# Die Bedeutung von Stickstoffmonoxid bei Calcium-Oszillationen in fettabgeleiteten Stammzellen des Menschen

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

vorgelegt von Myriam Hatry
aus Berlin

Gießen 2011

Aus dem Physiologischen Institut
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. H. Sauer

Gutachter: Prof. Dr. R. T. Schermuly

Tag der Disputation: 15.09.2011

# ERKLÄRUNG

Ich erkläre: ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wirklich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die aus 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.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Professor Dr. Heinrich Sauer von mir selbst durchgeführt worden.

Myriam Hatry

meinem Vater

# VERZEICHNISSE UND ABKÜRZUNGEN

## i. Inhaltsverzeichnis

i. Inhaltsverzeichnis ..... I
ii. Abbildungsverzeichnis ..... V
iii. Tabellenverzeichnis ..... VII
iv. Abkürzungen ..... IX

1. Vorwort ..... 1

2. Einleitung ..... 3

2.1. Stammzellen ..... 4
2.1.1. Embryonale Stammzellen ..... 6
2.1.2. Adulte Stammzellen ..... 6
2.1.2.1. Stammzellen aus Fettgewebe ..... 7
2.2. Calcium ..... 8
2.2.1. $IP_3$ Signalweg ..... 9
2.2.2. Diacylglycerol ..... 10
2.2.3. Phospholipase C ..... 10
2.2.4. Calcium-Oszillationen ..... 11
2.3. Gap Junctions ..... 14
2.4. Stickstoffmonoxid ..... 15
2.5. Reaktive Sauerstoffspezies und freie Radikale ..... 17

3. Zielsetzung der Arbeit ..... 19

4. Material und Methoden ..... 21

4.1. Material ..... 21
4.1.1. Firmen ..... 21
4.1.2. Geräte und Laborbedarf ..... 21
4.1.3. Chemikalien und Medien für die Zellkultur ..... 22
4.1.3.1. Chemikalien ..... 22
4.1.3.2. Medien ..... 23

4.1.4. Chemikalien für die Experimente ..... 24
4.1.4.1. NOS-Inhibitoren ..... 25
4.1.4.2. NO Donatoren ..... 26
4.1.4.3. Radikalfänger ..... 27
4.1.4.4. Gap Junction Inhibitoren ..... 29
4.1.4.5. $IP_3$ Inhibitoren ..... 30
4.1.4.6. NADPH-Oxidase Inhibitor ..... 30
4.1.4.7. Phospholipase C Inhibitor und Kontrollsubstanz ..... 30
4.1.4.8. SERCA Inhibitor ..... 31
4.1.4.9. Kreuzprobe ..... 32
4.1.4.10. Fluoreszenzfarbstoffe ..... 32
4.2. Methoden ..... 35
4.2.1. Die Zellkultur von ASCs ..... 35
4.2.1.1. Das Einfrieren von ASCs ..... 36
4.2.1.2. Das Auftauen von ASCs ..... 37
4.2.1.3. Die Kultivierung von ASCs ..... 37
4.2.1.4. Das Passagieren von ASCs ..... 38
4.2.1.5. Das Ausplattieren von ASCs ..... 38
4.2.1.6. Das Anfärben mit Fluoreszenzfarbstoffen ..... 38
4.2.1.7. Die konfokale Scanner-Lasermikroskopie ..... 39
4.2.2. Versuchsanzahl und statistische Signifikanz ..... 43
4.2.2.1. Experimente ..... 44
5. Ergebnisse ..... 45
5.1. Spontane Calcium-Oszillation ..... 45
5.2. Intrazelluläre Calciumfreisetzung ..... 48
5.3. PLC und $IP_3$ Signalweg ..... 48
5.3.1. PLC-Antagonist ..... 49
5.3.2. Inhibitor des $IP_3$-Receptors ..... 50
5.4. Gap Junction Kommunikation ..... 51
5.4.1. 1-Heptanol ..... 51
5.4.2. Carbenoxolone ..... 51
5.5. Gap Junction Regulation ..... 52
5.5.1. NOS-Inhibitoren ..... 52
5.5.1.1. ETU ..... 53
5.5.1.2. L-NAME ..... 53

5.5.1.3. L-NMMA....54
5.5.1.4. DPI....55
5.5.2. NADPH-Oxidase Inhibitor....56
5.5.3. NO Donatoren....57
5.5.3.1. SNAP....57
5.5.3.2. SNP....58
5.6. Kontrolle der Gap Junction Kommunikation und Regulation im Fotobleichverfahren....59
5.7. ROS-System....61
5.8. Kreuzproben....64
5.8.1. Lösungsmittel DMSO....64
5.8.2. Nährmedium HAM's F-10....64
5.9. Zusammenfassung der Ergebnisse....65

6. Diskussion....67

6.1. Calciumsignalwege in mesenchymalen Stammzellen....67
6.2. Spontane Calcium-Oszillationen als Informationsträger....68
6.3. Gap Junctions und interzelluläre Kommunikation....70
6.4. Gap Junction Regulation und NO Synthase....72
6.5. Ausdifferenzierung von Zellen und Calcium-Oszillationen....73
6.6. Abschließende Betrachtung und Ausblick....75

7. Zusammenfassung....79

8. Summary....81

9. Literaturverzeichnis....83

10. Publikationen....95

11. Danksagung....97

# ii. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Stammzellentypen und ihre Entstehung 5
Abb. 2: Intrazellulärer Calciumfluss 12
Abb. 3: Strukturformel L-NAME 25
Abb. 4: Strukturformel L-NMMA 25
Abb. 5: Strukturformel ETU 26
Abb. 6: Strukturformel DPI 26
Abb. 7: Strukturformel SNP 26
Abb. 8: Strukturformel SNAP 27
Abb. 9: Strukturformel N-(2-Mercapto-propionyl)-glycin 27
Abb. 10: Strukturformel Trolox 28
Abb. 11: Strukturformel Rutin 28
Abb. 12: Strukturformel Luteolin 29
Abb. 13: Strukturformel 1-Heptanol 29
Abb. 14: Strukturformel Carbenoxolone 29
Abb. 15: Strukturformel 2-Aminoethyl-diphenyl-borat 30
Abb. 16: Strukturformel Apocynin 30
Abb. 17: Strukturformel U-73122 31
Abb. 18: Strukturformel U-73343 31
Abb. 19: Strukturformel Thapsigargin 32
Abb. 20: Strukturformel Dimethylsulfoxid 32
Abb. 21: Strukturformel Fluo-3 AM 33
Abb. 22: Spektrum Fluo-3 AM (Nach einer Vorlage des Herstellers) 34
Abb. 23: Strukturformel Fluo-4 AM 34
Abb. 24: Spektrum Fluo-4 AM (Nach einer Vorlage des Herstellers) 34
Abb. 25: Strukturformel Calcein AM 35
Abb. 26: Spektrum Calcein AM (Nach einer Vorlage des Herstellers) 35
Abb. 27: ASCs in einer Zellkultur 36
Abb. 28: Prinzipzeichnung eines konfokalen Scanner-Lasermikroskops 40
Abb. 29: Spontane, asynchrone Calcium-Oszillationen von ASCs 46
Abb. 30: Typische Oszillationsmuster der Calciumkonzentration im Zeitverlauf 47
Abb. 31: Unterdrückung der Oszillation durch Thapsigargin 48
Abb. 32: Unterdrückung der Oszillation durch U-73122 49
Abb. 33: Unveränderte Oszillation bei U-73433 Zugabe 50
Abb. 34: Unterdrückung der Oszillation durch 2-APB 50

Abb. 35: Unterdrückung der Oszillation durch 1-Heptanol 51
Abb. 36: Unterdrückung der Oszillation durch Carbenoxolone 52
Abb. 37: Synchronisation der Oszillation durch Zugabe von ETU 53
Abb. 38: Synchronisation der Oszillation durch Zugabe von L-NAME 54
Abb. 39: Synchronisation der Oszillation durch Zugabe von L-NMMA 55
Abb. 40: Synchronisation der Oszillation durch Zugabe von DPI 56
Abb. 41: Keine Veränderung der Oszillation durch Zugabe von Apocynin 57
Abb. 42: Keine Veränderung der Oszillation durch Zugabe von SNAP 58
Abb. 43: Keine Veränderung der Oszillation durch Zugabe von SNP 59
Abb. 44: FRAP im Verlauf 60
Abb. 45: FRAP – Rückfluss des Calceins nach der Ausbleichung 61
Abb. 46: Unveränderte Oszillation bei Trolox Zugabe 62
Abb. 47: Unveränderte Oszillation bei Rutin Zugabe 62
Abb. 48: Unveränderte Oszillation bei Luteolin Zugabe 63
Abb. 49: Unveränderte Oszillation bei N-(2-Mercapto-propionyl)-glycin Zugabe 63
Abb. 50: Unveränderte Oszillation bei DMSO Zugabe 64
Abb. 51: Unveränderte Oszillation bei HAM’s F-10 Medium Zuführung 65

# iii. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Geräte und Hersteller/Lieferant 22
Tab. 2: Verwendete Chemikalien für die Zellkultur und Hersteller/Lieferant 23
Tab. 3: Zusammensetzung des verwendeten HAM's F-10 Nährmediums 23
Tab. 4: Zusammensetzung des verwendeten Gefriermediums 23
Tab. 5: Verwendete Chemikalien für die Experimente und Hersteller/Lieferant 24
Tab. 6: Typ und Anzahl der durchgeführten Experimente 44

# iv. Abkürzungen

| | |
|---|---|
| °C | Grad Celsius |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| µM | Mikromolar ($10^{-6\ mol}/_{l}$) |
| Abb. | Abbildung |
| ASC | adipose tissue derived stem cells (Stammzellen aus Fettgewebe) |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ATPase | Adenosintriphosphatase |
| Ca | Calcium |
| ca. | circa |
| $Ca^{2+}$ | Calcium-Ion |
| $CaCl_2$ | Calciumchlorid |
| $Ca_{er}^{2+}$ | endoplasmatisches Calcium |
| CaM | Calmodulin |
| $Ca_{mit}^{2+}$ | mitochondriales Calcium |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| $Ca_{zyt}^{2+}$ | zytosolisches Calcium |
| CBX | Carbenoxolone |
| CD | cluster of differentiation (Gruppen immunophänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen) |
| cGMP | cyclisches Guanosinmonophosphat |
| $CO_2$ | Kohlenstoffdioxid |
| Cx | Connexin |
| DAG | Diacylglycerol |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DPI | Diphenyliodoniumchlorid |
| EDRF | endothelium derived relaxing factor (vom Endothel stammender, Gefäßmuskulatur erschlaffender Faktor) |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |

| | |
|---|---|
| eNOS | endotheliale NO Synthase (auch NOS3) |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| ESZ | embryonale Stammzellen |
| Ethyl-TU | siehe: ETU |
| ETU | 2-Ethyl-2-thiopseudourea, Hydrobromide |
| FRAP | fluorescence recovery after photobleaching (Wiedergewinnung der Fluoreszenz nach Fotobleiche) |
| G | Gravitationskonstante |
| G-Protein | Guaninnucleotid-bindendes Protein |
| HeLa | Epithelzellen eines Zervixkarzinoms der Helen Lane genannten Patientin |
| HUVEC | human umbilical vein endothelial cells (humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen) |
| iNOS | induzierbare NO Synthase (auch NOS2) |
| $IP_3$ | Inositoltriphosphat |
| $IP_3R$ | Inositoltriphosphat Rezeptor |
| KCl | Kaliumchlorid |
| kDa | Kilo Dalton |
| kHz | Kilo Herz |
| L-NAME | $N^G$-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester |
| L-NMMA | $N^G$- Mono Methyl-L-Arginin |
| M | Molar |
| MEM | minimal essential medium |
| $MgCl_2$ | Magnesiumchlorid |
| mHz | Milliherz |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar ($10^{-3\ mol}/_{l}$) |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NADPH | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat |
| NFAT | nuclear factor of activated T-cells, (Transkriptionsfaktoren in T-Lymphozyten) |
| NF-KB | nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B- |

| | |
|---|---|
| | cells |
| nm | Nanometer |
| nM | Nanomolar ($10^{-9}$ mol/l) |
| NMPG | N-(2-Mercapto-propionyl)-glycin |
| nNOS | neuronale NO Synthase (auch NOS1) |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| $NO_2$ | Stickstoffdioxid |
| NOS | NO Synthase |
| $O_2$ | Sauerstoff |
| Oct/OAP | octamer binding transcription factor / octamer associated protein |
| pH | Maß für die saure oder alkalische Reaktion |
| $PIP_2$ | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PKC | Proteinkinase C |
| PKG | Proteinkinase G |
| PLC | Phosphoinositid-Phospholipase C (auch Phospholipase C) |
| ROI | region of interest (Untersuchungsregion) |
| ROS | reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies auch Sauerstoffradikale) |
| s | Sekunde |
| SD | standard deviation (Standardabweichung) |
| SERCA | sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase, (Calciumpumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Reticulums) |
| siRNA | small interfering RNA |
| SNAP | S-Nitroso-N-Acetyl-Penicillamin |
| SNP | sodium nitroprusside dihydrate (Nitroprussid-Natrium-Dihydrat) |
| Tab. | Tabelle |
| z. B. | zum Beispiel |

# 1. VORWORT

Alle Experimente der vorliegenden Arbeit entstanden im Zeitraum November 2006 bis Dezember 2007 am Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen und wurden im Laborbereich der AG Prof. Sauer (Kardiovaskuläre Stammzellforschung) durchgeführt. Betreuer der Arbeit war Prof. Dr. Heinrich Sauer.

Die verwendeten Stammzellenlinien sind von Dr. med. Paul Steffen nach einer von ihm praktizierten Methode isoliert worden.

Die bei Calciumströmen in der Zelle zu beobachtenden langsamen Oszillationen der *Calciumkonzentration* werden als „Calcium-Oszillation“ bezeichnet. Im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen diese Calcium-Oszillationen humaner Stammzellen, die aus Fettgewebe gewonnen wurden. Im Ergebnis kann gezeigt werden, dass die Synchronisierung von Calcium-Oszillationen durch die Abschaltung des Stickstoffmonoxid-Systems bewirkt werden kann. Da die interzelluläre Kommunikation durch Gap Junctions realisiert wird, ergibt sich aus den Experimenten die Schlussfolgerung, dass die Inhibition der NO Synthase die Durchlässigkeit der Gap Junction Koppelung beeinflusst.

# 2. EINLEITUNG

In der biomedizinischen Forschung hat das Thema “Regenerative Medizin“, zu dem unter anderem die Stammzellenforschung und das Tissue Engineering (Gewebezüchtung) gehören, zunehmend an Bedeutung gewonnen. So wird z.B. in Deutschland seit 1999 Forschung zu „Biologischer Ersatz von Organfunktionen“ [vgl. BmBF 1999] und seit 2004 der Schwerpunk „Zellbasierte regenerative Medizin“ [vgl. BmBF 2004] auch staatlicherseits nennenswert gefördert. Fachwelt wie Laien setzen große Hoffnungen in die regenerative Medizin, um mit ihr dem Ausfall von Zell-, Gewebe- und Organfunktionen therapeutisch begegnen zu können.

Für Zelltransplantationen sind aus Fettgewebe gewonnene mesenchymale Stammzellen, aus Gründen auf die im Weitern noch eingegangen wird, eine vielversprechende Quelle. Jedoch bedürfen die Kenntnisse über den Ausdifferenzierungsprozess von Stammzellen noch weiterer eingehender Untersuchungen. Mesenchymale Stammzellen zeigen im undifferenzierten Zustand spontane, langanhaltende Calcium-Oszillationen, die nach der Ausdifferenzierung nicht mehr zu beobachten sind. Folglich wird angenommen, dass die Oszillationen des intrazellulären Calciums mit dem Prozess der Ausdifferenzierung verknüpft sind [Li, Batra et al. 2004]. Deshalb untersucht die vorliegende Arbeit an undifferenzierten Stammzellen, die aus Fettgewebe gewonnen wurden, die Bedingungen der Calcium-Oszillation. Darüber hinaus wird die Synchronisation dieser Oszillationen zwischen benachbarten Zellen unter dem Einfluss von Stickstoffmonoxid (NO) und zugrundeliegender Signal- und Steuerungsprozesse erforscht. Damit will diese Arbeit zum Verständnis von intrazellulären und interzellulären Prozessen beitragen.

Zunächst wird im Folgenden ein Überblick über die grundlegenden Eigenschaften von Stammzellen und die spezielle Bedeutung von Stammzellen aus Fettgewebe gegeben. Daran anschließend wird auf Calcium als Botenstoff und Second Messenger eingegangen, sowie Funktion und Bedeutung des $IP_3$-Signalwegs aufgezeigt. Dem schließt sich eine Skizze der Calcium-Oszillationen und der Gap Junctions an. Da NO die Durchlässigkeit von Gap Junctions reguliert und die NO Synthase mit dem System der reaktiven Sauer-

stoffspezies (ROS) verbunden ist, werden NO und das ROS-System am Ende dieses Kapitels ebenfalls noch betrachtet.

## 2.1. Stammzellen

Stammzellen sind unspezialisierte Zellen, die das Potential haben sich nahezu unbegrenzt zu teilen und sich *in vivo* oder *in vitro* in zahlreiche spezialisierte Zelltypen auszudifferenzieren [Wislet-Gendebien, Hans et al. 2005]. Diese spezifische Fähigkeit von Stammzellen interessiert in der medizinischen Forschung vor allem auf dem Gebiet der Zellregeneration und der Herstellung von Geweben. Im Hinblick auf autologe Gewebetransplantation sind Stammzellen in den Fokus experimenteller Wissenschaft gerückt. In Abhängigkeit von ihrem Entwicklungspotential können Stammzellen nach drei Typen unterschieden werden:

*Totipotente* Zellen besitzen die Fähigkeit im menschlichen Körper zu jedweder spezialisierten Zelle heranzuwachsen. Desweiteren können sie auch sämtliche extraembryonale Gewebe bilden. Die einzigen bekannten totipotenten Zellen des menschlichen Körpers sind die Zellen der befruchteten Eizelle.

*Pluripotente* Stammzellen können sich in einen beliebigen Zelltyp des menschlichen Körpers ausdifferenzieren; sie sind aber nicht fähig extraembryonale Membranen zu bilden [Wobus 2001]. Die pluripotenten Stammzellen können ihrerseits in drei verschiedene Typen eingeteilt werden:

- Embryonale Stammzellen, die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste isoliert worden können.
- Embryonale Keimzellen, die aus ihren Vorläufern in den Keimdrüsen eines Fetus bei einer abgebrochenen Schwangerschaft isoliert werden können.

- Embryonale Krebszellen, die aus Keimzellkarzinomen isoliert werden können, wie sie manchmal in den Gonaden eines Fetus zu finden sind.

*Multipotente* Stammzellen (adulte Stammzellen) können sich nur in eine begrenzte Anzahl von Zelltypen differenzieren. Multipotente Stammzellen finden sich in adulten Organen, in denen sie tote oder beschädigte Zellen ersetzen können.

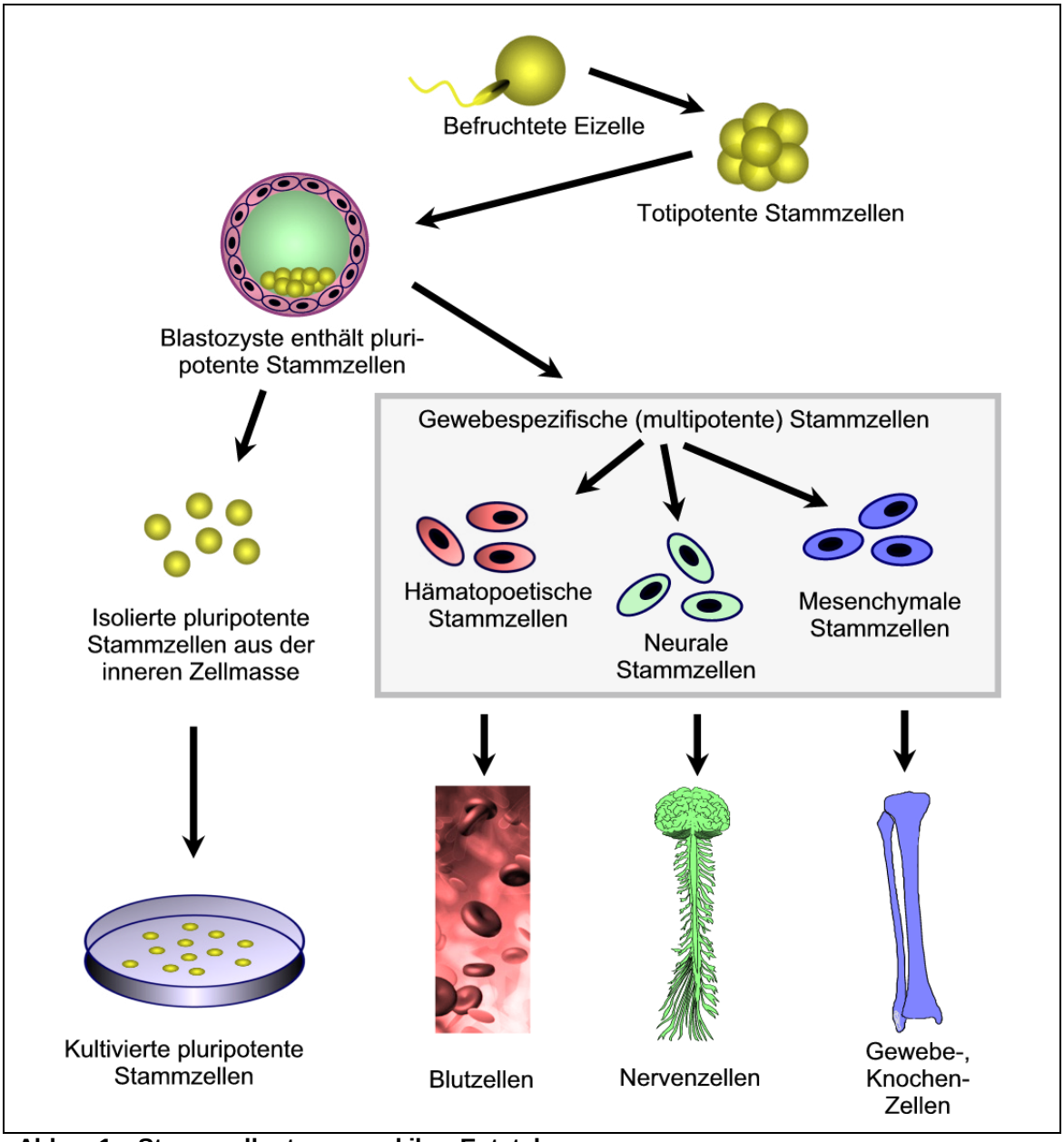


**Abb. 1: Stammzellentypen und ihre Entstehung**
Embryonale Stammzellen, die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste stammen, sind pluripotent und werden aus in vitro befruchteten Eizellen gewonnen.
(Nach einer Abbildung von http://www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006/07/stemcells2-GIF.gif)

### 2.1.1. *Embryonale Stammzellen*

In der frühen Embryogenese wird die befruchtete Eizelle zur Zygote. Beim Wachstum der Zygote durch Zellteilung zur Morula - mit ihren totipotenten Stammzellen - bilden sich im Weiteren die Blastozyste mit einer inneren Zellmasse und einem äußereren Trophoblasten heraus. Wie in Abb. 1 illustriert, werden embryonale Stammzellen (ESZ) aus einem frühen Embryoblast - die Zellmasse der Blastozyste - gewonnen. Die innere Zellmasse ist für den gesamten zukünftigen menschlichen Körper konstitutiv. Daraus folgt, dass alle ESZ die Fähigkeit besitzen, sich in die drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Entoderm) hin zu entwickeln [Wislet-Gendebien, Hans et al. 2005]. Derartige pluripotente Stammzellen werden aus *in vitro* befruchteten Eizellen gewonnen. Wegen der gesellschaftlichen und ethischen Problematik unterliegt die embryonale Stammzellenforschung strengen gesetzlichen Regelungen. Befruchtete Eizellen können der Forschung nur dann zugänglich gemacht werden, wenn das Einverständnis von Spenderseite vorliegt.

### 2.1.2. *Adulte Stammzellen*

Adulte Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die sich in adultem Gewebe oder Organen finden. Diese haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und können sich in alle wichtigen Zelltypen ausdifferenzieren [Orlic, Kajstura et al. 2001; Brazelton, Rossi et al. 2000]. Ihre Funktion ist es, das Ursprungsgewebe instand zu setzen, obgleich ihre Anzahl sehr gering ist. Ihre Entstehung ist bisher ungeklärt [NIH 2001]. Bisher wurden diese Zellen in rund 20 unterschiedlichen Geweben nachgewiesen, so z. B. im Gehirn, der Leber, dem Pankreas und dem Herzen, aber auch im Knochenmark, im Blut, im Skelettmuskel, der Haut, in Knochen und im Knorpel [Iscove 1990; Mackay, Beck et al. 1998; Zuk, Zhu et al. 2002; Pittenger, Mackay et al. 1999; Orlic, Kajstura et al. 2001; Kessinger, Bierman et al. 1991; Passier und Mummery 2002; Anversa und Nadal-Ginard 2002; NIH 2001]. Am bekanntesten sind wahrscheinlich jene mesenchymalen Stammzellen, die aus dem menschlichen Knochenmark gewonnen werden und auch bereits therapeutisch zum Einsatz kommen. So werden etwa nach einer Chemotherapie hämatopoetische Stammzellen transplan-

tiert, um das Knochenmark zu erneuern. Ein unbestreitbarer Vorteil der Verwendung von adultem Stammzellen ist deren Unbedenklichkeit in ethischer, sozialer und juristischer Hinsicht. Sie werden direkt vom Spender bzw. vom Patienten gewonnen und homolog bzw. autolog transplantiert. Autolog eingesetzt führen sie nicht zu immunologischen Reaktionen. Adulte Stammzellen wachsen zu Vorgängerzellen heran, bevor sie sich differenzieren. Auch Vorgängerzellen besitzen die Fähigkeit sich zu differenzieren, aber nur innerhalb eines gegebenen Gewebes. Menschliche Vorgängerzellen des Herzens können z.B. nur zu Zelltypen heranwachsen, die im Herzen zu finden sind.

Da der Ursprung der menschlichen adulten Stammzellen bisher nicht bekannt ist, ist es schwierig sie zu identifizieren. Üblicherweise zeichnen sie sich durch ihre Morphologie und Oberflächenmarker aus.

Adulte Stammzellen können sich in Zellen ausdifferenzieren, die abweichend von ihrem Ausgangsgewebe sind. Um ein Beispiel zu geben: Stammzellen des Knochenmarks (Mesoderm) können sich in Knochenzellen [Ferrari, Cusella–De Angelis et al. 1998; Gussoni, Soneoka et al. 1999] oder Herzmuskelzellen (Mesoderm) [Orlic, Kajstura et al. 2001] entwickeln. Experimentell konnte auch eine Ausdifferenzierung von Zellen zu Zellen eines anderen Keimblättertypus erreicht werden. Mesenchymale Stammzellen aus menschlichem Knochenmark (Mesoderm) sind zu neuronalen Zellen (Ektoderm) herangewachsen [Brazelton, Rossi et al. 2000; Mezey, Chandross et al. 2000]. Es muss nicht verwundern, dass die Forschung mit adulten Stammzellen eine vielversprechende Alternative zur Forschung mit embryonalen Stammzellen darstellt.

#### 2.1.2.1. Stammzellen aus Fettgewebe

Fettgewebe kann in routinemäßigen Verfahren abgesondert werden und stellt eine ausgezeichnete Quelle dar, um daraus mesenchymale Stammzellen zu gewinnen, die in der Regel als adipose tissue derived stem cells (ASCs) bezeichnet werden. Es konnte gezeigt werden, dass sie sich in Fett-, Knochen-, Knorpel- und Muskelgewebe differenzieren können[Kameritsch, Khandoga et al. 2005; Zuk, Zhu et al. 2002]. Auch die spontane endotheliale Differenzierung der ASCs ist beschrieben worden [Steffen 2008]. In anderen Studien ist belegt

worden, dass ASCs sich auch zu Herzzellen[Planat-Bénard, Menard et al. 2004] und neuronalen Vorgängerzellen[Ashjian, Elbarbary et al. 2003] entwickeln können. Damit wurde nachgewiesen, dass ASCs sogar zu Zellen anderer Keimblätter heranwachsen können, denn neuronales Gewebe ist ektodermalen Ursprungs und ASCs stammen aus mesenchymalem Gewebe.

In morphologischer Hinsicht ähneln ASCs den Fibroblasten, zeigen aber, ähnlich wie mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark verschiedene Oberflächenmarker von Stammzellen. Bisher wurden die folgenden Marker gefunden: CD13, CD29, CD44, CD90, CD105, SH-3 und STRO-1[De Ugarte, Alfonso et al. 2003]. Die für mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark typischen hämatopoetischen Marker (CD14, CD31 oder CD45) wurden jedoch bei ASCs *nicht* gefunden [Gimble und Guilak 2003].

Auch wenn die Fähigkeit der Differenzierung von ASCs nachgewiesen werden konnte, ist wenig über die physiologischen Eigenschaften der ASCs bekannt, die deren Zellteilung und Differenzierung möglicherweise steuern. Spontane Calcium-Oszillationen von undifferenzierten ASCs sind beschrieben worden, sowie der Zusammenhang zwischen der Ausdifferenzierung und der Einstellung dieser Oszillationen [Steffen 2008; Sauer, Steffen et al. 2007]. Weiter konnte gezeigt werden, dass Calcium-Oszillationen in mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark zelluläre Prozesse steuern [Dupont, Combettes et al. 2007]. Für ASCs sind derartige Untersuchungen jedoch nicht bekannt. Auch wurde der zelluläre Informationsaustausch mittels Gap Junctions und deren Beeinflussung durch NO an Astrozyten, HUVEC- (Humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen) und HeLa- (Epithelzellen eines Zervixkarzinoms der Helen Lane genannten Patientin) Zellen untersucht [Bolanos und Medina 1996; Patel, Mitchell et al. 2006], doch für ASCs fehlen entsprechende Untersuchungen.

## 2.2. Calcium

Calcium - chemisches Symbol Ca, Ordnungszahl 20, atomare Masse 40,078 - ist ein glänzendes silberweißes Metall. In seinem Elementarzustand kommt es

in der Natur nicht vor. Hauptsächlich ist Calcium im sedimentären Gestein als Bestandteil von Calcit, Dolomit und Gips zu finden.

Calcium ist für den lebenden Organismus unentbehrlich. Es ist bezogen auf die Masse im menschlichen Körper das fünft-wichtigste Element. Für die Anatomie, die Physiologie und die Biochemie des Organismus sowie der Zelle spielt es eine vitale Rolle, insbesondere auch für die Signalübertragung. Einerseits dient es als strukturelles Element im Knochen, andererseits ist es insbesondere für die physiologischen Vorgänge der Zelle erforderlich. In vielen zellulären Prozessen fungiert der Fluss der Calciumionen ($Ca^{2+}$) von und aus dem Zytoplasma als Signal. Das Skelett dient hierbei als mineralischer Speicher und gibt kontrolliert Calciumionen in den Blutstrom ab. Zirkulierendes Calcium kommt entweder in freier ionisierter Form vor oder ist gebunden an Blutproteine wie Serumalbumin. Das von der Nebenschilddrüse (Glandula parathyreoidea) abgesonderte Hormon (Parathormon) reguliert die Resorption von Calcium im Knochen.

Calciumionen sind wahrscheinlich der häufigste Botenstoff unter den sogenannten sekundären Botenstoffen, die zur Signalübertragung benutzt werden. Sie gelangen in das Zytoplasma entweder von außerhalb der Zelle über die Zellmembran durch Calciumkanäle (wie z.B. Calcium bindende Proteine) oder werden aus verschiedenen intrazellulären Calciumspeichern freigesetzt. In den Neuronen sind spannungsabhängige calciumselektive Ionenkanäle für synaptische Übertragungen von Bedeutung. Das Niveau von intrazellulärem Calcium wird durch Transportproteine reguliert, die es aus der Zelle heraus befördern. Calcium, welches in das Zellplasma eindringt, bewirkt eine bestimmte Aktion der Zelle, die wiederum vom Zelltyp abhängig ist. Zum Beispiel: die meisten sekretorischen Zellen setzen durch dieses Signal ihre Vesikel frei, Muskelzellen kontrahieren, Synapsen setzen synaptische Vesikel frei und gehen über in einen Prozess der neuronalen Plastizität, etc. [Löffler, Petrides et al. 2007].

### 2.2.1. *$IP_3$ Signalweg*

Der Inositoltriphosphat-Rezeptor ($IP_3R$) ist ein Membranglykoproteinkomplex der als $Ca^{2+}$ Kanal fungiert und durch Inositoltriphosphat ($IP_3$) aktiviert wird. Er

kommt fast überall im Gewebe vor, findet sich aber besonders häufig im Cerebellum. Die primäre Funktion des $IP_3$ ist die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischem Retikulum (ER) über den $IP_3R$. Zytosolisches Calcium ($Ca_{zyt}^{2+}$) bindet an Calmodulin (CaM), Calcineurin und andere Calcium bindende Proteine, um eine ganze Reihe von Signalereignissen herbeizuführen. Das $IP_3$ bildet sich zusammen mit Diacylglycerol - als Abspaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ($PIP_2$) - durch die zu der Familie der Enzyme gehörende Phospholipase C.

### 2.2.2. *Diacylglycerol*

Diacylglycerol (DAG) ist ein intrazellulärer Botenstoff, der sich vorübergehend in Zellen ansammelt, in denen Wachstumsfaktoren aktiv sind. Zellreflexe wie Wachstum oder Ausdifferenzierung werden durch die Bindung von DAG an Proteinkinase C (PKC) bewirkt. Erst durch diese Bindung wird die PKC aktiviert.

DAG wird rasch umgewandelt und hat nur einen vorübergehenden Effekt. Es kann zu Phosphoglyceriden phosphorylieren oder durch Hydrolysieren zu Glyzerol umgewandelt werden und bildet damit den Vorgänger für zahlreiche Hormone.

### 2.2.3. *Phospholipase C*

Unter den intrazellulären Signalleitungswegen kommt dem Signalweg der Phospholipase C (PLC) eine ganz besondere Bedeutung zu. PLC Signalübertragungen kommen in verschiedenen Formen vor und spielen eine Schlüsselrolle im Übertragungsprozess vieler Rezeptoren. Die Hauptfunktion besteht in der Hydrolysierung von $PIP_2$ zu DAG und $IP_3$. DAG ist für die weitere Aktivierung von PKC zuständig, während $IP_3$ zur Freisetzung von intrazellulären Calciumionen führt.

