zellpräparationen erhoben. Die statistische Analyse wurde mittels einseitiger ANOVA in Verbindung mit dem Student-Newman-Keuls-Test für post-hoc-Analysen durchgeführt. Bei den Gruppenanalysen wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ gewählt.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von 2-Desoxyglucose und Natriumzyanid auf den zellulären ATP-Gehalt und die zytosolische Calciumkonzentration

Um die Wirkung einer metabolischen Hemmung auf den zellulären ATP-Gehalt und die $[Ca^{2+}]_i$ der Endothelzellen zu untersuchen, wurde 2-Desoxyglucose (2-DG) plus Natriumzyanid (NaCN) in einer Konzentration von jeweils 5 mM eingesetzt.

Zunächst wurden die Endothelzellen unter einem Mikroskop im Nativbild und im Fluoreszenzbild untersucht. In Abb. 3.1 sind die einzelnen Endothelzellen mit ihren Zellgrenzen und -kernen innerhalb der Endothelzellenmonolayer im Fluoreszenzbild erkennbar. Nach gleichzeitiger Zugabe von 2-DG und NaCN jeweils in einer Konzentration von 5 mM zeigte sich im Zytosol eine Fluoreszenzzunahme, was auf eine $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung hindeutet. Ferner entfernten sich die Zellgrenzen voneinander, sodass interendotheliale Spalträume entstanden.

Der Untersuchungszeitraum umfasste 15 min. Unter basalen Bedingungen betrug der zelluläre ATP-Gehalt $17,6 \pm 1,1$ nmol/mg, hier gleich 100% gesetzt (Abb. 3.2). Nach Zugabe von 5 mM 2-DG + 5 mM NaCN nahm der zelluläre ATP-Gehalt stetig ab. Schon eine Minute nach Zugabe der Inhibitoren fiel der zelluläre ATP-Gehalt auf etwa 77 % und nach 15 min auf weniger als 25 % des Kontrollwertes. Die $[Ca^{2+}]_i$ der Endothelzellen betrug unter basalen Bedingungen $70,0 \pm 1,7$ nM. Die metabolischen Inhibitoren lösten wenige Sekunden nach Zugabe einen biphasischen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ aus, dabei stieg die endotheliale $[Ca^{2+}]_i$ steil an, erreichte nach drei Minuten ein Maximum, fiel wieder ab (initiale Phase), um nach 9 min erneut – nun aber stetig – über den gesamten verbleibenden Untersuchungszeitraum anzusteigen (sekundäre Phase).

Um zu überprüfen, ob der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg von einem Calciumeinstrom über die Plasmamembran ins Zytosol herrührt, oder ob es sich um eine endogene Calciumfreisetzung handelt, wurde das Experiment unter extrazellulär calciumfreien Bedingungen wiederholt. Unter diesen Bedingungen trat nach Zugabe der Inhibitoren der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg der initialen Phase auf. Der langsame, progrediente $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg der sekundären Phase blieb jedoch aus (Abb. 3.3).

Diese Daten zeigten, dass der initiale $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg unabhängig von der

extrazellulären $[Ca^{2+}]_o$ -Konzentration ist und daher vermutlich auf einer endogenen Ca^{2+} -Freisetzung beruht. Ferner machten diese Daten deutlich, dass der zweite, lang anhaltende Teil des biphasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs Folge eines Ca^{2+} -Einstroms über die Plasmamembran ist.

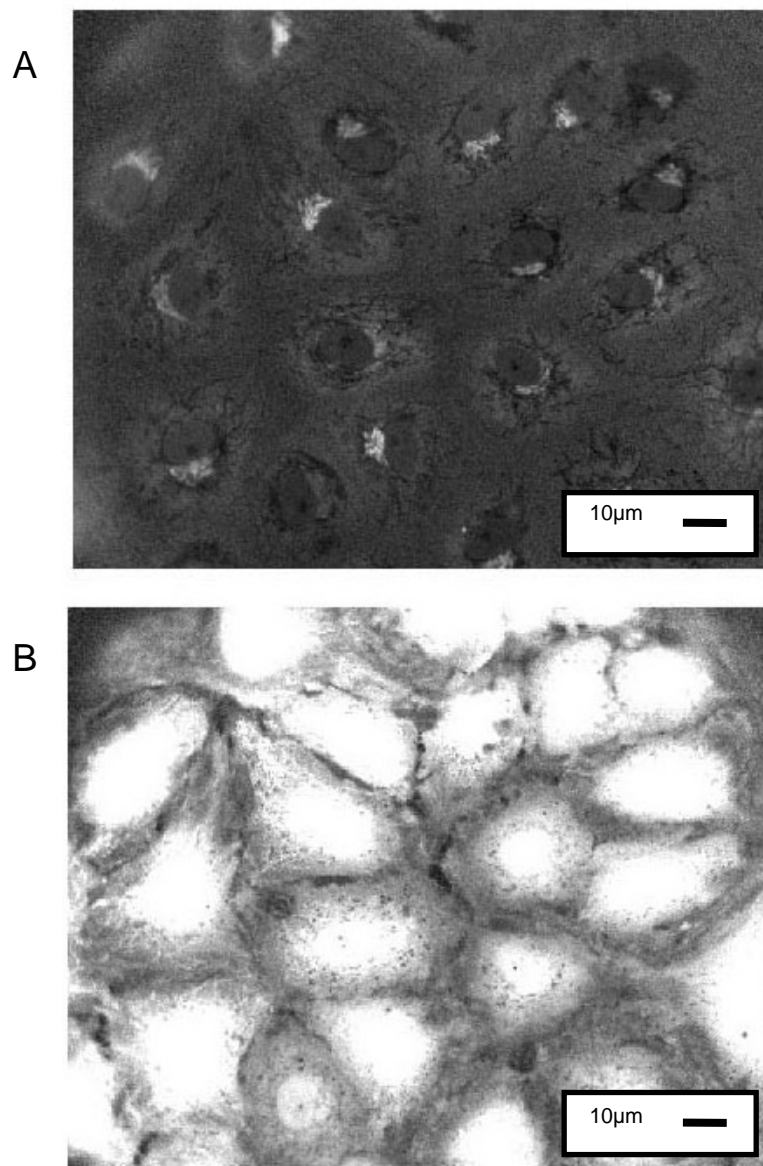


Abbildung 3.1. Fluoreszenzmikroskopisches Bild von Fura-2-beladenen Endothelzellen. Aus der Fura-2-Fluoreszenzratio generiertes Bild unmittelbar vor (A) und eine Minute nach (B) Zugabe von 5 mM 2-Desoxyglucose + 5 mM Natriumzyanid. Nach Zugabe der metabolischen Hemmstoffe stieg die Fura-2-Fluoreszenzratio an, was auf einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ hindeutet.

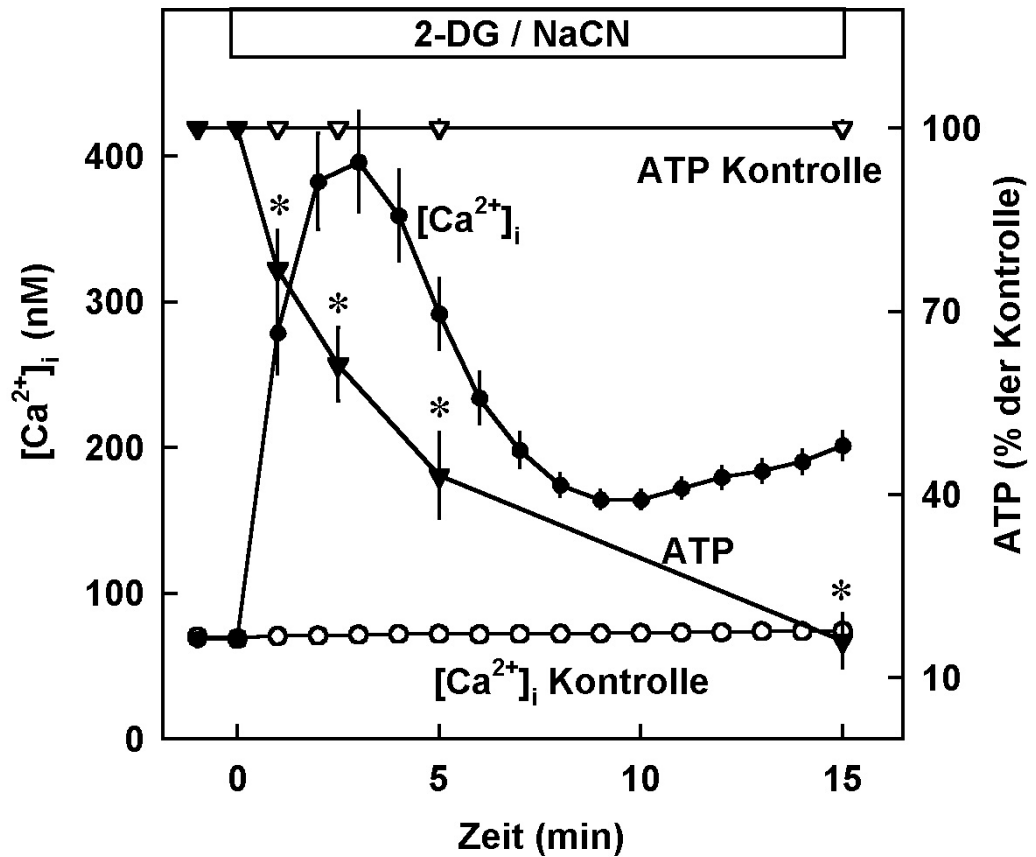


Abbildung 3.2. Wirkung von 2-Desoxyglucose und Natriumzyanid auf die $[Ca^{2+}]_i$ und auf das zelluläre ATP. Aortale Endothelzellen wurden in Gegenwart und Abwesenheit von 5 mM 2-Desoxyglucose (2-DG) + 5 mM Natriumzyanid (NaCN) inkubiert. Im Fall der $[Ca^{2+}]_i$ (—●— bzw. —○—) ist der Mittelwert \pm SD von $n = 60$ Zellen aus drei verschiedenen Zellpräparationen angegeben. * $p < 0.05$ vs. Kontrolle. Im Fall des ATP (—▼— bzw. —▲—) ist der MW \pm SD von $n = 6$ Experimenten aus drei verschiedenen Zellpräparationen in Prozent der Kontrolle angegeben. 100 % entspricht einem ATP-Gehalt von $17,6 \pm 1,1$ nmol/mg Protein. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. Im Fall der Kontrollen war SD teilweise kleiner als der Durchmesser der angegebenen Symbole.

