

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie

Zentrumsleiter: Univ.-Prof. Dr. med. Alwin E. Goetz

Klinikumsdirektor: Prof. Dr. med. Christian Zöllner

Untersuchung der ATP induzierten zytosolischen Calciumoszillationen in humanen umbilikalen Endothelzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Jonas de Mooy

aus Wiesbaden

Hamburg 2018

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 08.04.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Rainer Kiefmann

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Andreas Guse

Inhalt

1	Einleitung	6
1.1	Krankheitsbilder der gefäßendothelialen Dysfunktion	6
1.2	Aufbau und Funktion des Gefäßendothels	8
1.2.1	Regulation der endothelialen Barriere	10
1.2.2	Endotheliale Stickstoffmonoxid (NO) Produktion	12
1.3	Calcium und seine Homöostase	13
1.3.1	Die Inositoltriphosphat (IP3) Kaskade	14
1.3.2	Store operated Ca ²⁺ -entry (SOCE)	15
1.3.3	Weitere Mechanismen der Calciumhomöostase	18
1.4	Calciumoszillationen	20
1.5	ATP als Botenstoff und seine Homöostase	23
1.6	Zielsetzung der Arbeit	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Chemikalien	26
2.2	Primäre humane umbilikale Endothelzellen (HUVEC)	26
2.3	Material Zellkultur	26
2.4	Material Epifluoreszenzmikroskopie	27
2.5	Material Molekularbiologie	29
2.6	Primer	30
2.7	Material Proteinbiochemie	32
2.8	Antikörper	34
2.9	Material Transwell Flux Assay	34
2.10	Kultivierung von humanen umbilikalischen Endothelzellen (HUVEC)	35

2.11	Beschichtung der 6-Well und 12-Well Inserts.....	36
2.12	Vorbereitung der HUVEC für Calciumimaging	36
2.13	In vitro Epifluoreszenzmikroskopie.....	37
2.14	Calciumimaging mit Fura-2.....	38
2.14.1	Kalibrierung der Calciumkonzentration	38
2.14.2	Messpuffer	39
2.14.3	Experimentelles Versuchsprotokoll Calciumimaging.....	40
2.15	Experimentelles Versuchsprotokoll P2-Rezeptor Charakterisierung.....	43
2.16	Molekularbiologie	44
2.16.1	mRNA Isolierung.....	44
2.16.2	cDNA Synthese	45
2.16.3	Polymerasekettenreaktion.....	46
2.16.4	Agarose-Gelelektrophorese	46
2.17	Proteinbiochemie.....	47
2.17.1	Proteinextraktion.....	47
2.17.2	Proteinbestimmung	48
2.17.3	SDS-Gelelektrophorese.....	48
2.17.4	Western Blot.....	49
2.17.5	Antikörperdetektion	49
2.18	In vitro Transwell Flux Assay	50
2.19	Statistik	50
3	Ergebnisse.....	52
3.1	Effekt von ATP auf die zytosolische Calciumkonzentration in HUVEC	52
3.2	Effekt von ATP auf die zytosolische Calciumkonzentration in HUVEC - Monolayer.....	54
3.3	Rolle von P2X- und P2Y-Purinrezeptoren	55

3.3.1	Oszillationen nach P2-Rezeptor Agonisten	58
3.4	Untersuchung der Calciumoszillationen	60
3.5	SOCE Aktivität in HUVEC nach ATP Stimulation	62
3.6	ATP beeinflusst Permeabilität von HUVECs in vitro	64
4	Diskussion.....	67
4.1	Diskussion der Methoden	67
4.1.1	Calciumimaging mit Fura-2.....	67
4.1.2	Transwell Flux Assay	69
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	70
4.2.1	Effekt von ATP auf die zytosolische Calciumkonzentration in HUVEC	70
4.2.2	Die Konfluenz der HUVEC beeinflusst die Calciumoszillationen	70
4.2.3	Rolle von P2X- und P2Y-Purinrezeptoren	72
4.2.4	Untersuchung der ATP induzierten Calciumoszillationen	74
4.2.5	ATP aktiviert SOCE in HUVEC	77
4.2.6	ATP verstärkt die endotheliale Barriere in vitro.....	78
5	Zusammenfassung.....	80
6	Anhang.....	84
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	84
6.2	Tabellenverzeichnis	86
6.3	Abkürzungsverzeichnis.....	87
6.4	Literaturverzeichnis.....	90
7	Danksagung.....	106
8	Lebenslauf.....	107
9	Eidesstattliche Versicherung.....	108