### 2.2.4. *Calcium-Oszillationen*

Calcium-Oszillationen sind in der periodisch kontrahierenden Herzmuskelzelle und der neuronalen Zelle schon seit längerem bekannt [Morita, Koketsu et al. 1980]. Mitte der 80er-Jahre wurden dann Calcium-Oszillationen in nicht erregbaren Oozyten entdeckt [Cuthbertson und Cobbold 1985; Fewtrel 1993]. In den Folgejahren wurden Calcium-Oszillationen in einer ganzen Reihe von Zelltypen gefunden, ohne dass deren biologische Funktion zunächst bekannt war [Schuster, Marhl et al. 2002]. Calcium-Oszillationen sind bisher in Leberzellen [Prank, Waring et al. 2005], Fibroblasten [Vay, Hernandez-Sanmiguel et al. 2007], Azinuszellen des Pankreas [Menteyne, Burdakov et al. 2006] und Astrozyten [Morita, Higuchi et al. 2003] entdeckt worden. Ihre Bedeutung liegt im Zellwachstum, in der Sekretion von Hormonen, in der Aufnahme von Sinneseindrücken und in der neuronalen Signalgebung [Day, McGuinness et al. 2000; Clapham 2007].

*Spontane* Calcium-Oszillationen sind in sich differenzierenden embryonalen Stammzellen beschrieben worden [Kapur, Mignery et al. 2007; Sauer, Hofmann et al. 1998]. In mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark wurden sie erstmals 2002 von Kawano [Kawano, Shoji et al. 2002] untersucht. Seither ist das Interesse an Calcium-Oszillationen bei mesenchymale Stammzellen stetig gewachsen [Li, Sun et al. 2005; Li, Deng et al. 2006; Heubach, Graf et al. 2004; Zahanich, Graf et al. 2005; Kawano, Otsu et al. 2003].

Der Kernprozess der Calcium-Oszillation ist die Calciumfreigabe aus dem Speicher des Endoplasmatischen Retikulums (ER) über den Inositoltriphosphat Signalweg ($IP_3$). $IP_3$ und Diacylglycerol (DAG) entstehen durch die Spaltung von membranständigem Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat ($PIP_2$) durch Phosphoinositid-Phospholipase C (auch Phospholipase C (PLC)). Die verschiedenen Isoformen der PLC werden entweder durch hormonverkettete Guaninnucleotid-bindende Proteine (G-Proteine), durch Proteinkinase oder durch das Calcium selbst [Schuster, Marhl et al. 2002] aktiviert.

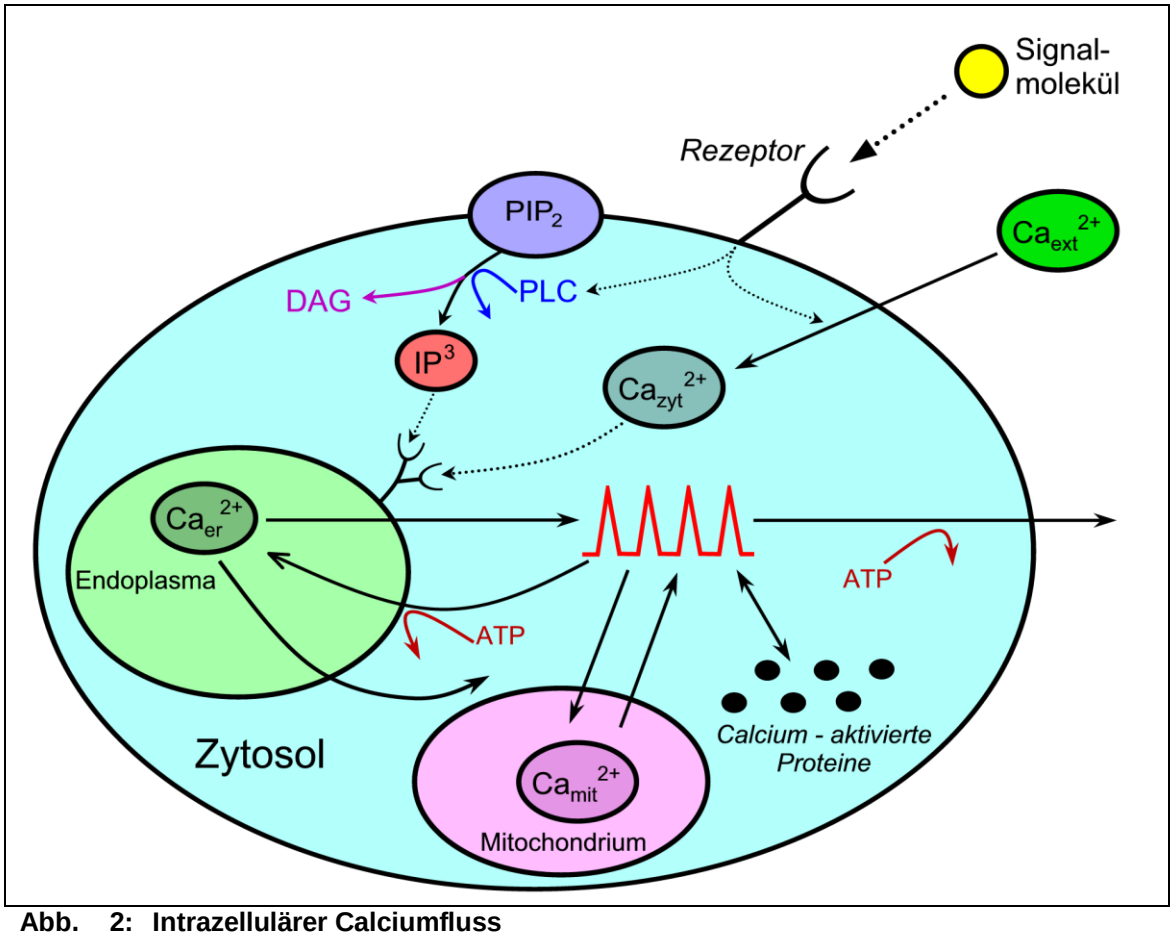


**Abb. 2: Intrazellulärer Calciumfluss**
Schematisches Diagramm der Entstehung von Calcium-Oszillationen durch $IP_3$ Konzentration: zytosolisches Calcium, endoplasmatisches Calcium, mitochondriales Calcium, proteingebundenes zytosolisches Calcium und extrazelluläres Calcium. (Nach einer Abbildung von http://pinguin.biologie.uni.jena.de/bioinformatik/Forschung/figs/calcium.PNG)

Die Öffnung des $IP_3$-Rezeptors kann entweder in Gegenwart von $IP_3$ oder von intrazellulärem Calcium (Calcium induzierte Calciumfreigabe) geschehen [Berridge 1993; Bezprozvanny und Ehrlich 1995]. Auf der anderen Seite kann die Abschaltung des $IP_3$-Rezeptors durch eine hohe Konzentration intrazellulären Calciums hervorgerufen werden [Bezprozvanny und Ehrlich 1995]. Jedoch ist bis heute nicht genau bekannt, wie andere Vorgänge in der Signalkaskade, wie z.B. die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) durch DAG und Calcium oder die Phosphorylierung des Inositoltriphosphat Rezeptors ($IP_3R$) durch PKC, die Öffnung des $IP_3$-Rezeptors beeinflussen [Schuster, Marhl et al. 2002]. Somit sind bisher fünf verschiedene Arten von Calciumströmen der Zelle bekannt:

- Zytosolisches Calcium ($Ca_{zyt}^{2+}$)
- Endoplasmatisches Calcium ($Ca_{er}^{2+}$)
- Mitochondriales Calcium ($C_{mit}^{2+}$)
- Zytosolisches Calcium mit Proteinbindung
- Extrazelluläres Calcium

In einigen Arbeiten wird der Einfluss des Membranpotentials ebenfalls diskutiert, insbesondere bei Zellen, bei denen Calcium ein Aktionspotential auslöst [Schuster, Marhl et al. 2002]. Auch die Frage wie extrazelluläres Calcium intrazelluläre Calcium-Oszillation beeinflusst, ist bisher noch offen [Schuster, Marhl et al. 2002]. Jedoch ist der Nachweis geführt, dass das Entfernen von extrazellulärem Calcium in endodermalen Zellen [Sauer, Hofmann et al. 1998] und in HeLa-Zellen [Bootman, Young et al. 1996; Sauer, Hofmann et al. 1998] die intrazelluläre Calcium-Oszillation abschaltet. Bei anderen Zelltypen, z.B. Pankreaszellen, ist jedoch extrazelluläres Calcium für die Oszillation nicht notwendig [Zimmermann und Walz 1997].

In keinem der bisher existierenden mathematischen Modelle der Calcium-Oszillation werden alle fünf Möglichkeiten der Calciumströme gleichzeitig betrachtet. Die Modelle unterscheiden sich durch unterschiedliche Anzahl und Auswahl der möglichen Kombinationen. Im Modell mit der kleinsten Dimension werden nur zwei der verschiedenen möglichen Calciumströme beschrieben [Schuster, Marhl et al. 2002]. In den meisten Arbeiten wird die Frequenz der Oszillationen und nicht die Amplitude als Informationsträger gesehen [Dupont und Goldbeter 1998; Goldbeter 1996; Kummer, Olsen et al. 2000; Meyer und Stryer 1988]. Bei dieser Betrachtungsweise stellt sich das Problem, dass es - um den Übergang der Calcium-Oszillation zu einem stabilen Signal mit zellulärer Auswirkung erklären zu können - ein Protein geben muss, welches die verschiedenen Frequenzen unterscheiden kann. Calcium-Oszillationen sind also ein komplexer Prozess, dem eine wichtige Rolle in der intra- und interzellulären Signalübermittlung zukommt.

## 2.3. Gap Junctions

Informationen zwischen Zellen können auf ganz verschiedene Art und Weise transportiert werden. Die direkte Kommunikation geschieht durch Gap Junctions. Dies sind Poren in der Zellmembran, die das Zytosol der beiden Zellen zu einem funktionalen Synzytium verbinden. Zum Beispiel wirken Gap Junctions als elektrische Synapse bei neuronalen und kardialen Zellen. Die elektrische Aktivität durch die Gap Junctions hindurch zeigt ihre Durchlässigkeit für kleine Ionen auf [Hick 1995]. Aber Gap Junctions ermöglichen nicht nur Ionenaustausch, sondern auch die Übertragung ungeladener Moleküle wie Nucleotide, Aminosäuren, Wasser, Glukose etc. Die maximale Diffusion einer Gap Junction liegt bei einem Molekulargewicht von ca. 1000 Dalton [Gratzl 2004].

Gap Junctions sind komplexe Proteinstrukturen innerhalb der Zellmembran und zwischen Zellmembranen benachbarter Zellen. Eine einzelne Gap Junction wird durch zwei Halbkanäle (Hemichannels) konstituiert, die durch je eine der beiden verbundenen Zellen bereitgestellt wird und die innerhalb des Interzellulärraums miteinander verbunden sind. In Abhängigkeit von unterschiedlichen Proteinen und deren Struktur stellt sich ein gerichteter oder ungerichteter Transport ein [Shestopalov und Panchin 2007]. Die innere Struktur von Gap Junctions wird durch sechs Connexine und deren jeweiligen vier Transmembran-Regionen gebildet. Diese, Connexon genannte, ringförmige Struktur bildet einen Halbkanal. Die Halbkanäle können durch gleiche oder durch unterschiedliche Connexine aufgebaut sein, worüber die Durchlässigkeit der Gap Junction bestimmt wird [Schmidt, Lang et al. 2005]. In der Nomenklatur der Connexine setzt sich der Name aus der Abkürzung „Cx“ und der theoretischen molaren Masse zusammen (z.B. Cx40 = Connexin mit einem Molekulargewicht von 40 kDa).

In den meisten humanen Geweben konnten Gap Junctions nachgewiesen werden. Zu den wenigen Ausnahmen bei denen keine Gap Junctions gefunden wurden, zählen Spermien, Erythrozyten, Thrombozyten und ausdifferenzierte Skelettmuskeln [Young, Cohn et al. 1987].

## 2.4. Stickstoffmonoxid

Das Gas Stickstoffmonoxid, eine chemische Verbindung aus Stickstoff und Sauerstoff, hat die Summenformel NO. Es hat eine wichtige Bedeutung als Zwischenprodukt in der Chemischen Industrie und ist allgemein bekannt wegen seiner Umweltbelastung („Luftverschmutzung“), da es durch die Verbrennungsmotoren von Kraftfahrzeugen, wie auch durch Heizkraftwerke entsteht und in Verbindung mit Sauerstoff ($2\ NO + O_2$) zu Stickstoffdioxid ($NO_2$) oxidiert [Buttler, Nicholson et al. 2003].

Obwohl von erstaunlich einfacher molekularer Struktur, besitzt NO eine grundlegende Bedeutung auf dem Gebiet der Neurologie, Physiologie und der Immunologie, da es eine wichtige Rolle im Körper von Lebewesen hat. Es muss somit nicht verwundern, das NO im Jahre 1992 sogar zum „Molekül des Jahres“ proklamiert wurde [Culotta und Koshland Jr. 1992].

NO diffundiert frei durch Membranen, da es ein ungepaartes Elektron besitzt und somit elektrisch neutral ist. Diese Eigenschaft macht NO zu einem idealen transienten Signalmolekül sowohl zwischen benachbarten Zellen, als auch innerhalb von Zellen [Stryer, Tasker et al. 1995].

Endogenes NO entsteht biosynthetisch aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff mittels des Enzyms NO Synthase (NOS) und durch Reduktion innerorganischer Nitrate. Es gibt drei Isoformen des NOS-Enzyms: endothelial (eNOS, *auch: NOS3, NOS-III*), neuronal (nNOS, *auch NOS1, NOS-I*) und induzierbar (iNOS *auch NOS2, NOS-II*) – jedes mit separaten Funktionen. Das neuronale Enzym nNOS und die endotheliale Isoform eNOS sind Calcium abhängig und produzieren eine geringe Menge Gas. Beide Isoformen fungieren als zelluläre Signalmoleküle. Die induzierte Isoform iNOS ist dagegen von Calcium unabhängig und produziert eine höhere Gasmenge, die zytotoxisch sein kann.

Das NO Molekül ist ein freies Radikal (siehe unten „Reaktive Sauerstoffspezies und freie Radikale“), womit sich seine hohe Reaktivität erklärt. Gleichwohl hat es in biologischen Systemen eine Lebensdauer (Halbwertszeit) von einigen Sekunden.

NO ist eines der wenigen bekannten gasförmigen Signalmoleküle und besitzt für Wirbeltiere eine Schlüsselstellung als biologischer Botenstoff bei einer Reihe von biologischen Prozessen. NO ist auch bekannt als „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) [Buttler, Nicholson et al. 2003]. Das Endothel von Blutgefäßen gebraucht NO, um der umgebenden glatten Muskulatur Entspannung zu signalisieren und darüber Vasodilatation und erhöhten Blutdurchfluss zu bewirken. Verstärkt ist die Produktion von NO bei Menschen, die in großer Höhe leben, da es dazu dient Hypoxie zu vermeiden. Nitroglyzerin und Amylnitrit dienen als Vasodilatoren, da sie im Körper NO freisetzen. Weitere Auswirkungen von NO sind beispielsweise: Blutgefäßdilatation, Erregungsübertragung zwischen den Nervenzellen, Veränderung des Haarzyklus und Peniserektion.

NO trägt zur Homöostase von Gefäßen bei, in dem es die Kontraktion vaskulärer glatter Muskulatur und deren Wachstum unterbindet. Gleichzeitig verhindert NO die Blutplättchenaggregation und die Leukozytenadhäsion zum Endothel. NO wird auch von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten als Teil des menschlichen Immunsystems über die iNOS generiert. Zytotoxische Mengen des NO werden zur Immunabwehr produziert, denn NO ist für Bakterien und andere humane Pathogene toxisch [Furchgott 1999]. Dieses kann unter bestimmten Bedingungen zu unerwünschten Rückwirkungen führen: Eine fulminante Infektion (Sepsis) bewirkt eine exzessive Produktion von NO durch die Makrophagen, was zur Vasodilatation (Ausweitung der Blutgefäße) führt; vermutlich einer der Hauptgründe von Hypotonie (niedriger Blutdruck) bei Sepsis.

NO wirkt auch am Herzmuskel, um die Kontraktionsfähigkeit und die Herzfrequenz herabzusetzen. Auch an Reperfusionsschäden kann NO beteiligt sein, wenn - nach einer zeitweisen Ischämie - mit der Wiederfreigabe des Blutstromes eine überhöhte Menge NO produziert wird und diese mit Hyperoxiden reagieren und das zerstörerische freie Radikal Peroxinitrit produzieren.

Auf zellulärer Ebene haben Studien ergeben, dass NO als Regulationsmolekül für Gap Junctions fungiert. Bisher konnte dies für endotheliale Zellen [Hundhausen 2003], für Neuronen [Patel, Mitchell et al. 2006], in der Spermatogenese [Lee und Cheng 2008], für retinale Zellen bei Hasen [Xin und Bloomfield

2000], für HUVEC und HeLa Zellen [Kameritsch, Khandoga et al. 2005] und für Zellen des Neocortex [Rörig und Sutor 1996]) gezeigt werden.

## 2.5. Reaktive Sauerstoffspezies und freie Radikale

Freie Radikale sind Chemikalien mit einem ungepaartem Elektron auf ihrer äußersten Schale; zu ihnen gehören die reaktiven Sauerstoffspezies - eng. reactive oxygen species (ROS). Letztere sind höchst reaktive Ionen des Sauerstoffmoleküls und haben folgende Charakteristika : kurze Lebensdauer, chemische Instabilität und ein hohes Reaktionspotential mit anderen Molekülen [Löffler, Petrides et al. 2007]. ROS werden z.B. bei radioaktiver Strahlung, Zigarettenrauch und Pestiziden vermehrt freigesetzt. Im menschlichen Körper entstehen ROS als Nebenprodukt der Atmungskette in den Mitochondrien. In Makrophagen werden sie zur zellulären Immunabwehr durch die NADPH-Oxidase [Han, Williams et al. 2001; Rada 2008] gebildet. Auch werden ROS zum Aufbau einiger körpereigener Hormone benötigt (z.B. Thyroxin) und spielen eine Rolle bei den Signalwegen der Zellen [Rhee 1999]. Im physiologischen Zustand befinden sich die ROS immer im dynamischem Gleichgewicht mit Antioxidantien und der NO Produktion. NO und ROS sind im Zellsystem als Gegenspieler bekannt [Ignarro 2000]. Wohingegen Antioxidantien Stoffe sind, die freie Radikale neutralisieren können, da sie ein Elektron abgeben können ohne selbst reaktiv zu werden. Zu den bekanntesten Antioxidantien gehören: Vitamin C und E, Glutathion, Betakarotin und Koenzym Q. Die Überproduktion von ROS ist in der Pathogenese einiger Krankheiten beschrieben worden. Eine Beteiligung von ROS in Entzündungsprozessen, Fibrose, Karzinogenese, Arteriosklerose ist in der Literatur zu finden [Ignarro 2000]. Außerdem hat ROS einen bedeutenden Anteil an der Zellalterung [Stadtman 1992].

# 3. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

In dieser Arbeit sollen die Calcium-Oszillationen von ASCs charakterisiert werden. Es gilt zu überprüfen, ob es - in Hinblick auf Amplitude und Frequenz - verschiedene Formen von Calcium-Oszillationen gibt und ob sich typische Oszillationsformen feststellen lassen.

Es gilt mehr Informationen über die intrazelluläre Generation der Calcium-Oszillationen zu erlangen. Folglich ist die Calciumquelle, die für Oszillation nötig ist und der intrazelluläre Signalweg zu bestimmen. Zu diesem Zweck werden $IP_3$–DAG und PLC untersucht. Nicht zuletzt interessiert auch durch welche Rezeptoren Calcium-Oszillationen ausgelöst werden. Zu diesem Zweck werden $IP_3$-Rezeptoren genauer betrachtet.

Das Vorhandensein und die Beteiligung von Gap Junctions an den Oszillationen wird überprüft, um mehr über das Verhalten einer ganzen Zellpopulation im Hinblick auf deren Kommunikation als Gruppe zu erfahren.

Auch NO und seine Wirkungen als Regulator der Permeabilität der Gap Junctions wird untersucht. In diesem Zusammenhang gilt es, sowohl NOS-Inhibitoren, Radikalfänger, als auch NO Donatoren zu betrachten.

Diese Untersuchungen geben Einblick in die Charakteristika, die Generation und die Möglichkeiten der Veränderung von Calcium-Oszillationen undifferenzierter Stammzellen. Deren Oszillationen sind – so die gängige These [Sun, Lipsky et al. 2006; Pierce, Murphy et al. 2007] nicht nur eine Kommunikationsform, sondern darüber hinaus für die Entwicklung und Ausdifferenzierung der ganzen Population bestimmend, da nach der Ausdifferenzierung keine Calcium-Oszillationen mehr nachzuweisen sind.

# 4. MATERIAL UND METHODEN

## 4.1. Material

### 4.1.1. *Firmen*

- Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland
- Calbiochem-Novabiochem GmbH, 65796 Bad Soden, Deutschland
- Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland
- Gilson International B.V., 65520 Bad Camberg, Deutschland
- Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Deutschland
- Heidolph Elektro GmbH, 93309 Kelheim, Deutschland
- Heraeus Instruments, 63452 Hanau, Deutschland
- Hirschmann® Laborgeräte, 74246 Eberstadt, Deutschland
- Invitrogen, 76131 Karlsruhe, Deutschland
- Leica, 64625 Bensheim, Deutschland
- Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
- Roth, 76231 Karlsruhe, Deutschland
- PAA, 35091 Cölbe, Deutschland
- Sarstedt, 51588 Nümbrecht, Deutschland
- Sartorius, 37075 Göttingen, Deutschland
- Sigma (-Aldrich), 82024 Taufkirchen, Deutschland
- Zeiss, 07745 Jena, Deutschland

### 4.1.2. *Geräte und Laborbedarf*

| **Gerät** | **Firma** |
|---|---|
| 24-Multiwell Schalen | Falcon™, Greiner |
| Deckgläser | Roth |
| Immersionsöl | Roth |
| Inkubator | HERAcell® 240, Kendro |
| Lichtmikroskop | Zeiss® |

| Gerät | Firma |
|---|---|
| Konfokales Laser Mikroskope TCS SP2 | Leica |
| Kryoröhrchen | Biochrom |
| Mikro Röhrchen 1,5 ml | Sarstedt |
| Objektträger | Roth |
| pH Meter digital | Sartorius |
| Pipetten: (Standard) | Pipetus® (Hirschmann®) |
| - (Plastik) | Becton Dickinson |
| - (Glas) | Roth |
| Pipettiergerät -Pipetman® | Gilson |
| Sterilbank | Heraeus® |
| Vortexer | Heidolph |
| Waage | Sartorius |
| Wasserbad | Hirschmann |
| Zellkulturflaschen | Falcon™, Greiner |
| Zellkulturröhrchen | Greiner |
| Zentrifuge | Labofuge® 300, Heraeus® |

**Tab. 1: Verwendete Geräte und Hersteller/Lieferant**

## 4.1.3. *Chemikalien und Medien für die Zellkultur*

### 4.1.3.1. Chemikalien

| Type | Firma |
|---|---|
| HAM's F-10 mit Glutamin | PAA, Sigma |
| Trypsin/EDTA | Invitrogen |
| MEM Aminosäuren | Biochrom |
| Penicillin / Streptomycin | PAA |
| L- Glutamin | PAA |
| β-Mercaptoethanol | Sigma |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Calbiochem |

| Type | Firma |
|---|---|
| Fötales Rinderserum (FBS) | Sigma |

**Tab. 2: Verwendete Chemikalien für die Zellkultur und Hersteller/Lieferant**

#### 4.1.3.2. Medien

***HAM's F-10 Medium***

Das HAM's F-10 Medium ist ursprünglich für Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster (CHO) entwickelt worden. Heutzutage wird es jedoch für vielfältige andere Zellen eingesetzt, unter anderem für adulte Stammzellen. Für die Versuche zu dieser Arbeit wurde dem Medium Aminosäure, Antibiotika, Mercaptoethanol und hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum hinzugefügt. Die Inaktivierung des Rinderserums wurde durch eine Erhitzung auf 56 °C für die Dauer von 35 Minuten bewirkt.

Die genaue Zusammensetzung des in den Versuchen verwendeten HAM's F-10 Nährmediums ist wie folgt:

| | |
|---|---|
| 500 ml | HAM's F-10 mit L-Glutamin |
| 10 % | Fötales Rinderserum (hitzeinaktiviert) |
| 5 ml | β-Mercaptoethanol (0,1 mM) |
| 1 % | MEM Aminosäure (2 mM) |
| 2,5 ml | L-Glutamin (2 mM) |
| 2,5 ml | Penicillin / Streptomycin (100 M/ml) |

**Tab. 3: Zusammensetzung des verwendeten HAM's F-10 Nährmediums**

***Gefriermedium***

Das Medium zum Einfrieren der Zellen setzt sich wie folgt zusammen:

| | |
|---|---|
| 50 % | Fötales Rinderserum (hitzeinaktiviert) |
| 40 % | HAM's F-10 Nährmedium |
| 10 % | DMSO |

**Tab. 4: Zusammensetzung des verwendeten Gefriermediums**

## 4.1.4. *Chemikalien für die Experimente*

| **Type** | **Name** | **Hersteller** |
|---|---|---|
| NOS-Inhibitor | L-NAME | Calbiochem |
| | L-NMMA | Calbiochem |
| | ETU | Calbiochem |
| | DPI | Calbiochem |
| NO Donator | SNP | Calbiochem |
| | SNAP | Calbiochem |
| Radikalfänger | NMPG | Sigma |
| | Trolox | Calbiochem |
| | Rutin | Calbiochem |
| | Luteolin | Calbiochem |
| Gap Junction Inhibitor | 1-Heptanol | Sigma |
| | Carbenoxolone | Sigma |
| $IP_3$ Inhibitor | 2-APB | Sigma |
| NADPH-Oxidase Inhibitor | Apocynin | Calbiochem |
| Phospholipase C Inhibitor | U-73122 | Calbiochem |
| *Kontrolle hierzu* | U-73343 | Calbiochem |
| SERCA Inhibitor | Thapsigargin | Calbiochem |
| *Kreuzprobe* | DMSO | Sigma |
| | Medium (HAM's F-10) | PAA, Sigma |
| *Fluoreszenzfarbstoffe* | Fluo-3 AM(*) | Molecular Probes |
| | Fluo-4 AM(*) | Molecular Probes |
| | Calcein AM | Molecular Probes |

**Tab. 5: Verwendete Chemikalien für die Experimente und Hersteller/Lieferant**

*) Die Produktion und der Verkauf von Fluo-3 AM wurde während der Versuche eingestellt. Der Hersteller hat es durch das Nachfolgeprodukt Fluo-4 AM ersetzt.

### 4.1.4.1. NOS-Inhibitoren

***L-NAME***

$N^G$-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME) ist ein zellpermeables Analogon von eNOS mit vergleichsweise langsamer reversibler Enzymhemmung [Rees, Palmer et al. 1990].

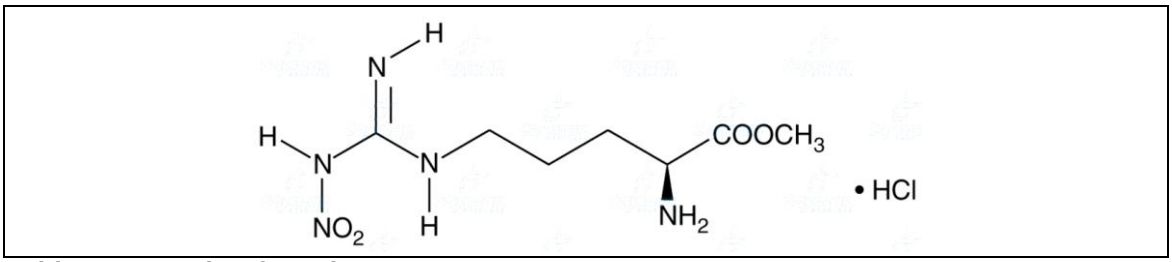


**Abb. 3: Strukturformel L-NAME**

***L-NMMA***

$N^G$- Mono Methyl-L-Arginin (L-NMMA) ist ein zellpermeables Analogon von Arginin und ein kompetitiver Inhibitor aller drei NOS-Isoformen [Reif und McCreedy 1995].

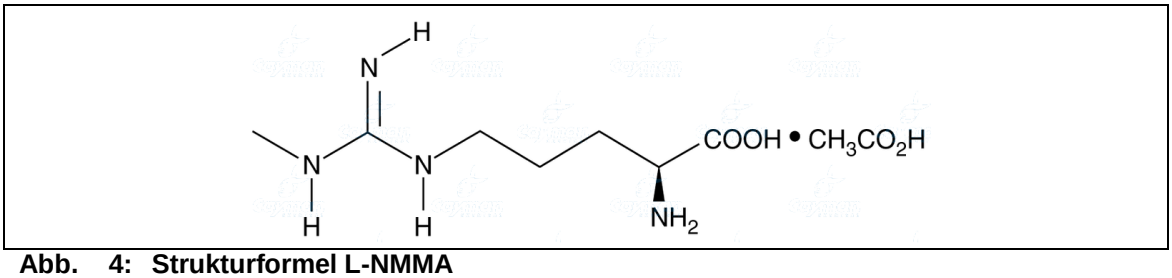


**Abb. 4: Strukturformel L-NMMA**

***ETU***

2-Ethyl-2-thiopseudourea, Hydrobromide (ETU) - anderweitig auch mit Ethyl-TU abgekürzt - ist ein zellpermeabler kompetitiver Inhibitor des humanen endothelialen, neuronalen und induzierbaren NOS-Isoenzyms [Southan, Szabo et al. 1995].

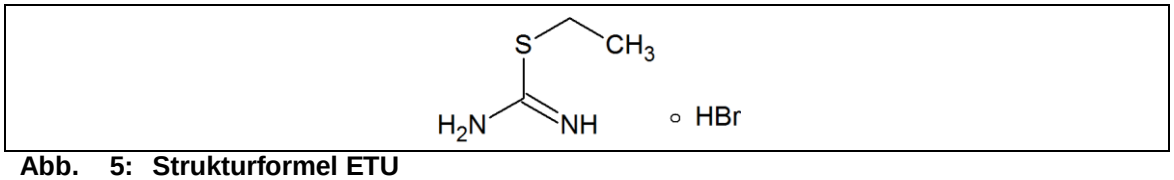


**Abb. 5: Strukturformel ETU**

***DPI***

Diphenyliodoniumchlorid (DPI) ist ein zellpermeabler irreversibler Inhibitor der eNOS. Durch die Unterdrückung von Flavoproteinen wirkt es auch als Enzymhemmer für die NADPH-Oxidase [O'Donnell, Tew et al. 1993].

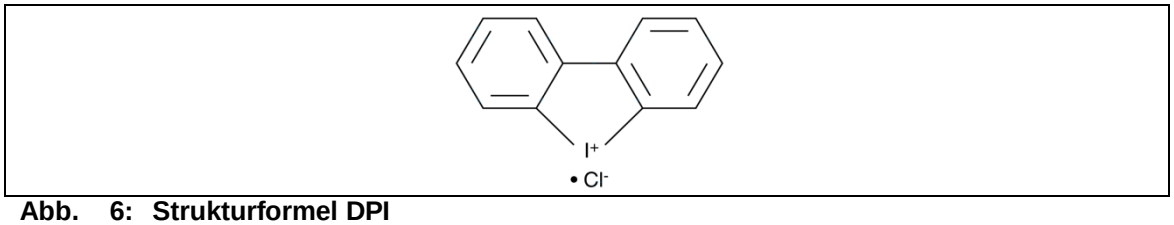


**Abb. 6: Strukturformel DPI**

### 4.1.4.2. NO Donatoren

***SNP***

Nitroprussid-Natrium-Dihydrat - im angelsächsischen sodium nitroprusside dihydrate (SNP) - ist ein potenter NO Donator [Kowaluk, Seth et al. 1992].

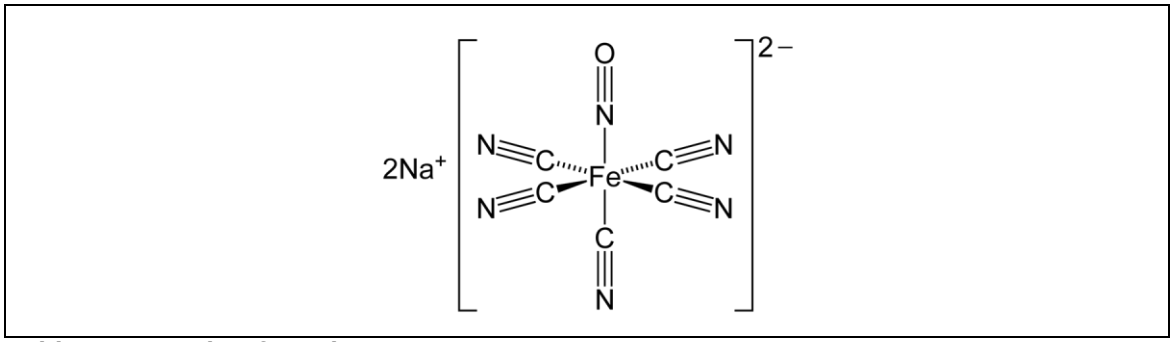


**Abb. 7: Strukturformel SNP**

***SNAP***

S-Nitroso-N-Acetyl-Penicillamin (SNAP) ist ein NO Donator, der merklich die lösliche Guanylatcyclase aktiviert [Henry, Drummer et al. 1989].

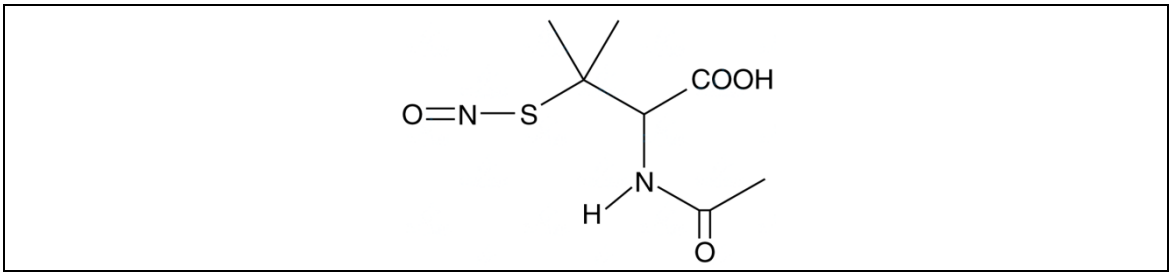


**Abb. 8: Strukturformel SNAP**

### 4.1.4.3. Radikalfänger

***N-(2-Mercapto-propionyl)-glycin***

N-(2-Mercapto-propionyl)-glycin (NMPG) - auch als Tiopronin bezeichnet - ist ein zellschützendes Antioxidans. Es vermindert ROS, indem der Pool zelleigener Radikalfänger erhöht wird [De Flora, Izzotti et al. 1991].