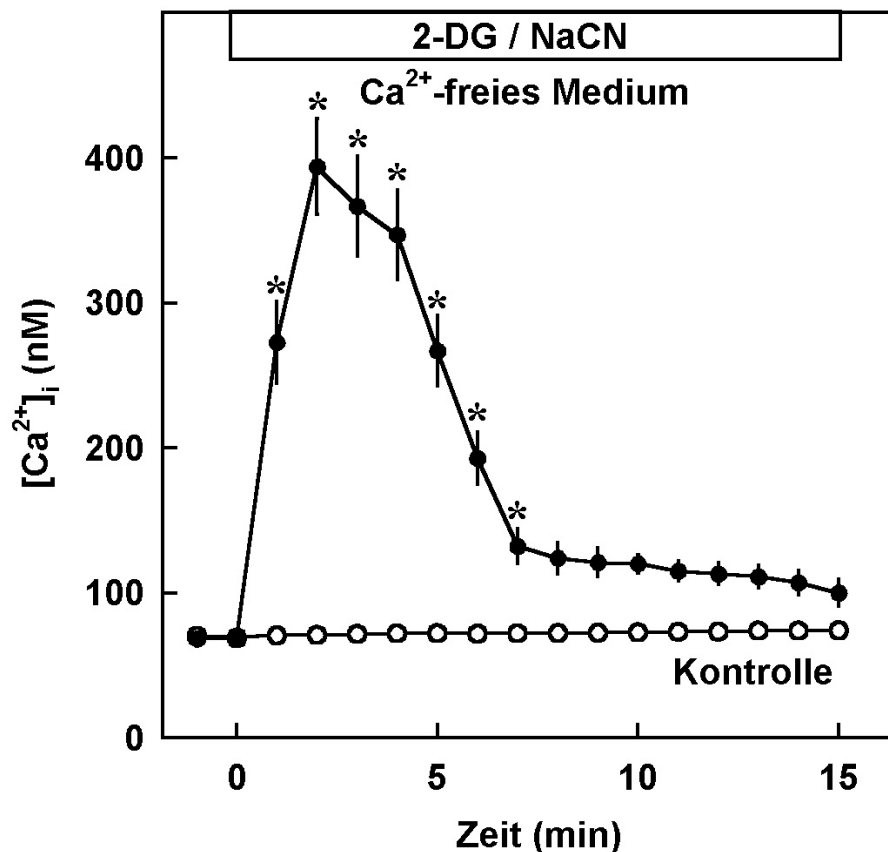


Abbildung 3.3. Wirkung von 2-Desoxyglucose und Natriumzyanid auf die $[Ca^{2+}]_i$ unter extrazellulären Ca^{2+} -freien Bedingungen. Aortale Endothelzellen wurden in Gegenwart (– ● –) und Abwesenheit (– ○ –) von 5 mM 2-Desoxyglucose (2-DG) und 5 mM Natriumzyanid (NaCN) inkubiert. Angegeben ist der MW \pm SD von n = 60 Zellen aus drei verschiedenen Zellpräparationen. *p < 0,05 vs. Kontrolle. Im Fall der Kontrolle war SD kleiner als der Durchmesser der angegebenen Symbole.

3.2 Einfluss von 2-Desoxyglucose und Natriumzyanid auf den zellulären ATP-Gehalt in Gegenwart und Abwesenheit von Pyruvat oder Glucose

Um den Einfluss der glykolytischen und der mitochondrialen ATP-Synthese zu bestimmen, wurde die alleinige Wirkung von 2-DG bzw. von NaCN auf den zellulären ATP-Gehalt untersucht.

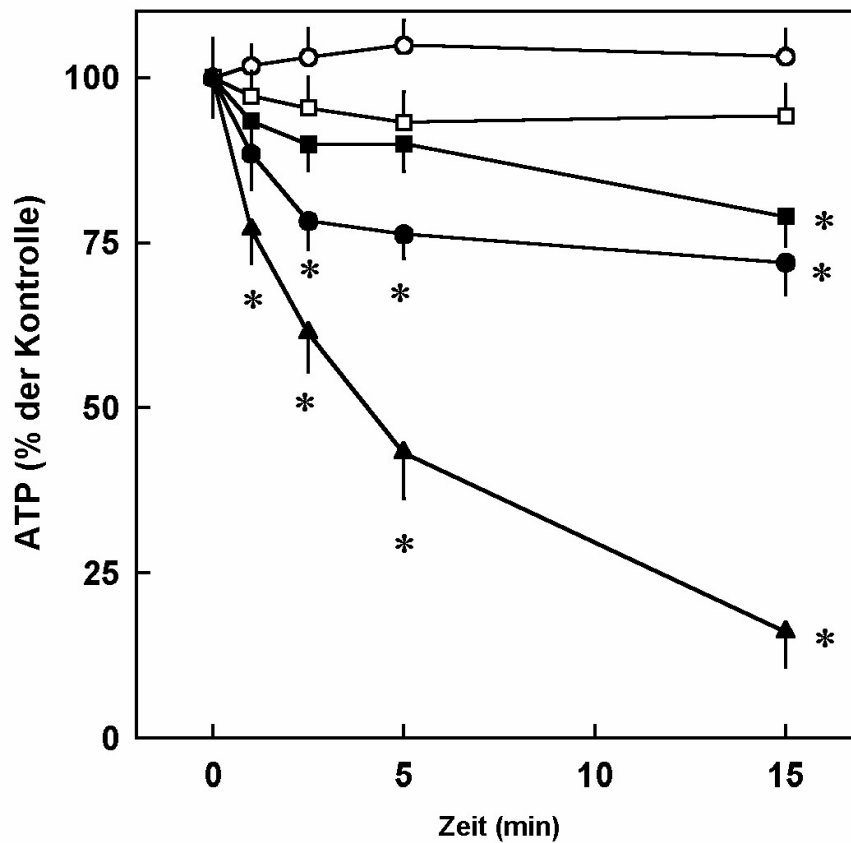


Abbildung 3.4. Wirkung von 2-Desoxyglucose und Natriumzyanid auf das zelluläre ATP in Gegenwart und Abwesenheit von Pyruvat und Glucose. Die Endothelzellen wurden mit 10 mM Desoxyglucose (2-DG) in Gegenwart (– ○ –) und Abwesenheit (– ● –) von 5 mM Pyruvat oder mit 5 mM Natriumzyanid (NaCN) in Gegenwart (– □ –) und Abwesenheit (– ■ –) von 10 mM Glucose inkubiert. Eine andere Gruppe von Endothelzellen wurde mit 5 mM 2-DG + 5 mM NaCN in Abwesenheit von Pyruvat und Glucose (– ▲ –) inkubiert. Angegeben ist der MW \pm SD von n = 6 Monolayern 3 verschiedener Zellpräparationen in Prozent der Kontrolle. 100 % entspricht einem ATP-Gehalt von $17,6 \pm 1,1$ nmol/mg Protein. *p < 0,05 vs. Kontrolle. Die Kontrolle (jeweils 100%) ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Ferner wurde in weiteren Experimenten analysiert, ob die Inhibition der Glykolyse (mittels 2-DG) im Hinblick auf ihren Beitrag zum zellulären ATP-Gehalt durch Pyruvat zu beeinflussen ist, oder ob die Inhibition der mitochondrialen ATP-Synthese (mittels NaCN) durch Glucose beeinflusst werden kann.

2-Desoxyglucose in Gegenwart und Abwesenheit von Pyruvat

Zunächst wurden die Endothelzellen in Gegenwart von 10 mM 2-DG inkubiert, daraufhin sank der endotheliale ATP-Gehalt in den ersten 2,5 min., im weiteren Verlauf fiel das ATP kaum weiter ab (Abb. 3.4). In einem zweiten Schritt wurde eine andere Gruppe von Endothelzellen für 20 min mit 5 mM Pyruvat vorinkubiert. Die anschließende Zugabe von 10 mM 2-DG führte zu keiner Absenkung des ATP über den gesamten Beobachtungszeitraum.

Natriumzyanid in Gegenwart und Abwesenheit von Glucose

Analog zu den oben beschriebenen Versuchen wurden hier in einem ersten Schritt die Zellen mit 5 mM NaCN inkubiert, daraufhin kam es in den ersten 5 min zu einer leichten aber nicht signifikanten Abnahme des zellulären ATP-Gehalts. Erst nach 15 min sank dieser signifikant auf 80% des Ausgangswertes (Abb. 3.4). In einem zweiten Schritt wurden andere Zellen für 20 min mit 10 mM Glucose vorinkubiert und danach mit 5 mM NaCN behandelt. Daraufhin zeigte sich kein signifikanter ATP-Verlust. Über den gesamten Beobachtungszeitraum blieb das ATP auf Werten von über 90% der Kontrolle.

2-Desoxyglucose + Natriumzyanid in Abwesenheit von Pyruvat und Glucose

Nach gleichzeitiger Zugabe von 2-DG und NaCN in einer Konzentration von jeweils 5 mM in Abwesenheit von Pyruvat und Glucose sank der zelluläre ATP-Gehalt der Endothelzellen schon nach einer Minute rasch und signifikant ab (Abb. 3.4). Am Ende der Messung war weniger als 25% der ATP-Kontrolle vorhanden.

3.3 Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von 2-Desoxyglucose auf die zytosolische Calciumkonzentration

Um den alleinigen Einfluss von 2-DG auf die $[Ca^{2+}]_i$ der Endothelzellen zu untersuchen, wurden die Endothelzellen mit 2-DG inkubiert. Die alleinige Zugabe zu den Endothelzellen bewirkte analog zu den Versuchen, bei denen 2-DG in Kombination mit NaCN gegeben wurde, einen biphasischen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 3.5).

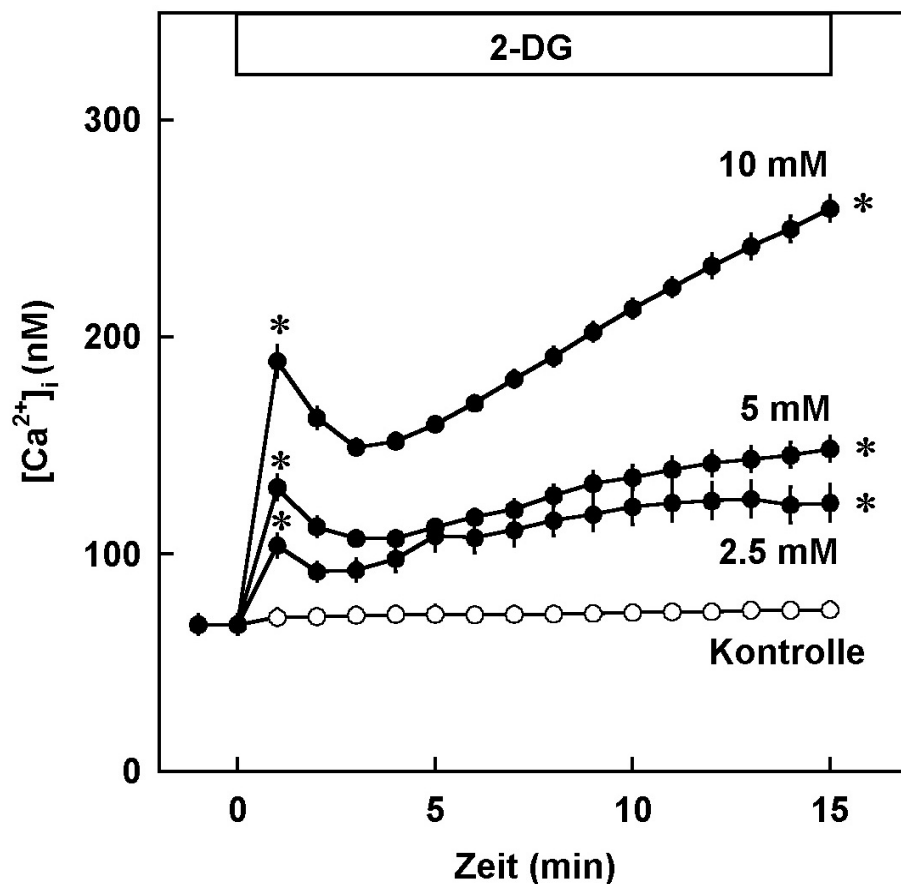


Abbildung 3.5. Dosis-Wirkungs-Beziehung von 2-Desoxyglucose auf die $[Ca^{2+}]_i$. Aortale Endothelzellen wurden in Gegenwart (– ● –) von 2,5; 5 und 10 mM und in Abwesenheit (– ○ –) von 2-Desoxyglucose (2-DG) inkubiert. Angegeben ist der MW \pm SD von n = 60 Zellen. *p < 0,05 vs. Kontrolle. Im Fall der Kontrolle war SD kleiner als der Durchmesser der angegebenen Symbole.