1 Einleitung

1.1 Krankheitsbilder der gefäßendothelialen Dysfunktion

Das Gefäßendothel, das die innerste Schicht der Blutgefäße des menschlichen Organismus auskleidet, ist verantwortlich für eine Vielzahl von überlebenswichtigen Funktionen. Dazu gehören u.a. das Bereitstellen von Nährstoffen für die darunterliegenden Gewebe und das Aufrechterhalten des onkotischen Druckes im Gefäßsystem (Deanfield et al. 2007).

Ist im Rahmen von verschiedenen Krankheitsbildern, wie zum Beispiel Sepsis, SIRS oder Lungenödem, die Funktion des Gefäßendothels gestört, kann dies weitreichende Folgen für den Organismus haben. Eine zentrale Rolle spielt die endotheliale Dysfunktion exemplarisch betrachtet bei der Entstehung des kardialen Lungenödems. Bei einer akuten Verschlechterung der linksventrikulären Pumpfunktion kommt es im Sinne eines Rückwärtsversagens zu einer Drucksteigerung und Volumenbelastung im pulmonalen Gefäßbett und dabei zur endothelialen Schädigung. Ein pulmonales Ödem ist die Folge. Es äußert sich klinisch führend mit Dyspnoe und im Extremfall als respiratorisches Versagen (Ware und Matthay 2005). Neben den hämodynamischen Folgen eines akuten Herzversagens ist die respiratorische Symptomatik potentiell lebensbedrohlich.

Häufig erfolgt eine akute Reduktion der kardialen Pumpfunktion mit Folge eines Lungenödems auf Basis einer chronischen Grunderkrankung, wie der koronaren Herzkrankheit, der hypertensiven Herzerkrankung, Klappenerkrankungen oder einer Kardiomyopathie, im Rahmen einer akuten kardialen Dekompensation. Aber auch ohne kardiale Vorschädigung können Erkrankungen wie Myokarditis, metabolische Entgleisungen oder neu auftretende Herzrhythmusstörungen, wie zum Beispiel das Vorhofflimmern, zu

einer akuten Verschlechterung der kardialen Leistungsfähigkeit und unter Umständen zum pulmonalen Ödem führen.

Pathophysiologisch lässt sich die Entstehung eines Ödems durch kardiogene Ursachen mit der Starling-Gleichung herleiten:

$$J_v = K_f([P_c - P_i] - \sigma[\pi_p - \pi_i])$$

Tabelle 1: Legende Starling-Gleichung

J_v	Flüssigkeitsverlagerung
K_f	gefäßendothelialer Filtrationskoeffizient
P_c	kapillärer hydrostatischer Druck
P_i	interstitieller hydrostatischer Druck
σ	Reflektionskoeffizient
π_p	onkotischer Druck der Plasmaproteine
π_i	intestitieller onkotischer Druck

K_f entspricht dem gefäßendothelialen Filtrationskoeffizienten und wird durch Multiplikation der kapillären Oberfläche mit der Wasserdurchlässigkeit definiert. Der hydrostatische Druck, der onkotische Druck und das Verhalten der kapillären Oberfläche stehen als die veränderbaren Faktoren der Gleichung bezüglich der Flüssigkeitsverlagerung zwischen Interstitium und Gefäß im Gleichgewicht. Eine Veränderung eines Faktors kann folglich eine veränderte Flüssigkeitsverlagerung bewirken (Klinke et al. 2010). Im Fall eines kardiogenen Lungenödems steigt der hydrostatische Druck im Gefäßsystem der Lungenkapillaren durch das Rückwärtsversagen des Herzens an und proteinarme Filtrationsflüssigkeit wird vermehrt vom Gefäßsystem in das Interstitium der Lunge verlagert. (Pinto, DS und Kociol, RD; Uptodate; Zugriff am 18. November 2016).