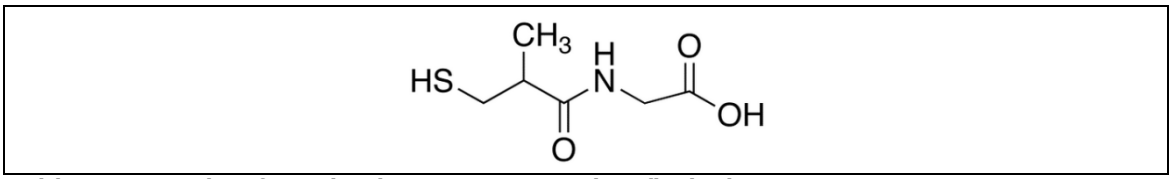


**Abb. 9: Strukturformel N-(2-Mercapto-propionyl)-glycin**

***Trolox***

Trolox, 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure ist ein Analogon zu α-Tocopherol. Als ein zellpermeables Vitamin E-Derivat ist es ein wirksames Antioxidans [Wu, Hashimoto et al. 1990].

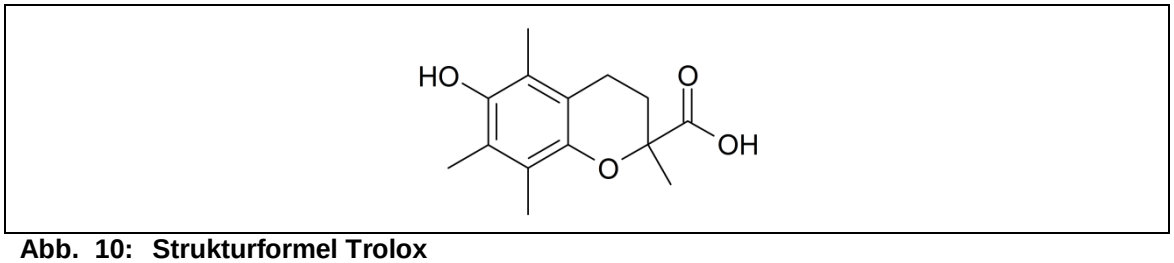


**Abb. 10: Strukturformel Trolox**

### *Rutin*

Rutin - Quercetin-3-O-rutinosid - Vitamin $C_2$ - ist ein polyphenolisches Flavonoid, das als Antioxidans wirkt. Es kann die Peroxid-Produktion in Gliazellen abschwächen, in dem es als freier Radikalfänger agiert. Auch werden Nierenzellen durch Rutin von oxidativen Schäden geschützt [Van Acker, Tromp et al. 1995].

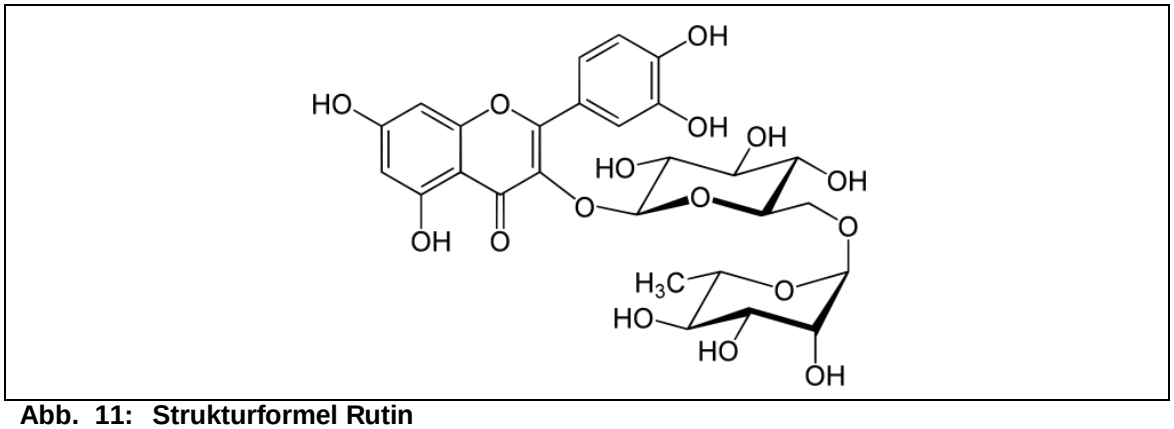


**Abb. 11: Strukturformel Rutin**

### *Luteolin*

Luteolin, 3′,4′,5,7-Tetrahydroxyflavone ist ein nicht oxidierendes Flavonoid und ein freier Radikalfänger. Darüber hinaus ist interessant, dass es bei Leberzellen von Ratten die Aktivität der zytosolischen Glutathion S-Transferase unterbindet [Korkina und Afanas'ev 1997].

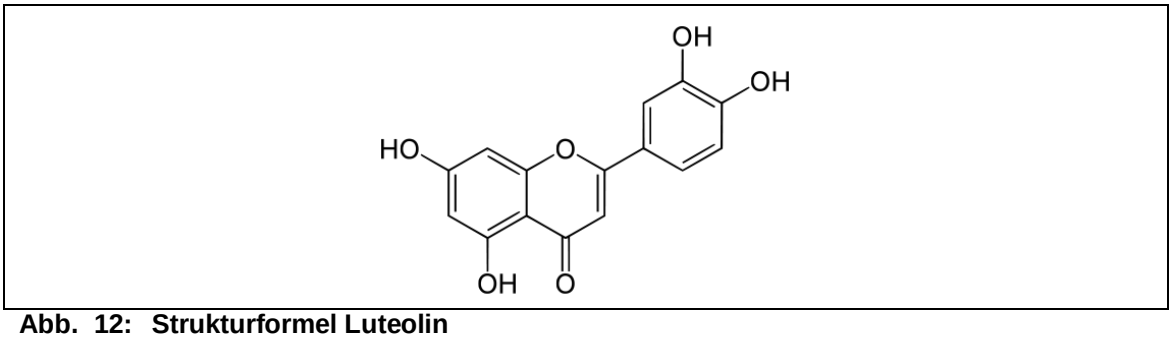


**Abb. 12: Strukturformel Luteolin**

### 4.1.4.4. Gap Junction Inhibitoren

#### *1-Heptanol*

1-Heptanol ist ein Alkohol, der die Gap Junctions unterbindet und die zelluläre Kommunikation blockiert, ohne dabei die Natriumkanalaktivität signifikant zu verändern [Christ, Spektor et al. 1999]

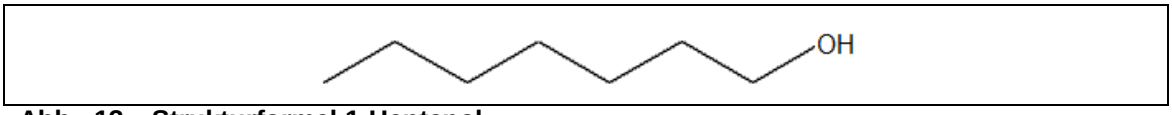


**Abb. 13: Strukturformel 1-Heptanol**

#### *Carbenoxolone*

Carbenoxolone (CBX) - auch Glycyrrhetinhemisuccinate-Dinatrium - ist ein mittelgradig lipophiles Glycyrrhetinsäure Derivat, von dem bekannt ist, dass es direkt als Entkoppler auf Gap Junctions wirkt, ohne jedoch die Ionenkanäle zu beeinflussen [Davidson und Baumgarten 1988].

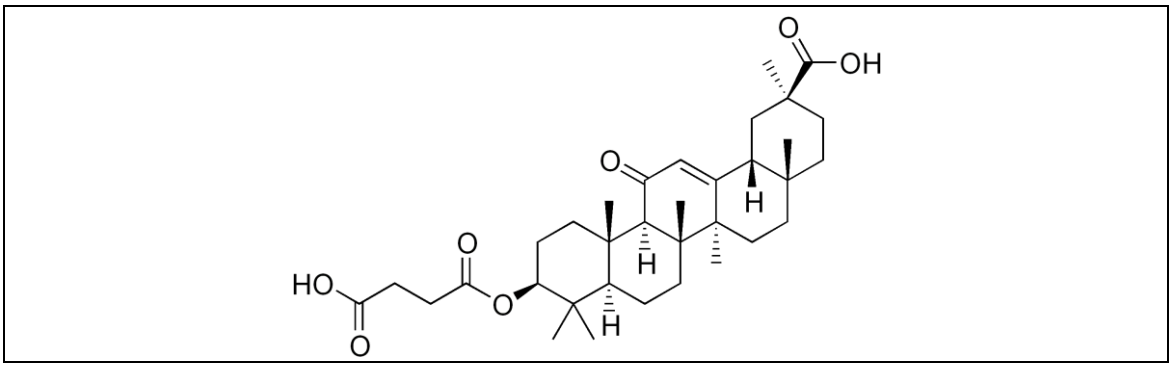


**Abb. 14: Strukturformel Carbenoxolone**

### 4.1.4.5. $IP_3$ Inhibitoren

***2-Aminoethyl-diphenyl-borat***

2-Aminoethyl-diphenyl-borat (2-APB) ist ein membrandurchlässiger Modulator für die intrazelluläre $IP_3$-induzierte Calciumfreigabe [Maruyama, Kanaji et al. 1997].

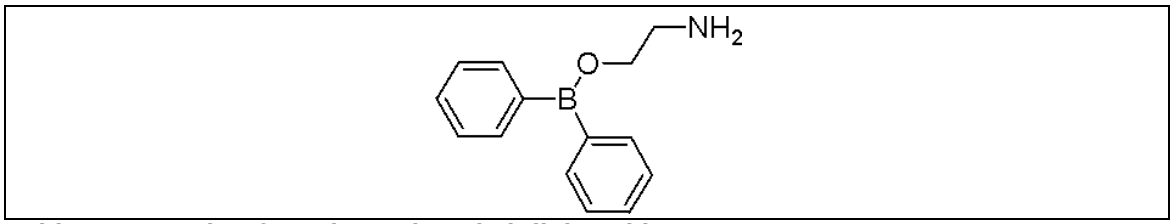


**Abb. 15: Strukturformel 2-Aminoethyl-diphenyl-borat**

### 4.1.4.6. NADPH-Oxidase Inhibitor

***Apocynin***

Apocynin - 4-Hydroxy-3-methoxyacetophenon - zählt zu den zelldurchlässigen Katecholaminen und verhindert selektiv die NADPH-Oxidase. Außerdem verhindert es die intra- und extra-zytoplasmatische ROS Produktion [van den Worm, Beukelman et al. 2001].

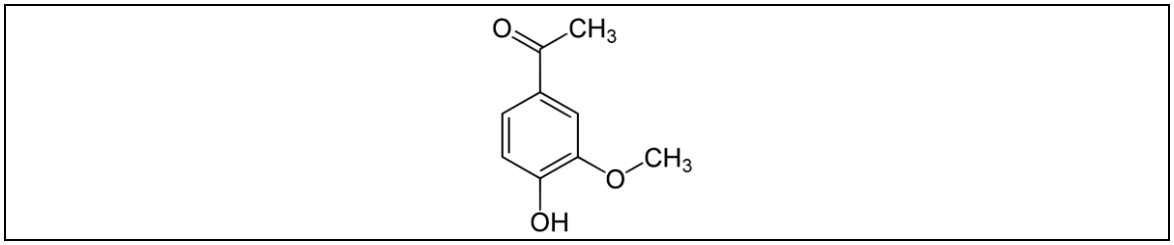


**Abb. 16: Strukturformel Apocynin**

### 4.1.4.7. Phospholipase C Inhibitor und Kontrollsubstanz

***U-73122***

Der Inhibitor U-73122, ein Aminosteroid, inhibiert die PLC und darüber die Hydrolyse des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphats ($PIP_2$) zu $IP_3$. Die Aktivierung

der PLC wird unterbunden, indem die Ankoppelung von G-Proteinen unterdrückt wird. Jedoch bleibt die Produktion von cAMP unverändert [Yule und Williams 1992].

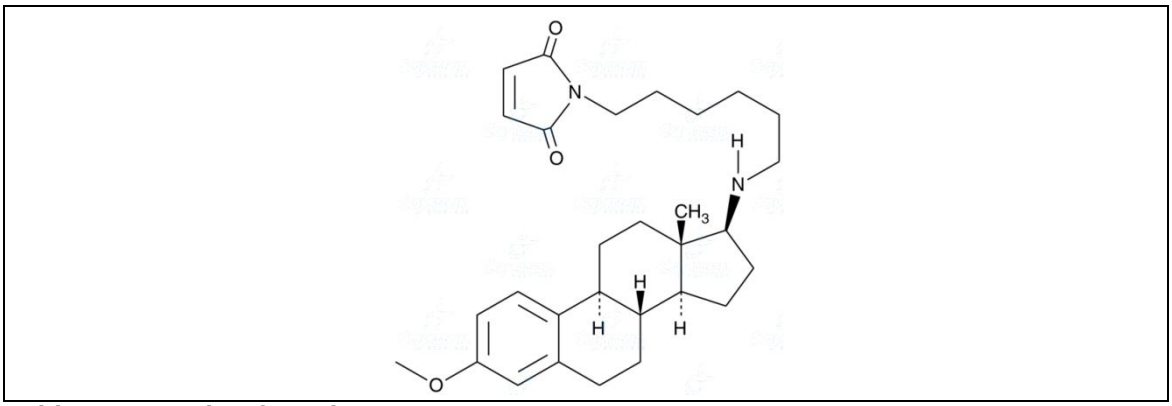


**Abb. 17: Strukturformel U-73122**

***U-73343***

U-73343 ist ein zelldurchlässiges Analogon des U-73122, welches als sehr schwacher Inhibitor der PLC fungiert. Es wird als Negativkontrolle genutzt [Yule und Williams 1992].

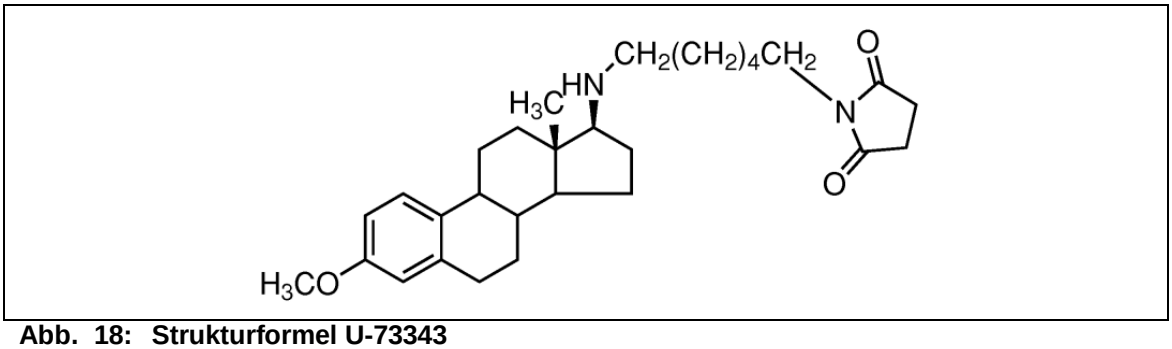


**Abb. 18: Strukturformel U-73343**

### 4.1.4.8. SERCA Inhibitor

***Thapsigargin***

Thapsigargin, ein Extrakt der Pflanze *Thapsia Garganica*, ist ein zelldurchlässiges Lacton, das die Calcium ATPase im endoplasmatischen Retikulum unter-

bindet. Es vermehrt weder $IP_3$, noch hat es einen signifikanten Effekt auf die Proteinkinase C [Thastrup, Cullen et al. 1990].

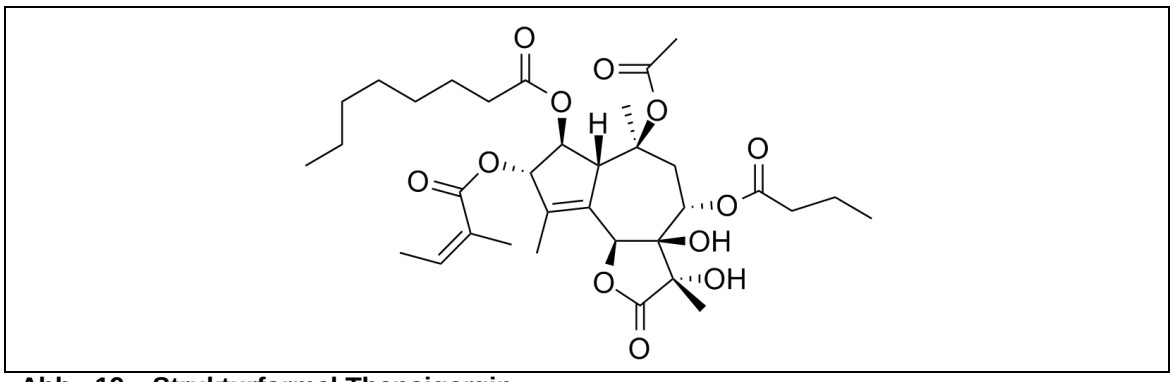


**Abb. 19: Strukturformel Thapsigargin**

### 4.1.4.9. Kreuzprobe

***Dimethylsulfoxid***

Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ein organisches Lösungsmittel welches zum Zellschutz bei Gefrierprozessen eingesetzt wird. Es verhindert die Bildung von Eiskristallen, die Dehydration, die pH-Änderung und die Denaturierung von Proteinen. DMSO ist bei Raumtemperatur toxisch für Zellen.

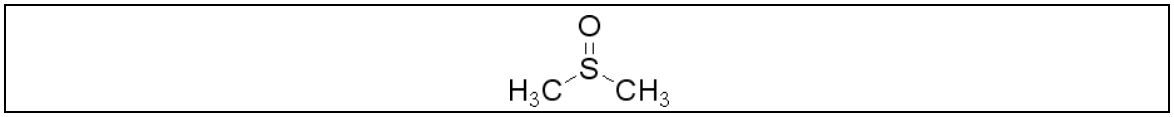


**Abb. 20: Strukturformel Dimethylsulfoxid**

### 4.1.4.10. Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszierende Substanzen absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge, wobei einige Elektronen angeregt werden. Die so absorbierte Energie kann in Form von Wärme und Licht wieder abgegeben werden [Probes 1996; Schild 1996]. Die Fluoreszenz hat ein niedrigeres Energieniveau und eine längere Wellenlänge als das anregende Licht. Wenn das anregende Licht in der Wellenlänge und der Intensität konstant ist, sind auch alle emittierten Photonen linear zur Anzahl der fluoreszierenden Moleküle. Die Intensität der Fluoreszenz kann

mittels eines lichtempfindlichen Photovervielfachers (eng. photomultiplier) gemessen werden.

***Fluo-3 AM und Fluo-4 AM***

Diese beiden Fluoreszenz-Calcium-Indikatoren sind zelldurchlässige Farbstoffe. Sie werden durch Licht im sichtbaren Spektrum (Wellenlänge 488 nm) angeregt und haben eine hohe Affinität zu Calcium. Mit den Fluofarbstoffen lässt sich schnell und sicher der intrazelluläre Calciumfluss darstellen. Zum Einsatz kommen diese Stoffe besonders in der zeitlich-dynamischen Darstellung von Calciumsignalwegen. Fluo-3 AM und Fluo-4 AM treten durch die Zellmembran in die Zelle ein, erst im Zytosol werden sie hydrolisiert und funktionsfähig. Sie können dann Calciumionen mittels Chelaten binden. Je mehr Calcium gebunden wird, desto mehr Fluoreszenz wird dann bei einer Wellenlänge von 515 nm abgegeben. Fluo-4 AM ist das Nachfolgeprodukt von Fluo-3 AM, das im Laufe der Versuche nicht mehr vom Hersteller vertrieben wurde. Im Weiteren wird nicht mehr zwischen den Produkten unterschieden; sie werden zusammenfassend als „Fluo-3/-4 AM“ bezeichnet.

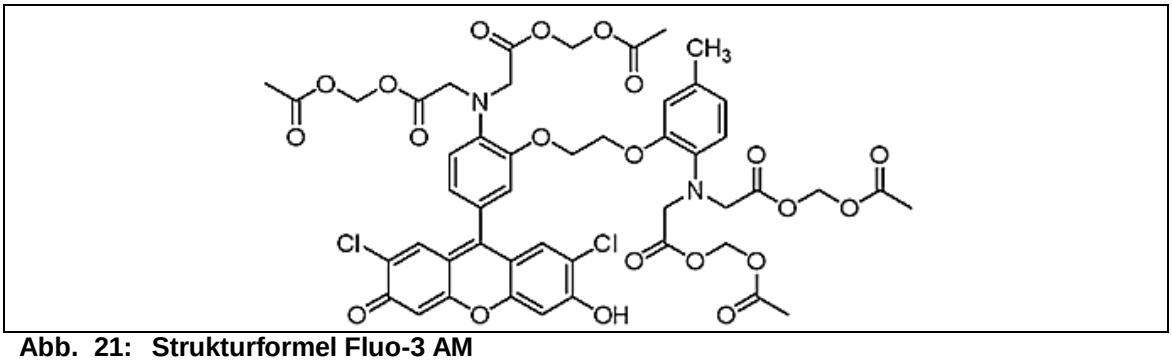


**Abb. 21: Strukturformel Fluo-3 AM**

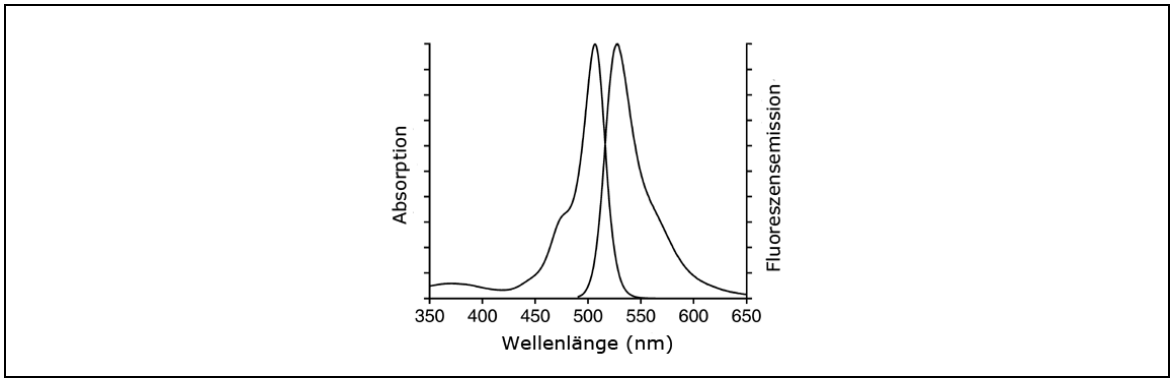


**Abb. 22: Spektrum Fluo-3 AM (Nach einer Vorlage des Herstellers)**

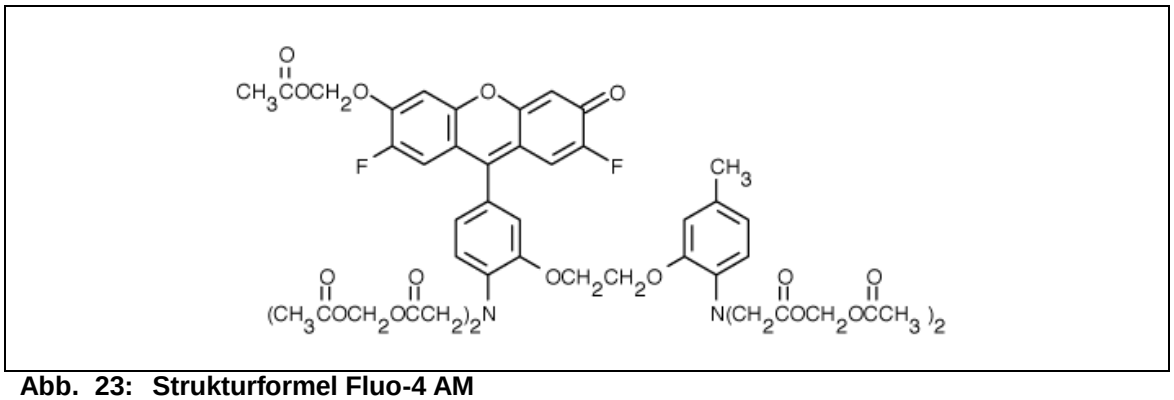


**Abb. 23: Strukturformel Fluo-4 AM**

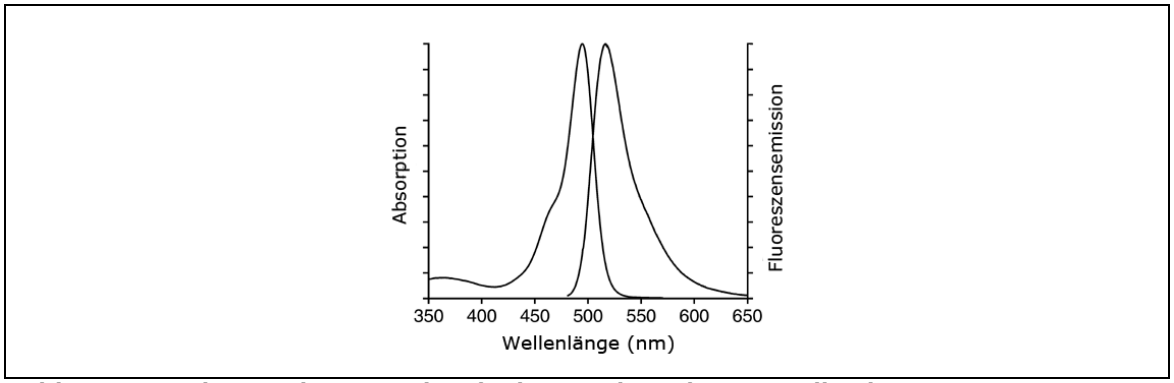


**Abb. 24: Spektrum Fluo-4 AM (Nach einer Vorlage des Herstellers)**

### *Calcein*

Calcein ist ein zelldurchlässiger, zunächst nicht fluoreszierender und hydrophober Stoff, welcher in der Zelle von zytoplasmatischen Esterasen schnell hydrolisiert wird. Die darauf entstehende Zellmembran-undurchlässige, hydrophile Substanz ist das dann fluoreszierende Calcein. Licht von 494 nm Wellenlänge

stellt das Anregungsmaximum dar und das Emissionsmaximum liegt bei 517 nm.

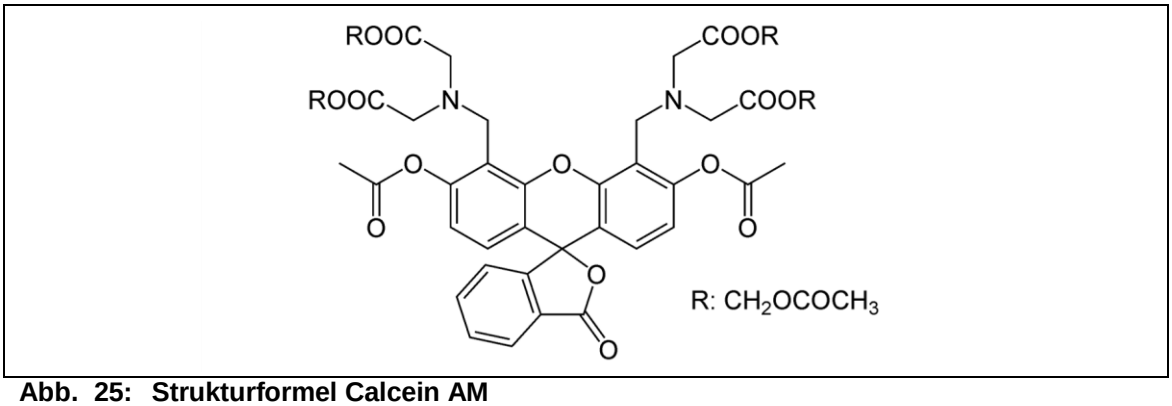


**Abb. 25: Strukturformel Calcein AM**

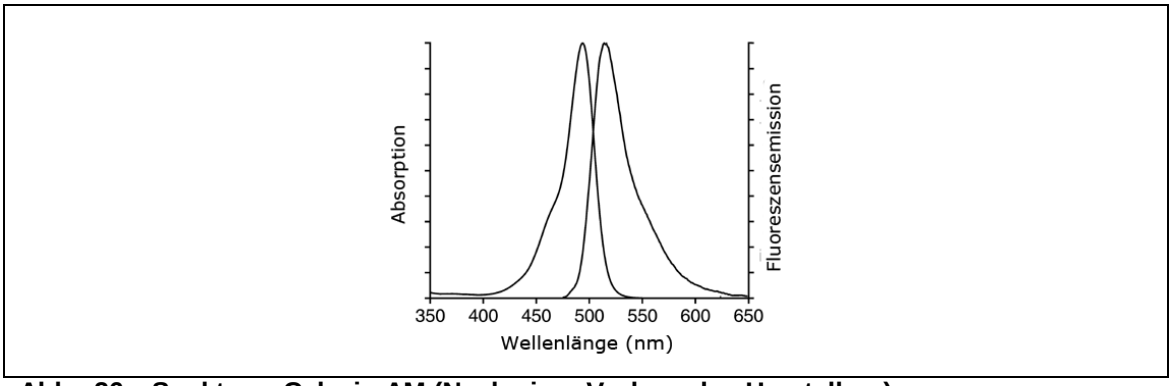


**Abb. 26: Spektrum Calcein AM (Nach einer Vorlage des Herstellers)**

## 4.2. Methoden

### 4.2.1. *Die Zellkultur von ASCs*

Die Isolation der verwendeten Primärzellen wurde nach einem bewährten Verfahren durchgeführt, das der Mitarbeiter Dr. Steffen für eigene Arbeiten [Steffen 2008] im Labor der AG Prof. Sauer - Physiologisches Institut Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen - benutzt und etabliert hat. Die Gewebeentnahme wurde mit Einverständnis der Patienten und mit Zustimmung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Gießen durchgeführt. Die Schritte im Einzelnen:

Das von Patienten extrahierte Fettgewebe wird mechanisch zerkleinert und mit einer Natrium-Chlorid-Lösung dilutiert. Nach einigen Waschungen, um die Blutrückstände zu beseitigen, schwimmen die Fettzellen an der Oberfläche dieser Lösung. Danach werden die Fettzellen mittels Enzymen (Liberase) bei 37 °C verdaut und die Stammzellen vom Fettgewebe separiert. Dazu wird das oben schwimmende Fettgewebe abgenommen. Nach Zentrifugation, zum Zwecke der Konzentration, sind die Stammzellen für den Gebrauch als Zellkulturen aufbereitet.

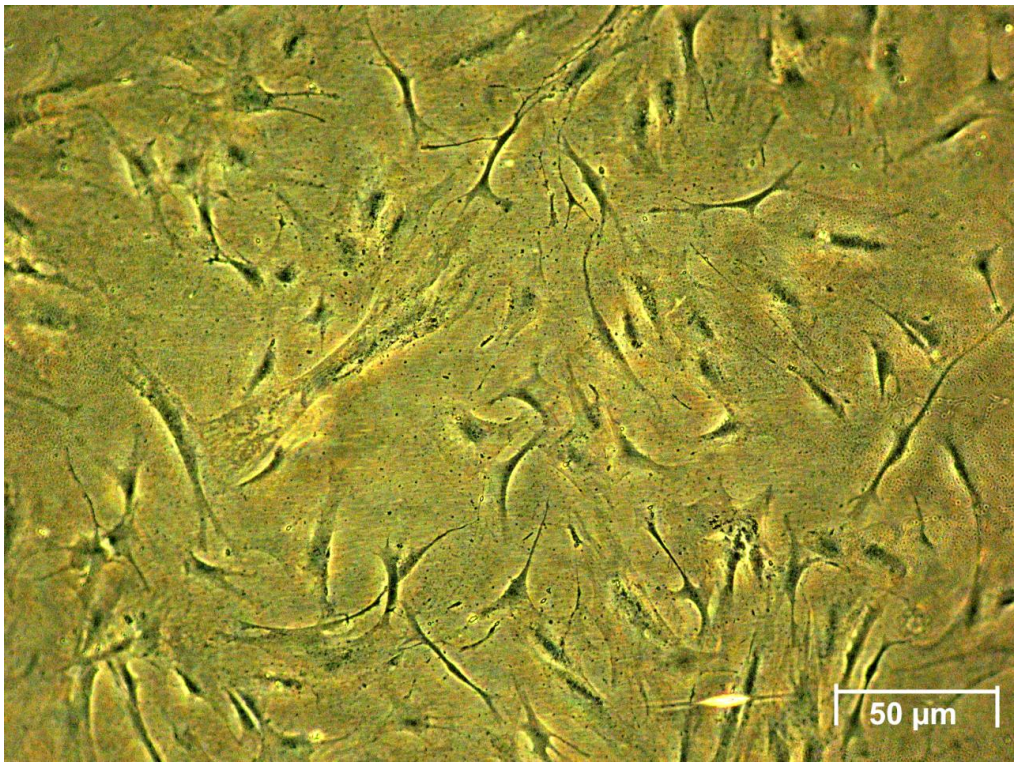


**Abb. 27: ASCs in einer Zellkultur**
Dieses Foto zeigt einen subkonfluenten Zellrasen von undifferenzierten ASCs. Die Zellen werden in einer T-25-Zellkulturflasche aufbewahrt und der Medienwechsel mit HAM's F-10 -Medium wird alle 48 Stunden durchgeführt.
(Foto der optischen Mikroskopie von der Autorin)

#### 4.2.1.1. Das Einfrieren von ASCs

Die - wie zuvor beschrieben - gewonnenen Stammzellen können in flüssigem Stickstoff bei -196 °C längerfristig aufbewahrt werden. Hierzu sind die folgenden vorbereitenden Arbeiten nötig:

Zunächst wird das Medium der ASCs entfernt, und die Zellen werden in 2 ml, auf 37 °C angewärmter, Trypsin/EDTA-Lösung (0,2% Trypsin) einmal gewa-

schen. Im Folgenden werden die Zellen mit 5 ml derselben Lösung inkubiert und anschließend aus der T-25-Zellkulturflasche in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Durch Hinzufügen von 9 ml HAM's F-10 Medium wird die Wirkung der Trypsinlösung abgestoppt. Nach dem Zentrifugieren mit 160 G für die Dauer von 5 Minuten kann der Überstand abpipettiert werden und die ASCs werden in 5 ml eiskaltem Gefriermedium resuspendiert. Nach mehrmaligem Hin- und Herpipettieren zum Durchmischen wird jeweils 1 ml der Lösung in vorgekühlte, auf Eis gelagerten Kryoröhrchen gefüllt. Die so vorbereiteten Kryoröhrchen werden für mindestens 2 Stunden bei – 20 °C gelagert, bevor sie für 24 Stunden zunächst auf – 80 °C heruntergekühlt werden. Danach können sie in einem Tank mit flüssigem Stickstoff bei ca. – 196 °C eingelagert werden.