Der initiale Anstieg (1. Phase) zeigte sich hier nach wenigen Sekunden. Der transitorische Abfall und das sekundäre stetige Ansteigen (2. Phase) des Calciumsignals traten auch hier auf. 2-DG zeigte im Konzentrationsbereich 2,5 bis 10 mM eine positive Dosis-Wirkungs-Beziehung auf das $[Ca^{2+}]_i$ -Signal. Der Effekt von 10 mM 2-DG auf die $[Ca^{2+}]_i$ war durch weitere Dosiserhöhung nicht zu steigern, sodass alle weiteren Experimente mit der 2-DG-Konzentration von 10 mM durchgeführt wurden.

3.4 Einfluss von 2-Desoxyglucose auf die zytosolische Calciumkonzentration in Gegenwart und Abwesenheit von Pyruvat

Um den Einfluss von 2-Desoxyglucose in Gegenwart und Abwesenheit Pyruvat auf die $[Ca^{2+}]_i$ zu untersuchen, wurden die Endothelzellen zunächst mit von 10 mM 2-DG inkubiert. Draufhin zeigten sie (wie erwartet) einen biphasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. In einem zweiten Schritt wurde eine andere Gruppe von Endothelzellen mit 5 mM Pyruvat für 20 min vorinkubiert und anschließend 10 mM 2-DG zugegeben. Aus der Abbildung 3.6 geht hervor, dass Pyruvat den initialen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg induziert durch 2-DG nicht reduziert.

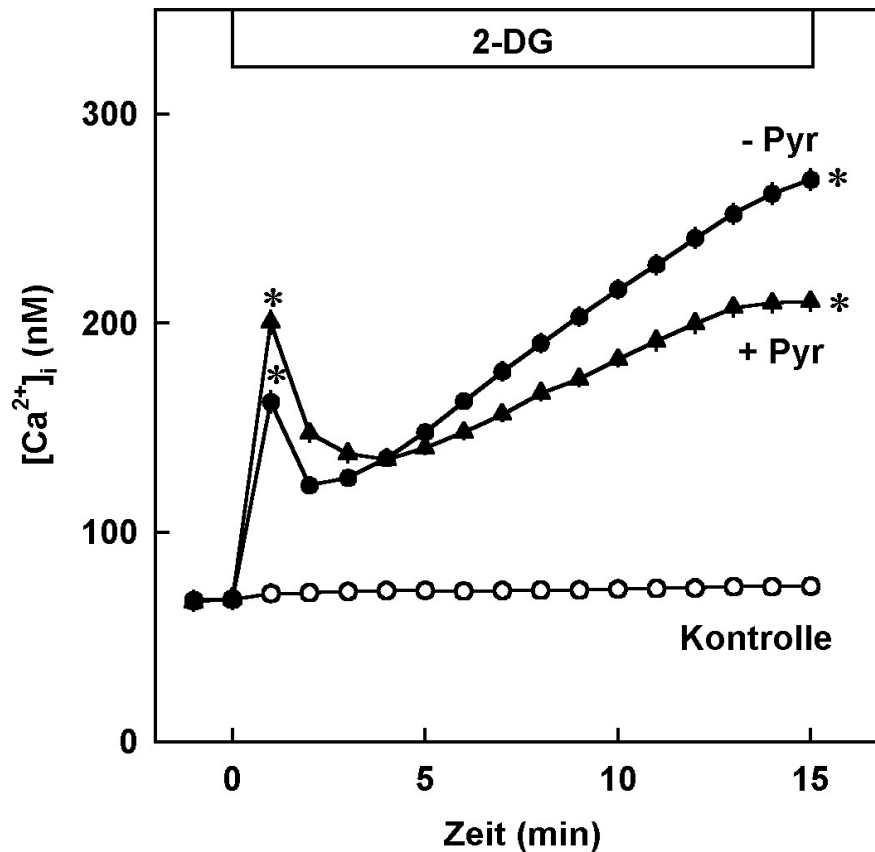


Abbildung 3.6. Wirkung von Pyruvat auf den 2-Desoxyglucose-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Aortale Endothelzellen wurden mit 10 mM 2-Desoxyglucose (2-DG) in Gegenwart (– ▲ –) und Abwesenheit (– ● –) von 5 mM Pyruvat inkubiert. Angegeben ist der MW \pm SD von n = 60 Zellen. *p < 0,05 vs. Kontrolle (– ○ –). Im Fall der Kontrolle war SD teilweise kleiner als der Durchmesser der angegebenen Symbole.

3.5 Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Natriumcyanid auf die zytosolische Calciumkonzentration

Auch die Zugabe von NaCN führte nach einer Minute zu einem biphasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg (Abb. 3.7), ähnlich wie er schon nach Zugabe von 2-DG beobachtet wurde (Abb. 3.5). Im Konzentrationsintervall von 1 mM bis 5 mM NaCN nahm das $[Ca^{2+}]_i$ -Signal zu. Eine weitere Steigerung der zugegebenen NaCN-Konzentration konnte keinen höheren Effekt auf die $[Ca^{2+}]_i$ bewirken. Aus diesem Grund wurden die weiteren Experimente mit einer Konzentration von 5 mM NaCN durchgeführt.

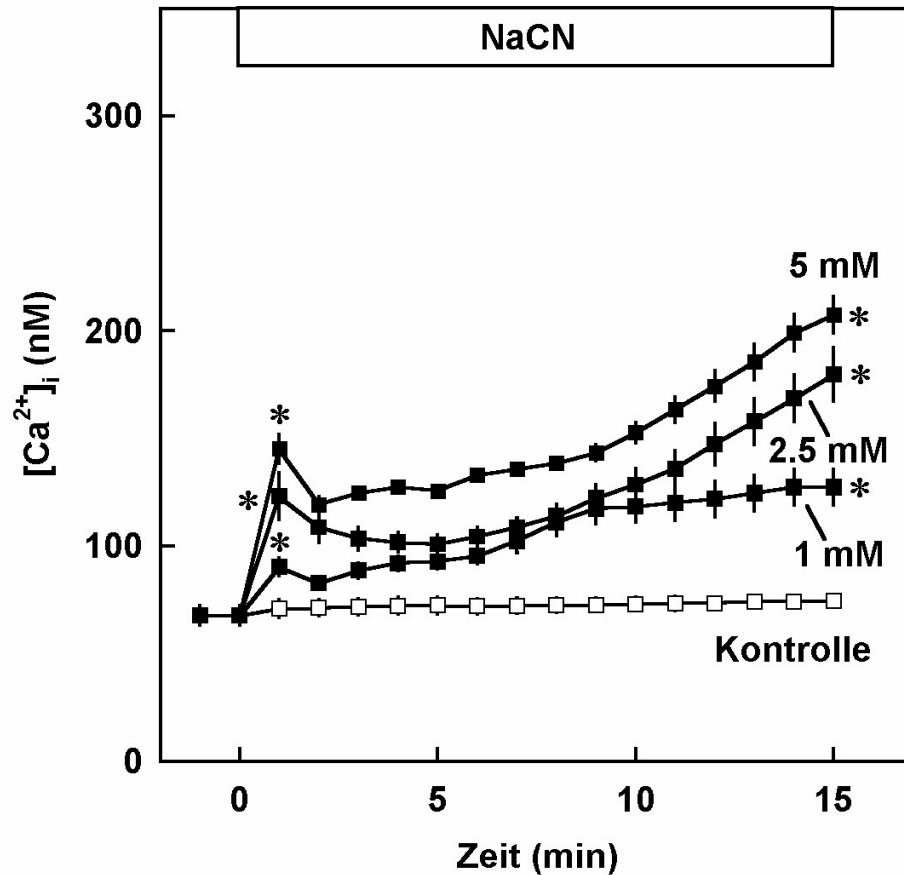


Abbildung 3.7. Dosis-Wirkungs-Beziehung von Natriumzyanid auf die $[Ca^{2+}]_i$. Aortale Endothelzellen wurden in Gegenwart (—■—) von 1; 2,5 und 5 mM und in Abwesenheit (—□—) von Natriumzyanid (NaCN) inkubiert. Angegeben ist der MW \pm SD von n = 60 Zellen. *p < 0,05 vs. Kontrolle. Im Fall der Kontrolle war SD teilweise kleiner als der Durchmesser der angegebenen Symbole.

3.6 Einfluss von Natriumzyanid auf die zytosolische Calciumkonzentration in Gegenwart und Abwesenheit von Glucose

Um den Einfluss von Natriumzyanid in Gegenwart und Abwesenheit von Glucose zu untersuchen, wurden Endothelzellen im schon bekannten experimentellen Ablauf zunächst in Gegenwart von 5 mM NaCN inkubiert. Daraufhin zeigten auch sie (wie erwartet) einen biphasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg (Abb. 3.8).