Aus der Starling-Gleichung ergibt sich auch, dass auch eine Veränderung der relativen Wasserdurchlässigkeit der kapillären Oberfläche (enthalten in K_f) das Gleichgewicht der Flüssigkeitsverlagerung verändern kann. So scheint die kapilläre Permeabilität unter erhöhtem intravasalen Druck in experimentellen Ansätzen erhöht, was ein Hinweis auf die (Teil-)Regulation der endothelialen Barriere durch das Gefäßendothel selber ist (West und Mathieu-Costello 1995). Gerade im Hinblick auf potentielle pharmakotherapeutische Optionen des pulmonalen Ödems ist das Verständnis der kapillären Permeabilität von großem Interesse. In besonderem Fokus steht dabei die gefäßendotheliale Regulation seiner eigenen Barrierefunktion und seine potentiell protektiven oder pathologischen Effekte für pulmonale Ödeme jeder Kausalität (Rodrigues und Granger 2015; Sukriti et al. 2014).

1.2 Aufbau und Funktion des Gefäßendothels

Das Gefäßendothel kleidet als Gewebe die zum Lumen zeigende Wandseite von Blutgefäßen aus. Dabei sitzen die Endothelzellen einer Basallamina auf und bilden eine Glykokalix aus. Endothelzellen zeichnen sich durch die Ausbildung dichter Zell-Zell Kontakte, wie *tight junctions* (TJ), *adhaerens junctions* (AJ) und *gap junctions* (GJ) aus. Vor allem TJs und AJs dienen dem Aufrechterhalten und Regulation der endothelialen Barriere. Wichtiger Bestandteil der endothelialen AJs ist VE-Cadherin. Über Bestandteile der GJs, den Connexinen, ist eine Kommunikation der Zellen untereinander über kleine Signalmoleküle möglich. Aktin-Filamente, Mikrotubuli oder Intermediärfilamente durchziehen die Zellen und stabilisieren den Zellverband (Dudek und Garcia 2001).

Grundsätzlich kommen im menschlichen Körper drei verschiedene Arten von Endothel vor:

- Das kontinuierliche Endothel, das ubiquitär im vaskulären System vorkommt und durch eine durchgehende Ausbildung von *tight junctions* charakterisiert ist. Es dient unter anderem der Regulation und Aufrechterhaltung der vaskulären Barriere (Lüllmann-Rauch und Asan 2015).
- Das fenestrierte Endothel hat eine erhöhte Permeabilität für große Moleküle und kommt zum Beispiel in Nierenglomeruli, sowie im Darm vor (Lüllmann-Rauch und Asan 2015).
- Das diskontinuierliche Endothel imponiert mit weiten Zwischenräumen und Poren, die einen freien Transport vieler Blutbestandteile ermöglichen. Hier sind Zell-Zell Kontakte und die Basalmembran stellenweise unterbrochen. Diskontinuierliches Endothel findet sich zum Beispiel in den Gefäßsinusoiden der Leber, der Milz und des Knochenmarks (Lüllmann-Rauch und Asan 2015).

Die vorliegende Arbeit verwendet Endothelzellen, die bei Konfluenz einen kontinuierlichen Endothelzellverband ausbilden. Neben Versuchen bei vollständiger oder fast vollständiger Konfluenz des Zellrasens, wurden darüber hinaus in dieser Arbeit auch Versuche im Stadium des diskontinuierlichen Zellverbandes bei ca. 30-40 % Konfluenz durchgeführt, im Folgenden als „Einzelzellversuche“ gekennzeichnet.

1.2.1 Regulation der endothelialen Barriere

Die Regulation der endothelialen Barriere ist von hoher klinischer Relevanz zum Beispiel im Rahmen inflammatorischer Krankheiten, wie dem *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) oder im Rahmen von Krankheiten, die mit erhöhten Filtrationsdrücken einhergehen. Exemplarisch genannt ist die akute Linksherzinsuffizienz mit konsekutivem hydrostatischen Lungenödem. Im Gegensatz zu Mechanismen der erhöhten endothelialen Permeabilität ist zu den potentiell nutzbaren barriereprotektiven Mechanismen ungleich weniger bekannt.

Einer der identifizierten kritischen Schlüsselspieler der Regulation der endothelialen Barrierefunktion ist Calcium (Voelkel et al. 2009). Verschiedene Mechanismen sind mittlerweile bekannt, wie extra- und intrazelluläre Calciumsignalveränderungen Einfluss auf die Barriere nehmen (Voelkel et al. 2009).