#### 4.2.1.2. Das Auftauen von ASCs

Zum Auftauen von ASCs werden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und bei 37 °C im Wasserbad unter stetiger Bewegung in ca. 1 bis 2 Minuten aufgetaut. Da DMSO, ein Inhaltsstoff des Gefriermediums, zelltoxisch ist, muss der Auftauvorgang schnell durchgeführt werden. Der Inhalt der Kryoröhrchen wird mit 10 ml HAM's F-10 -Medium verdünnt und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen übertragen. Nachdem die Zellen für 5 Minuten bei 160 G zentrifugiert sind und nach Abnahme des Überstandes werden die Zellen mit 10 ml HAM's F-10 -Medium in eine T-25-Zellkulturflasche transferiert. Die aufgetauten ASCs können abschließend in eine reguläre Zellkultur übernommen werden.

#### 4.2.1.3. Die Kultivierung von ASCs

ASCs werden mit 10 ml HAM's F-10-Medium in T-25-Kulturflaschen kultiviert. Die Kultivierung erfolgt im Inkubator bei 37 °C, 5 % $CO_2$ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Der Wechsel des Nährmediums erfolgt alle 48 Stunden. Hierbei wird das alte Medium abpipettiert und 10 ml frisches, auf 37 °C temperiertes HAM's F-10-Medium, ohne den Strahl über die Zellschicht zu richten, aufpipettiert. Die Zellkultivierung wird alle 2 Tage mittels optischem Mikroskop auf ihren Konfluenzgrad hin kontrolliert und bei einem Konfluenzgrad von ca. 95 % passagiert.

#### 4.2.1.4. Das Passagieren von ASCs

Zum Überführen der ASCs in eine neue Passage werden die Zellen einmal mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,2 % Trypsin) gewaschen und danach für 5 Minuten mit 5 ml derselben Lösung inkubiert. Im Folgenden wird nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren zum Durchmischen die Hälfte der Zellsuspension in eine T-25-Flasche überführt und mit 8 ml HAM's F-10-Medium aufgefüllt, um die Wirkung des Trypsin abzustoppen. Mit der zweiten Hälfte der Zellsuspension kann ebenso verfahren werden oder - nach entsprechender Vorbehandlung - eingefroren, verworfen oder für Versuche ausplattiert werden.

#### 4.2.1.5. Das Ausplattieren von ASCs

Zur Vorbereitung der ASCs für Experimente wird eine 24-Lochplatte mit Glasplättchen bestückt und mit 24 x 1 ml HAM's F-10-Medium aufgefüllt. Nach dem Passagieren der Zellen wird eine Hälfte der Trypsin/EDTA-Zellsuspension auf die vorbereitete 24-Lochplatte verteilt (ca. 200 µl pro Loch). Innerhalb von 24 Stunden sind die ASCs an den Glasplättchen festgewachsen und sind nun bereit für Experimente.

#### 4.2.1.6. Das Anfärben mit Fluoreszenzfarbstoffen

***Fluo-3/-4 AM***

Eine Vorratslösung des Fluo-3/-4 AM-Farbstoffes mit einer Konzentration von 10 mM wird durch Suspension in 100 µl DMSO und 0,02 g Pluronic hergestellt. Für die Experimente werden jeweils 2 µl der Vorratslösung in 1 ml des HAM's F-10-Mediums aufgelöst, um damit eine Konzentration von 20 µM zu erreichen. 500 µl des so hergestellten Farbstoffes wird pro Vertiefung der 24-Lochplatte verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten werden die Zellen auf den Glasplättchen im HAM's F-10-Medium auf Objektivträger übertragen.

***Calcein***

Die Calcein Vorratslösung mit einer Konzentration von 10 µM wird durch eine Verdünnung mit 5 µl DMSO hergestellt. Für die Experimente wird 1 µl der Vorratslösung zu jeweils 2 ml HAM's F-10-Medium gegeben, um dann in der Konzentration von 5 µM vorzuliegen. Es werden 200 µl pro Vertiefung der 24-Lochplatte verwendet. Nach 30 minütiger Inkubation sind die ASCs für Experimente verwendungsbereit.

#### 4.2.1.7. Die konfokale Scanner-Lasermikroskopie

In der konfokalen Scanner-Lasermikroskopie werden Bilder von 3D-Proben abgebildet, ohne das Präparat durch z.B. histologische Schnitte zuvor zu zerstören. Das Arbeitsprinzip bei Fluoreszenzanwendungen ist wie folgt:

Laser-Licht einer spezifischen, auswählbaren Wellenlänge dient zur Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen. Das Anregungslicht wird über bewegliche, im kHz Bereich arbeitende Abtastspiegel (scanning mirrors) als hochfokussierter Punkt durch das Objektiv hindurch rasterförmig über das Präparat in der x- und y-Achse gelenkt. Das Präparat sendet von diesem angeregten Punkt Emissionslicht durch dasselbe Objektiv zurück. Das Objektiv und die variable, konfokale Lochblende mit einem Durchmesser, typisch kleiner 50 µm, bewirken zusammen, dass nur Licht der Fokusebene zum Detektor gelangen kann. Da zudem der dichroische Spiegel das kurzwellige Anregungslicht vom langwelligeren Emissionslicht trennt, ergibt sich eine weniger gestörte Erfassung der Fluoreszenzstärke durch den Detektor. Somit wird ein besseres Signal / Rausch-Verhältnis erzielt und damit eine weitere Erhöhung von Kontrast bzw. Auflösung. Das vom Detektor für jeden Rasterpunkt der gescannten x- und y-Achse ermittelte Licht wird von einem Computer als Rasterdaten aufgezeichnet. So entsteht ein Gitternetz mit Fluoreszenzwerten einer Fokusebene. Durch Veränderung der Fokusebene – also der z-Achse - für einen weiteren Rasterdurchgang kann ein weiteres Gitternetz mit Fluoreszenzwerten einer anderen Ebene aufgenommen werden. Bei dieser Technik spricht man auch von „Optischen Schnitten".

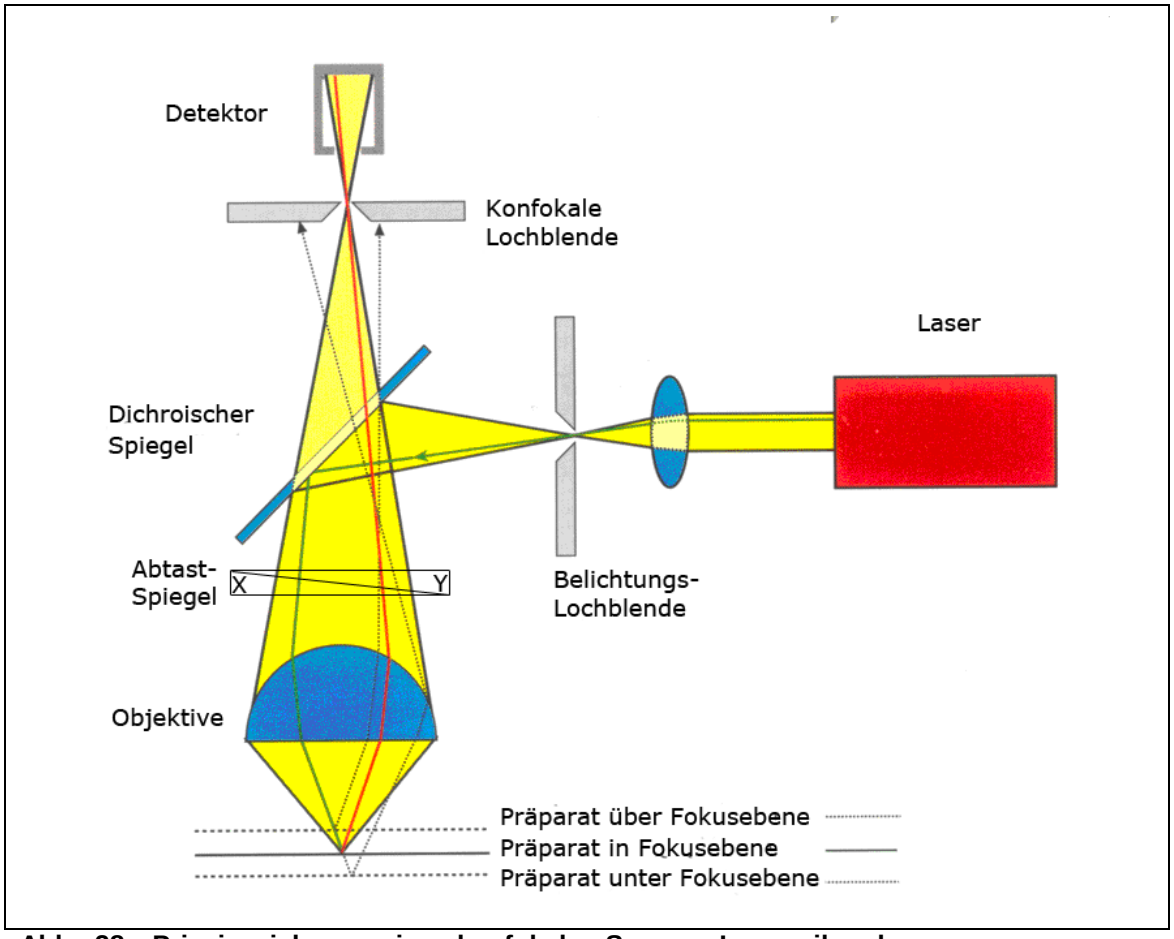


**Abb. 28: Prinzipzeichnung eines konfokalen Scanner-Lasermikroskops**
Veränderte Darstellung nach einer Zeichnung unter „http://www.uni-kassel.de/fb19/cellbio/wwwSeiten/Clsm01.htm“

Aber nicht nur die im Vergleich zum optischen Mikroskop deutlich verbesserte Auflösung und die Möglichkeit der „Optischen Schnitte“ sind ein Vorteil der konfokalen Scanner-Lasermikroskopie, sondern auch die vergleichsweise schonende Behandlung der zu untersuchenden Probe. Da der Laser nur kurzzeitig - für Millisekunden - die Fluoreszenz eines kleinen, ausgesuchten Areals anregt - und andere Bereiche nicht bestrahlt werden - sind die gerade nicht gescannten Areale somit auch nicht ausgebleicht oder anderweitig verändert.

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurde ein Krypton/Argon-Laser mit den Wellenlängen 458 nm und 488 nm eingesetzt. Alle Bilder wurden mit dem Leica Konfokal-Mikroskop TCS SP2 und der Leica Software „ScanWare“ aufgenommen und mit der Software des Mikroskops ausgewertet. Zur Weiterverarbeitung und Aufbereitung wurden Bilder und Daten exportiert und mit einem

Bildverarbeitungsprogram nachbearbeitet bzw. mit Excel (Microsoft) ausgewertet.

***Der Leica Live-Data-Mode***

Für dynamische Untersuchungen und Experimente an lebenden Zellen steht der Leica „Live-Data-Mode“ zur Verfügung. In diesem Betriebsmodus des Mikroskops können die Auswirkungen von gesteuerten Einflüssen auf lebende Organismen durch das Setzen von Ereignismarkern verfolgt werden. Der grundsätzliche Untersuchungsablauf verläuft wie folgt:

Zunächst werden für den Versuch die grundlegenden Parameter für die Mikroskopie, insbesondere die Wellenlänge des Lasers eingestellt. Nach dem Einfärben der ASCs mit einem fluoreszierenden Calciumindikator werden diese mit HAM’s F10 unter das Mikroskop gebracht. Unter Bildbetrachtung werden dann 20 bis 30 Zellen in zufälliger Verteilung als Untersuchungsregionen (region of interest Abk. ROI) markiert. Dann wird der Live-Data-Mode gestartet. Die Bildrate der Versuche variiert dabei zwischen 3 bis 8 s/Bild. Für die ersten Versuche beträgt die Bildrate zunächst ca. 3 s/Bild. Die feine zeitliche Auflösung mit vielen Frames ergibt eine hohe Datenmenge. Da sich klar ergibt, dass die Spikes der Calcium-Oszillationen typisch 130 Sekunden (± 60 Sekunden) auseinander liegen, wird zur Reduzierung der Datenmenge die Framerate auf bis zu ca. 8 s/Bild ausgeweitet. Nach ca. 400 bis 1000 Sekunden wird über die Software ein Ereignismarker „Change“ gesetzt und gleichzeitig die Untersuchungssubstanz den ASCs zugeführt. Für ca. 400 bis 1000 Sekunden werden die Zellen dann weiter beobachtet, bevor die Laser-Mikroskopie beendet werden kann. Die Zugabe von Untersuchungssubstanzen ist in jedem Fall ungefähr in der Mitte der protokolierten Mikroskopie angesiedelt.

Die Software liefert unter anderem ein Kurvendiagramm der Fluoreszenzwerte aller ROIs, die bei rhythmischer Amplitudenschwankung die Calcium-Oszillation der markierten Zellen anzeigt. Der im Diagramm ebenfalls angezeigte Change-Marker erlaubt eine visuelle Beurteilung in Hinblick, ob Änderungen der rhythmischen Amplitudenschwankungen mit der Zufuhr der Untersuchungssubstanz zeitgleich bzw. leicht zeitverzögert eingetreten sind.

***Der Leica FRAP-Mode***

Eine Methode um den Durchgang von Molekülen durch die Gap Junctions zu bestimmen ist das Ausbleichen von einzelnen Zellen und die Messung des Rückstroms durch die Gap Junctions. Dieses Verfahren wird „fluorescence recovery after photobleaching“ (FRAP) genannt [Meyvis, De Smedt et al. 1999].

Um FRAP anwenden zu können, muss vorbereitend ein Fluoreszenzmarker an das interessierende Molekül kovalent angebunden werden. Dann werden diese Fluoreszenzmoleküle einzelner ausgewählter Zellen durch Laserlicht geringer Intensität zunächst soweit angeregt, dass sie zu fluoreszieren beginnen. Nach Erreichen dieser Startbedingung wird auf dieselben ausgewählten Zellen ein gezielter Laserimpuls hoher Energiedichte gerichtet, der die Moleküle zerstört. Diese hören dadurch auf zu fluoreszieren. Die so gebleichten Zellen sind jedoch von Zellen mit intakten Fluoreszenz-Molekülen umgeben. Die Einwanderung solcher fluoreszierenden Moleküle in die gebleichte Zelle kann die Fluoreszenz dieser Zelle wieder herstellen. Zwei Parameter können mit der FRAP-Methode dabei erfasst werden:

- Welche Stärke der Fluoreszenz stellt sich mit der Einwanderung in Relation zur Startbedingung wieder her.
- In welcher Zeit wandern die Fluoreszenz-Moleküle in die gebleichte Zelle ein.

Mit diesen kinetischen Parametern der FRAP-Methode kann an lebenden Zellen die Diffusion und der Transport von Molekülen über Zellmembranen erfasst werden.

Bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zu der Gap Junction Regulation mittels der FRAP-Technik sind ASCs mit dem Fluoreszenzmarker Calcein, wie weiter oben beschrieben, angefärbt worden. Für die ROIs dauert die Zeit vor der Bleiche zur Herstellung der Startbedingung 5 Sekunden bei einer Laserintensität von 15 %. Die Bleichphase zur Zerstörung der Fluoreszenz-Moleküle beträgt 2 Sekunden bei 100 % Laserintensität. Die Beobachtungszeit nach der Bleiche bemisst sich auf mindestens 20 Sekunden, in der die Wiederaufnahme

der Fluoreszenz als Prozentsatz der Startbedingung gemessen wird. Durch den Einsatz von NOS-Inhibitoren (DPI und L-NAME) und des Gap Junction Blockers (1-Heptanol), in identischer Konzentration wie diese in den Versuchen mit dem Live-Data-Mode zur Anwendung gelangen, ergibt sich mit FRAP eine ausgezeichnete Kontrollmöglichkeit die Gap Junction Durchlässigkeit zu untersuchen.

### 4.2.2. *Versuchsanzahl und statistische Signifikanz*

Aus den Zellkulturen der ASCs wurden für die Versuche, einschließlich Kontrollen, die Passagen 2 bis 10 verwendet. Sowohl in den Spontanoszillationen, wie auch in den Versuchen, zeigen sich keine Unterschiede der eingesetzten Passagen.

Alle Versuche im Live-Data-Mode wurden mindestens vier Mal durchgeführt (siehe Tab. 6). Die Anzahl der definierten ROIs pro Versuch liegt bei jeweils 20 bis 30 Zellen.

Bei den Untersuchungen mit der FRAP-Technik wurden für jeden Versuchsdurchgang mindestens 50-mal Bleichvorgänge an Zellen durchgeführt. Der Diffusionskoeffizient des Transportes über die Membran wurde nach der Methode von Koppel [Koppel 1979] mit den folgenden Gleichungen bestimmt:

$$F(\Delta x,t) = F_0\{[1-\beta\alpha_2(t)]\exp[-(\Delta x)^2/\omega^2(t)]\} - \{(1-\beta)\alpha_0\exp[-\Delta x)^2/\omega_0^2]\} \quad (1)$$

$$a_2 = \alpha_0/(1+t/\tau_D) \quad (2)$$

$$\tau_D = \omega_0^2/4D \quad (3)$$

wobei β die Größe der mobilen Fraktion - Moleküle die durch Diffusion oder aktiven Transport in das ausgebleichte Areal gelangen - darstellt, $\alpha_0$ eine Konstante ist, die das Ausmaß des Bleichens beschreibt, $\omega_0$ ist der 1/e Radius des Laserstrahls, $\tau_D$ ist die Diffusionszeit, und D der Diffusionskoeffizient ist.

Zusammenfassende Resultate werden mit dem arithmetischem Mittelwert und der zugehörigen Standardabweichung (SD) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels „Student-T-Test“ ermittelt und wie folgt klassifiziert:

- *p < 0.05 = „signifikant“
- **p < 0.01 = „hoch signifikant“
- ***p < 0.001 = „extrem signifikant“

#### 4.2.2.1. Experimente

| Type | Name | Konzentration | Hersteller | Anzahl der Experimente | |
|---|---|---|---|---|---|
| NOS-Inhibitor | L-NAME | 50 µM | Calbiochem | 7 | * |
| | L-NMMA | 100 µM | Calbiochem | 6 | |
| | ETU | 100 µM | Calbiochem | 8 | |
| | DPI | 10 µM | Calbiochem | 7 | * |
| NO Donator | SNP | 100 µM | Calbiochem | 7 | |
| | SNAP | 100 µM | Calbiochem | 6 | |
| Radikalfänger | NMPG | 100 µM | Sigma | 7 | |
| | Trolox | 100 µM | Calbiochem | 6 | |
| | Rutin | 100 µM | Calbiochem | 5 | |
| | Luteolin | 100 µM | Calbiochem | 4 | |
| Gap Junction Inhibitor | 1-Heptanol | 2,5 mM | Sigma | 4 | * |
| | Carbenoxolone | 100 µM | Sigma | 5 | |
| $IP_3$ Inhibitor | 2-APB | 10 µM | Sigma | 4 | |
| NADPH-Oxidase Inhibitor | Apocynin | 1 mM | Calbiochem | 8 | |
| Phospholipase C Inhibitor | U-73122 | 20 µM | Calbiochem | 4 | |
| Kontrolle | U-73433 | 20 µM | Calbiochem | 4 | |
| SERCA Inhibitor | Thapsigargin | 10 µM | Calbiochem | 4 | |
| Kreuzprobe | DMSO | 12,8 µM | Sigma | 5 | |
| | Medium (HAM’s F-10) | | PAA, Sigma | 4 | * |

**Tab. 6: Typ und Anzahl der durchgeführten Experimente**
*) Versuche auch mit FRAP-Technik durchgeführt.

# 5. ERGEBNISSE

Dieses Kapitel beschreibt zunächst typische Oszillationsmuster und Versuche zur intrazellulären Entstehung dieser Calcium-Oszillationen. Im Weiteren kommen Experimente zur Gap Junction Kommunikation und der Gap Junction Regulation zur Darstellung. Abschließend werden das ROS-System und spannungsabhängige Kaliumkanäle betrachtet.

In der grafischen Darstellung wird für die mit dem Leica Live-Data-Mode durchgeführten Versuche je eine Zelle (ROI) exemplarisch herausgegriffen. Für die Experimente im Fotobleichverfahren können hingegen die Messwerte einer Versuchsreihe kumuliert werden, so dass die grafische Auswertung immer den Durchschnitt darstellt.

## 5.1. Spontane Calcium-Oszillation

Unter dem Lasermikroskop zeigen Fluo-3/-4 AM-beladene, undifferenzierte ASCs spontane, stetige Calcium-Oszillationen, die sich für jede einzelne Zelle in Amplitude und Frequenz jedoch unterschiedlich darstellen. Auch bei örtlicher Nachbarschaft sind Amplitude und Frequenz individuell andersartig ausgeprägt.

Beim Betrachten der Zellen im Live-Data-Mode werden individuelle Zellen als ROI markiert, um ihre jeweilige Calcium-Oszillation als Graph der Calciumkonzentration über einen Zeitverlauf darzustellen. Individuelle Zellen zeigen ein jeweils typisches Verlaufsmuster. Die Muster der verschiedenen Zellen sind jedoch unterschiedlich in Bezug auf Frequenz, Verlaufsform und Amplitude. Einige typische Beispiele sind in Abbildung 30 dargestellt.

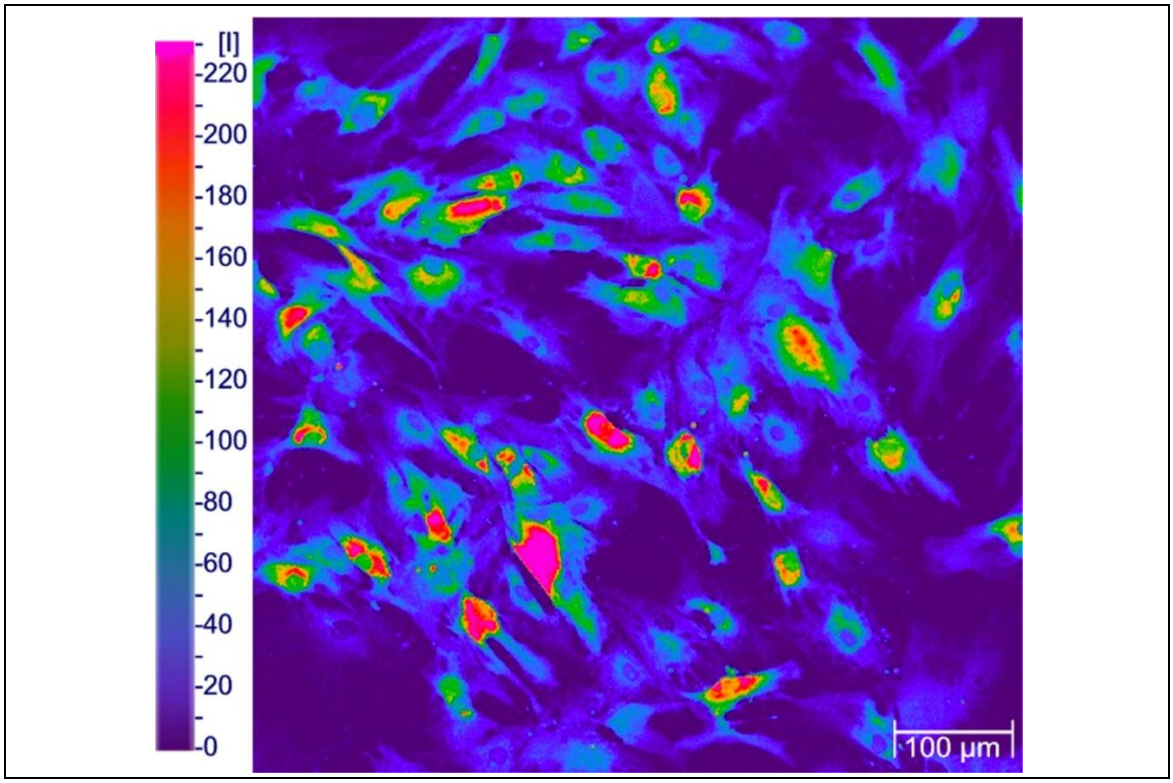


**Abb. 29: Spontane, asynchrone Calcium-Oszillationen von ASCs**
Die Zellschicht ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM in einer Konzentration von 20 µM angefärbt. I = Intensität
Wenig Calcium = geringe Intensität der Fluoreszenz
Viel Calcium = Hohe Intensität der Fluoreszenz

Wenn auch typischerweise der zeitliche Abstand der Calciumspikes bei 130 s (± 60 s) liegt, gibt es jedoch auch deutliche Ausnahmen. Im Extrem sind Zeiten von 800 s und mehr zwischen den Spikes zu beobachten.

Die Form der Calciumspikes ist mehrheitlich eingipflig, die Oszillationen weisen also nur eine Frequenz auf. Allerdings sind auch zweigipflige Konzentrationsänderungen des Calciums zu messen, die informationstechnisch als mehrfrequent zu bewerten sind.

Zwischen den Intensitätsgipfeln des Calciums sind die Verlaufsformen der Konzentrationsänderungen erstaunlich gleichförmig. Nach dem rapiden Abfall der Calciumkonzentration zeigt sich zuerst ein langsamer, nahezu linearer Wiederanstieg. Ab einem bestimmten Niveau des Calciums nimmt die Konzentration dann exponentiell zu, um den nächsten Spike zu erreichen. Der lineare Anstieg ist in seiner Ausprägung variabel und besonders bei Zellen die relativ langsam oszillieren nur minimal.

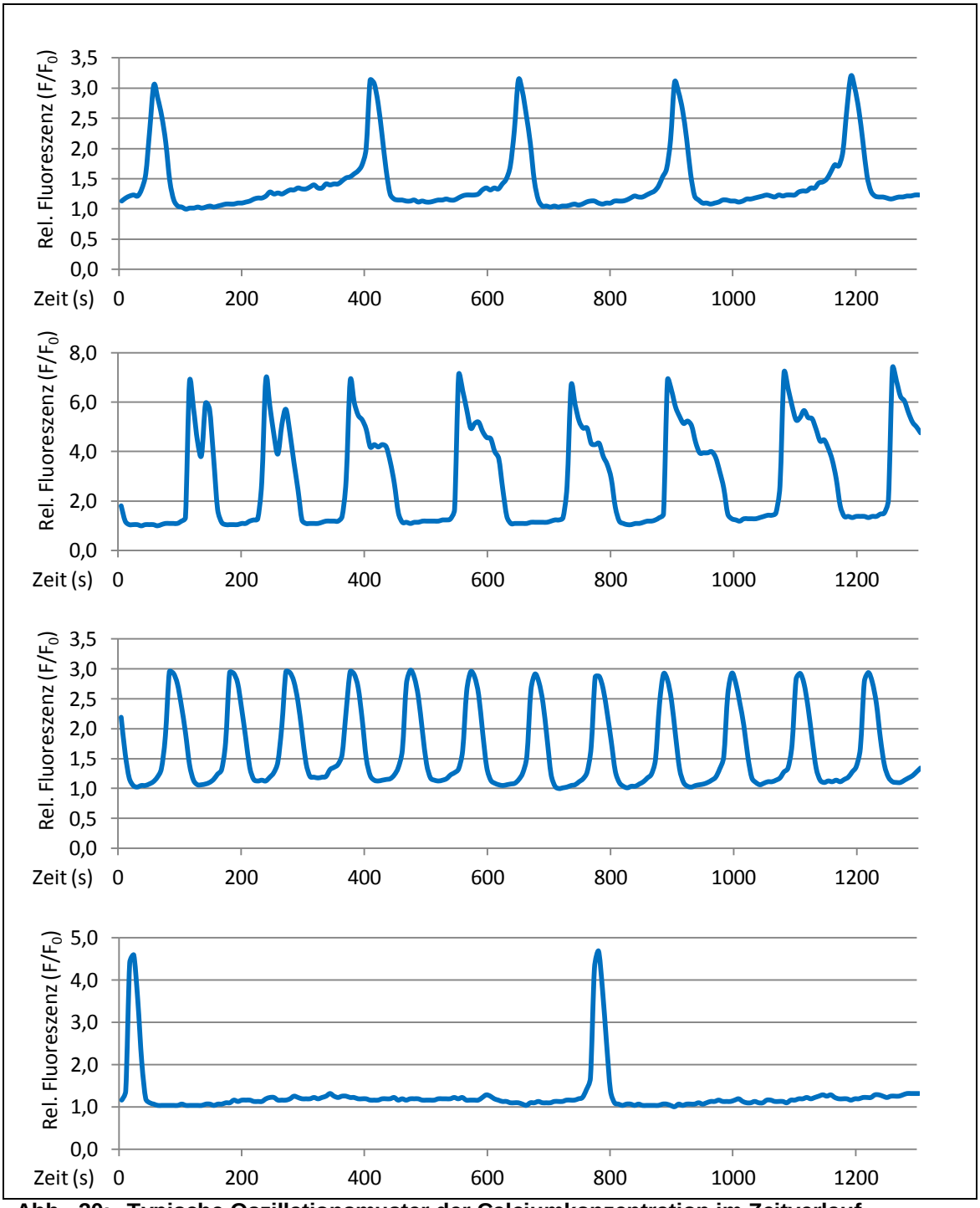


**Abb. 30: Typische Oszillationsmuster der Calciumkonzentration im Zeitverlauf**
(Kontrolle 4 – ROI 35, 29, 17, 36 von oben nach unten)

Die Amplitude der Konzentrationsänderung des Calciums einer einzelnen Zelle zeigt über den Zeitraum einer Versuchsanordnung nur geringe Schwankungen. Ob diese leichten Veränderungen selbst nochmal einem regelmäßigen Muster folgen, wie eine Reihe von Beobachtungen nahe legen, kann jedoch erst mit deutlich verlängerten Messreihen abschließend beurteilt werde. Im Vergleich

der Amplituden verschiedener Zellen zeigen sich außerordentliche Unterschiede in dem periodischen Wechsel der Calciumkonzentration. Bei der Verwendung eines relativen Fluoreszenzmaßtabs mit $F/F_0$ (Fluoreszenzintensität / Minimum der Fluoreszenzintensität der Messreihe) ergibt sich eine interessante Bandbreite der gemessenen Amplituden. Das beobachtete Minimum der relativen Fluoreszenz liegt bei ca. 1,5 und das Maximum bei ca. 8,0.

## 5.2. Intrazelluläre Calciumfreisetzung

Calcium-Oszillationen können durch die rhythmische Freigabe von Calcium aus dem ER-Speicher entstehen. Wird Thapsigargin, ein Inhibitor der SERCA, in einer Konzentration von 10 µM zu den spontan oszillierenden Zellen gegeben, brechen die Oszillationen leicht zeitverzögert abrupt ab. Dies ist ein Nachweis, dass die Calciumfreigabe aus dem ER eine notwendige Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Oszillation ist.

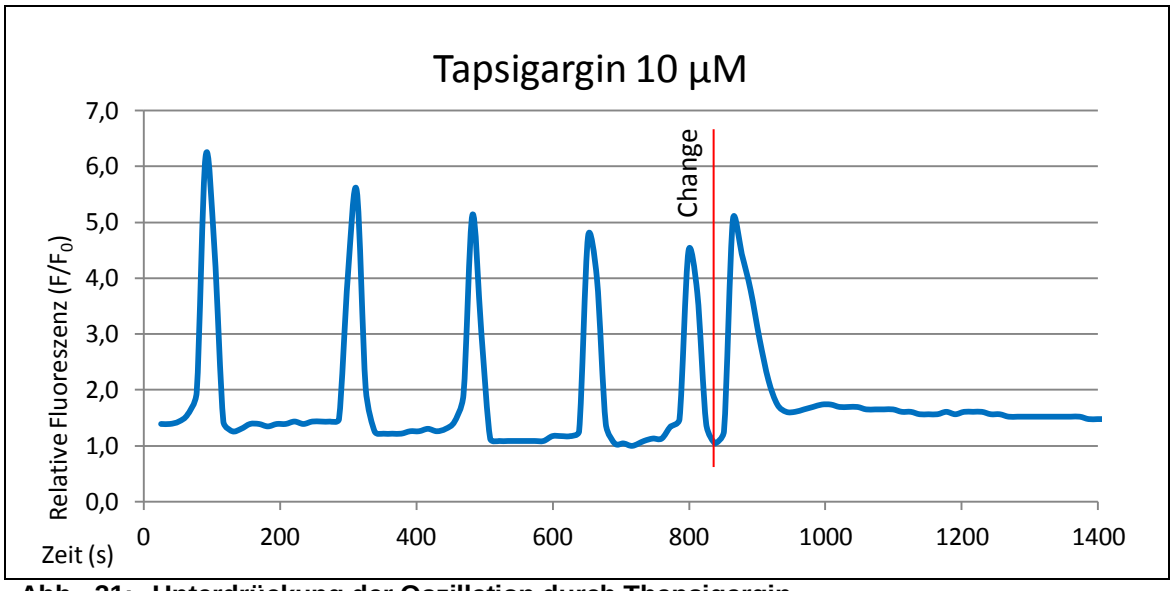


**Abb. 31: Unterdrückung der Oszillation durch Thapsigargin**
Die Substanzzugabe ist auf der Zeitachse markiert.
(Versuch 2 – ROI 38)

## 5.3. PLC und $IP_3$ Signalweg

Die Calciumfreigabe von intrazellulären Speichern kann entweder durch den Ryanodin- oder durch den $IP_3$-Rezeptor erfolgen. $IP_3$ entsteht durch die enzy-

matische Aktivierung der PLC. Sowohl der $IP_3$-Rezeptor, als auch die PLC können durch Inhibitoren zu Versuchszwecken ausgeschaltet werden.

### 5.3.1. *PLC-Antagonist*

Bei Anwesenheit des PLC-Antagonisten U-73122 in einer Konzentration von 20 µM brechen Oszillationen schlagartig ab, wohingegen das inaktive Analogon U-73433 in der gleichen Konzentration keinen Effekt auf die Calcium-Oszillation zeigt. Somit gibt es einen Nachweis, dass die PLC für die Aufrechterhaltung der Oszillationen notwendig ist.