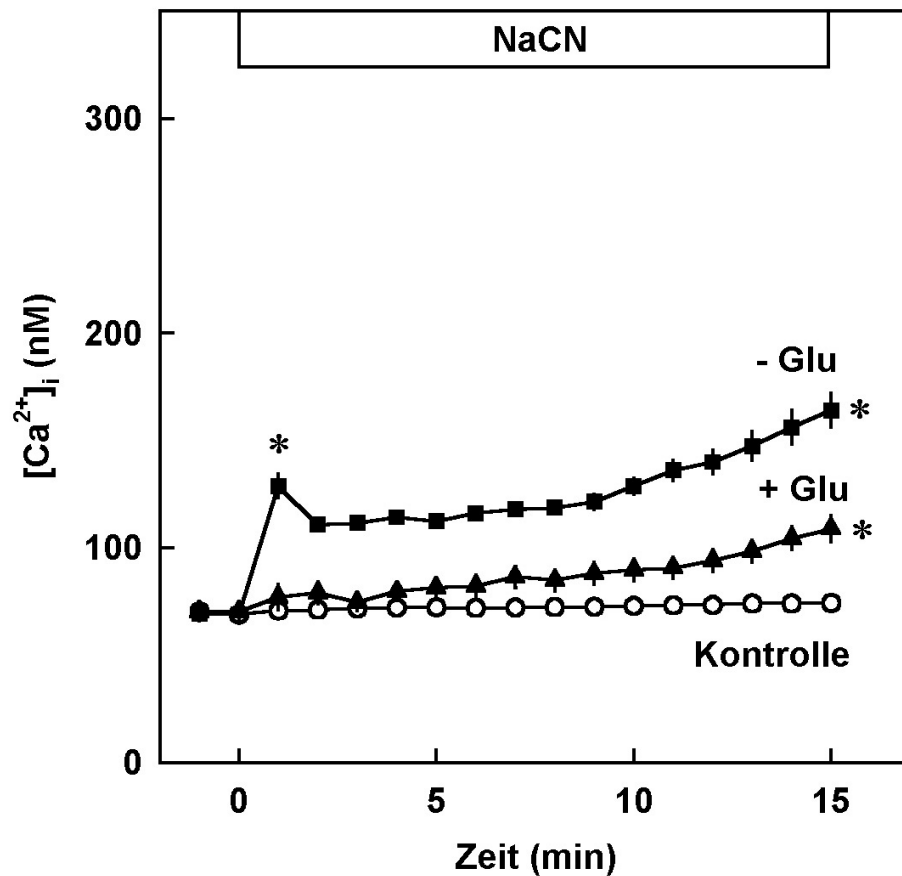


Abbildung 3.8. Wirkung von Glucose auf den Natriumzyanid-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Aortale Endothelzellen wurden mit 5 mM Natriumzyanid (NaCN) in Gegenwart (– ▲ –) und Abwesenheit (– ■ –) von 10 mM Glucose inkubiert. Angegeben ist der MW \pm SD von n = 60 Zellen in nM angegeben. *p < 0,05 vs. Kontrolle (– ● –). Im Fall der Kontrolle war SD kleiner als der Durchmesser der angegebenen Symbole.

In einem weiteren Schritt wurde eine andere Gruppe von Endothelzellen für 20 min mit 10 mM Glucose vorinkubiert. Danach wurden die Zellen mit 5 mM NaCN zur Hemmung der mitochondrialen ATP-Synthese behandelt. Nach Vorinkubation der Endothelzellen mit Glucose war der initiale, durch NaCN induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg nahezu vollständig unterbunden. Auch der sekundäre $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg wurde reduziert.

3.7 Metabolische Inhibition bei frisch isolierten aortalen Endothelzellen

Da bekannt ist, dass Zellen in Kultur neben Veränderung ihrer Morphologie auch Änderungen der funktionellen Eigenschaften zeigen, wurden einige Experimente, die bisher an kultivierten aortalen Endothelzellen durchgeführt wurden, an frisch isolierten aortalen Endothelzellen wiederholt. Dies geschah unter der Fragestellung, ob die Kultivierung und die damit möglicherweise verbundenen Veränderungen der Endothelzellen ihre Reaktionen auf metabolische Hemmung beeinflussen.

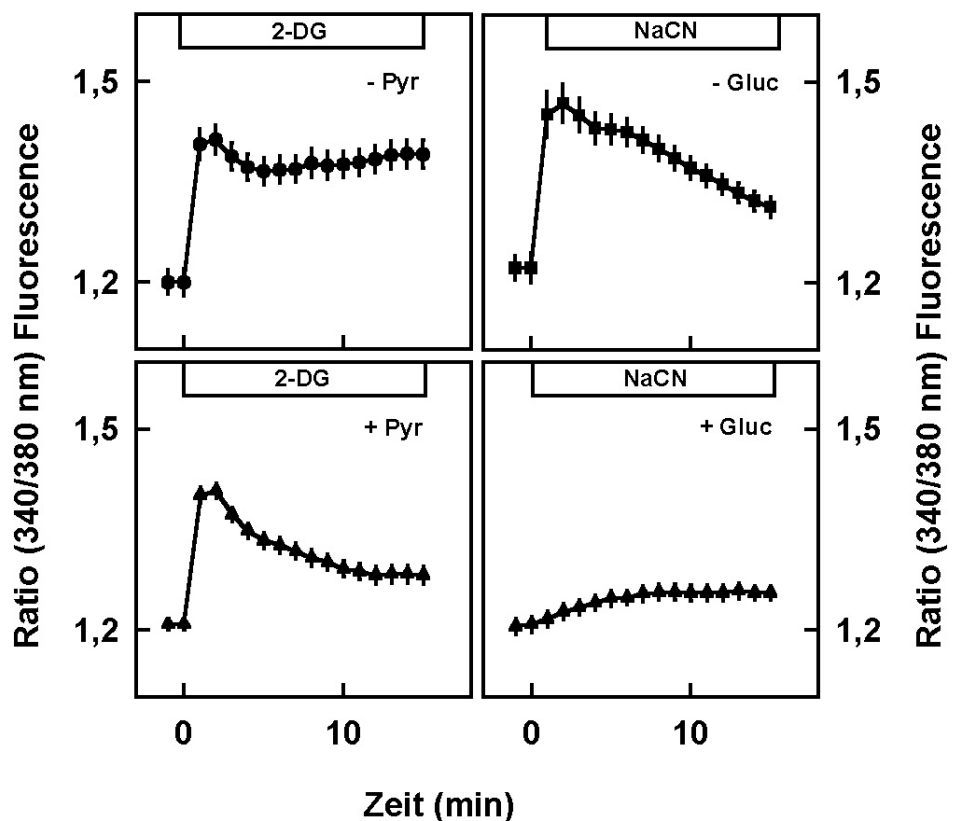


Abbildung 3.9. Wirkung von 2-Desoxyglucose und Natriumcyanid auf $[Ca^{2+}]_i$ in Gegenwart und Abwesenheit von Pyruvat und Glucose in frisch isolierten aortalen Endothelzellen. Die Zellen wurden mit 10 mM 2-DG in Gegenwart (links unten) und Abwesenheit (links oben) von 5 mM Pyruvat oder mit 5 mM NaCN in Gegenwart (rechts unten) und Abwesenheit (rechts oben) von 10 mM Glucose inkubiert. Angegeben sind die MW \pm SD des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses (340nm / 380nm) von n = 60 Zellen.

Die Änderung des zytosolischen freien Calciums, angezeigt durch das Fura-2-Fluoreszenzverhältnis, ist in Abb. 3.9 dargestellt. Die frisch isolierten Zellen wurden in identischen Versuchsprotokollen mit 10 mM 2-DG in Gegenwart und Abwesenheit von 5 mM Pyruvat und mit 5 mM NaCN in Gegenwart und Abwesenheit von 10 mM Glucose durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten in allen vier experimentellen Ansätzen qualitativ keine Unterschiede zu den Versuchen mit kultivierten Zellen der ersten Passage. Die metabolischen Inhibitoren 2-DG und NaCN bewirkten einen raschen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg, was sich in der rapiden Zunahme des Fura-2-Fluoreszenzverhältnisses zeigte. Dieser Anstieg konnte im Falle des 2-DG nicht durch Pyruvat unterdrückt werden. Mit Glucose gelang es, wie auch bei kultivierten Endothelzellen gezeigt, den durch NaCN hervorgerufenen Anstieg nahezu zu unterbinden.

3.8 Einfluss von Lithiumionen auf die 2-DG-induzierte Zunahme der zytosolischen Calciumkonzentration

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob Lithiumione, die den Inositol-Stoffwechsel hemmen (Berridge, 1993), in Endothelzellen einen durch 2-DG hervorgerufenen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg verhindern können. Dazu wurden Endothelzellen für 24 Stunden mit 10 mM Lithiumchlorid vorbehandelt. Die anschließende Zugabe von 2-DG zu diesen Zellen zeigte, dass der initiale $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg nahezu vollständig unterdrückt wurde (Abb. 3.10). Dies untermauerte die Annahme, dass es sich bei dem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ um einen IP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Freisetzungsmechanismus handeln könnte.

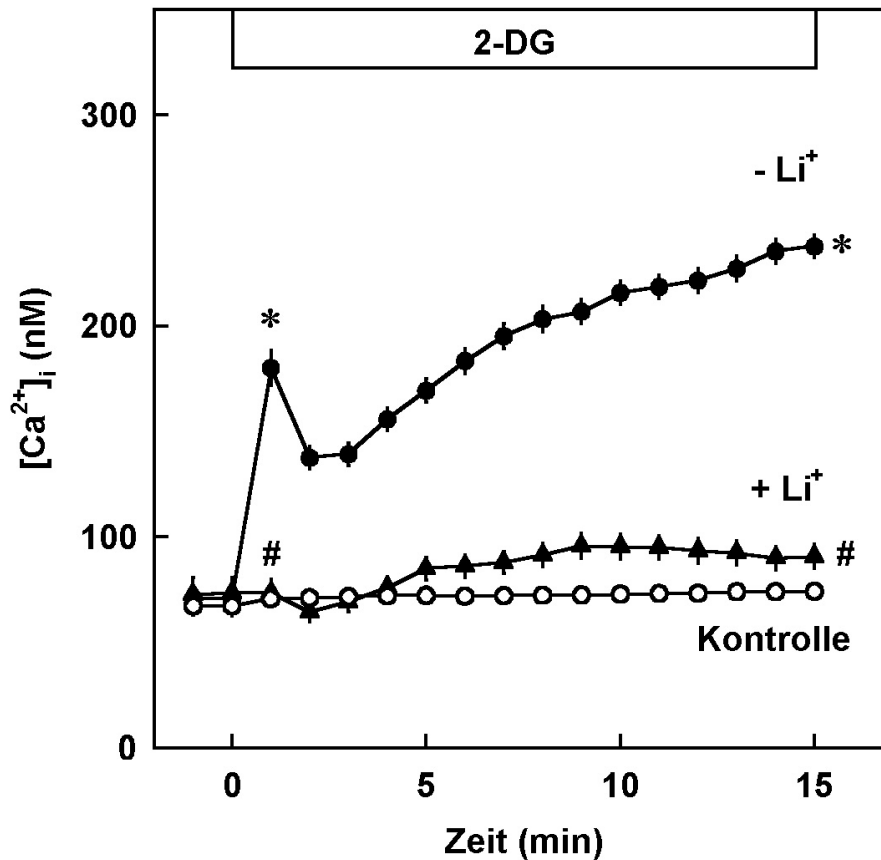


Abbildung 3.10. Wirkung von Lithiumionen auf den 2-Desoxyglucose-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Aortale Endothelzellen wurden in Abwesenheit ($- \bullet -$) und Gegenwart ($- \blacktriangle -$) von 10 mM Lithiumchlorid (Li^+) für 24 Stunden vorinkubiert, anschließend wurde 10 mM Desoxyglucose (2-DG) zugegeben. Die Zellen der Kontrolle ($- \circ -$) wurden ebenfalls für 24 h mit 10 mM Lithiumchlorid behandelt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD von $n = 60$ Zellen. $*p < 0,05$ vs. Kontrolle, $\#p < 0,05$ vs. 2-DG in Abwesenheit von Lithium. Im Fall der Kontrolle war SD kleiner als der Durchmesser der angegebenen Symbole.