Im Zytosol ist freies Calcium in der Lage, an eine Vielzahl von regulatorischen Proteinen, unter anderem an Calmodulin (CaM), zu binden. Kommt es zu einem zytosolischen Calciumsignal, wie zum Beispiel durch die pro-inflammatorische Mediatoren Histamin oder Thrombin, ist Calmodulin in der Lage, die Aktivität der Myosinleichtkettenkinase (MLCK) zu erhöhen (Garcia et al. 1997). Die Phosphorylierung der regulatorischen Myosinleichtkette (MLC) durch die MLCK ist ein zentraler Mechanismus in der Regulation der endothelialen Barrierefunktion. Die Phosphorylierung der MLC führt zu einer Kontraktion von Aktomyosinfilamenten. Dadurch werden benachbarte Zellen auseinandergezogen und damit die parazelluläre Permeabilität gesteigert (Shen et al. 2010). Über Calmodulin verringert Calcium so die endotheliale Barrierefunktion. Die Myosinleichtkettenphosphatase (MLCP) ist der Gegenspieler der MLCK. Sie unterliegt der inhibitorischen Kontrolle der kleinen GTPase RhoA. (Kumar et al. 2009).

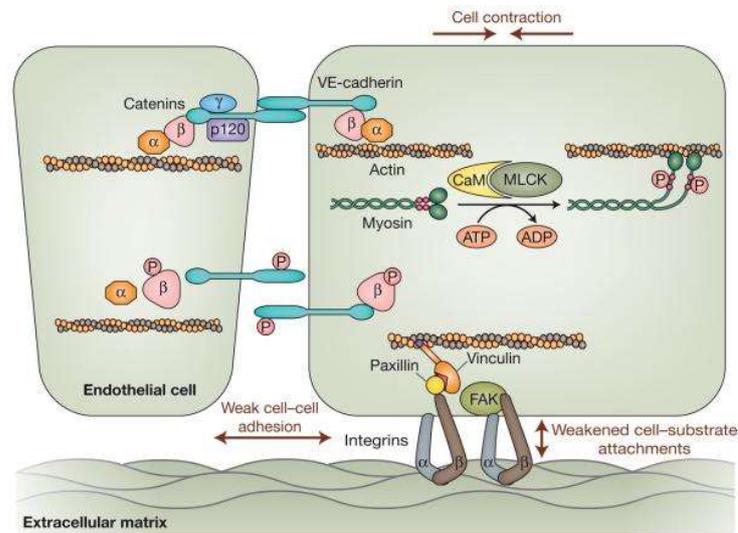


Abbildung 1-1: Mechanismen der endothelialen Barriereregulation. VE-Cadherin, ein Bestandteil der junctionalen adherens junctions (AJ), verbindet die Endothelzellen und die intrazellulären Actomyosinfilamente über die Catenin-Familie (α , β , γ und p120). Die dynamische Interaktion mit der Ca^{2+} /Calmodulin (CaM) abhängigen Myosinleichtkettenkinase (MLCK) kontrolliert die parazelluläre Permeabilität. Die Aktomyosinfilamente sind über Paxillin und Vinculin unter Beteiligung von Integrinen (α , β) und der fokalen Adhäsionskinase (FAK) mit der extrazellulären Matrix verbunden. Adenosintriphosphat (ATP); Adenosindiphosphat (ADP); Phosphatrest (P). Verändert nach Kumar *et al.* (Kumar *et al.* 2009).

Eine Beteiligung der Calcium- bzw. DAG abhängigen Proteinkinase C (PKC) wurde ebenfalls gezeigt, wobei einige Isoformen die Permeabilität erhöhen, andere sie erniedrigen (Vandenbroucke *et al.* 2008; Monti *et al.* 2010).

Rote Blutkörperchen und vor allem Blutplättchen enthalten diverse Phospholipide, die die endotheliale Barriere verstärken und vor gesteigerter Permeabilität schützen können. Ein Beispiel hierfür ist die barrierefördernde Wirkung der Calciumfreisetzung durch Sphingosin-1-Phosphat (S1P). S1P kommt unter anderem in Blutplättchen vor und aktiviert die Calcium-abhängige kleine GTPase Rac1 in Endothelzellen (Garcia *et al.* 2001). Es konnte gezeigt werden, dass eine Rac1-Aktivierung zu einer Umstrukturierung der kortikalen Aktinfasern führt und zu einer Stabilisierung der Zell-Zell-Verbindungen beiträgt (Baumer *et al.* 2008).