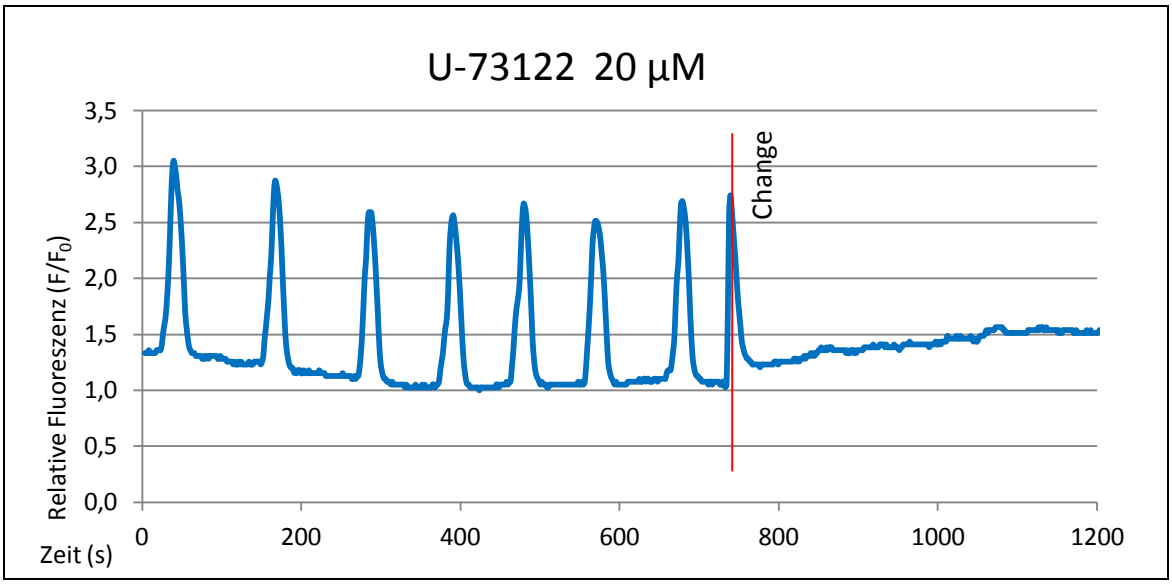


**Abb. 32: Unterdrückung der Oszillation durch U-73122**
Die Substanzzugabe ist auf der Zeitachse markiert.
(Versuch 1 – ROI 07)

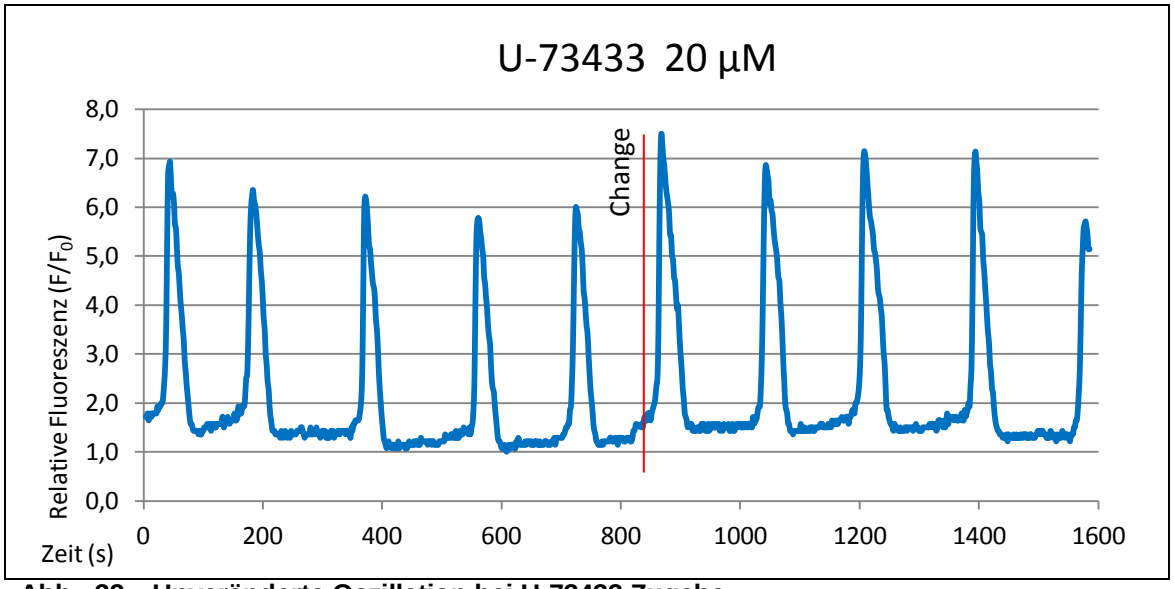


**Abb. 33: Unveränderte Oszillation bei U-73433 Zugabe**
Die Substanzzugabe ist auf der Zeitachse markiert.
(Versuch 1 – ROI 24)

## 5.3.2. *Inhibitor des $IP_3$-Receptors*

Wird 2-APB, ein $IP_3$-Rezeptor-Inhibitor, in einer Konzentration von 10 µM zu den oszillierenden Zellen gegeben, brechen die Oszillationen sofort ab. Die Bedeutung des $IP_3$-Rezeptors für die Calciumfreigabe zur Aufrechterhaltung der Calcium-Oszillationen wird hiermit aufgezeigt.

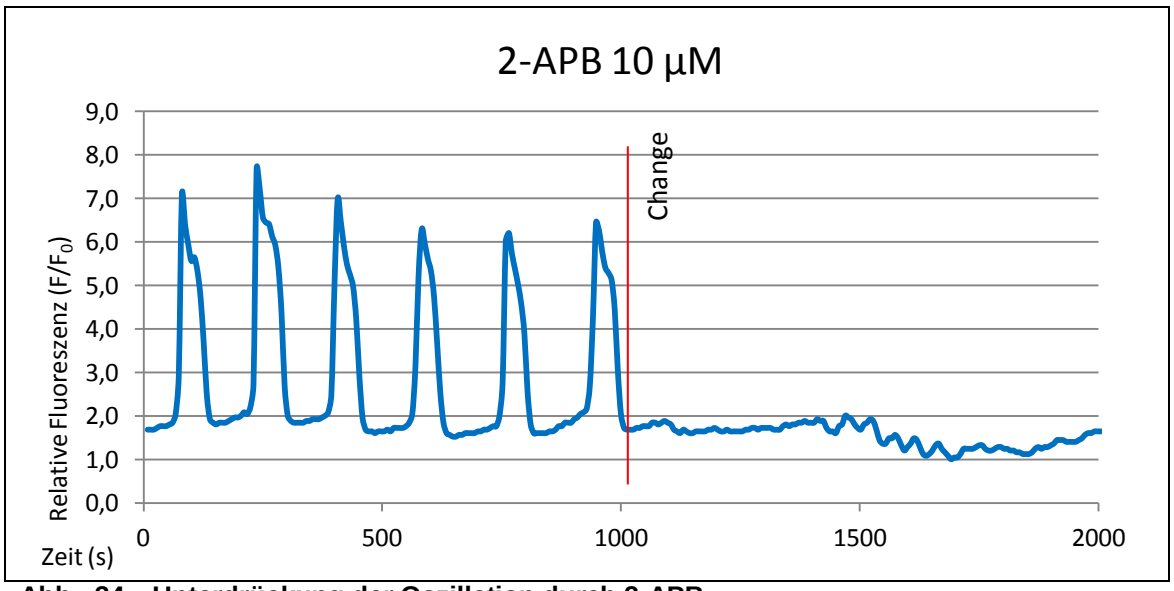


**Abb. 34: Unterdrückung der Oszillation durch 2-APB**
Die Substanzzugabe ist auf der Zeitachse markiert.
(Versuch 4 – ROI 01)

## 5.4. Gap Junction Kommunikation

Calcium und $IP_3$ können als kleines Molekül durch Gap Junction durchtreten [Sáez, Connor et al. 1989]. Da bei der Betrachtung der Zellpopulation die Calcium-Oszillationen asynchron unterschiedlich sind, gilt es zu klären, ob Gap Junctions für die Entstehung von Calcium-Oszillationen eine Rolle spielen. Dies kann über den Einsatz von Gap Junction Inhibitoren untersucht werden. Zwei Inhibitoren – 1-Heptanol und Carbenoxolone – wurden in den Versuchen benutzt.

### 5.4.1. *1-Heptanol*

Mit der Zugabe des Gap Junction Blockers 1-Heptanol mit einer Konzentration von 2,5 mM werden die Calcium-Oszillationen eingestellt. Hiermit zeigt sich, dass die Entstehung von Calcium-Oszillationen von den Gap Junctions abhängig ist.

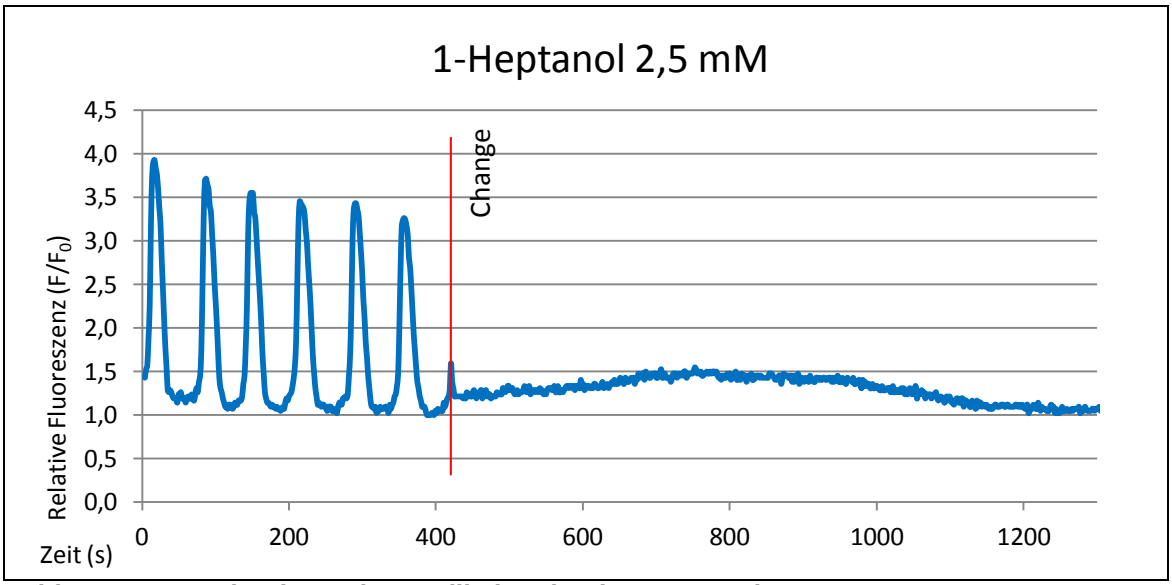


**Abb. 35: Unterdrückung der Oszillation durch 1-Heptanol**
Die Substanzzugabe ist auf der Zeitachse markiert.
(Versuch 1 – ROI 07)

### 5.4.2. *Carbenoxolone*

Calcium-Oszillationen können nicht mehr aufrechterhalten werden wenn der Gap Junction Blocker Carbenoxolone mit einer Konzentration von 100 µM zu

den ASCs hinzugegeben wird. Somit ist ein weiterer Beleg für die Notwendigkeit durchlässiger Gap Junctions zur Aufrechterhaltung von Calcium-Oszillationen gegeben.

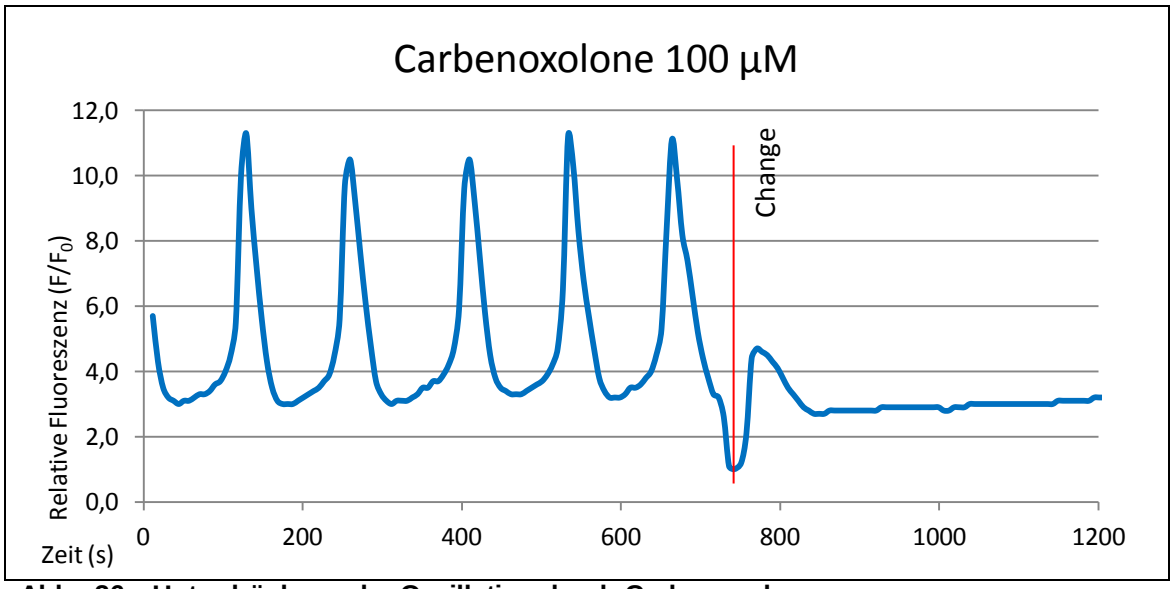


**Abb. 36: Unterdrückung der Oszillation durch Carbenoxolone**
Die Substanzzugabe ist auf der Zeitachse markiert.
(Versuch 4 – ROI 35)

## 5.5. Gap Junction Regulation

Da Gap Junctions zur Aufrechterhaltung der Calcium-Oszillationen benötigt werden, in der Probe Zellen jedoch individuell oszillieren, muss nach einem Regulator der Permeabilität der Gap Junctions geforscht werden. Es ist bekannt, dass NO die Durchlässigkeit der Gap Junctions reguliert [Kameritsch, Khandoga et al. 2005], daher sind NOS-Inhibitoren in die Untersuchung aufzunehmen.

### 5.5.1. *NOS-Inhibitoren*

Alle eingesetzten NOS-Inhibitoren zeigen das gleiche Ergebnis: die Calcium-Oszillationen synchronisieren sich in Bezug auf die Frequenz.

Diese Beobachtung legt nahe, dass NOS-Inhibitoren die Gap Junction Permeabilität steigern.

### 5.5.1.1. ETU

Durch die Zugabe des NOS-Inhibitors ETU, in einer Konzentration von 100 µM zu oszillierenden Zellen, werden die Oszillationen synchronisiert. Dieses ist ein Hinweis, dass die Gap Junction Permeabilität durch die Verhinderung der NO Freisetzung verstärkt wird.

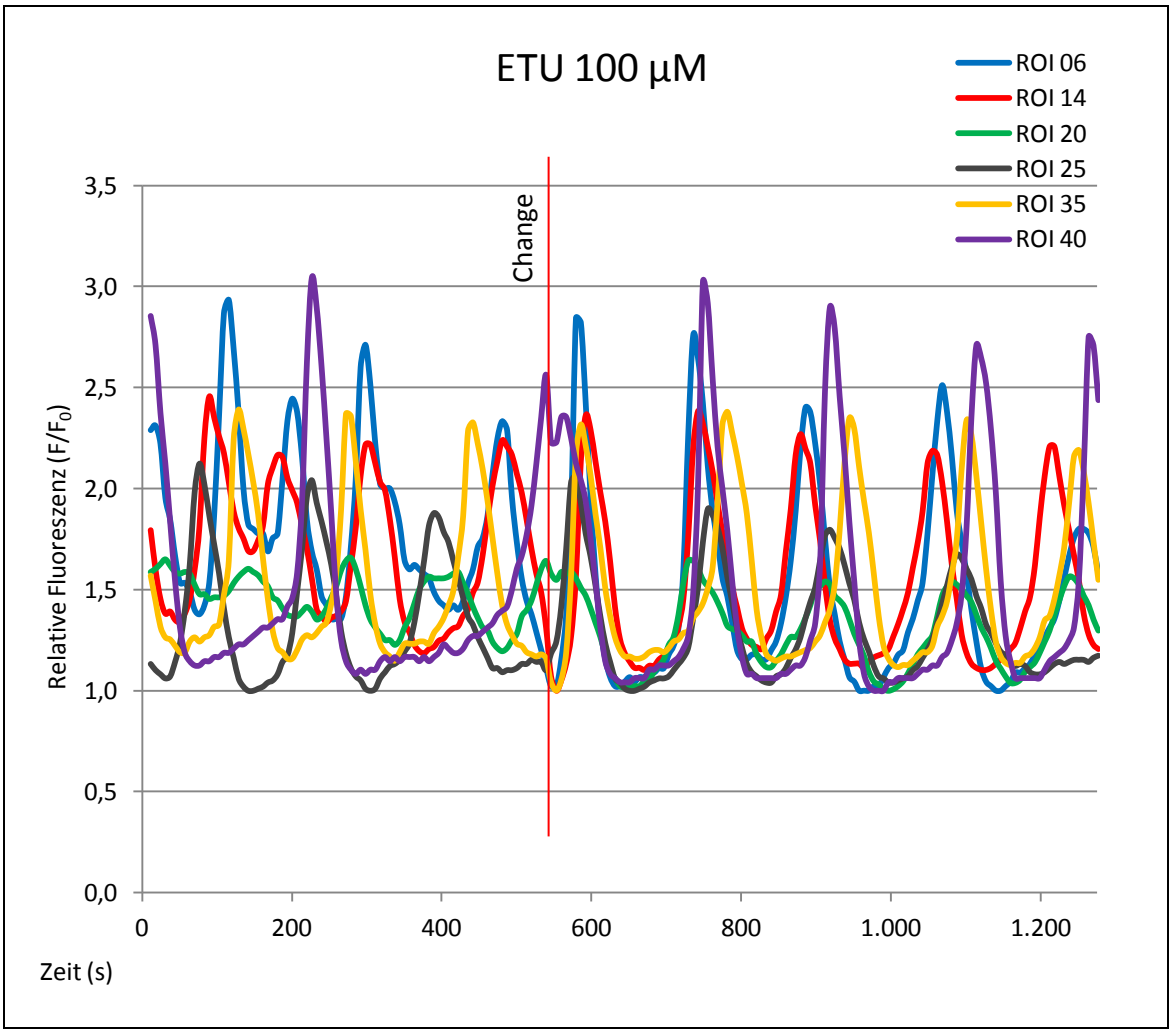


**Abb. 37: Synchronisation der Oszillation durch Zugabe von ETU**
Die Substanzzugabe ist auf der Zeitachse markiert.
(Versuch 1 – ROI 06, 14, 20, 25, 35, 40)

### 5.5.1.2. L-NAME

Wird der NOS-Inhibitor L-NAME, in einer Konzentration von 50 µM, zu den oszillierenden Zellen gegeben, synchronisieren sich die Oszillationen. Auch dieses Ergebnis eines weiteren NOS-Inhibitors kann mit einer gesteigerten Gap Junction Durchlässigkeit erklärt werden.

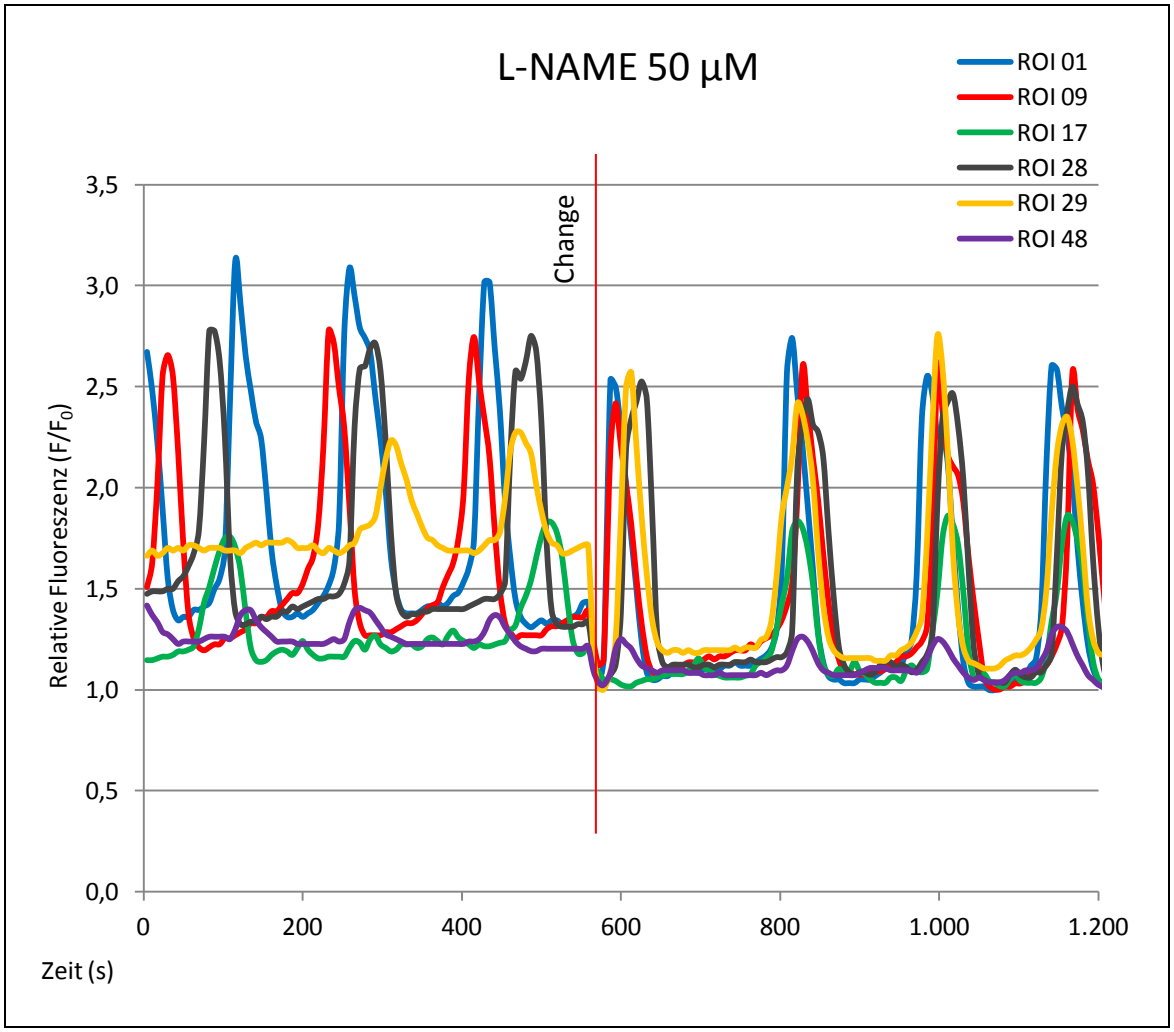


**Abb. 38: Synchronisation der Oszillation durch Zugabe von L-NAME**
Die Substanzzugabe ist auf der Zeitachse markiert.
(Versuch 3 – ROI 01, 09, 17, 28, 29, 48)

### 5.5.1.3. L-NMMA

Eine Synchronisation der Oszillationen zeigt sich ebenso bei der Zugabe des NOS-Inhibitor L-NMMA in einer Konzentration von 100 µM. Auch diese Ergebnisse des dritten eingesetzten NOS-Inhibitors stützen die These, dass die Abschaltung von NOS die Gap Junction Kopplung verstärkt und darüber die Synchronisierung oszillierender Zellen ermöglicht.

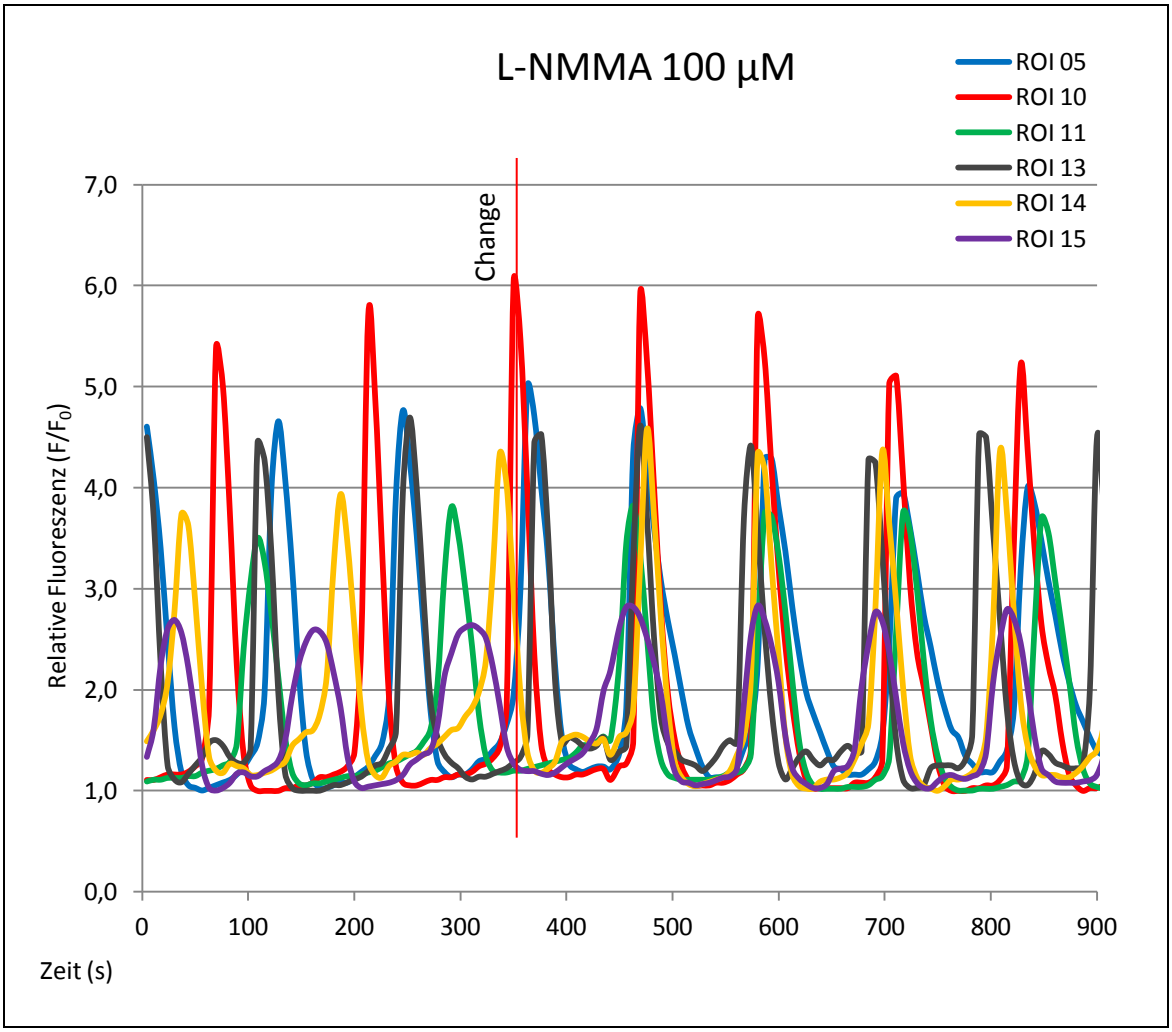


**Abb. 39: Synchronisation der Oszillation durch Zugabe von L-NMMA**
Die Substanzzugabe ist auf der Zeitachse markiert.
(Versuch 6 – ROI 05, 10, 11, 13, 14, 15)

#### 5.5.1.4. DPI

DPI, ein NOS- und NADPH-Oxidase-Inhibitor, synchronisiert die Oszillationen bei der Anwendung in einer Konzentration von 10 µM. Da der NOS-Inhibitor DPI auch die NADPH-Oxidase blockt, kann und sollte bestimmt werden, über welchen Weg DPI die Calcium-Oszillationen beeinflusst. Wie im nachfolgenden Abschnitt „NADPH-Oxidase Inhibitor" gezeigt, hat die Blockierung der NADPH-Oxidase keinen Einfluss auf die Calcium-Oszillationen. Abermals wird somit die Bedeutung der NOS-Inhibitoren für die gesteigerte Gap Junction Permeabilität der ASCs aufgezeigt.

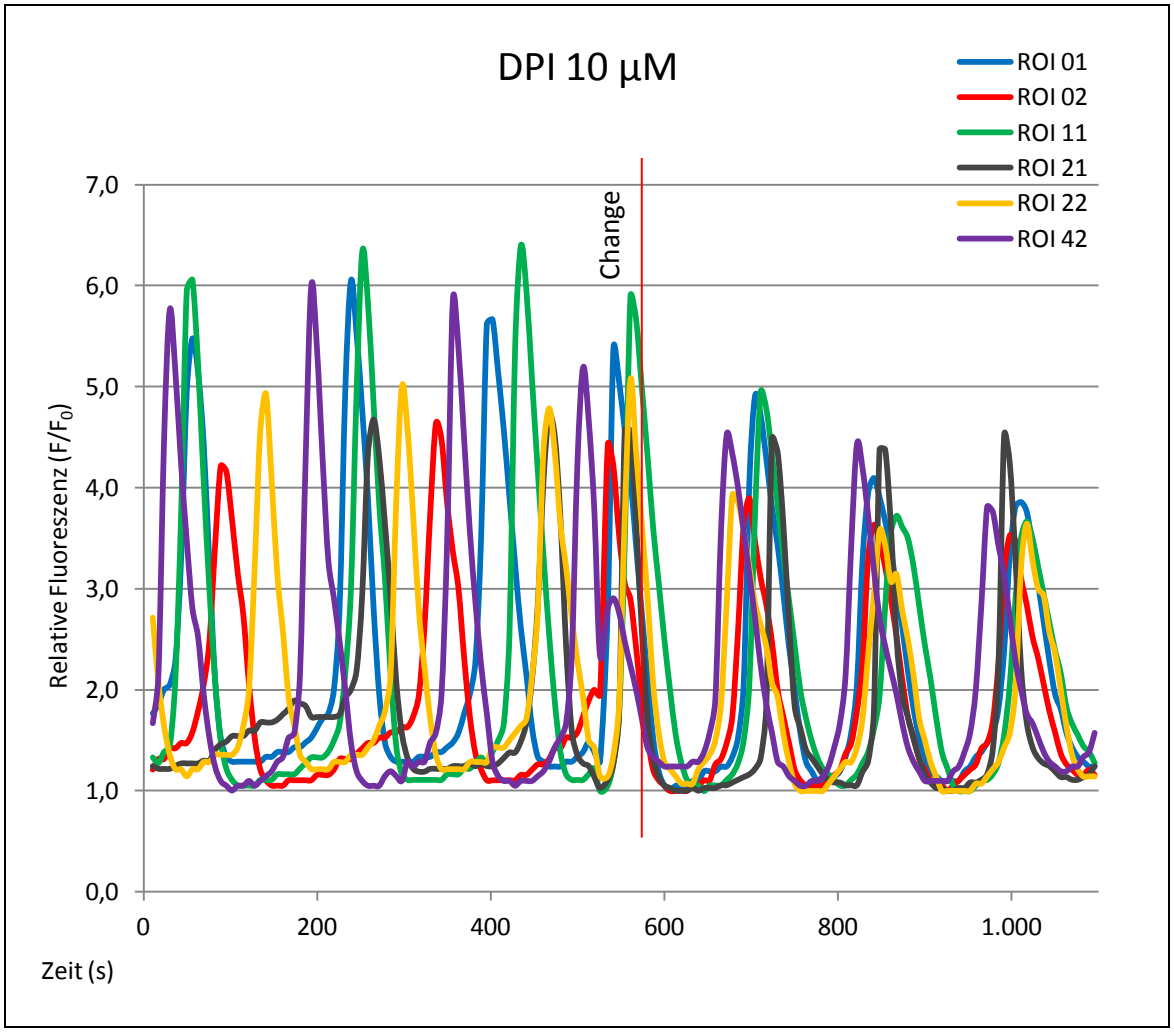


**Abb. 40: Synchronisation der Oszillation durch Zugabe von DPI**
Die Substanzzugabe ist auf der Zeitachse markiert.
(Versuch 5 – ROI 01, 02, 11, 21, 22, 42)

## 5.5.2. *NADPH-Oxidase Inhibitor*

Als NADPH-Oxidase Inhibitor wurde Apocynin ausgewählt, da es ausschließlich NADPH-Oxidase verhindert, ohne einen Effekt auf NOS zu haben. Die Calcium-Oszillationen zeigen im Versuch mit Apocynin keine Veränderungen. Dies zeigt, dass die Blockierung der NADPH-Oxidase offensichtlich nicht zu synchronen Formen der Calcium-Oszillation führt. Die von DPI bewirkte Synchronisation der Calcium-Oszillation geschieht offensichtlich nur über die Verhinderung der NOS.