3.9 Einfluss von Xestospongin C auf die 2-DG-induzierte Zunahme der zytosolischen Calciumkonzentration

Das Endoplasmatische Retikulum kann Ca^{2+} über IP_3 -abhängige Calciumkanäle ins Zytosol freisetzen. Es wurden aber auch Ryanodin-sensitive Calciumkanäle für die Membran des ER auf funktioneller Ebene beschrieben (Ziegelstein, 1994 a). Der durch 10 mM 2-DG induzierte Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konnte nicht durch Ryanodin gehemmt werden (25 μM Ryanodine + 10 mM 2-DG: 180 ± 7 nM; n=60 vs. 10 μM 2-DG allein: 185 ± 6 nM, $p > 0,05$). Xestospongin C (XeC) wurde als ein Hemmstoff des IP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Kanals beschrieben (Gafni, 1997). Es wurde zunächst überprüft, ob XeC auch in Endothelzellen auf die IP_3 -abhängige Ca^{2+} -Freisetzung wirkt. Kontrollexperimente zeigten, dass Xestospongin C (3 μM) einen durch extrazelluläres ATP induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg zu $94\% \pm 4\%$ (n=60) unterdrücken konnte (ATP als extrazellulärer Agonist bewirkt in Endothelzellen eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER). Anschließend wurde die Wirkung des Hemmstoffstoffes XeC auf die durch 2-DG-induzierte Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ untersucht. Deshalb wurden die Endothelzellen hier 20 min vor der Messung mit mit XeC in einer Konzentration von 0,3 μM bzw. 3 μM vorinkubiert und anschließend 10 mM 2-DG zugegeben. Die Abb. 3.11 zeigt, dass XeC die initiale Ca^{2+} -Freisetzung vollständig unterbinden konnte. Auch die sekundäre Phase des biphasischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs, welche durch einen Influx von außen in die Zelle begründet ist, konnte durch XeC mit ansteigender Dosis vermehrt unterdrückt werden. Deshalb wurde in einem anderen experimentellen Ansatz das Xestospongin C (3 μM) erst 3 min nach Zugabe des 2-DG (10 mM) zugegeben. Der Beobachtungszeitraum wurde für dieses Experiment auf 30 min ausgedehnt. Innerhalb dieser Zeit stieg die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Zugabe von 10 mM 2-DG von $67 \text{ nM} \pm 7$ auf 297 ± 20 nM an. Wurde Xestospongin C erst nach dem initialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Gipfel (1. Phase), d.h. nach 3 min zu den Endothelzellen gegeben, so erhöhte sich die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf 273 ± 11 nM ($p > 0,05$ vs. 2-DG ohne XeC; keine graphische Darstellung dieser Experimente). XeC beeinflusst die sekundäre Phase des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs unter diesen Bedingungen nicht.

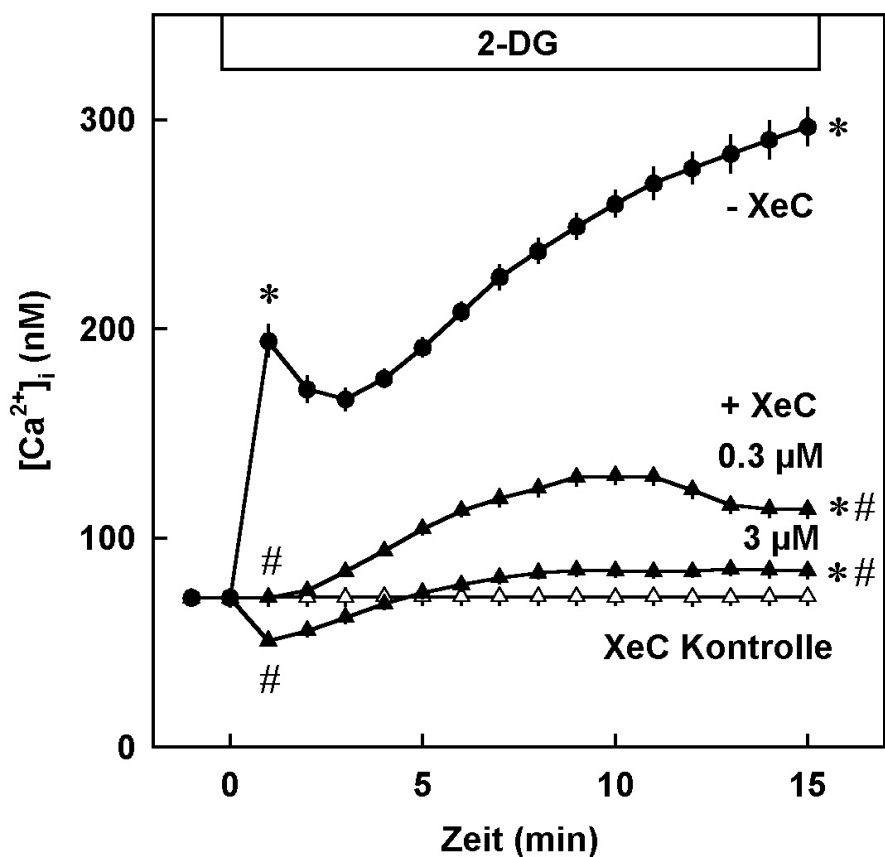


Abbildung 3.11. Wirkung von Xestospongin C auf den 2-Desoxyglucose-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Aortale Endothelzellen wurden mit 0,3 bzw. 3 μM Xestospongin C (XeC), einem Inhibitor des IP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Kanals 20 min vorinkubiert, anschließend wurde 10 mM 2-DG zugegeben (– \blacktriangle –). Eine Gruppe von Endothelzellen wurden nur mit dem Lösungsmittel (DMSO) 20 min vorinkubiert und anschließend 10 mM 2-Desoxyglucose (2-DG) zugegeben (– \bullet –). Kontrollbedingungen (– \blacktriangle –) sind durch Vorinkubation von 3 μM Xestospongin C ohne Zugabe von 2-DG gekennzeichnet. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD von $n = 60$ Zellen. * $p < 0,05$ vs. XeC alleine, # $p < 0,05$ vs. 2-DG ohne XeC.

4. Diskussion

4.1 Hauptbefunde

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer metabolischen Hemmung auf die Ca^{2+} -Homöostase aortaler Endothelzellen des Schweins untersucht. Die Hauptbefunde dieser Arbeit sind:

1. Kultivierte aortale Endothelzellen (1.Passage) antworteten auf die gleichzeitige Hemmung der glykolytischen und mitochondrialen ATP-Bereitstellung mit einem raschen Abfall des zellulären ATP-Gehalts und mit einem biphasischen Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg der initialen Phase trat auch unter extrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen auf. Im Gegensatz dazu blieb der sekundäre langsam progrediente $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg der zweiten Phase aus.
2. Die alleinigen Hemmungen von glykolytischer oder mitochondrialer ATP-Synthese zeigten quantitativ ähnliche Effekte auf den zellulären ATP-Gehalt. Die Hemmung beider ATP-Synthesewege durch 2-DG oder NaCN führte jeweils zu einer Abnahme des zellulären ATP-Gehalts, der aber beim Einsetzen des initialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs noch nicht signifikant reduzierte war.
Ferner zeigten die Experimente, dass die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ empfindlicher auf eine Inhibition der Glykolyse als auf eine Inhibition der mitochondrialen Atmung reagierte. Die NaCN-induzierte Steigerung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konnte durch Glucose fast vollständig unterdrückt werden, die 2-DG-induzierte Zunahme von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ jedoch nicht durch Pyruvat.
3. In frisch isolierten (nicht passagierten) aortalen Endothelzellen löste eine metabolische Hemmung einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration aus. Ganz analog zu den Befunden kultivierter und passagierter aortaler Endothelzellen konnte die NaCN-induzierte Steigerung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Glucose unterdrückt werden, die 2-DG-induzierte Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ jedoch nicht durch Pyruvat

4. Die Hemmung des Inositolstoffwechsels durch Lithiumione, sowie die Hemmung des IP₃-sensitiven Calciumfreisetzungskanals des Endoplasmatischen Retikulums durch Xestospongin C verhinderte die [Ca²⁺]_i-Zunahme in metabolisch inhibierten aortalen Endothelzellen.

4.2 Metabolische Hemmung mitochondrialer und glykolytischer ATP-Synthese und ihr Einfluss auf die endotheliale Calciumhomöostase

Die simultane Zugabe von 2-DG und NaCN führte zu einer raschen Abnahme des zellulären ATP-Gehalts der Endothelzellen. Zeitgleich stieg die [Ca²⁺]_i über den Beobachtungszeitraum biphasisch an. Diese Beobachtung deckt sich mit denen, die unter Energieverarmung bei koronaren Endothelzellen der Ratte gefunden wurden (Noll, 1995). Unter extrazellulär Ca²⁺-freien Bedingungen löste die Zugabe von 2-DG und NaCN nur den primären [Ca²⁺]_i-Anstieg (initiale Phase) aus, der langsame, progrediente [Ca²⁺]_i-Anstieg (sekundäre Phase) blieb hier aus (Abb. 3.3). Schäfer et al. (2001) konnten zeigen, dass nach metabolischer Hemmung während der initialen Phase keine zweiwertigen Kationen die Plasmamembran der Endothelzellen passieren. Im Gegensatz dazu kam es im Verlauf der sekundären Phase zu einem progredienten Einstrom von Kationen.

Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass (i) der [Ca²⁺]_i-Anstieg der initiale Phase auf einer Ca²⁺-Freisetzung aus endogenen Speichern herrührt und dass (ii) der [Ca²⁺]_i-Anstieg der sekundären Phase durch einen Ca²⁺-Einstrom über die Plasmamembran verursacht wird. Auch Ziegelstein et al. (1994) konnten durch metabolische Hemmung an aortalen Rattenendothelzellen eine Zunahme der [Ca²⁺]_i induzieren. Sie beobachteten aber lediglich einen langsamen, progredienten Anstieg. Dieser [Ca²⁺]_i-Anstieg konnte nicht durch Entzug des extrazellulären Calciums verhindert werden. Der [Ca²⁺]_i-Anstieg blieb jedoch dann aus, wenn zunächst die endogenen Ca²⁺-Speicher durch Thapsigargin, einem Hemmstoff der Ca²⁺-ATPase des Endoplasmatischen Retikulums, entleert und anschließend die metabolische Hemmung ausgelöst wurde. Diese Ergebnisse führten Ziegelstein et al. zu der Schlussfolgerung, dass der [Ca²⁺]_i-Anstieg nur auf einer Freisetzung von Ca²⁺ aus dem Endoplasmatischen Retikulum herrührt.