Der *second messenger* zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) spielt für die protektiven Mechanismen innerhalb der intrazellulären Signalkaskaden eine große Rolle (Fukuhara *et al.*

2005). Für Adenosintriphosphat (ATP) in seiner Rolle als extrazellulärer Mediator wurde *in vitro* eine Rac1-Aktivierung und eine damit eingehende Barriereverstärkung gezeigt (Jacobson et al. 2006).

Neben den gezeigten Calcium-abhängigen Prozessen der Barriere-regulation finden sich sowohl für die Barriere-verstärkenden Effekte von ATP und Sphingosin-1-Phosphat (Noll et al. 1999), sowie den Barriere-vermindernden Effekt von Thrombin und Histamin (Stolwijk et al. 2016), Hinweise, dass diese komplett Calcium-unabhängig ablaufen. Jacobson *et al.* brachten die ATP abhängige Barriereverstärkung analog zum Sphingosin-1-Phosphat-Mechanismus mit einer Calcium-unabhängigen Rac1- und Cortaktin-Aktivierung in Verbindung (Jacobson et al. 2006). Spekulativ erfolgt in dem Fall die Barriereverstärkung durch ATP über die auf eine P2Y11-Aktivierung folgende Signalkaskade. Bekannterweise wird hier *downstream* cAMP-abhängig Rac1 induziert. (Zemskov et al. 2011). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) die MLCP-Aktivität stimuliert wird und es dadurch zu einer Verstärkung der endothelialen Barriere kommt (Sriwai et al. 2008).

Zusammenfassend kann die Eigenregulation der gefäßendothelialen Barriere sowohl Calcium-abhängig als auch Calcium-unabhängig erfolgen.

1.2.2 Endotheliale Stickstoffmonoxid (NO) Produktion

Eine weitere wichtige Funktion des Endothels ist seine Rolle als Produktionsort von vasoaktiven Mediatoren, wie Bradykinin, Thrombin oder NO. Dadurch ist das Endothel direkt an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt. Die Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin wird durch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) katalysiert. NO

diffundiert vom Endothel zu den vaskulären glatten Muskelzellen und induziert dort eine cGMP vermittelte Vasodilatation. Außerdem steht das Endothel über direkte Zell-Zell-Kontakte mit den unter der Basallamina liegenden glatten Muskelzellen in Verbindung. Die NO-Produktion ist ebenfalls ein Calcium sensibler Prozess (Deanfield et al. 2007). Zusätzlich nehmen sympathische Nervenfasern direkten Einfluss auf die Endothelzellen und sind in der Lage, die endotheliale NO-Produktion zu unterdrücken (Chistiakov et al. 2015). Die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) bezüglich der Regulation der endothelialen Barrierefunktion variiert je nach Lokalisation. Im mikrovaskulären Endothelium induziert NO eine MLCK-abhängige Hyperpermeabilität (Kubes 1995). So ist zum Beispiel die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) bei der durch den vaso-endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) induzierten Hyperpermeabilität ein determinierender Faktor (Fukumura et al. 2001). In kultivierten Endothelzellen wurden hingegen auch protektive barriereverstärkende Effekte nachgewiesen (Yuan und Rigor 2010).

1.3 Calcium und seine Homöostase

Veränderungen, wie mechanische Stimuli, kleine extrazelluläre und intrazelluläre Signalmoleküle oder Noxen, werden von Endothelzellen detektiert und unter anderem als kurze Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration intrazellulär vermittelt (Berridge et al. 2003). Binden Hormone, Wachstumsfaktoren oder extrazelluläre Mediatoren an membranständige Rezeptoren, wird Calcium als *second messenger* in das Zytosol ausgeschüttet. Als solcher kann Calcium verschiedene Effekte einschließlich zentraler Mechanismen, wie Transkription, Zell-Zyklus Regulation, Kontraktion oder Apoptose, modulieren (Berridge et al. 2003). In dieser Arbeit wird exemplarisch die Wirkung von

extrazellulärem ATP und anderen Nukleotiden auf den intrazellulären Calciumhaushalt und bei ATP auch auf die Barrierefunktion der Endothelzellen untersucht.