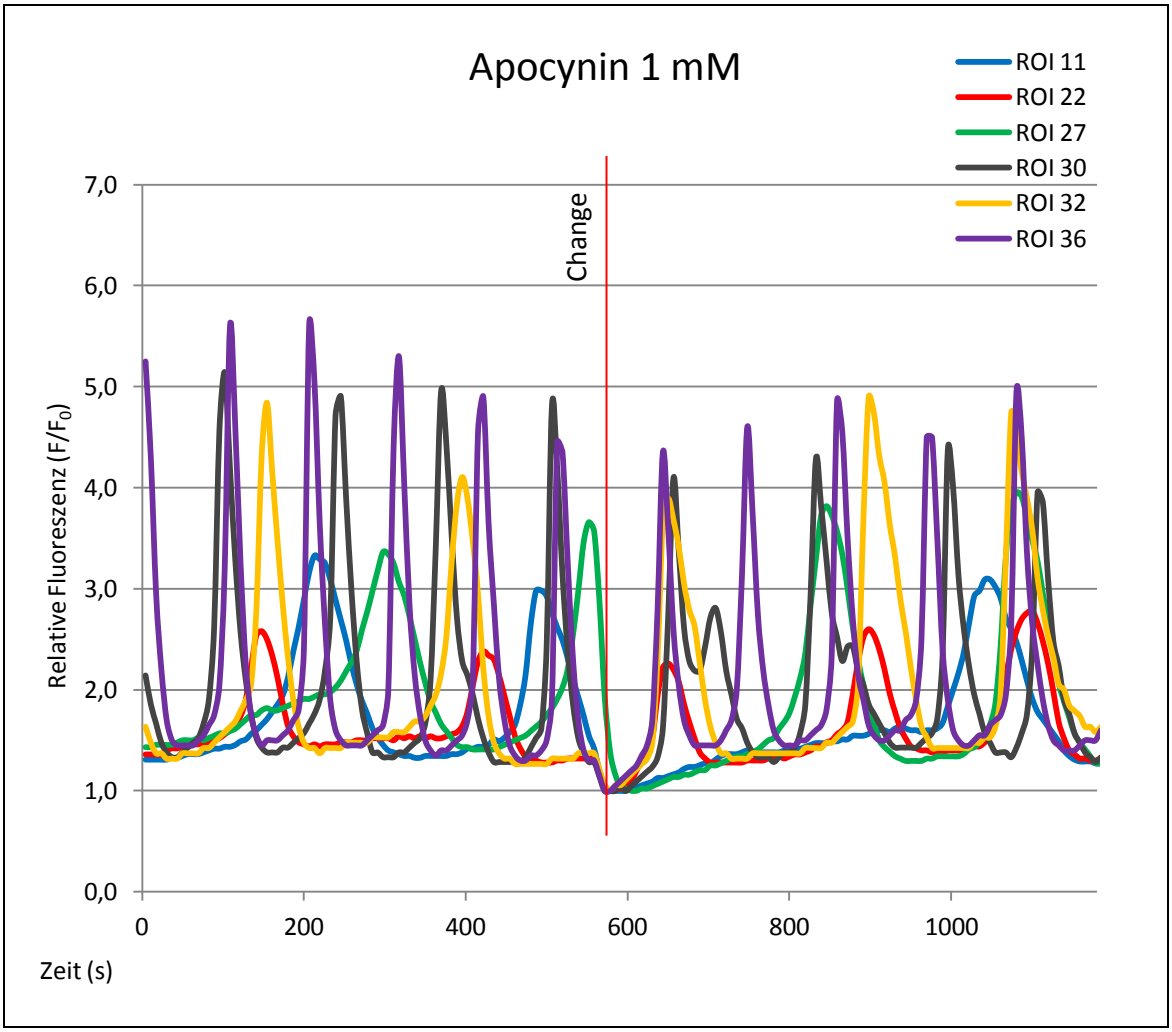


**Abb. 41: Keine Veränderung der Oszillation durch Zugabe von Apocynin**
Die Substanzzugabe ist auf der Zeitachse markiert.
(Versuch 6 – ROI 11, 22, 27, 30, 32, 36)

## 5.5.3. *NO Donatoren*

Da NOS-Inhibitoren Calcium-Oszillationen synchronisieren ist zu untersuchen, ob die intrazelluläre NO Konzentration für die Gap Junction Regulation eine Rolle spielt. Die Versuche mit NO Donatoren erhöhen die intrazelluläre NO Konzentration, zeigen jedoch keine Auswirkungen auf die Calcium-Oszillationen.

### 5.5.3.1. SNAP

Oszillierende ASCs zeigen keine Veränderung in ihren Calcium-Oszillationen nach der Zugabe des NO Donators SNAP in einer Konzentration von 100 µM.

Ein Einfluss der NO Donatoren auf die Calcium-Oszillation kann somit ausgeschlossen werden.

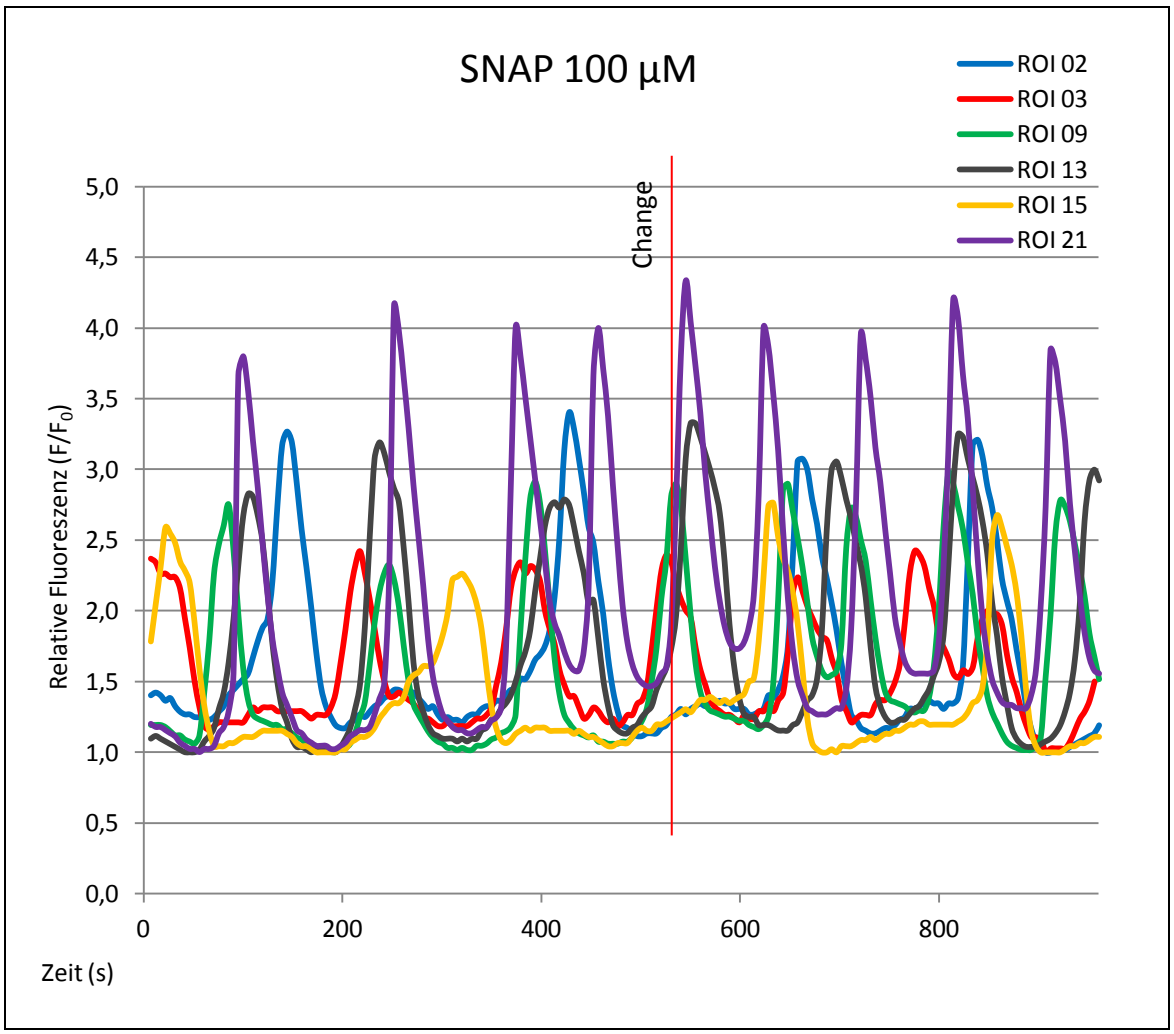


**Abb. 42: Keine Veränderung der Oszillation durch Zugabe von SNAP**
Die Substanzzugabe ist auf der Zeitachse markiert.
(Versuch 2 – ROI 02, 03, 09, 13, 15, 21)

### 5.5.3.2. SNP

Die Zugabe von SNP, ein weiterer NO Donator, in einer Konzentration von 100 µM, zeigt ebenfalls keine Auswirkung auf die Calcium-Oszillationen. Die Oszillationen der ASCs sind bezüglich Amplitude und Frequenz vor der Zugabe, wie nach der Zugabe des NO Donators ohne auffällige Veränderungen.

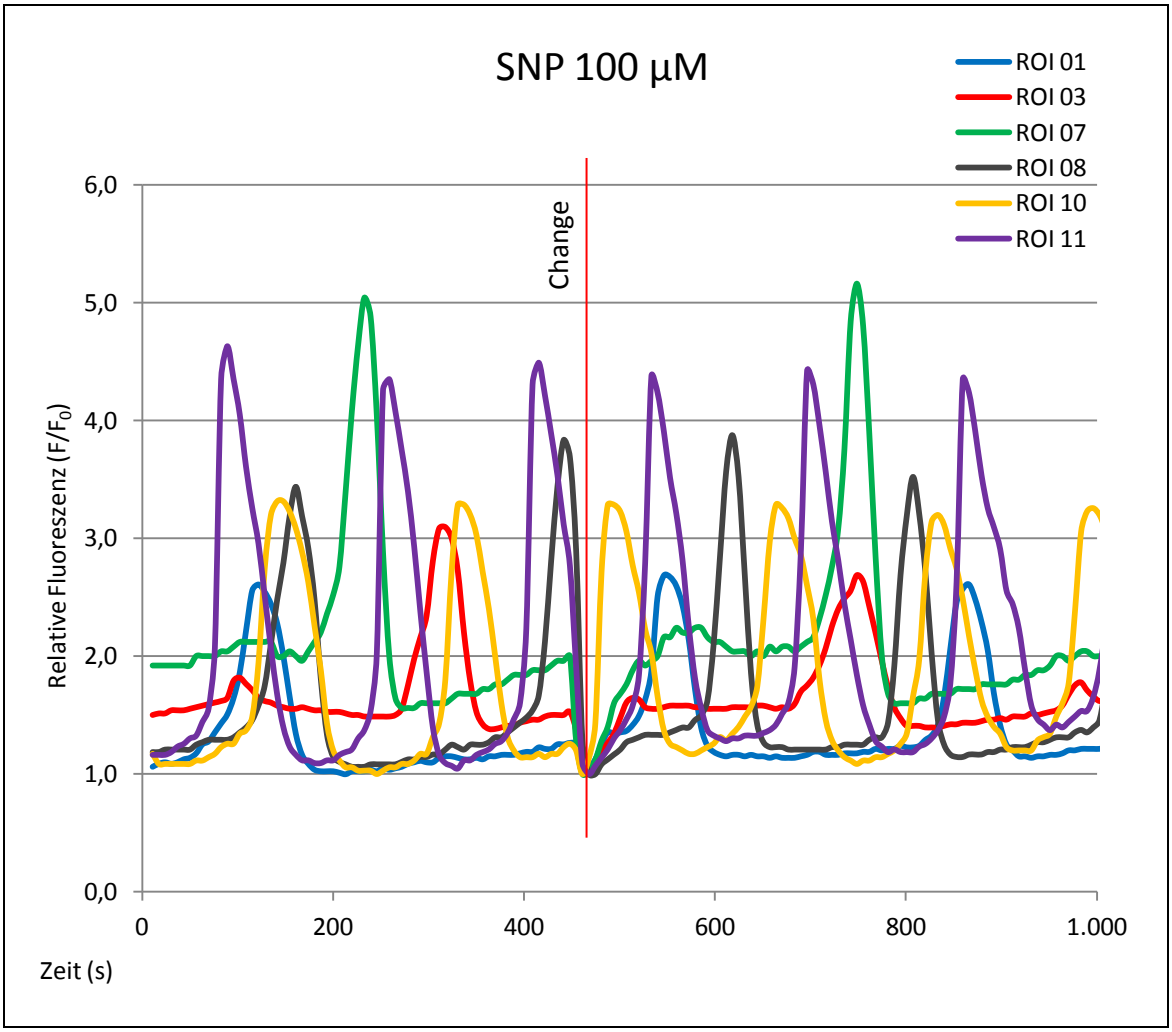


**Abb. 43: Keine Veränderung der Oszillation durch Zugabe von SNP**
Die Substanzzugabe ist auf der Zeitachse markiert.
(Versuch 1 – ROI 01, 03, 07, 08, 10, 11)

## 5.6. Kontrolle der Gap Junction Kommunikation und Regulation im Fotobleichverfahren

Um die Wirkung der NOS-Inhibitoren und Gap Junction Blocker zu überprüfen, wurde ein weiteres Untersuchungsverfahren eingesetzt. Bei der FRAP-Technik werden die ASCs mit dem Fluoreszenz -Indikator Calcein in einer Konzentration von 5 µM inkubiert. Dann wird eine einzelne Zelle fotogebleicht und der darauf eintretende Rückfluss des Calceins gemessen. Hierzu wird die Intensität der Fluoreszenz erfasst, die eine direkte Messgröße für die Calcein-Konzentration ist. Somit kann die Menge des Calceins, als auch die Kinetik des Rückflusses festgestellt werden. Mit diesem Verfahren sind Gap Junction Blocker, NOS-Inhibitoren und zur Kontrolle unbehandelte Zellen verglichen worden.

Als Gap Junction Blocker wird 1-Heptanol wie in den Live-Data-Verfahren in einer Konzentration von 2,5 mM eingesetzt. Auch die beiden NOS-Inhibitoren DPI und L-NAME werden mit den Konzentrationen der vorrangehenden Versuche (DPI mit 10 µM und L-NAME mit 50 µM) angewandt. Außerdem werden als Kontrollgruppe ASCs, die ausschließlich mit Calcein inkubiert sind, mit der gleichen Technik gebleicht. Die Lichtstärke und die Bleichdauer sind für alle Versuche konstant.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe steigern die NOS-Inhibitoren den Rückfluss nach dem Bleichen, während der Gap Junction Blocker den Rückfluss vermindert. So kann auch im FRAP-Verfahren gezeigt werden, dass die NOS-Inhibitoren die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions steigern. Durch die zwei unterschiedlichen Untersuchungsverfahren ist dieses Ergebnis deutlich gesichert.

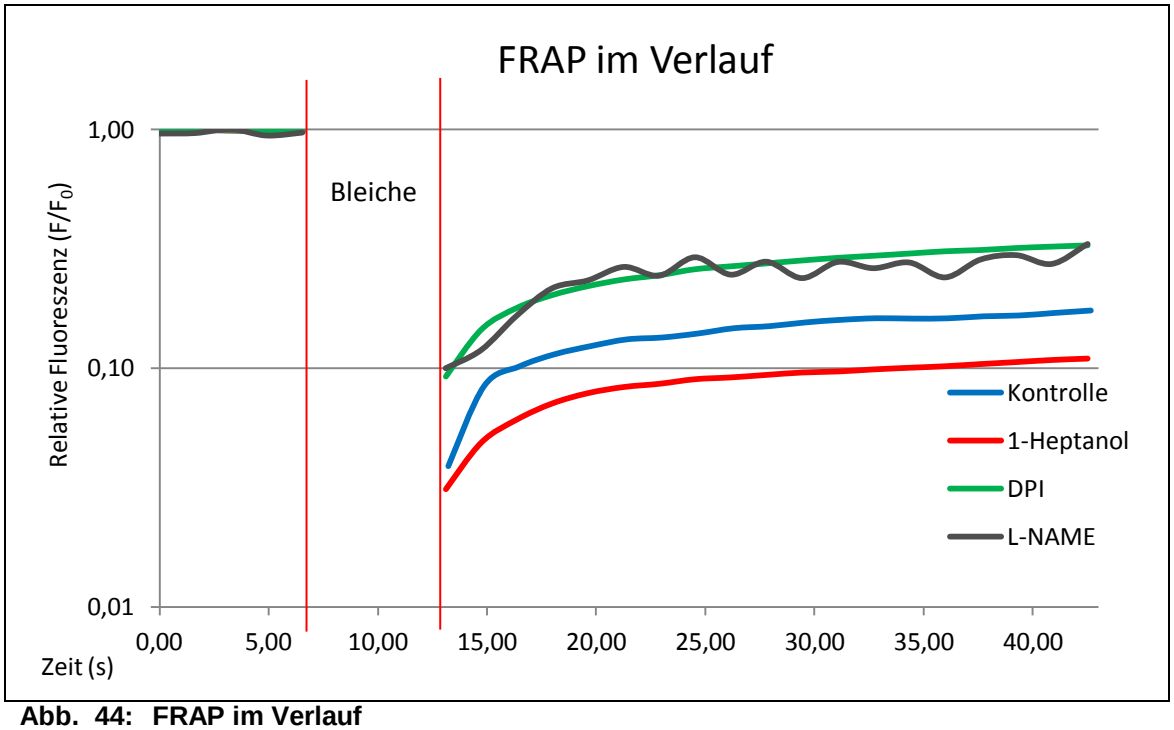


**Abb. 44: FRAP im Verlauf**
Relative Fluoreszenz der Durchschnittswerte (n=50), logarithmische Darstellung im Vergleich zur Kontrolle:
Gap Junction Blocker: 1-Heptanol (2,5 mM)
NOS-Inhibitoren: DPI (10 µM) und L-NAME (50 µM)

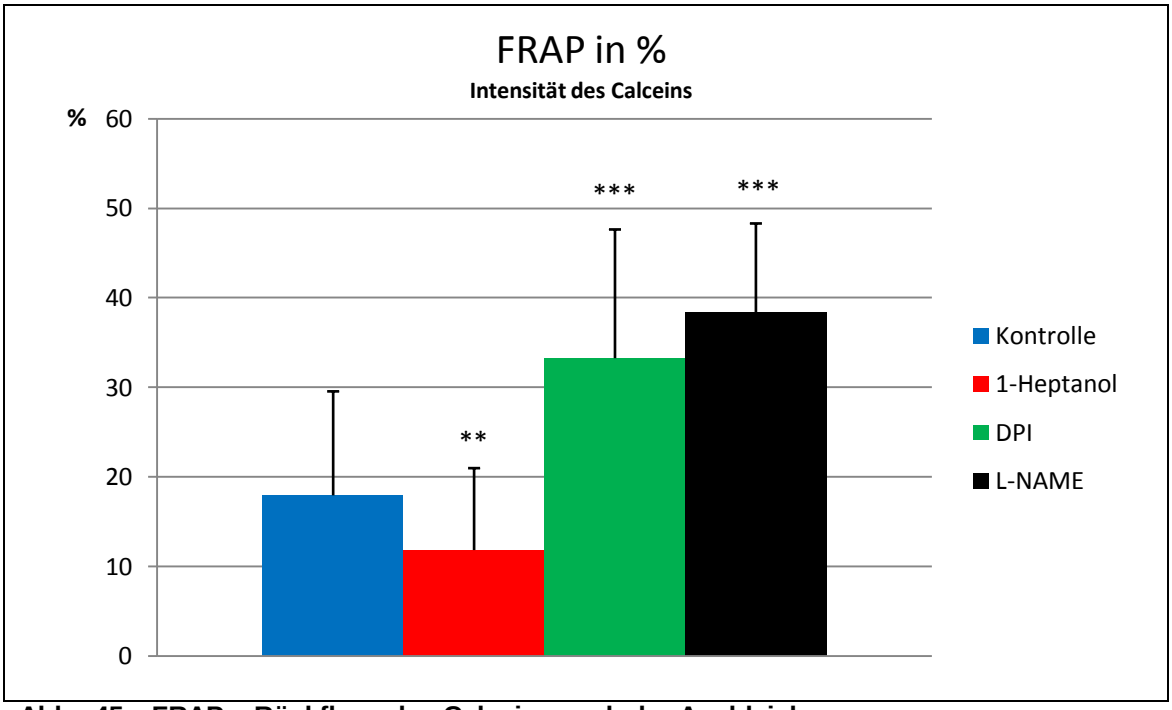


**Abb. 45: FRAP – Rückfluss des Calceins nach der Ausbleichung**
Prozentuale Darstellung mit Standardabweichung des durchschnittlichen maximalen Calceienrückflusses (n=50).
Kontrolle 17,95 % ± 11,61
Gap Junction Blocker: 1-Heptanol (2,5 mM) 11,84 % ± 9,15; t-Test p<0,01
NOS-Inhibitoren: DPI (10 µM) 33,27 % ± 14,38; t-Test p<0,001
L-NAME (50 µM) 38,31 % ±18,10; t-Test p<0,001

## 5.7. ROS-System

Durch den engen Zusammenhang des ROS-Systems mit dem NO System und deren dynamischen Gleichgewichts wurden auch freie Radikalfänger in Bezug auf die Calcium-Oszillationen untersucht. Bei diesen Experimenten kommen Trolox, Rutin, Luteolin und NMPG zum Einsatz. Bei keinem dieser freien Radikalfänger zeigte sich eine Veränderung der Oszillation. Somit kann die Beteiligung des ROS-Systems an der Entstehung und Aufrechterhaltung der Calcium-Oszillationen ausgeschlossen werden. Im Folgenden die Ergebnisse der Versuche mit den unterschiedlichen Radikalfängern im Einzelnen:

Bei der Zugabe von Trolox in einer Konzentration von 100 µM verändert sich die Calcium-Oszillation nicht.

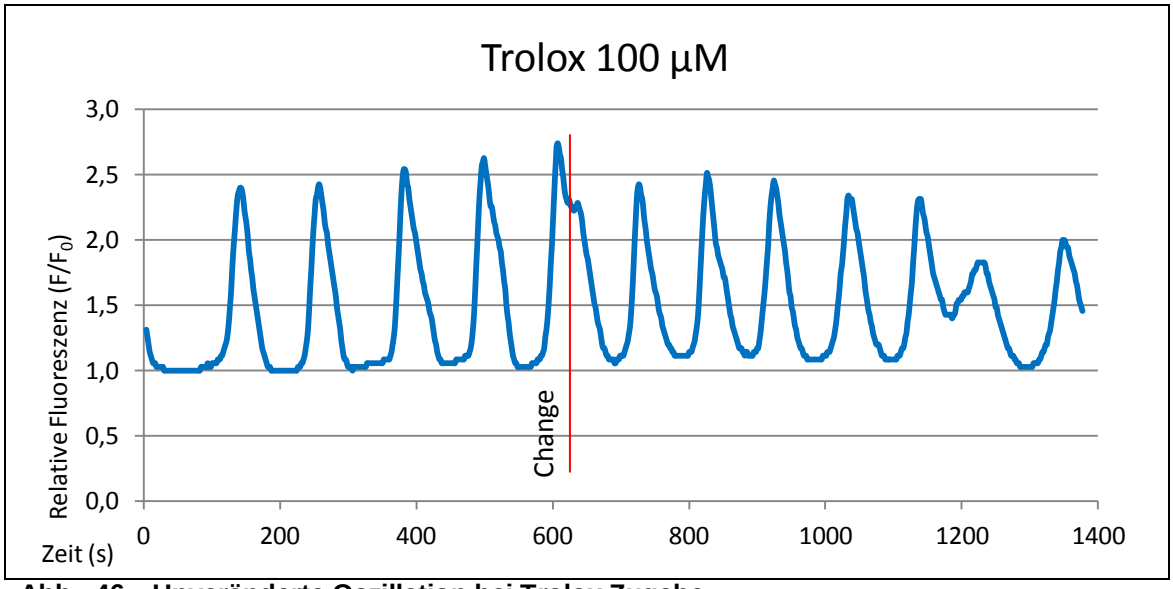


**Abb. 46: Unveränderte Oszillation bei Trolox Zugabe**
Die Substanzzugabe ist auf der Zeitachse markiert.
(Versuch 2 – ROI 03)

Auch bei der Zugabe von Rutin in einer Konzentration von 100 µM zeigen die Calcium-Oszillationen keine Veränderungen.

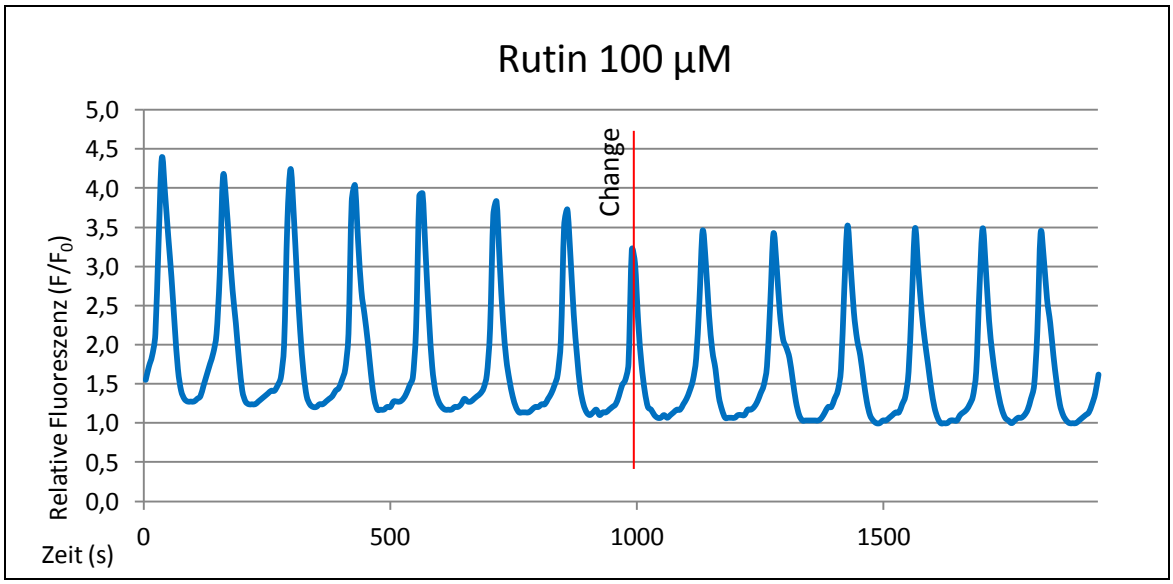


**Abb. 47: Unveränderte Oszillation bei Rutin Zugabe**
Die Substanzzugabe ist auf der Zeitachse markiert.
(Versuch 3 – ROI 16)

Auch mit dem dritten eingesetzten freien Radikalfänger Luteolin in einer Konzentration von 100 µM zeigen sich keine Veränderungen bei der Calcium-Oszillation.

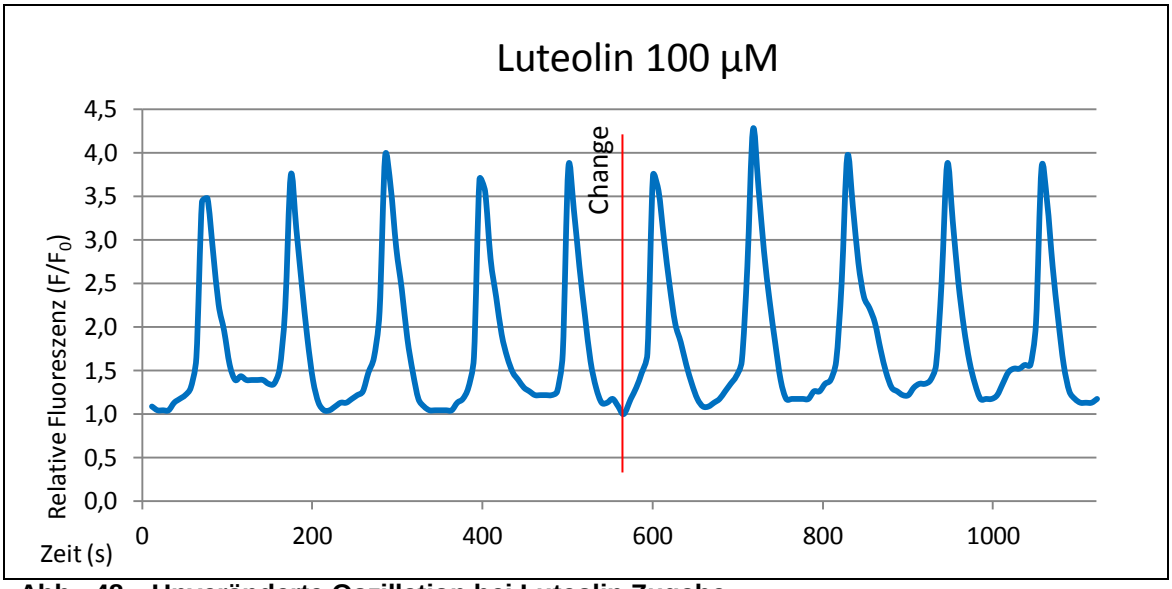


**Abb. 48: Unveränderte Oszillation bei Luteolin Zugabe**
Die Substanzzugabe ist auf der Zeitachse markiert.
(Versuch 3 – ROI 19)

Abermals keine Veränderung der Calcium-Oszillation beim vierten Radikalfänger N-(2-Mercapto-propionyl)-glycin in einer Konzentration von 100 µM.

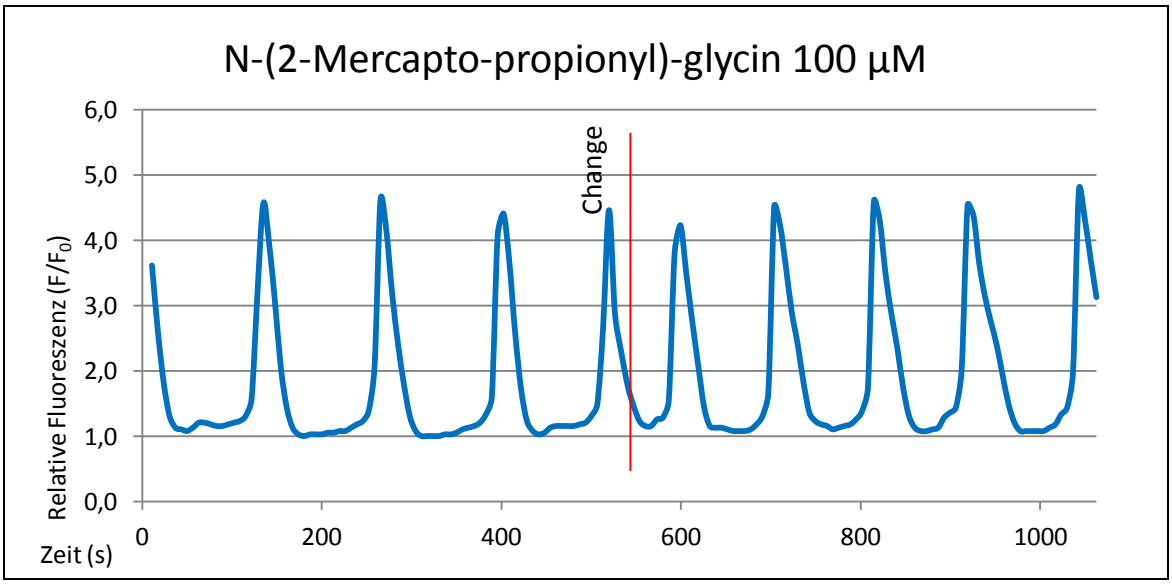


**Abb. 49: Unveränderte Oszillation bei N-(2-Mercapto-propionyl)-glycin Zugabe**
Die Substanzzugabe ist auf der Zeitachse markiert.
(Versuch 3 – ROI 01)

## 5.8. Kreuzproben

### 5.8.1. *Lösungsmittel DMSO*

Bei einer Vielzahl der eingesetzten Chemikalien werden Lösungen mit einem Zusatz des Lösungsmittels DMSO verwendet. Um mögliche Auswirkungen des DMSO auf die Calcium-Oszillationen auszuschließen, wurden 500 µl HAM's F-10 / DMSO-Lösung mit einer DMSO-Konzentration von 12,8 µM zu den oszillierenden Zellen hinzugegeben. Die Zelloszillationen bleiben von der DMSO-Zugabe unbeeindruckt.

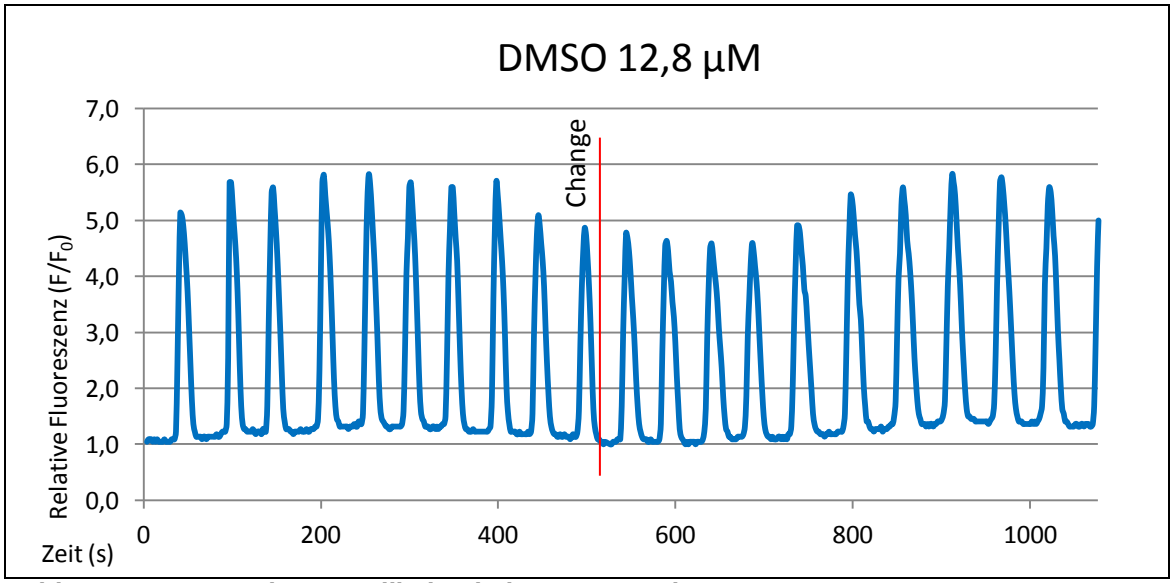


**Abb. 50: Unveränderte Oszillation bei DMSO Zugabe**
Die Substanzzugabe ist auf der Zeitachse markiert.
(Versuch 3 – ROI 17)

### 5.8.2. *Nährmedium HAM's F-10*

Ebenfalls auszuschließen ist, dass das mechanische Einpipettieren von Flüssigkeiten die Oszillation beeinflusst. Hierzu werden 500 µl HAM's F-10 Medium zu oszillierenden Zellen hinzugegeben. Wie zu erwarten reagieren die Zellen nicht auf die Zugabe der Flüssigkeit.