Es bleibt offen, ob die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von Ziegelstein et al. und

denen dieser Arbeit auf Unterschieden im experimentellen Vorgehen zurückzuführen ist, oder ob sie in der untersuchten Endothelzellpräparation begründet ist. Die letztgenannte Ursache erscheint eher unwahrscheinlich, da gezeigt werden konnte, dass Endothelzellen unterschiedlicher Herkunft auf eine metabolische Hemmung mit einem biphasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg antworten. (Noll, 1995; Schäfer, 2001).

4.3 Unterschiedliche Empfindlichkeit der zytosolischen Calciumkonzentration auf die Hemmung der einzelnen ATP-bereitstellenden Systeme

Die Effekte auf die $[Ca^{2+}]_i$ bei isolierter oder kombinierter metabolischer Hemmung sind qualitativ ähnlich. Nach alleiniger Hemmung der Glykolyse durch 2-DG, aber auch nach alleiniger Hemmung der mitochondrialen ATP-Produktion durch NaCN antworteten die Endothelzellen mit einem biphasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Bei gleichzeitiger Hemmung beider Energie-produzierender Wege zeigt sich die biphasische $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort jedoch deutlich ausgeprägter. Der initiale $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg beginnt jeweils ca. eine Minute nach Zugabe der metabolischen Inhibitoren. Vergleicht man die gefundenen Ergebnisse mit den korrespondierenden Daten des zellulären ATP-Gehalts, zeigt sich im Falle einer alleinigen Hemmung von Glykolyse oder mitochondrialer Atmung, dass bei Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ der zelluläre ATP-Gehalt immer noch unverändert ist. Nur im Falle der gleichzeitigen Hemmung der Energieproduktion mit 2-DG und NaCN ergab sich nach einer Minute ein signifikanter ATP-Abfall.

Diese Ergebnisse legen die Annahme nahe, dass (i) die initiale Ca^{2+} -Freisetzung schon durch sehr geringe Änderungen des zellulären ATP-Gehalts bedingt sein kann oder dass (ii) die Ca^{2+} -Freisetzung durch lokale Änderungen der ATP-Konzentration getriggert wird, die sich jedoch nicht im ATP-Gehalt der gesamten Zelle bemerkbar machen.

Der initiale $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei maximaler 2-DG-Konzentration ist deutlich höher als jener bei maximaler NaCN-Konzentration. Die Hemmung der Glykolyse wirkt sich somit stärker als die Hemmung der mitochondrialen Atmung auf das biphasische $[Ca^{2+}]_i$ -Signal aus.

Weiterhin zeigten auch die Experimente, in denen Pyruvat und Glucose zur

Unterstützung der mitochondrialen bzw. glykolytischen ATP-Synthese eingesetzt wurden, dass die beiden Stoffwechselwege eine unterschiedliche Bedeutung für die Ca^{2+} -Antwort haben. Die Zugabe von Pyruvat reichte nicht aus, um die 2-DG-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung nahezu oder vollständig zu unterbinden. Dieses Ergebnis konnte auch von einer anderen Arbeitsgruppe (Shimizu und Paul, 1999) beobachtet werden.

Diese Befunde zeigen, dass der Ca^{2+} -Freisetzungsmechanismus des Endoplasmatischen Retikulums besonders sensitiv für Änderungen der glykolytischen ATP-Produktion ist. Xu et al. (1995) konnten zeigen, dass die Kaskade der glykolytischen Enzyme unmittelbar mit den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums assoziiert ist. Es liegt daher nahe anzunehmen, dass die Ca^{2+} -Freisetzung durch lokale Änderungen der ATP-Konzentration im Bereich der ER-Membranen getriggert wird.

4.4 Zellkultur-bedingte Einflüsse auf die Calciumhomöostase

Endothelzellen wie auch Zellpräparationen anderer Gewebe zeigen unter Kulturbedingungen die Tendenz, mit zunehmender Passage ihren ATP-Bedarf über die anaerobe Glykolyse und weniger über die mitochondriale ATP-Produktion zu decken. Hiermit geht einher, dass die Expression der glykolytischen Enzyme im Verlauf der Kultivierung gesteigert ist und die Zahl der Mitochondrien währenddessen abnimmt. Es stellte sich daher die Frage, ob die Ca^{2+} -Antwort der Endothelzellen durch die Kulturbedingungen verändert wird. Deshalb wurden die Versuche mit frisch isolierten adhärennten Endothelzellen durchgeführt.

Frisch isolierte Endothelzellen reagieren auf eine metabolische Hemmung mit einem raschen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg. Der 2-DG-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg konnte, wie auch bei kultivierten Endothelzellen, nicht durch Pyruvat unterdrückt werden. Ebenso konnte durch Zugabe von extrazellulärer Glucose der durch NaCN hervorgerufene $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg nahezu unterdrückt werden.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Kultivierung der Endothelzellen ihre Ca^{2+} -Antwort unter metabolischer Hemmung nicht beeinflusst. Ferner zeigten sie im Speziellen, dass die Glykolyse auch in primären Zellen größeren Einfluss auf die Ca^{2+} -Freisetzung hat. Schäfer et al. (2001) konnten eine ganz ähnliche Ca^{2+} -Antwort an Endothelzellen

frisch isolierter Aortensegmente zeigen. Es liegt daher nahe, dass die Hemmung der Glykolyse in vivo eine wichtige Rolle bei der Regulation der Ca^{2+} -Homöostase einnimmt.

4.5 Mechanismus der Ca^{2+} -Freisetzung des Endoplasmatischen Retikulums

Auf funktioneller Ebene sind für die Membran des Endoplasmatischen Retikulums zwei verschiedene Calciumkanäle beschrieben worden: (i) Ryanodin-sensitive Calciumkanäle und (ii) IP_3 -abhängige Calciumkanäle (Ziegelstein, 1994 a).

Da die durch 2-DG induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum durch Ryanodin nicht beeinflusst werden konnte, lag nahe, dass sie über IP_3 -sensitive Calciumkanäle des ER vermittelt wird. Zwei experimentelle Ansätze der vorliegenden Arbeit (i) der Einsatz von Lithium und (ii) der Gebrauch von Xestospongin C verifizierten diese Hypothese.

(i) Berridge und seine Mitarbeiter machten die Entdeckung, dass IP_3 die rasche Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER bzw. dem Sarkoplasmatischen Retikulum glatter Muskelzellen auslöst (Berridge, 1993). IP_3 ist in den meisten Zellen ein äußerst kurzlebiges Molekül. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Lithiumchlorid die Inositolmonophosphatase hemmt, dies bewirkt eine IP_3 -Verarmung (Einat, 1998). In dieser Arbeit konnte in aortalen Endothelzellen gezeigt werden, dass Lithium die 2-DG-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Zunahme weitgehend unterdrücken kann. Dies zeigt die Beteiligung eines IP_3 -abhängigen Mechanismus.

(ii) Diese Folgerung wird durch die Experimente mit Xestospongin C (XeC) unterstützt. Es konnte schon in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass XeC die IP_3 -vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum aortaler Endothelzellen hemmen kann (Noll, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde der Hemmstoff XeC u.a. in seiner Wirkung auf die 2-DG-induzierte Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ untersucht. Analog zu den Kontrollexperimenten, bei denen ATP als Agonist über IP_3 -abhängige Calciumkanäle eine $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung induzierte, konnte Xestospongin C auch den 2-DG-induzierten Calciumanstieg verhindern. Des Weiteren konnten Schäfer et al. zeigen, dass die membranständige Calcium-ATPase des Endoplasmatischen Retikulums nach metabolischer Hemmung funktionell aktiv und in ihrer Leistung nicht gedrosselt ist (Schäfer, 2001).

Diese Befunde erlauben die Schlussfolgerung dass der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg, der durch Hemmung der Glykolyse hervorgerufen wird, auf eine Ca^{2+} -Freisetzung über IP_3 -abhängige Ca^{2+} -Kanäle des Endoplasmatischen Retikulum zurückzuführen ist (Abb. 4.1).

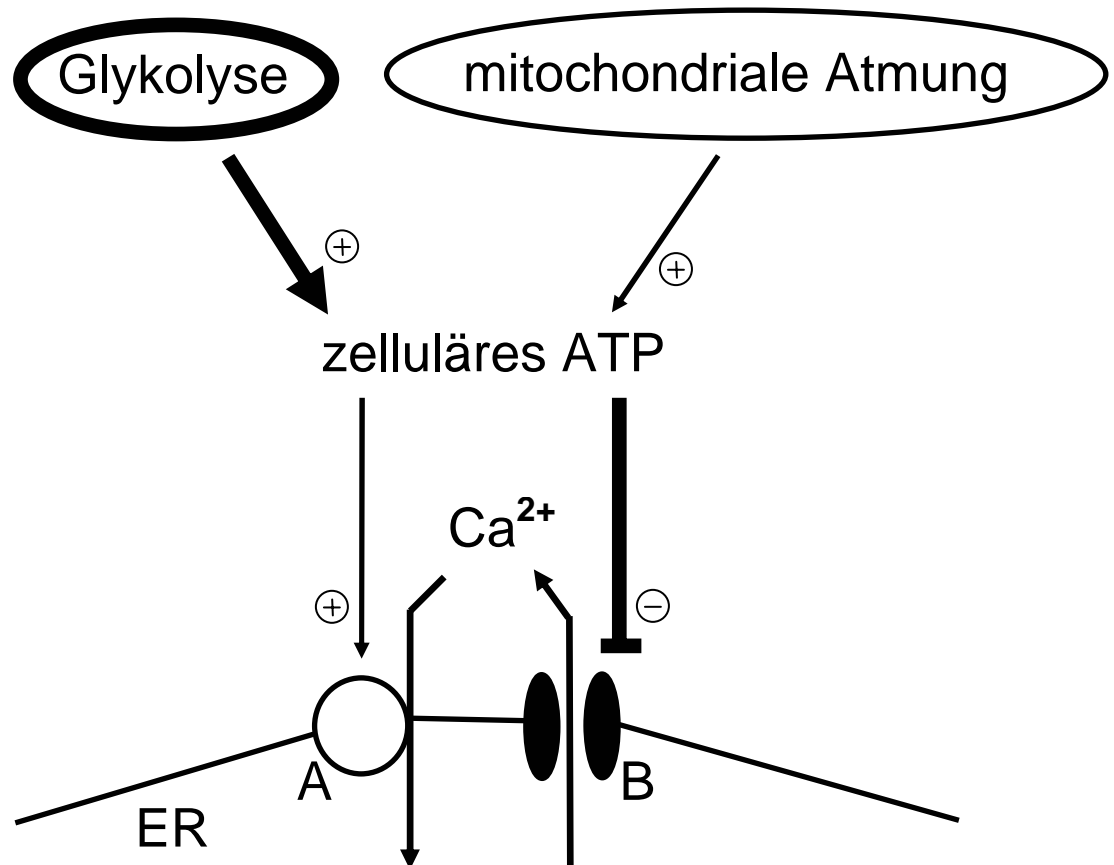


Abbildung 4.1. Endogenen Ca^{2+} -Freisetzung unter metabolischer Hemmung. Die Ca^{2+} -ATPase (A) des Endoplasmatischen Retikulums (ER) ist aktiv und führt zu einer Speicherung von Ca^{2+} ins ER. Die Glykolyse ist mit den Membranen des ER assoziiert. Speziell eine Abnahme des glykolytisch-produzierten ATP bewirkt eine Ca^{2+} -Freisetzung über den IP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Kanal (B) ins Zytosol bei noch aktiver Ca^{2+} -ATPase.