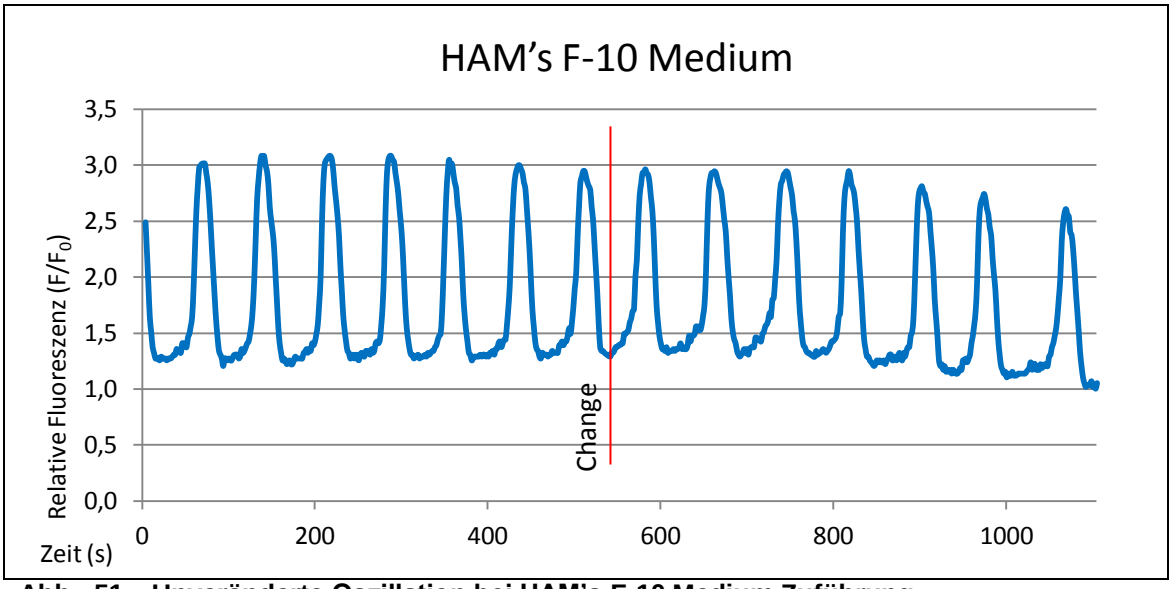


**Abb. 51: Unveränderte Oszillation bei HAM's F-10 Medium Zuführung**
Die Substanzzugabe ist auf der Zeitachse markiert.
(Versuch 1 – ROI 26)

## 5.9. Zusammenfassung der Ergebnisse

Undifferenzierte ASCs zeigen stetige, spontane, asynchrone Calcium-Oszillationen. Im Laufe der Arbeit konnte gezeigt werden, dass zur Aufrechterhaltung der Oszillationen die PLC, der $IP_3$-Rezeptor und die Calciumfreisetzung aus dem ER benötigt werden. Im Rückschluss kann angenommen werden, dass die Calcium-Oszillationen über Calciumspeicher aus dem ER und über den PLC - $IP_3$ Signalweg generiert werden.

Bei Betrachtung der individuellen Zelle werden typische Oszillationsmuster mit gleichbleibender Frequenz und Amplitude gefunden. Im Zellverband können keine Synchronisation der Oszillationen beobachtet werden. Dies legt eine niedrige interzelluläre Kommunikation in Bezug auf Calciumsignale nahe. Jedoch benötigt die Oszillation Gap Junctions, da bei der Ausschaltung dieser die Oszillationen sofort aufhören.

Da NO in der Literatur für einige Zelltypen als Regulator der Permeabilität von Gap Junctions bekannt ist, sind NOS-Inhibitoren zur Untersuchung der ASCs herangezogen worden. Die NOS-Inhibitoren synchronisieren die Calcium-Oszillationen der gesamten Zellkolonie. Hieraus ergibt sich der klare Hinweis, dass NOS-Inhibitoren die Permeabilität von Gap Junctions bei ASCs steigern.

Die NO Konzentration allein scheint aber keine Rolle bei der Permeabilität der Gap Junctions zu spielen, da NO Donatoren keinen Effekt zeigen. Auch Radikalfänger, welche die NO Konzentration durch ihr dynamisches Gleichgewicht mit ROS ändern, lösen keine Veränderungen in den Calcium-Oszillationen aus.

Die für die Differenzierung der ASCs nötigen Calcium-Oszillationen entstehen durch den PLC - $IP_3$ Signalweg mit Calcium aus dem ER. Sie benötigen die interzelluläre Kommunikation mittels Gap Junctions, deren Permeabilität durch NOS-Inhibitoren gesteigert wird. Die Permeabilität wird jedoch nicht durch die intrazelluläre NO Konzentration beeinflusst.

# 6. DISKUSSION

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zu undifferenzierten ASCs haben einen vielversprechenden Einblick in die Calcium-Oszillation, sowie das Phänomen der synchronisierten Calcium-Oszillation durch Gap Junction Regulation ermöglicht.

## 6.1. Calciumsignalwege in mesenchymalen Stammzellen

Adulte Stammzellen sind nicht erregbare Zellen mit der Fähigkeit sich in unterschiedliche Zelltypen differenzieren zu können. Die Differenzierung in Zellen aller drei Keimblätter ist möglich. So können aus adulten Stammzellen erregbare Zellen des kardialen und neuronalen Gewebes entstehen. Diese erregbaren Zellen benutzen Calciumsignale für ihre Erregung, ihre Kontraktionen und ihre synaptischen Übertragungen [Tögel und Westenfelder 2007]. Intrazelluläres, freies Calcium ($Ca^{2+}$) ist ein wichtiger biologischer Signalträger, der in der Zelle für viele Prozesse wie z.B. Erregung, Exozytose, Zellmobilität, Apoptose, Transkription von Genen und Zelldifferentiationen Voraussetzung ist [Clapham 2007; Pollheimer und Knöfler 2005]. Die zwei Hauptquellen des Calciums sind das extrazelluläre Calcium, das über die Plasmamembran in das Innere der Zelle gelangt, sowie das intrazelluläre Calcium, das in zelleigenen Speichern zur Verfügung steht. Die Bedeutung des extrazellulären Calciums wurde für ASCs [Steffen 2008] und für mesenchymale Zellen aus Knochenmark [Kawano, Shoji et al. 2002] von anderen bereits untersucht. Für die mesenchymalen ASCs konnte die Freisetzung des Calciums aus dem ER als intrazellulärer Calciumspeicher nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit Ergebnissen für mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark [Kawano, Shoji et al. 2002]. Neben dem in der vorliegenden Untersuchung verwendetem Thapsigargin wurde in der erwähnten Arbeit außerdem auch noch Cyclopiazonicsäure zum Nachweis verwendet. ASCs können mit mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark durchaus verglichen werden, denn beide zeigen spontane Calcium-Oszillationen, die vom $IP_3$-Rezeptor abhängig sind und somit nahelegen,

dass sie vergleichbare Mechanismen der Zelldifferenzierung verwenden[Kawano, Shoji et al. 2002]. Obwohl beide Stammzellpopulationen sich in einigen CD-Markern unterscheiden kann dieser Vergleich durchaus herangezogen werden [De Ugarte, Alfonso et al. 2003; Zuk, Zhu et al. 2002].

Auch was die Calciumfreigabe mittels des Signalwegs über den $IP_3$-Rezeptor betrifft, führt der Test mit dem $IP_3$-Inhibitor 2-APB, unabhängig davon, ob die Zellen aus Fett (PLA) oder aus Knochenmark gewonnen werden, zum gleichen Resultat [Kawano, Shoji et al. 2002; Wu, Kamimura et al. 2000].

## 6.2. Spontane Calcium-Oszillationen als Informationsträger

Die beobachteten Frequenzen der spontanen Oszillation liegen in der Betrachtung über alle durchgeführten Experimente im Bereich von 10 mHz bis 1,25 mHz, also vergehen ca. 100 Sekunden bis 800 Sekunden zwischen zwei Spikes. Damit decken sich die erhaltenen Werte mit den Beobachtungen anderer Arbeiten, insbesondere auch mit den Resultaten bei Versuchen mit mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark [Kawano, Shoji et al. 2002]. Auch die Feststellung von anderen, dass nicht alle Zellen aus einer Population spontane Oszillationen zeigen, deckt sich mit den eigenen Ergebnissen. Jedoch erscheint die Angabe einer unteren bzw. minimalen Frequenz aus zwei Gründen problematisch:

- Eine Aussage hierüber ist letztendlich nur durch eine unendlich lange Beobachtung möglich, da immer noch weitere Spikes auftreten könnten. So betrachtet, relativiert sich auch die Aussage, dass nicht alle Zellen einer Population spontane Oszillationen zeigen.
- Mit Oszillation wird eine Zustandsänderung zwischen zwei oder mehreren Zuständen verstanden. Sobald Oszillationen nicht linear ablaufen, also mehr als zwei Zustandsänderungen durchlaufen und quasi multifrequent sind, sind weitere Aussagen über das Messverfahren der Frequenz (z.B. Messung der Grundfrequenz) erforderlich.

Erwähnenswert erscheint die Verlaufsform der Calcium-Oszillation. Fast durchgängig zeigt sich zwischen zwei Spikes, ausgehend vom Wert der geringsten Calciumkonzentration, ein zunächst linearer Anstieg. Erst ab einer gewissen Konzentration wird der Verlauf der Calciumkonzentration dann expotentiell, um den nächsten Konzentrations-Spike zu bilden. Möglicherweise hängt dieser Verlauf mit der Freigabe von Calcium aus unterschiedlichen Speichern zusammen. In Frage kommen hierfür insbesondere Calcium aus dem Mitochondrium und/oder Calcium von Calcium aktivierten Proteinen. Spezielle Untersuchungen, die z.B. die Calciumabgabe aus dem Mitochondrium unterdrücken oder die Abgabe durch Proteine unterbinden, könnten sicherlich näheren Aufschluss hierzu geben.

Bisherige Aussagen zur maximalen Dauer spontaner Oszillationen stellen sich mit den hier durchgeführten Untersuchungen anders dar. Auch wenn mit den eigenen Experimenten nicht versucht wurde eine maximale Dauer festzuhalten, zeigen Versuche mit z.B. 35 Minuten oder 46 Minuten Länge erheblich länger andauernde Oszillationen als bisher an mesenchymalen Stammzellen gemessen wurde [Kawano, Shoji et al. 2002]. Am Ende der Versuchsreihen zeigten die ASCs weiter stetige Oszillationen. Ein Grund für eine definierte maximale Oszillationsdauer vor der Ausdifferenzierung der Zellen wurde in der Literatur nicht gefunden. Somit sollte davon ausgegangen werden, dass mesenchymale Stammzellen bei entsprechenden Bedingungen bis zu ihrer Ausdifferenzierung Oszillationen zeigen.

So wichtig auch die Frage zu den Erscheinungsbildern der spontanen Calcium-Oszillationen gerade auch für die experimentelle Forschung ist, so bleiben die folgenden Kernüberlegungen:

- warum werden überhaupt Oszillationen als Zellsignal verwendet
- warum nehmen Oszillationen diese Signalform bezüglich Amplitude und Frequenz an
- wie sind diese Oszillationen als Code zu verstehen.

Die wohl wichtigste Argumentation hierzu stellt die mögliche Informationsmenge in den Mittelpunkt. Konzentrationsänderungen im Sinne von Oszillationen kön-

nen über die mannigfaltige Änderung von Frequenz und Amplitude und deren Kombination viel mehr Informationen codieren und damit transportieren, als es allmähliche Konzentrationsänderungen vermögen [Schuster, Marhl et al. 2002]. Wie in der anhaltenden Diskussion erkennbar, gibt es gute Gründe gerade die Änderungen der Frequenz und nicht die der Amplitude als eigentlichen Informationsträger auszumachen. Hierbei kommen informationstheoretische Überlegungen wie auch experimentelle Arbeiten zum Tragen [Goldbeter 1996; Kummer, Olsen et al. 2000; Tang und Othmer 1995]. So konnte die Änderung der Frequenz der Calcium-Oszillation als Regulator der Genexpression ermittelt werden [Dolmetsch, Xu et al. 1998]. Darüber hinaus konnten nicht nur Gene an- und abgeschaltet werden, sondern durch elektrische Beeinflussung der Calcium-Oszillation konnte die Differenzierung zu Knochenzellen befördert werden [Sun, Liu et al. 2007]. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Ausdifferenzierung zu einer bestimmten Ziellinie durch einen definierten Code der Calcium-Oszillation bestimmt wird.

## 6.3. Gap Junctions und interzelluläre Kommunikation

Mit der Frage nach dem Grund der Oszillation undifferenzierter Zellen und der Vermutung, dass diese für die Ausdifferenzierung der gesamten Population konstitutiv ist, stellt sich sogleich die Frage der Kommunikation zwischen Zellen, da ohne Koordination eine gleiche Entwicklung schwer vorstellbar ist. Es muss also eine Möglichkeit der Informationsübertragung von Zelle zu Zelle existieren. Der bekannteste und am weitesten verbreitete Weg Information zwischen benachbarten Zellen zu transportieren sind die Gap Junctions. Diese Zellverbindungen existieren in fast allen Zelltypen und lassen kleine Metaboliten, Second-Messenger und elektrische Signale vom Zytosol einer Zelle zum Zytosol einer anderen Zelle hindurchtreten [Dhein 2004; Laird 2006]. Gap Junctions des Cx43 und Cx40 Subtyps konnten bei mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark festgestellt werden und zeigten Kommunikation mittels elektrischer Signale, die durch die Gap Junctions hindurchtreten [Valiunas, Doronin et al. 2004]. In einem anderen Versuch konnte gezeigt werden, dass klonale Stamm-

zellen aus der Leber in Ko-Kultur mit neonatalen Herzzellen sich phänotypisch zu Herzzellen entwickeln, solange zytosolische Kommunikation durch Gap Junctions gegeben war [Anderson, Muller-Borer et al. 2007]. Das Vorhandensein von Gap Junctions des Subtyps Cx43 konnte immunhistochemisch von der Arbeitsgruppe Prof. Sauer auch für ASCs nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark konnte bei ASCs Gap Junctions des Subtyps Cx40 nicht gefunden werden [Sauer, Sharifpanah et al. 2011].

Die in dieser Arbeit verwendeten ASCs benutzen zu ihrer interzellulären Kommunikation Gap Junctions. Wie in den Ergebnissen durch das Blockieren der Gap Junctions gezeigt, ist deren Funktion für die Calcium-Oszillation notwendig. Fehlt diese Verbindung zwischen den Zellen, wird auch die Signalaussendung in Form von Calcium-Oszillation eingestellt. Dieses kann in der Richtung interpretiert werden, dass ohne den Zusammenschluss der Population die individuelle Zelle keine Information über ihre Ausdifferenzierung sendet oder empfängt. Um der Frage nach der Bedeutung der Calcium-Oszillationen genauer nachzugehen, wäre es interessant in einer weiteren Studie zu untersuchen, ob undifferenzierte ASCs, deren Oszillationen durch Gap Junction Blocker verhindert werden, trotzdem ausdifferenzieren. Desweiteren ist noch unbestimmt ob - und wenn ja in welcher Form - Sende- bzw. Empfängerinstanzen speziell für Calcium-Oszillation existieren.

Zusammengefast sind in dieser Diskussion bisher zwei Zustände der Gap Junctions und deren Auswirkung auf die Calcium-Oszillation betrachtet worden:

- unveränderte Gap Junctions mit asynchronen Oszillationen
- geblockte Gap Junctions mit fehlenden Oszillationen.

Als dritten Zustand der Durchlässigkeit der Gap Junctions - Thema des folgenden Abschnittes - gibt es die erleichterte bzw. beförderte Durchlässigkeit durch NOS-Inhibitoren, bei der sich die Calcium-Oszillation als synchron erweist.

## 6.4. Gap Junction Regulation und NO Synthase

Die Synchronisation der Calcium-Oszillation unter NOS-Inhibitoren zeigt eine Möglichkeit die Durchlässigkeit der Gap Junctions zu regulieren. Weiterführende Untersuchungen der AG Prof. Sauer zur Expression von NOS konnten im Antikörpertest und Western Blot bei ASCs nNOS nachweisen - die anderen Isoformen der NOS jedoch nicht [Sauer, Sharifpanah et al. 2011]. In diesen weiterführenden Untersuchungen der AG Prof. Sauer ist zudem die Wirkung der NOS-Inhibitoren nachdrücklich bestätigt worden, indem die nNOS durch siRNA herunter reguliert wurde und sich synchrone Oszillationen einstellten. Auch konnte mit dem NO Donator SNAP die durch siRNA synchronisierten Oszillationen desynchronisiert werden. Diese Versuche haben gezeigt, dass Gap Junction Regulation vom intrazellulären NO Niveau abhängt [Sauer, Sharifpanah et al. 2011]. Da NO die Permeabilität von Gap Junctions reguliert, ist in den eigenen Untersuchungen mit NO Donatoren die Konzentration von NO gesteigert worden. Die spontanen, asynchronen Calcium-Oszillationen der ASCs haben sich durch NO Donatoren nicht verändert; im Gegensatz zu vielen in der Literatur beschriebenen Untersuchungen mit anderen Zelltypen [Kameritsch, Khandoga et al. 2005; Bolanos und Medina 1996]. Es ist davon auszugehen, dass NO in hinreichender Menge vorhanden ist und ein Anstieg der NO Konzentration darüber hinaus keine Wirkung auf die Calcium-Oszillation hat.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Permeabilität der Gap Junctions durch die Unterdrückung der NO Synthase gesteigert und darüber die Calcium-Oszillation in eine synchrone Oszillation multipler benachbarter Zellen überführt. Die Beeinflussung der NO Synthase - und darüber die indirekte Absenkung des NO - zeigt eine ausgeprägte Synchronisation der Calcium-Oszillation bei ASCs und somit eine Veränderung in der Durchlässigkeit der Gap Junctions. Neurowissenschaftliche Untersuchungen zur Funktion der Retina zeigen in Analogie zu den Versuchen mit ASCs ebenfalls einen Zusammenhang zwischen NO Synthase und Gap Junction Permeabilität. In den neuronalen Gap Junctions der amakrinen Zellen der Retina wird durch Lichteinfall vermehrt NO durch die NO Synthase freigesetzt. NO diffundiert in retinale Neuronen und aktiviert dort

die Guanylatcyclase, so dass vermehrt cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) gebildet wird. Die Konzentrationssteigerung des cGMP wiederum aktiviert die Proteinkinase G (PKG), welche ihrerseits durch die Phosphorylierung von Connexine die Gap Junction Permeabilität herabsetzt [Bloomfield und Völgyi 2009; Hu, Pan et al. 2010; Lu und McMahon 1997]. Auch für andere Zelltypen konnten Teilschritte dieses Signalwegs aufgezeigt werden. So konnte an HeLa-Zellen gezeigt werden, dass NO den gleichen Effekt wie cGMP auf die Durchlässigkeit von Gap Junctions hat [Patel, Mitchell et al. 2006]. Auch bei Deiters-Zellen im Corti-Organ wurde die Gap Junction Durchlässigkeit durch NO Donatoren sowie cGMP Analoga verringert [Sakaorat, Steffen et al. 2000]. Ebenso konnte in der Harnblase neugeborener Ratten die Wirkung der NO Synthase über den NO/cGMP Signalweg und die PKG untersucht und in ihrer Auswirkung auf die Blasenkontraktion bestätigt werden [Artim, Kullmann et al. 2009]. Das Zusammenspiel von NO und cGMP bei der Regulation der Durchlässigkeit von Gap Junctions ist auch für Zellen des Neocortexes von Ratten bekannt [Rörig und Sutor 1996a; Rörig und Sutor 1996b]. Die Änderung der Durchlässigkeit durch die Phosphorylierung der Gap Junctions mittels der NO Synthase konnte auch in Zellen des Myometriums von Ratten gezeigt werden [Sladek, Westerhausen-Larson et al. 1999]. Die Veränderung der Permeabilität von Gap Junctions durch Phosphorylierung von Connexinen an Serin oder Tyrosin ist auch bereits untersucht worden [Moreno und Lau 2007].

Durch die vielfältigen dargelegten Zusammenhänge zwischen den Eckpfeilern NO Synthase und Gap Junctions kann die für die Retina ermittelte Signalkette als generelle Signalkette für Gap Junction Regulation durch NO Synthasen angenommen werden und somit auch als Signalweg bei den ASCs. Allerdings sind selbstverständlich zur Verifizierung entsprechende Untersuchungen noch durchzuführen.

## 6.5. Ausdifferenzierung von Zellen und Calcium-Oszillationen

Von ASCs ist bekannt, dass diese nur im undifferenzierten Zustand spontane Calcium-Oszillationen zeigen, in der Differenzierung - z. B. zu Endothel - lassen

sich diese Oszillationen jedoch nicht mehr beobachten [Steffen 2008]. Nach der Diskussion von Signalwegen zwischen Zellen und der Diskussion informationstechnischer Aspekte von Oszillationen als Interzellkommunikation soll nun die übergeordnete Frage nach der Bedeutung für den Prozess der Proliferation diskutiert werden. Die Tatsache, dass Stammzellen während ihrer Ausdifferenzierung Calcium-Oszillationen zeigen, jedoch diese im differenziertem Zustand nicht mehr unterhalten, wirft die Frage nach der Bedeutung dieser biologischen Umstellung auf.

Bei humanen mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark konnten analog zu den ASCs spontane Calcium-Oszillationen im undifferenzierten Zustand beobachtet werden, welche jedoch nach der Ausdifferenzierung zu Adipozyten aufhörten. Gleichzeitig wurden nur bei bestehenden Oszillationen Transkriptionsfaktoren (nuclear factor of activated T-cells - abgekürzt: NFAT) im Zellkern transloziert [Kawano, Otsu et al. 2006]. In einer anderen Untersuchung wurde nicht nur der prinzipielle Zusammenhang zwischen Calcium-Oszillationen und NFAT bestätigt, sondern auch eine Abhängigkeit von der Frequenz der Calcium-Oszillationen konstatiert [Tomida, Hirose et al. 2003]. Auch diese Ergebnisse sind in einer anderen Studie bestätigt worden, bei der darüber hinaus die Beteiligung weiterer Transkriptionsfaktoren - nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF-κB) – und Octamer binding transcription factor / Octamer associated protein (Oct/OAP) entdeckt wurde [Dolmetsch, Xu et al. 1998; Lewis 2003].

Die eingangs aufgestellte Vermutung, dass Calcium-Oszillationen generell bei Stammzellen eine Schlüsselrolle zur Ausdifferenzierung einnehmen, kann somit als hoch wahrscheinlich angesehen werden. Im Lichte der genannten Untersuchungen wird ebenso die Theorie - nach der die Frequenz der Calcium-Oszillationen der eigentliche Informationsträger für die kollektive Zellausbildung ist - zu einem guten Stück gestützt. Zur weiteren Absicherung dieser Thesen sollten entsprechende Untersuchungen insbesondere auch mit ASCs durchgeführt werden.

## 6.6. Abschließende Betrachtung und Ausblick

Aus ethischen Gründen, wie auch aus dem praktischen Grund der leichten und unkomplizierten Verfügbarkeit, sind ASCs sowohl in Bezug zur Forschung wie auch in Bezug zu einer späteren praktischen Anwendung in Richtung Tissue Engineering besonders prädestiniert. Auf der Grundlage der eigenen Untersuchungen, sowie den damit zusammenhängenden Ergebnissen und Fragestellungen anderer, sollen im Folgenden Hinweise und Anregungen zu möglichen weiterführenden Untersuchungen und theoretischen Aufarbeitungen aufgezeigt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entstehung von Calcium-Oszillationen der ASCs zu untersuchen und die daran beteiligten Rezeptoren und Speicher zu bestimmen. Zugleich sind damit Grundlagen zur Beeinflussung der Calcium-Oszillationen für weitere Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet geschaffen worden.

Für ASCs konnte der bekannte Calciumsignalweg (über $IP_3$ – PLC mit Calciumfreigabe aus dem ER) in den Versuchen bestätigt werden. Ergänzungsbedürftig ist jedoch die Untersuchung über die Eintrittsmöglichkeiten des Calciums in die Zelle. Bei mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark wurden als Eintrittsmöglichkeit des Calciums in die Zelle spannungsabhängige Calciumkanäle gefunden [Zahanich, Graf et al. 2005; Ye 2009]. Die Ähnlichkeit der ASCs zu den mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark legt das Vorhandensein ebensolcher Kanäle nahe und bedarf der experimentellen Abklärung.

Die spontanen Calcium-Oszillationen der ASCs wurden in dieser, wie auch in anderen Arbeiten zur Calcium-Oszillation von mesenchymalen Stammzellen, nur phänomenologisch beschrieben. Unter der Annahme, dass Calcium-Oszillationen ein molekularer Code der Zellkolonie zu ihrer Differenzierung sind, müssen die Oszillationen nicht nur phänotypisch beschrieben werden, sondern ihre Informationsfunktion muss dekodiert werden. Eine solche Dekodierung setzt letztendlich eine mathematische Beschreibung der periodischen Calciumänderungen voraus [Schuster, Marhl et al. 2002]. Insbesondere in Hinblick auf zukünftige steuernde Eingriffe auf die Ausdifferenzierung für Tissue Engineering

ist die genaue Kenntnis des Codes mindestens hilfreich, wenn nicht sogar unumgänglich.

Wie schon bei mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark bekannt war und in der vorliegenden Arbeit für ASCs bestätigt werden konnte, sind Gap Junctions als Mittel der interzellulären Kommunikation zur Aufrechterhaltung von Calcium-Oszillationen zwingend erforderlich. Es hat sich gezeigt, dass die Durchlässigkeit der Gap Junctions variiert und diese Variation auch beeinflusst werden kann. Für die ASCs konnte mit der vorliegenden Arbeit die Beeinflussung durch NOS-Inhibitoren demonstriert werden. Der Weg von der Beeinflussung der NO Synthase zur veränderten Durchlässigkeit der Gap Junctions blieb jedoch ein Black-Box Experiment. Wie bereits aufgezeichnet, gibt es eine Reihe von analogen Untersuchungen, die mehr oder weniger Licht in diese Black-Box gebracht haben [Rörig und Sutor 1996; Rörig und Sutor 1996a; Rörig und Sutor 1996b]. Für ASCs ließe sich sicherlich die vermutete Wirkungskaskade von NOS über NO ➜ cGMP ➜ PKG ➜ Phosphorylierung zur Regulierung der Gap Junctions im Detail nachverfolgen. Außerdem kann mit derartigen detaillierten Untersuchungen ein Beitrag geleistet werden, um herauszufinden auf welchen Stufen der Wirkungskaskade eine Beeinflussung der Durchlässigkeit der Gap Junctions möglich ist. So haben weiter oben vorgestellte Untersuchungen, bei denen die Konzentration des cGMPs vermindert bzw. vermehrt wurde, eine gleichartige Wirkung wie NOS-Inhibitoren bzw. NO Donatoren in Bezug auf die Permeabilität der Gap Junctions feststellen können [Bolanos und Medina 1996; Kameritsch, Khandoga et al. 2005; Patel, Mitchell et al. 2006]. Gerade auch im Hinblick auf die gezielte und gesteuerte Ausdifferenzierung zum Zweck des Tissue Engineering können Erkenntnisse über den praktikabelsten Eingriff in die Wirkungskaskade zur Beeinflussung der Gap Junctions von hoher Bedeutung sein und zwar in zweifacher Hinsicht:

- Erstens sind Gap Junctions in der Richtung zu kontrollieren, dass sie in ausreichendem Maß erhalten bleiben, da ein typisches Merkmal von Krebszellen die mangelnde Koppelung der Zellen untereinander ist. So sollte in der Zellkultur während der Phase der Differenzierung die Gap Junction Kommunikation auch diesbezüglich kontrolliert werden. Dieses

Problem stellt sich auch noch einmal mit der Verpflanzung von herangezüchteten Zellen in einen Organismus. Die gezüchteten Zellen müssen nicht nur weiterhin untereinander, sondern auch mit dem sie umgebenden Wirtsgewebe in ausreichendem Maße kommunizieren [Trosko, Chang et al. 2000; Trosko 2007; Leithe, Sirnes et al. 2006].

- Zweitens stellt sich das Problem, wie sich eine Zellpopulation über die durch die Gap Junctions gesteuerten Calcium-Oszillationen und dem darin vermuteten Code in ein ganz spezifisches Gewebe ausdifferenzieren lässt. Um mehr Erkenntnisse zu gewinnen eignen sich unter anderem Langzeituntersuchungen mit ASCs, in denen über mehrere Wochen die Calcium-Oszillationen in ihrem Rhythmus verändert werden. Hierbei wäre interessant, ob die Zellen überhaupt ausdifferenzieren und wenn ja, zu welchem Gewebetyp. Besonders interessiert in diesem Zusammenhang eine Variation der Calcium-Oszillationen über verschiede Bandbreiten und Rhythmen hinweg, um erste Einblicke in mögliche Steuerungsmechanismen der Zellausdifferenzierung zu erhalten. Beispiele, wie die Frequenz der Calcium-Oszillationen verändert werden kann, wenn auch nicht mit Stammzellen, sondern an Epithelzellen der Luftröhre bzw. an glatten Muskelzellen der Nabelschnur, liegen vor [Evans und Sanderson 1999; Meng, To et al. 2007].

Versuche direkt in Richtung Tissue Engineering sind bereits durchgeführt worden und zeigen vielversprechende Resultate. So konnte bei ASCs in Ko-Kultur mit Kardiomyozyten von Ratten eine erhöhte Vaskularisation und räumliche Ausbreitung des angezüchteten Gewebes in vivo erzielt werden [Choi, Matsuda et al. 2010]. Auch ASCs von Ratten, die lokal in Wunden von Ratten injiziert wurden, zeigten eine signifikante Verbesserung der Wundheilung [Nan, Gao et al. 2010]. Autologe ASCs konnten im Tierversuch signifikant die Knochenheilung verbessern [Dragoo, Carlson et al. 2007].

Das ultimative Ziel des Tissue Engineering mit ASCs wäre ein Verfahren zur Beeinflussung der Calcium-Oszillationen zu finden und dadurch die ASCs in jede Ziellinie und Zelltyp gezielt auszudifferenzieren. Mit dem Wissen um diese Technik könnten alle Gewebearten des menschlichen Körpers ersetzt werden.

Die ASCs können sehr einfach aus subkutanem Fettgewebe ohne größeren Eingriff entnommen werden. Nach der Aufbereitung und gezielter Differenzierung im Labor können die so gewonnenen Zellen ohne Probleme zurück in den Ursprungsorganismus transplantiert werden, wo sie als eigene Zellen erkannt werden und dadurch von immunologische Reaktionen und von Abstoßungsprozessen ausgenommen sind. Das Wissen um die Calcium-Oszillationen zu vertiefen und die Technik zur Beeinflussung der Calcium-Oszillationen zu erweitern sind Schlüssel zur Entwicklung dieser vielversprechenden Therapievariante und zugleich die Hoffnung und Erwartung erkrankter Menschen.

# 7. ZUSAMMENFASSUNG

Aus Fettgewebe gewonnene humane Stammzellen (ASCs) sind eine vielversprechende Quelle für Geweberegeneration durch Zelltransplantation. Sie sind einfach zu entnehmen, können zu Zelltypen aller drei Keimblätter ausdifferenzieren und führen, autolog verwendet, zu keinen immunologischen Reaktionen. Bis zu einem möglichen therapeutischen Einsatz sind noch eine Reihe von praktischen wie theoretischen Fragen zu klären, insbesondere nach der gezielten und gesteuerten Ausdifferenzierung. Hierbei haben die Calcium-Oszillationen nach gegenwärtigem Forschungsstand eine Schlüsselfunktion. Die vorliegende Arbeit untersucht an ASCs die Generation von Calcium-Oszillationen und die Regulation der Gap Junctions durch NO.

ASCs zeigen spontane, langanhaltende Calcium-Oszillationen. Das Calcium wird aus intrazellulären Speichern bezogen, da die Oszillationen in Anwesenheit des SERCA-Inhibitors Thapsigargin aufgehoben werden. Die Calcium-Oszillationen werden über den $IP_3$-Signalweg, die PLC und die Gap Junctions reguliert. In Anwesenheit von Antagonisten des $IP_3$-Rezeptors (2-APB) der Phospholipase-C (U-73122) und der Gap Junctions (1-Heptanol und Carbenoxolone) sind keine Oszillationen beobachtet worden. Die Stickstoffmonooxid-Synthase-Inhibitoren (NOS-Inhibitoren) L-NMMA, L-NAME, ETU und DPI synchronisieren dagegen die Oszillationen der beobachteten Zellgruppen. Die Inkubation mit den NO Donatoren SNAP und SNP blieb ohne Effekt. Bei der “fluorescence recovery after photobleaching” Methode (FRAP) zeigt sich ein erhöhter Rückfluss des Fluoreszenz-Indikators Calcein in den gebleichten Bereich in Anwesenheit der NO Inhibitoren DPI und L-NAME. Hieraus lässt sich erkennen, dass die Synchronisierung der Calcium-Oszillation eines verbesserten Durchflusses durch die Gap Junctions bedarf. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass NOS-Inhibitoren die Calcium-Oszillation undifferenzierter Stammzellen aus Fettgewebe synchronisieren, indem sie die Durchlässigkeit der Gap Junctions steuern.

# 8. SUMMARY

Fat-derived mesenchymal stem cells are a promising source of stem cells for cell transplantation, since they can be harvested easily, pose no immunologic difficulties at autologous implantation and can differentiate into cells from all three germinal sheets. In the present study it is shown that undifferentiated human fat-derived stem cells display robust oscillations of intracellular calcium which may be associated with differentiation processes. Calcium oscillations were dependent on calcium release from intracellular stores since they were abolished in the presence of the store-depleting agent thapsigargin. Calcium oscillations were apparently regulated by the inositol 1,4,5-trisphosphate ($IP_3$) pathway and dependent on gap junctional coupling since they were abolished in the presence of the phospholipase C antagonist U73122, in the presence of the $IP_3$ receptor antagonist 2-aminoethoxydiphenylborate (2-APB) as well as in the presence of the gap junction uncouplers 1-heptanol and carbenoxolone. Preincubation with the NOS inhibitors NG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA), N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), 2-etyl-2-thipseudourea (ETU) and diphenylen iodonium (DPI), synchronized calcium oscillations between individual cells within the area of inspection, whereas the NO donor S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP) and sodium nitroprusside (SNP) were without effects. The synchronization of calcium oscillations was due to an improvement of intracellular coupling since fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments revealed increased reflow of the fluorescence indicator Calcein into the bleached area in the presence of the NOS inhibitors DPI and L-NAME. Thus, synchronization of calcium oscillations demonstrates an increased gap junction coupling. In summary the data demonstrates that NOS inhibitors synchronize calcium oscillations in undifferentiated fat-derived stem cells by facilitating gap junctional coupling.

# 9. LITERATURVERZEICHNIS

**ANDERSON**, P.A.; **MULLER-BORER**, B.J.; **ESCH**, G.L.; **COLEMAN**, W.B.; **GRISHAM**, J.W. und **MALOUF**, N.N. (2007): „Calcium signals induce liver stem cells to acquire a cardiac phenotype“. In: *Cell Cycle* (2007), 6, 1565-1569

**ANVERSA**, P. und **NADAL-GINARD**, B. (2002): „Myocyte renewal and ventricular remodelling“. In: *Nature* (2002), 415, 240-243

**ARTIM**, D. E.; **KULLMANN**, F. A.; **DAUGHERTY**, S. L.; **WU**, H. Y. und **DE GROAT**, W. C. (2009): „Activation of the nitric oxide-cGMP pathway reduces phasic contractions in neonatal rat bladder strips via protein kinase G“. In: *Am J Physiol Renal Physiol.* (2009), 297(2), F333-F340 ( Epub 2009 Jun 3)

**ASHJIAN**, P. H.; **ELBARBARY**, A. S.; **EDMONDS**, B.; **DEUGARTE**, D.; **ZHU**, M.; **ZUK**, P. A. und **LORENZ**, H. P. (2003): „In Vitro Differentiation of Human Processed Lipoaspirate Cells into Early Neural Progenitors“. In: *Plast Reconstr Surg* (2003), 111, 1922-1931

**BERRIDGE**, M. J. (1993): „Inositol trisphosphate and calcium signalling“. In: *Nature* (1993), 361, 315-25

**BEZPROZVANNY**, I. und **EHRLICH**, B.E. (1995): „The inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) receptor“. In: *J. Membr. Biol.* (1995), 145, 205-216

**BLOOMFIELD**, S. A. und **VÖLGYI**, B. (2009): „The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina“. In: *Nat Rev Neurosci* (2009), 10(7), 495-506 (Epub 2009 Jun 3)

**BMBF**, Bundesministerium für Bildung und Forschung (1999): „Bekanntmachung des Bundesministeriums für Bildung und Forschung der Förderrichtlinien zu "Biologischer Ersatz von Organfunktionen" vom 23. November 1999“. In: *Bundesanzeiger* (1999), Nr. 230 vom 4.12.1999

**BMBF**, Bundesministerium für Bildung und Forschung (2004): „Richtlinien zur Förderung der"Zellbasierten, regenerativen Medizin"“. In: *Bundesanzeiger* (2004), Nr. 181 vom 24.09.2004

**BOLANOS**, J. P. und **MEDINA**, J.M. (1996): „Induction of nitric oxide synthase inhibits gap junction permeability in cultured rat astrocytes“. In: *J. Neurochem.* (1996), 66, 2091–2099

**BOOTMAN**, M. D.; **YOUNG**, K. W.; **YOUNG**, J. M.; **MORETON**, R. B. und **BERRIDGE**, M. J. (1996): „Extracellular calcium concentration controls the frequency of intracellular calcium spiking independently of inositol 1,4,5-trisphosphate production in HeLa cells“. In: *Biochem. J.* (1996), 314(Pt 1), 347-354

**BRAZELTON**, T. R.; **ROSSI**, F. M.; **KESHET**, G.I. und **BLAU**, H.M. (2000): „From Marrow to Brain: Expression of Neuronal Phenotypes in Adult Mice“. In: *Science* (2000), 290, 1775-1777

**BUTTLER**, A. R.; **NICHOLSON**, R. und **BUTLER**, A. (2003): Life, Death and Nitric Oxide. 1 edition. Cambridge : Royal Society of Chemistry

**CHOI**, Y. S.; **MATSUDA**, K.; **DUSTING**, G. J.; **MORRISON**, W. A. und **DILLEY**, R. J. (2010): „Engineering cardiac tissue in vivo from human adipose-derived stem cells“. In: *Biomaterials* (2010), 31(8), 2236-2242

**CHRIST**, G.J.; **SPEKTOR**, M.; **BRINK**, P.R. und **BARR**, L. (1999): „Further evidence for the selective disruption of intercellular communication by heptanol“. In: *Am. J. Physiol.* (1999), 276, H1911–H1917

**CLAPHAM**, D. E. (2007): „Calcium signaling“. In: *Cell* (2007), 131(6), 1047-1058

**CUI**, L.; **LIU**, B.; **LIU**, G.; **ZHANG**, W.; **CEN**, L.; **SUN**, J.; **YIN**, S.; **LIU**, W. und **CAO**, Y. (2007): „Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model“. In: *Biomaterials* (2007), 28, 5477-5486

**CULOTTA**, E. und **KOSHLAND JR.**, D. E. (1992): „NO news is good news“. In: *Science* 258 (1992), 5090, 1862-1865

**CUTHBERTSON**, K. S. und **COBBOLD**, P. H. (1985): „Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell Ca2+“. In: *Nature* (1985), 316, 541-542

**DAVIDSON**, J.S. und **BAUMGARTEN**, I.M. (1988): „Glycyrrhetinic acid derivatives: a novel class of inhibitors of gap-junctional intercellular communication. Structure-activity relationships“. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1988), 247, 1104–1107

**DAY**, M. L.; **MCGUINNESS**, O. M.; **BERRIDGE**, M. J. und **JOHNSON**, M. H. (2000): „Regulation of fertilization-induced Ca(2+) spiking in the mouse zygote“. In: *Cell Calcium* (2000), 28(1), 47-54

**DE FLORA**, S.; **IZZOTTI**, A.; **D´AGOSTINI**, F. und **CESARONE**, C.F. (1991): „Antioxidant activity and other mechanisms of thiols involved in chemoprevention of mutation and cancer“. In: *Amer. J. Med.* (1991), 91, 122S-130S

**DE UGARTE**, D. A.; **ALFONSO**, Z.; **ZUK**, P. A.; **ELBARBARY**, A.; **ZHU**, M.; **ASHJIAN**, P.; **BENHAIM**, P.; **HEDRICK**, M. H. und **FRASER**, J. K. (2003): „Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow“. In: *Immunology Letters* (2003), 89, 267-270

**DHEIN**, S. (2004): „Pharmacology of gap junctions in the cardiovascular system“. In: *Cardiovasc Res.* (2004), 62, 287-298

**DOLMETSCH**, R. E.; **LEWIS**, R. S.; **GOODNOW**, C. C. und **HEALY**, J. I. (1997): „Differential activation of transcription factors induced by Ca2+ response amplitude and duration“. In: *Nature* (1997), 386(6627), 855-858

**DOLMETSCH**, R. E.; **XU**, K. und **LEWIS**, R. S. (1998): „Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression“. In: *Nature* (1998), 392(6679), 933-936

**DRAGOO**, J. L.; **CARLSON**, G.; **MCCORMICK**, F.; **KHAN-FAROOQI**, H.; **ZHU**, M.; **ZUK**, P. A. und **BENHAIM**, P. (2007): „Healing full-thickness cartilage defects using adipose-derived stem cells.“. In: *Tissue Eng* (2007), 13, 1615-1621

**DUPONT**, G.; **COMBETTES**, L. und **LEYBAERT**, L. (2007): „Calcium dynamics: spatio-temporal organization from the subcellular to the organ level“. In: *Int Rev Cytol.* (2007), 261, 193-245 Review

**DUPONT**, G. und **GOLDBETER**, A. (1998): „CaM kinase II as frequency decoder of Ca2+ oscillations“. In: *Bioessays* (1998), 20, 607-610

**EVANS**, J. H. und **SANDERSON**, M. J. (1999): „Intracellular calcium oscillations induced by ATP in airway epithelial cells“. In: *Am J Physiol.* (1999), 277(1 Pt 1), L30-L41

**FARLEY**, J. und **RUDY**, B. (1988): „Multiple types of voltage-dependent Ca2+-activated K+ channels of large conductance in rat brain synaptosomal membranes“. In: *Biophys J* (1988), 53(6), 919-934

**FERRARI**, G.; **CUSELLA–DE ANGELIS**, G.; **COLETTA**, M.; **PAOLUCCI**, E.; **STORNAIUOLO**, A.; **COSSU**, G. und **MAVILIO**, F. (1998): „Muscle Regeneration by Bone Marrow–Derived Myogenic Progenitors“. In: *Science* (1998), 279, 1526-1530

**FEWTREL**, l C. (1993): „Ca2+ oscillations in non-excitable cells“. In: *Annu Rev Physiol* (1993), 55, 427-454

**FURCHGOTT**, R. F. (1999): „Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide.“. In: *Les Prix Nobel* (1999), 226-243

**GIMBLE**, J. M. und **GUILAK**, F. (2003): „Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization and differentiation potential“. In: *Cytotherapy* (2003), 5, 362-369

**GOLDBETER**, A. (1996): Biochemical oscillations and cellular rhythms: The molecular basis of periodic and chaotic behaviour. Cambridge : Cambridge University Press

**GRATZL**, M. (Hrsg.) (2004): Histologie. 6. Heidelberg : Springer (Deutsche Ärzte-Versicherung)

**GUSSONI**, E.; **SONEOKA**, Y.; **STRICKLAND**, C. D.; **BUZNEY**, E. A.; **KHAN**, M. A.; **FLINT**, A. F.; **KUNKEL**, L. M. und **MULLIGAN**, R. C. (1999): „Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation“. In: *Nature* (1999), 401, 390-394

**HAN**, D.; **WILLIAMS**, E. und **CADENAS**, E. (2001): „Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space“. In: *Biochem J* (2001), 353(Pt 2), 411-416

**HENRY**, P.J.; **DRUMMER**, O. H. und **HOROWITZ**, J. D. (1989): „S-nitrosothiols as vasodilators: implications regarding tolerance to nitric oxide-containing vasodilators“. In: *Br. J. Pharmacol.* (1989), 98, 757-766

**HEUBACH**, J. F.; **GRAF**, E. M.; **LEUTHEUSER**, J.; **BOCK**, M.; **BALANA**, B.; **ZAHANICH**, I.; **CHRIST**, T.; **BOXBERGER**, S.; **WETTWER**, E. und **RAVENS**, U. (2004): „Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells“. In: *J Physiol.* (2004), 554(Pt 3), 659-672 ( Epub 2003 Oct. 24)

**HICK**, C. (1995): Kurzlehrbuch Physiologie. München : Urban und Fischer

**HILLE**, B. (1992): Ionic Channels of Excitable Membranes. 2nd Ed. Sunderland. MA : Sinauer Associates. Inc

**HUBER**, M. T. und **BRAUN**, H. A. (2006): „Stimulus-response curves of a neuronal model for noisy subthreshold oscillations and related spike generation“. In: *Phys Rev E* 73 (2006), 4

**HU**, E. H.; **PAN**, F.; **VÖLGYI**, B. und **BLOOMFIELD**, S. A. (2010): „Light increases the gap junctional coupling of retinal ganglion cells“. In: *J Physiol.* (2010), 588(Pt 21), 4145-4163

**HUNDHAUSEN**, Ch. (2003): Einfluß der endothelialen Autakoide NO und PGI2 auf die Permeabilität endothelialer Gap Junctions. LMU München, Medizinische Fakultät, Dissertation

**IGNARRO**, L. J. (Hrsg.) (2000): Nitric Oxide - Biology and Pathobiology. San Diego, San Francisco, New York, Bostown, Sydney, Tokyo : Academic Press (http://www.amazon.de/gp/reader/0123704200/ref=sib_dp_pt#reader-link)

**ISCOVE**, N. (1990): „Haematopoiesis. Searching for stem cells“. In: *Nature* (1990), 347, 126-127

**KAMERITSCH**, P.; **KHANDOGA**, N.; **NAGEL**, W.; **HUNDHAUSEN**, C.; **LIDINGTON**, D. und **POHL**, U. (2005): „Nitric oxide specifically reduces the permeability of Cx37-containing gap junctions to small molecules“. In: *J Cell Physiol.* (2005), 203(1), 233–242

**KAPUR**, N.; **MIGNERY**, G. A. und **BANACH**, K. (2007): „Cell cycle-dependent calcium oscillations in mouse embryonic stem cells“. In: *Am J Physiol Cell Physiol* (2007), 292, C1510-C1518

**KAWANO**, S.; **OTSU**, K.; **KURUMA**, A.; **SHOJI**, S.; **YANAGIDA**, E.; **MUTO**, Y.; **YOSHIKAWA**, F.; **HIRAYAMA**, Y.; **MIKOSHIBA**, K. und **FURUICHI**, T. (2006): „ATP autocrine/paracrine signaling induces calcium oscillations and NFAT activation in human mesenchymal stem cells“. In: *Cell Calcium* (2006), 39(4), 313-324

**KAWANO**, S.; **OTSU**, K.; **SHOJI**, S.; **YAMAGATA**, K. und **HIRAOKA**, M. (2003): „Ca(2+) oscillations regulated by Na(+)-Ca(2+) exchanger and plasma membrane Ca(2+) pump induce fluctuations of membrane currents and potentials “. In: *Cell Calcium* (2003), 34(2), 145-146

**KAWANO**, S.; **SHOJI**, S.; **ICHINOSE**, S.; **YAMAGATA**, K.; **TAGAMI**, M. und **HIRAOKA**, M. (2002): „Characterization of Ca(2+) signaling pathways in human mesenchymal stem cells“. In: *Cell Calcium* (2002), 32, 165-174

**KESSINGER**, A.; **BIERMAN**, P. J.; **VOSE**, J. M. und **ARMITAGE**, J. O. (1991): „High-dose cyclophosphamide, carmustine, and etoposide followed by autologous peripheral stem cell transplantation for patients with relapsed Hodgkin's disease“. In: *Blood* (1991), 77, 2322-2325

**KOPPEL**, D. E. (1979): „Fluorescence reduistribution after photobleaching“. In: *Biophys. J.* 28 (1979), 281-292

**KORKINA**, L. G. und **AFANAS'EV**, I. B. (1997): „Review: "Antioxidant and chelating properties of flavonoids"“. In: *Adv Pharmacol* 38 (1997), 151-163

**KOWALUK**, E. A.; **SETH**, P. und **FUNG**, H.-L. (1992): „Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle“. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262 (1992), 916-922

**KUMMER**, U.; **OLSEN**, L. F.; **DIXON**, C. J.; **GREEN**, A. K.; **BORNBERG-BAUER**, E. und **BAIER**, G. (2000): „Switching from simple to complex oscillations in calcium signaling“. In: *Biophys J.* (2000), 79(3), 1188-1195

**LAIRD**, D. W. (2006): „Life cycle of connexins in health and disease“. In: *Biochem J.* (2006), 394, 527-543

**LEE**, N. P. und **CHENG**, C. Y. (2008): „Nitric oxide and cyclic nucleotides: their roles in junction dynamics and spermatogenesis“. In: *Adv Exp Med Biol* (2008), 636, 172-185

**LEITHE**, E.; **SIRNES**, S.; **OMORI**, Y. und **RIVEDAL**, E. (2006): „Downregulation of gap junctions in cancer cells“. In: *Crit Rev Oncog* (2006), 12(3-4), 225-256

**LEWIS**, R. S. (2003): „Calcium oscillations in T-cells: mechanisms and consequences for gene expression“. In: *Biochem Soc Trans.* (2003), 31(Pt 5), 925-929

**LI**, G. R.; **DENG**, X. L.; **SUN**, H.; **CHUNG**, S. S.; **TSE**, H. F. und **LAU**, C. P. (2006): „Ion channels in mesenchymal stem cells from rat bone marrow“. In: *Stem Cells* (2006), 24(6), 1519-1528

**LI**, G. R.; **SUN**, H.; **DENG**, X. und **LAU**, C. P. (2005): „Characterization of ionic currents in human mesenchymal stem cells from bone marrow“. In: *Stem Cells.* (2005), 23(3), 371-382

**LI**, Y. J.; **BATRA**, N. N.; **YOU**, L.; **MEIER**, S. C.; **COE**, I. A., Yellowley, C. E. und **JACOBS**, C. R. (2004): „Oscillatory fluid flow affects human marrow stromal cell proliferation and differentiation“. In: *J. Orthop. Res.* (2004), 22, 1283-1289

**LÖFFLER**, G.; **PETRIDES**, P. E. und **HEINRICH**, P. C. (Hrsg.) (2007): Biochemie und Pathobiochemie. 8. Heidelberg : Springer Medizin Verlag (http://www.amazon.de/gp/reader/3540326804/ref=sib_dp_pt#reader-link)

**LÖFFLER**, G.; **PETRIDES**, P. und **HEINRICH**, P. (Hrsg.) (2007): Biochemie und Pathobiochemie. Heidelberg : Springer Medizin Verlag

**LU**, C. und **MCMAHON**, D. G. (1997): „Modulation of hybrid bass retinal gap junctional channel gating by nitric oxide“. In: *J Physiol.* (1997), 499(PT 3), 689-699

**MACKAY**, A. M.; **BECK**, S. C.; **MURPHY**, J. M.; **BARRY**, F. P.; **CHICHESTER**, C. O. und **PITTENGER**, M. F. (1998): „Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow“. In: *Tissue Eng.* (1998), 4, 415-428

**MARUYAMA**, T.; **KANAJI**, T.; **NAKADE**, S.; **KANNO**, T. und **MIKOSHIBA**, K. (1997): „2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P3-induced Ca2+ release“. In: *J Biochem* (1997), 122, 498-505

**MENG**, F.; **TO**, W.; **KIRKMAN-BROWN**, J.; **KUMAR**, P. und **GU**, Y. (2007): „Calcium oscillations induced by ATP in human umbilical cord smooth muscle cells“. In: *J Cell Physiol.* (2007), 213(1), 79-87

**MENTEYNE**, A.; **BURDAKOV**, A.; **CHARPENTIER**, G.; **PETERSEN**, OH. und **CANCELA**, J. M. (2006): „Generation of specific Ca(2+) signals from Ca(2+) stores and endocytosis by differential coupling to messengers“. In: *Curr Biol* (2006), 16, 1931-1937

**MEYER**, T. und **STRYER**, L. (1988): „Molecular model for receptor-stimulated calcium spiking“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A 85* (1988), 5051-5055

**MEYVIS**, T. K. L.; **DE SMEDT**, S. C.; **VAN OOSTVELDT**, P. und **DEMEESTER**, J. (1999): „Fluorescence Recovery After Photobleaching: A Versatile Tool for Mobility and

Interaction Measurements in Pharmaceutical Research“. In: *Pharmaceutical Research* 16 (1999), 8, 1153-1162

**MEZEY**, E.; **CHANDROSS**, K. J.; **HARTA**, G.; **MAKI**, R. A. und **MCKERCHER**, S. R. (2000): „Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated in Vivo from Bone Marrow“. In: *Science 290* (2000), 1779-1782

**MORENO**, A. P. und **LAU**, A. F. (2007): „Gap junction channel gating modulated through protein phosphorylation“. In: *Prog Biophys Mol Biol.* (2007), 94(1-2), 107-119

**MORITA**, K.; **KOKETSU**, K. und **KUBA**, K. (1980): „Oscillation of [Ca2+]i-linked K+ conductance in bullfrog sympathetic ganglion cell is sensitive to intracellular anions“. In: *Nature* (1980), 283, 204-205

**MORITA**, M.; **HIGUCHI**, C.; **MOTO**, T.; **KOZUKA**, N.; **SUSUKI**, J.; **ITOFUSA**, R.; **YAMASHITA**, J. und **KUDO**, Y. (2003): „Dual regulation of calcium oscillation in astrocytes by growth factors and pro-inflammatory cytokines via the mitogen-activated protein kinase cascade“. In: *J Neurosci* (2003), 23, 10944-10952

**NAN**, H.; **GAO**, J. H.; **LU**, F. und **FU**, B. C. (2010): „Transplantation of adipose tissue-derived stem cells promotes soft tissue wound repair in rats (Article in Chinese - PubMed Abstract in Englisch PMID: 21177165)“. In: *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* (2010), 30(12), 2633-2636 Zitiert nach PubMed.gov (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21177165)

**NIH**, National Institutes of Health (2001): Stem cells: Scientific Progress and Future Research. - : Department of Health and Human Services

**O'DONNELL**, B. V.; **TEW**, D. G.; **JONES**, O. T. und **ENGLAND**, P. J. (1993): „Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase“. In: *Biochem J* 290 (1993), 41-49

**ORLIC**, D.; **KAJSTURA**, J.; **CHIMENTI**, S.; **JAKONIUK**, I., Anderson, S. M.; **LI**, B.; **PICKEL**, J.; **MCKAY**, R.; **NADAL-GINARD**, B.; **BODINE**, D. M.; **LERI**, A. und **ANVERSA**, P. (2001): „Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium“. In: *Nature* (2001), 410, 701-705

**PASSIER**, R. und **MUMMERY**, C. (2002): „Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair“. In: *Cardivasc Res* (2002), 58, 324-335

**PATEL**, L. S.; **MITCHELL**, C. K.; **DUBINSKY**, W. P. und **O'BRIEN**, J. (2006): „Regulation of gap junction coupling through the neuronal connexin Cx35 by nitric oxide and cGMP“. In: *Cell Commun Adhes.* (2006), 13 (1-2), 41-54

**PIERCE**, W.; **MURPHY**, S. C.; **M.**, Patricia.; **SHEEHAN**, D.; **CAPLICE**, N. M. und **MACKRILL**, J. J. (2007): „Calcium signaling in vescular stem cells“. In: *Live Sciences 2007* (2007), Proc Life Sciences, PC521: Poster Communications ,

http://www.physoc.org/custom2/publications/proceedings/archive/article.asp?ID=Proc Life SciencesPC521

**PITTENGER**, M. F.; **MACKAY**, A. M.; **BECK**, S. C.; **JAISWAL**, R. K.; **DOUGLAS**, R.; **MOSCA**, J. D.; **MOORMAN**, M. A.; **SIMONETTI**, D. W.; **CRAIG**, S. und **MARSHAK**, D. R. (1999): „Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells“. In: *Science* (1999), 284, 143-147

**PLANAT-BÉNARD**, V.; **MENARD**, C.; **ANDRÉ**, M.; **PUCEAT**, M.; **PEREZ**, A.; **GARCIA-VERDUGO**, J.-M.; **PÉNICAUD**, L. und **CASTEILLA**, L. (2004): „Spontaneous Cardiomyocyte Differentiation From Adipose Tissue Stroma Cells“. In: *Circ Res* (2004), 94, 223-229

**POLLHEIMER**, J. und **KNÖFLER**, M. (2005): „Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review“. In: *Placenta* (2005), 26 Suppl. A, 21-30

**PRANK**, K.; **WARING**, M.; **AHLVERS**, U.; **BADER**, A.; **PENNER**, E.; **MOLLER**, M.; **BRABANT**, G. und **SCHOFL**, C. (2005): „Precision of intracellular calcium spike timing in primary rat hepatocytes“. In: *Syst Biol (Stevenage)* 2 (2005), 31-34

**PROBES**, Molecular (Hrsg.) (1996): Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. 6. Eugene, Oregon :

**RADA**, B., Leto, T. (2008): „Oxidative Innate Immune Defenses by Nox/Duox Family NADPH Oxidases “. In: Egesten, A. / Schmidt, A. / Herwald, H. (Hrsg.) (2008): Trends in Innate Immunity - Contrib Microbiol. Bd. 15. Basel : Karger, 164-187 (http://content.karger.com/produktedb/produkte.asp?doi=10.1159/000136357&typ=pdf)

**REES**, D. D.; **PALMER**, R. M. J.; **SCHULTZ**, H. F.; **HODSON**, H. F. und **MONCADA**, S. (1990): „Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo“. In: *Br. J. Pharmacol.* 101 (1990), 742-752

**REIF**, D. W. und **MCCREEDY**, S. A. (1995): „N-nitro-L-arginine and N-monomethyl-L-arginine exhibit a different pattern of inactivation“. In: *Arch Biochem Biophys.* (1995), 320, 170-176

**RHEE**, S. G. (1999): „Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger“. In: *Exp Mol Med* (1999), 31(2), 53-59

**RÖRIG**, B. und **SUTOR**, B. (1996a): „Nitric oxide-stimulated increase in intracellular cGMP modulates gap junction coupling in rat neocortex“. In: *Neuroreport* (1996), 7(2), 569-572

**RÖRIG**, B. und **SUTOR**, B. (1996b): „Regulation of gap junction coupling in the developing neocortex“. In: *Mol Neurobiol* (1996), 12(3), 225-249

**RÖRIG**, B. und **SUTOR**, B. (1996): „Regulation of gap junction coupling in the developing neocortex“. In: *Mol Neurobiol* (1996), 12(3), 225-249

**SÁEZ**, J. C.; **CONNOR**, J. A. und **SPRAY**, D. C. Bennett, M. V. (1989): „Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (1989), 86, 2708–2712

**SAKAORAT**, B.; **STEFFEN**, M. und **JOSEPH**, S. S. (2000): „Nitric oxide uncouples gap junctions of supporting Deiters cells from Corti's organ“. In: *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* (2000), 440(5), 710-712

**SAUER**, H.; **HOFMANN**, C.; **WARTENBERG**, M.; **WOBUS**, A. M. und **HESCHELER**, J. (1998): „Spontaneous calcium oscillations in embryonic stem cell-derived primitive endodermal cells“. In: *Exp Cell Res 238* (1998), 13-22

**SAUER**, H.; **SHARIFPANAH**, F.; **HATRY**, M.; **STEFFEN**, P.; **BARTSCH**, C.; **HELLER**, R.; **PADMASEKAR**, M.; **HOWALDT**, H. P.; **BEIN**, G. und **WARTENBERG**, M. (2011): „NOS inhibition synchronizes calcium oscillations in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by increasing gap-junctional coupling“. In: *J Cell Physiol* 226 (2011), 6, 1642-1650

**SAUER**, H.; **STEFFEN**, P.; **HATRY**, M. und **WARTENBERG**, M. (2007): „Calcium oscillations in differentiating mesenchymal stem cells derived from human fat tissue“. In: *Acta Physiologica* (2007), P04-L2, 14

**SCHILD**, D. (1996): „Laser scanning microscopy and calcium imaging“. In: *Cell Calcium* (1996), 19, 281-296

**SCHMIDT**, R. F.; **LANG**, F. und **THEWS**, G. (2005): Physiologie des Menschen. Heidelberg : Springer Medizin Verlag

**SCHUSTER**, S.; **MARHL**, M. und **HOFER**, T. (2002): „Modelling of simple and complex calcium oscillations. From single-cell responses to intercellular signalling“. In: *Eur J Biochem* (2002), 269, 1333-1355

**SHESTOPALOV**, V. I. und **PANCHIN**, Y. (2007): „Pannexins and gap junction protein diversity“. In: *Cell. Mol. Life Sci.* (2007), 65, 376-394

**SLADEK**, S.M.; **WESTERHAUSEN-LARSON**, A. und **ROBERTS**, J. M. (1999): „Endogenous nitric oxide suppresses rat myometrial connexin 43 gap junction protein expression during pregnancy“. In: *Biol Reprod* (1999), 61(1), 8-13

**SOUTHAN**, G. J.; **SZABO**, C. und **THIERMAN**, C. (1995): „Isothioureas: potent inhibitors of nitric-oxide synthases with variable isoform selectivity“. In: *Br. J. Pharmacol* (1995), 114, 510-516

**STADTMAN**, E. R. (1992): „Protein oxidation and aging“. In: *Science* (1992), 257 (5074), 1220-1224

**STEFFEN**, P. C. (2008): Spontane Endotheliale Differenzierung von humanen fettabgeleiteten Stammzellen. Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereiches Medizin, Inauguraldissertation

**STRYER**, L.; **TASKER**, R. und **RHODES**, C. (1995): Biochemistry. 4th Ed. New York : W. H. Freeman

**SUN**, S.; **LIPSKY**, S. und **CHO**, M. (2006): „Physical regulation of human mesenchymal stem cells through alteret calcium dynamics“. In: *MCB* 4 (2006), 3(4), 213

**SUN**, S.; **LIU**, Y.; **LIPSKY**, S. und **CHO**, M. (2007): „Physical manipulation of calcium oscillations facilitates osteodifferentiation of human mesenchymal stem cells“. In: *FASEB J* (2007), 21, 1472-1480

**TANG**, Y. und **OTHMER**, H. G. (1995): „Frequency encoding in excitable systems with applications to calcium oscillations“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995), 92(17), 7869-7873

**THASTRUP**, O.; **CULLEN**, P. J.; **DRØBAK**, B. K.; **HANLEY**, M. R. und **DAWSON**, A. P. (1990): „Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca2+ stores by“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990), 87, 2466-2470

**TÖGEL**, F. und **WESTENFELDER**, C. (2007): „Adult bone marrow-derived stem cells for organ regeneration and repair“. In: *Dev Dyn.* (2007), 236(12), 3321-3331

**TOMIDA**, T.; **HIROSE**, K.; **TAKIZAWA**, A.; **SHIBASAKI**, F. und **IINO**, M. (2003): „NFAT functions as a working memory of Ca2+ signals in decoding Ca2+ oscillation“. In: *EMBO J.* (2003), 22(15), 3825-3832

**TROSKO**, J. E. (2007): „Gap junctional intercellular communication as a biological "rosetta stone" in understanding, in a systems biological manner, stem cell behavior, mechanisms of epigenetic toxicology, chemoprevention and chemotherapy“. In: *J Membr Biol* (2007), 218, 93-100

**TROSKO**, J. E.; **CHANG**, C. C.; **WILSON**, M. R.; **UPHAM**, B.; **HAYASHI**, T. und **WADE**, M. (2000): „Gap junctions and the regulation of cellular functions of stem cells during development and differentiation“. In: *Methods* (2000), 20, 245-264

**VALIUNAS**, V.; **DORONIN**, S.; **VALIUNIENE**, L.; **POTAPOVA**, I.; **ZUCKERMAN**, J.; **WALCOTT**, B.; **ROBINSON**, R. B.; **ROSEN**, M. R.; **BRINK**, P. R. und **COHEN**, I. S. (2004): „Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions“. In: *J Physiol.* (2004), 555, 617-626 (Epub 2004 Feb 6)

**VAN ACKER**, S. A. B. E.; **TROMP**, M. N. J. L.; **HAENEN**, G. R. M. M.; **VANDERVIJGH**, W. J. F. und **BAST**, A. (1995): „Flavonoids as Scavengers of Nitric Oxide Radical (Abstract)“. In: *Biochem Biophys Res Commun* 214 (1995), 3, 755-759

**VAN DEN WORM**, E.; **BEUKELMAN**, C. J.; **VAN DEN BERG**, A. J.; **KROES**, B. H.; **LABADIE**, R. P. und **VAN DIJK**, H. (2001): „Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils“. In: *Eur J Pharmacol* (2001), 433, 225-230

**VAY**, L.; **HERNANDEZ-SANMIGUEL**, E.; **SANTO-DOMINGO**, J.; **LOBATON**, C. D.; **MORENO**, A.; **MONTERO**, M. und **ALVAREZ**, J. (2007): „Modulation of Ca(2+) release and Ca(2+) oscillations in HeLa cells and fibroblasts by mitochondrial Ca(2+) uniporter stimulation“. In: *J Physiol* (2007), 580, 39-49

**WISLET-GENDEBIEN**, S.; **HANS**, G.; **LEPRINCE**, P.; **RIGO**, J.M.; **MOONEN**, G. und **ROGISTER**, B. (2005): „Plasticity of Cultured Mesenchymal Stem cells: Switch from Nestin-Positive to Excitable Neuron-Like Phenotype“. In: *Stem Cells* (2005), 23, 392-402

**WOBUS**, A.M. (2001): „Potential of embryonic stem cells“. In: *Mol. Aspects Med.* (2001), 22, 149-164

**WU**, J.; **KAMIMURA**, N.; , Takeo, T.; , Suga, S.; **WAKUI**, M.; **MARUYAMA**, T. und **MIKOSHIBA**, K. (2000): „2-Aminoethoxydiphenyl borate modulates kinetics of intracellular Ca(2+) signals mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca(2+) “. In: *Mol Pharmacol* (2000), 58(6), 1368-1374

**WU**, T. W.; **HASHIMOTO**, N.; **WU**, J.; **CAREY**, D.; **LI**, R. K.; **MICKLE**, D. A. und **WEISEL**, R. D. (1990): „The cytoprotective effect of Trolox demonstrated with three types of human cells“. In: *Biochem Cell Biol* (1990), 68, 1189-1194

**XIN**, D. und **BLOOMFIELD**, S. A. (2000): „Effects of nitric oxide on horizontal cells in the rabbit retina“. In: *Vis Neurosci* (2000), 17(5)

**YE**, B. (2009): „Ca2+ Oscillations and Its Transporters in Mesenchymal Stem Cells“. In: *Physo.l Res.* 59 (2009), 3, 323-329

**YOUNG**, J. D.-E.; **COHN**, Z. und **GILULA**, N. B. (1987): „Expression in exogenous systems, lipid bilayers in which fragments of isolated gap junction membranes were incorporated“. In: *Cell.* (1987), 48, 733-743

**YULE**, D. I. und **WILLIAMS**, J. A. (1992): „U73122 inhibits $Ca^{2+}$ oscillations in response to cholecytokinin and carbachol but not JMV-180 in rat pancreatic acinar cells“. In: *J. Biol. Chem* (1992), 267, 13830-13835

**ZAHANICH**, I.; **GRAF**, E. M.; **HEUBACH**, J. F.; **HEMPEL**, U.; **BOXBERGER**, S. und **RAVENS**, U. (2005): „Molecular and functional expression of voltage-operated calcium

channels during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells“. In: *J Bone Miner Res.* (2005), (Epub 2005 May. 31), 20(9), 1637-1646

**ZIMMERMANN**, B. und **WALZ**, B. (1997): „Serotonin-induced intercellular calcium waves in salivary glands of the blowfly Calliphora erythrocephala“. In: *J Physiol* (1997), 500 (Pt 1), 17-28

**ZUK**, P. A.; **ZHU**, M.; **ASHJIAN**, P.; **DE UGARTE**, P. D.; **HUANG**, J. I.; **MIZUNO**, H.; **ALFONSO**, Z. C.; **FRASER**, J. K.; **BENHAIM**, P. und **HEDRICK**, M. H. (2002): „Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells“. In: *Molecular Biology of the cells* (2002), 13, 4279-4295

# 10. PUBLIKATIONEN

Sauer, H.; Sharifpanah, F.; Hatry, M.; Steffen, P.; Bartsch, C.; Heller, R.; Padmasekar, M.; Howaldt, H. P.; Bein, G.; Wartenberg, M.: “NOS inhibition synchronizes calcium oscillations in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by increasing gap junctional coupling”. In: J Cell Physiol. (2011) 226, 6, 1642-1650

Sauer, H.; Steffen, P.; Hatry, M.; Wartenberg, M. (2007): “Calcium oscillations in differentiating mesenchymal stem cells derived from human fat tissue”. In Acta Physiologica. 189, P04-L2-14.

# 11. DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Heinrich. Sauer, Physiologisches Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Humanmedizin, dafür bedanken, dass er mir die Chance gegeben hat Forschung zu erleben und Teil seiner Arbeitsgruppe im Labor zu sein.

Mein voller Dank geht auch an alle Mitglieder der Forschungsgruppe für deren Hilfe und Anleitungen.

Natürlich bedanke ich mich bei meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung und Liebe.

Nicht zu vergessen sind meine Kommilitonen Hannah Groot Bramel, Hanna Jitschin und Katharina Graf für ihre offenen Ohren; sie haben sich alle Geschichten über „meine Zellen“ angehört und mir Mut gemacht.