Nun stellt sich die Frage, über welchen Mechanismus ATP die IP_3 -regulierte Ca^{2+} -Freisetzung beeinflusst. Es konnte für andere Zellspezies gezeigt werden, dass durch geringfügige Erniedrigung der intrazellulären ATP-Konzentration die IP_3 -Empfindlichkeit der ER-Calciumkanäle größer werden kann (Ferris, 1989; Smith,

1985). Eine solche Sensitivierung könnte die Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle auch in metabolisch gehemmten Endothelzellen erhöhen. Ferner ist aber auch denkbar, dass unter metabolischer Hemmung die IP_3 -Syntheserate rasch gesteigert wird und es so zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit der Ca^{2+} -Kanäle kommt.

Die Hemmung der IP_3 -abhängigen Calciumkanäle durch XeC konnte nicht nur die endogene Ca^{2+} -Freisetzung, sondern auch die sich daran anschließende sekundäre $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung unterbinden. Eine vergleichbare Wirkung zeigte auch Lithium. Andererseits konnte Xestospongin C die sekundäre Phase, d.h. den Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran nicht beeinflussen, wenn es zeitlich erst nach dem initialen Gipfel des $[Ca^{2+}]_i$ -Signals gegeben wurde.

Die Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg der sekundären Phase durch die initiale Ca^{2+} -Freisetzung des ER angestoßen wird. Es scheint naheliegend, dass der sekundäre $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg somit auf einer Aktivierung des „store operated“ transplasmalemalen Ca^{2+} -Einstroms beruht (Mason, 1991).

4.6 Pathophysiologische Relevanz des Mechanismus

Die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum, die durch die Hemmung der glykolytischen ATP-Produktion initiiert wird, kann sehr empfindlich auf Hypoxie- und/oder Ischämiebedingungen reagieren. Im ischämisch-reperfundierten Gewebe kann eine Reihe von Faktoren die endotheliale Glykolyse hemmen. Unter diesen Faktoren ist besonders die Azidose, die erhöhte Konzentration von Laktat und das vermehrte Auftreten von Sauerstoffradikalen zu nennen (Hyslop, 1988; Wilson, 1990). Es wäre durchaus denkbar, dass die rasche Antwort des endothelialen zytosolischen Calciums auf die Hemmung der Glykolyse als ein physiologischer Sensor für metabolische Änderungen im umgebenden Gewebe fungiert.

Ferner könnten die entleerten Calciumspeicher des Endoplasmatischen Retikulums für die reduzierte Ansprechbarkeit auf Endothel-abhängigen Dilatatoren verantwortlich sein, wie sie von einigen Autoren nach Hemmung der glykolytischen Energieproduktion beschrieben wurde (Griffith, 1987; Weir, 1991). Dies scheint darin begründet zu sein, dass die Wirkung dieser vasoaktiven Mediatoren über die $[Ca^{2+}]_i$ -

induzierte Aktivierung der NO-Synthase vermittelt wird. Die gleichen Autoren (Griffith, 1987; Weir, 1991) sahen keine Endothel-abhängige Vasodilatation nach alleiniger Zugabe von 2-DG. Es ist unklar, wie diese Ergebnisse mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit insbesondere mit dem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg nach 2-DG-Gabe in Einklang zu bringen sind. Zwei Erklärungsansätze kommen hier in Betracht. Einerseits, so argumentiert auch Griffith (1986), könnte 2-DG einen hemmenden Effekt auf die NO-Synthase haben, dies wäre Ca^{2+} -unabhängig. Andererseits könnte die $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort der untersuchten Gefäße sehr viel kleiner ausgefallen sein als im Modell der vorliegenden Arbeit.

Der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg nach Hemmung der Glykolyse in Endothelzellen führt unter anderem zu einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität (Curry, 1992; Noll, 1995). Diese Permeabilitätserhöhung ermöglicht einerseits den Austausch von Substanzen, wie z.B. Albumin oder anderer Serumproteine zwischen Blut und Gewebe, kann aber bei überschießender Permeabilität andererseits zu einem interstitiellen Ödem und somit zur Verlängerung von Diffusionswegen führen.

4.7 Schlussfolgerung

Aufgrund der Befunde dieser Arbeit ergibt sich folgendes Bild über die Abläufe der endothelialen zytosolischen Ca^{2+} -Freisetzung unter metabolischer Hemmung:

Geringe Änderungen der glykolytischen ATP-Bereitstellung bewirken eine rasche Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol. Der ATP-Abfall bedingt durch die Hemmung der Glykolyse, in der vorliegenden Arbeit durch 2-Desoxyglucose induziert, kann jedoch unter in vivo Bedingungen durch eine Reihe anderer Faktoren verursacht sein. Die lokale Abnahme der ATP-Konzentration wirkt sich auf den totalen zellulären ATP-Gehalt nicht wesentlich aus. Sie öffnet jedoch die IP_3 -abhängigen ER-Calciumkanäle. Trotz der ATP-Abnahme ist die membranständige ER- Ca^{2+} -ATPase aktiv. Die Ca^{2+} -Entspeicherung des Endoplasmatischen Retikulums bedingt eine weitere $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung. Diese kommt durch den Einstrom von Ca^{2+} über die Plasmamembran zu Stande. Bezogen auf die in vivo Situation hat diese Ca^{2+} -Überladung eine Vielzahl von Folgen für die Endothelzellfunktion. Da eine Hemmung des IP_3 -regulierten Ca^{2+} -Freisetzungskanals durch Xestospongin C im Modell der vorliegenden Arbeit den biphasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg unterbinden konnte, ist es

denkbar, dass die Hemmung dieses Freisetzungsmechanismus auch in vivo eine Ca^{2+} -Überladung verhindern könnte. Strategien, die auf die Hemmung dieses Mechanismus abzielen, eröffnen eventuell neue therapeutische Wege für die Protektion der endothelialen Schrankenfunktion unter Ischämie und anschließender Reperfusion.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle einer metabolischen Hemmung auf die Calciumhomöostase in aortalen Schweineendothelzellen untersucht. Dabei wurden einerseits kultivierte (1. Passage) und andererseits frisch isolierte aortale Endothelzellen eingesetzt. 2-Desoxyglucose (10 mM), ein Inhibitor der Glykolyse, bewirkt einen Anstieg der zytosolischen freien Calciumkonzentration innerhalb einer Minute. Zu dieser Zeit ist der totale zelluläre ATP-Gehalt noch unbeeinflusst. Stimulation der oxidativen Energiebereitstellung durch Zugabe von Pyruvat (5 mM) konnte den 2-DG-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg nicht abschwächen. Der zelluläre ATP-Gehalt konnte durch dieses Manöver jedoch relativ konstant gehalten werden. Diese Ergebnisse konnten an kultivierten und frisch isolierten aortalen Endothelzellen gezeigt werden. Der Mechanismus der Calciumfreisetzung wurde analysiert. Sowohl Lithium (10 mM), ein Hemmer der Inositolmonophosphatase, als auch Xestospongine C (3 μ M), ein potenter Hemmer des Inositoltriphosphat-sensitiven Calciumfreisetzungskanals des Endoplasmatischen Retikulums, verhinderten den Anstieg der zytosolischen freien Calciumkonzentration unter metabolischer Hemmung durch 2-Desoxyglucose. Die Ergebnisse der Arbeit demonstrieren, dass das Endoplasmatische Retikulum der Endothelzellen besonders sensitiv auf glykolytische Hemmung reagiert. Wenn sich eine solche Hemmung der Glykolyse ereignet, wird das Calciumdepot des Endoplasmatischen Retikulums kurzfristig entleert. Dies geschieht durch die Öffnung des Inositoltriphosphat-sensitiven Calciumfreisetzungskanals des Endoplasmatischen Retikulums. Die Hemmung des IP_3 -sensitiven Calciumfreisetzungsmechanismus könnte therapeutische Strategien zur Protektion der endothelialen Schrankenfunktion aufzeigen.

6. Literaturverzeichnis

1. Ando J., Komatsuda T. und Kamiya A. Cytoplasmic calcium response to fluid shear stress in cultured vascular endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 24: 871-877, 1988.
2. Arndt H., P. Kubes und Granger D. N. Involvement of neutrophils in ischemia-reperfusion injury in the small intestine. *Kli. Wochenschr.* 69: 1056-1060, 1991.
3. Arnould T., Michiels C., Alexandre I. und Remacle J. Effect of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells. *J Cell Physiol* 152: 215-221, 1992.
4. Berridge M. J. Inositol Triphosphate and Calcium Signaling. *Nature* (361): 315-325, 1993
5. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
6. Busse R., Mülsch A., Fleming I. und Hecker M. Mechanisms of nitric oxide release from the vascular endothelium. *Circulation* 87, Suppl. V: V18-25, 1993.
7. Carson M. R., Shasby S. S., und Shasby D. M.. Histamine and inositol phosphate accumulation in endothelium: cAMP and a G protein. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 257: L259-L264, 1989.
8. Cotran R .S. New roles for the endothelium in inflammatory and immunity. *Am. J. Pathol.* 129: 407-413, 1987
9. Curry F. E. Modulation of venular microvessel permeability by calcium influx into endothelial cells. *FASEB J* 6: 2456-2466, 1992

10. Duin N. und Sutcliffe J. A History of Medicine. 38-41. London: Simon & Schuster Ltd, 1992.
11. Einat H., Kofman O., Itkin O., Lewitan R. J. und Belmaker R. H. Augmentation of lithium's behavioral effect by inositol uptake inhibitors. *J Transm* 105 (1): 31-38, 1998.
12. Ferris C. D., Hanganir R. L. und Snyder S. H. Calcium flux mediated by purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in reconstituted lipid vesicles is allosterically regulated by adenine nucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2147-2151, 1989.
13. Furchgott R. F. und Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 3: 2007-2018, 1993.
14. Gafni J., Munsch J. A., Lam T. H., Catlin M. C., Costa L. G., Molinski T. F. und Pessah I. N. Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron* 19: 723-733, 1997.
15. Garcia J. G., Davis H. W. und Patterson C. E. Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol* 163: 510-522, 1995.
16. Griffith T. M., Edwards D. H., und Henderson A. H. Unstimulated release of endothelium derived relaxing factor is independent of mitochondrial ATP generation. *Cardiovasc Res* 21: 565-568, 1987.
17. Griffith T. M., Edwards D. H., Newby A. C., Lewis M. J. und Henderson A. H. Production of endothelium derived relaxant factor is dependent on oxidative phosphorylation and extracellular calcium. *Cardiovasc Res* 20: 7-12, 1986.
18. Grynkiewicz G., Poenie M. und Tsien R. Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450, 1985.

19. Hyslop P. A., Hinshaw D. B., Halsey W. A. Jr, Schraufstatter I. U., Sauerheber R. D., Spragg R. G., Jackson J. H. und Cochrane C. G. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury: the glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 263: 1665-1675, 1988.
20. Jaffe E. A., Nachmann R. L., Becker C. G. und Minick C. R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins, Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 52: 2745-2756, 1973.
21. Jaffe E. A. Physiologic functions of normal endothelial cells (Review). *Ann N Y Acad Sci.* 454: 279-291, 1985.
22. Jaffe E. A., Grulich J., Weksler B. B., Hampel G. und Watanabe K. Correlation between thrombin-induced prostacyclin production and inositol trisphosphate and cytosolic free calcium levels in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 262: 8557-8565, 1987.
23. Jüngling E. und Kammermeier H. Rapid assay of adenine nucleotides or creatine compounds in extracts of cardiac tissue by paired-ion reversed-phase high performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 102: 358-361, 1980
24. Just H. Structure and Function of the Endothelium in Cardiovascular Disease. *Biotechnology in Drug Research.* 44: 382-384, 1994
25. Krützfeldt A., Spahr R., Mertens S., Siegmund B. und Piper H. M. Metabolism of exogenous substrates by coronary microvascular endothelial cells in culture. *J Mol Cell Cardiol* 22: 1393-1404, 1990
26. Kuhne W., Besselmann M., Noll T., Muhs A., Watanabe H. und Piper H. M. Desintegration of cytoskeletal structure of actin filaments in energy-depleted endothelial cells. *Am J Physiol* 264: H1599-H1608, 1993

27. Ladilov Y. V., Siegmund B., Balser C. und Piper H. M. Stimulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture. *Circ Res* 80: 69-75, 1997
28. Li Q, Altschuld A. und Stokes B. T. Quantification of intracellular free calcium in single adult cardiomyocytes by fura-2 fluorescence microscopy: calibration of fura-2 ratios. *Biochem Biophys Res Commun* 147: 120-126, 1987.
29. Lucchesi B. R. Complement, neutrophils and free radicals: Mediators of reperfusion injury. *Drug Research* 44: 420-432, 1994.
30. Majno G. und Palade G. Studies on inflammation. The effects of histamin and serotonin on vascular permeability, an electron microscopy study. *J Biophys Biochem Cytol* 11: 571-605, 1961.
31. Mason M. J., Garcia-Rodriguez C. und Grinstein S. Coupling between intracellular Ca^{2+} stores and the Ca^{2+} permeability of the plasma membrane: comparison of the effects of thapsigargin, 2,5-di(tert-butyl)-1,4-hydroquinone, and cyclopiazonic acid in rat thymic lymphocytes. *J Biol Chem* 266: 20856-20882, 1991.
32. Mertens S., Noll T., Spahr A., Krützfeldt A., und Piper H. M. Energetic response of coronary endothelial cells to hypoxia. *Am J Physiol* 258: H689-H694, 1990.
33. Muhs A., Noll T., und Piper H. M. Vinculin phosphorylation and barrier failure of coronary endothelial monolayers under energy depletion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 273: H608-H617, 1997.
34. Newby A. C., Henderson A. H. Stimulus-secretion coupling in vascular endothelial cells. *Ann. Rev. Physiol.* 52: 661-674, 1990.
35. Noll T., Muhs A., Besselmann M., Watanabe H., und Piper H. M. Initiation of hyperpermeability in energy-depleted coronary endothelial monolayers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 268: H1462-H1470, 1995.

36. Noll T., Schafer M., Schavier-Schmitz U., Piper H. M. ATP induces dephosphorylation of myosin light chain in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C717-C723, 2000
37. Piper H. M. (Hrsg.). Microcarrier cultures of endothelial cells. In: *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research*. Heidelberg: Springer-Verlag, S. 220-229, 1990.
38. Pohl U. und Kaas J. Interaction of hormones with the vascular endothelium / Effects on the control of vascular tone. *Drug Res.* 44: 459-461, 1994.
39. Schäfer M., Bahde D., Bosche B.*, Ladilov Y., Schäfer C., Piper H. M., und Noll T. Modulation of early $[Ca^{2+}]_i$ rise in metabolically inhibited endothelial cells by xestospongine C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280 (3): H1002-H1010, 2001.
40. Shen J., Lusinskas F. W., Connolly A., Dewey C. F. Jr und Gimbrone M. A. Jr. Fluid shear stress modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 262: C384-C390, 1992.
41. Shimizu S. und Paul R. J. Hypoxia and alkalinization inhibit endothelium-derived nitric oxide but not endothelium-derived hyperpolarizing factor responses in porcine coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 335-344, 1999.
42. Simionescu M. und Simionescu N. (Hrsg.) *Endothelial cell biology*. New York: Plenum Press, 1988.
43. Smith J. B., Smith L., und Higgins B. L. Temperature and nucleotide dependence of calcium release by myo-inositol 1,4,5-trisphosphate in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 260: 14413-14416, 1985.
44. Unno N., Menconi M. J., Salzman A. L., Smith M., Hagen S., Ge Y., Ezzell R. M., und Fink M. P. Hyperpermeability and ATP depletion induced by chronic hypoxia or glycolytic inhibition in Caco-BBE monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 270: G1010-G1021, 1996.

45. Watanabe H., Kuhne W., Spahr R., Schwartz P., und Piper H. M. Macromolecule permeability of coronary and aortic endothelial cells under energy depletion. *Am J Physiol* 260: H1344-H1352, 1991
46. Watanabe H., Kuhne W., Schwartz P., und Piper H. M. A₂ M-adenosin receptor stimulation increases macromolecule permeability of endothelial cells. *Am J Physiol* 262: H1174-H1181, 1992
47. Weir C. J., Gibson I. F. und Martin W. Effects of metabolic inhibitors on endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilatation of rat and rabbit aorta. *Br J Pharmacol* 102: 162-166, 1991.
48. Wilson J., Winter M., und Shasby D. M. Oxidants, ATP depletion and endothelial permeability to macromolecules. *Blood* 76: 2578-2582, 1990.
49. Xu K. Y., Zweier J. L. und Becker L. C. Functional coupling between glycolysis and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport. *Circ Res* 77: 88-97, 1995.
50. Zeither A. M.. Endothelial modulation of coronary vasomotor tone in humans / Effect of atherosclerosis and risk factors for coronary artery disease. *Drug Res.* 44: 439-442, 1994.
51. Ziegelstein R. C., Cheng L., Aversano T., Ouyang P., Lakatta E. G., und Silverman H. S. Increase in rat aortic endothelial free calcium mediated by metabolically sensitive calcium release from endoplasmic reticulum. *Cardiovasc Res* 28: 1433-1439, 1994.
52. Ziegelstein R. C., Spurgeon H. A., Pili R., Passaniti A., Cheng L., Corda S., Lakatta E. G. und Capogrossi M. C. A functional ryanodine-sensitive intracellular Ca²⁺ store is present in vascular endothelial cells. *Circ Res* 74: 151-156, 1994 a.

* Ein großer Teil der vorliegenden Arbeit wurde bereits im *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 280: H1002-10, 2001 veröffentlicht.

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Dr. Piper für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Doktorarbeit an seinem Institut.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Privatdozent Dr. Noll und Herrn Dr. Schäfer für die intensive Betreuung der Arbeit sowie für die fruchtbaren Gespräche und Diskussionen bedanken.

Ferner danke ich allen technischen und akademischen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts für die gute Atmosphäre innerhalb des Labors sowie innerhalb des Graduierten Kollegs. Die Zeit, die ich im Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen verbringen durfte, hat mich sehr geprägt, ich habe dort viel gelernt und werde sicherlich auf meinem weiteren wissenschaftlichen Werdegang oft an diese Zeit zurückdenken.

Lebenslauf

Personendaten

Name: Bosche
Vorname: Bert
Geburtsdatum: 21.09.1972
Geburtsort: 49377 Vechta
Familienstand: ledig
Konfession: römisch-katholisch
Eltern: Werner Bosche, Elektriker
Dietlinde Bosche, Dipl. Pädagogin

Schulbildung

08/1979 – 07/1983 Grundschole Lioba-Schole in Vechta
08/1983 – 06/1985 Orientierungsstufe (5. & 6. Klasse in Niedersachsen)
Schulzentrum-Vechta-Süd
08/1985 – 05/1992 Gymnasium Antonianum in Vechta
05/1992 Schulabschluss mit Erwerb der Allgemeinen
Hochschulreife (Abitur)

Zivildienst

08/1992 – 10/1993 Zivildienst und Ausbildung als Rettungssanitäter an der
Malteser Hilfsdienst Rettungswache in Vechta

Hochschulbildung

10/1993 – 09/1994 Studium der Film- und Fernsehwissenschaften, der
Psychologie und der Kunstgeschichte an der Freien
Universität in Berlin
04/1995 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Justus-
Liebig-Universität in Gießen
03/1997 Ärztliche Vorprüfung
03/1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/1998 Beginn des Studiums der Philosophie, der Pädagogik und

	Fortsetzung des Studiums der Psychologie an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
09/2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2000	Immatrikulation für Humanmedizin, Philosophie, Pädagogik und Psychologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster
	Beginn des Praktischen Jahres am Universitätsklinikum in Münster(UKM)
10/2000 – 02/2001	1. Tertial: Klinik und Poliklinik für Neurologie des UKM
02/2000 – 06/2001	2. Tertial: Innere Medizin C des UKM
06/2001 – 09/2001	3. Tertial: Allgemein- und Unfallchirurgie des UKM
12/2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	Abschluss des Studiums der Humanmedizin
04/2002– 03/2003	Fortsetzung des Studiums der Philosophie, der Pädagogik und der Psychologie an der Universität zu Köln

Beruflicher Werdegang

03/2002 – 09/2003	Arzt im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität zu Köln sowie am Max Planck Institut für neurologische Forschung Köln
09/2003	Wissenschaftlicher Assistent an der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität zu Köln sowie am Max Planck Institut für neurologische Forschung Köln
Köln, den 23.10.2003	B. Bosche

Erklärung

Ich habe die vorliegende 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 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.

Köln, den 06.02.2003

B. Bosche