Es wird angenommen, dass durch die Möglichkeit der Zelle, das Calcium Signal je nach Agonist zeitlich, örtlich, in seiner Amplitude und in seiner Frequenz zu formen, viele unterschiedliche Effekte durch den selben *second messenger* bewirkt werden können (Dupont et al. 2011). Daher besitzen eukaryontische Zellen eine Vielzahl an unterschiedlichen Mechanismen bzw. Akteuren zur Regulation der intrazellulären Calciumkonzentrationen. Beteiligt sind Calciumkanäle in der Plasmamembran, Zell-Organellen im Zytosol, aber auch Calcium-ATPasen oder $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Die gesamte Calciumhomöostase ist ein Resultat des Zusammenspiels zwischen den einzelnen Komponenten, des *calcium-toolkits*, einer Zelle (Berridge et al. 2003).

Natürlicherweise liegt die zytosolische Calciumkonzentration einer ruhenden Zelle bei ca. 100 nM und damit deutlich niedriger, als die extrazelluläre Calciumkonzentration, die bei ca. 1 mM liegt (Islam 2012). Dieser Konzentrationsgradient wird von der Zelle aktiv unter Verbrauch von intrazellulärem ATP aufrechterhalten. Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist der wichtigste intrazelluläre Calcium Speicher.

1.3.1 Die Inositoltriphosphat (IP3) Kaskade

Die Entstehung eines Calciumsignals wird oft durch die Bindung eines extrazellulären Agonisten an einen spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptor auf der Plasmamembran und die darauffolgende IP3-Kaskade vermittelt (Berridge et al. 2003). Dadurch wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert, die die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP₂) zu Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerine (DAG) katalysiert. IP₃ diffundiert ins

Zellinnere und bindet an spezifische IP₃-Rezeptoren (IP₃R) auf der Membran des ERs. Der IP₃R agiert als Calciumkanal und erlaubt nach seiner Aktivierung eine Entleerung der ER-Calciumspeicher entlang des Konzentrationsgradienten (Islam 2012). Zusätzlich ist der IP₃R in seiner Regulation sensitiv auf die zytosolische Calciumkonzentration. Hohe Konzentrationen (>1 µM) inhibieren die Öffnung und moderat hohe (0,5 – 1 µM) erhöhen die Offenwahrscheinlichkeit (Bootman et al. 2001). In der Literatur finden sich starke Hinweise, dass die regulatorische Funktion von Calcium auf den IP₃-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Calcium-Oszillationen und der interzellulären Weitergabe des Calcium-Signals spielt. Die genauen molekularen Mechanismen sind allerdings noch nicht verstanden (Islam 2012).

1.3.2 *Store operated Ca²⁺-entry (SOCE)*

Anschließend an die Entleerung der ER-Calciumspeicher lässt sich ein zusätzlicher Einstrom von Calcium über die Plasmamembran aus dem Extrazellulärraum beobachten. Dieses Phänomen wurde 1986 erstmals beschrieben und als *store operated Ca²⁺-entry (SOCE)* bezeichnet (Putney 1986).

Durch die Entleerung der ER-Calciumspeicher wird das ER-membranständige Protein *stromal interaction molecule 1 (STIM1)* aktiviert (Hogan und Rao 2015). STIM1 fungiert durch eine EF-Hand-Domäne, ein Strukturmotiv Calcium-bindender Proteine, als Calciumsensor für die ER-Calciumkonzentration und aktiviert plasmamembranständige Calciumkanäle, wie zum Beispiel Orai1, über eine *sterile alpha motif (SAM)*-Domäne (Rosado et al. 2015). Es kommt in direkter Folge zu einem zusätzlichen Calciumeinstrom in die Zelle

aus dem Extrazellulärraum. SOCE ist für diverse Agonisten in vaskulären Endothelzellen beschrieben (Bishara et al. 2002; Prakriya und Lewis 2015).

In humanen Endothelzellen scheinen neben STIM1 und Orai1 auch die Plasmamembrankanäle *transient receptor potential channels canonical* 1 und 4 (TRPC1 und TRPC4) eine Rolle zu spielen, wobei die Datenlage für TRPC1 am besten ist (Brough et al. 2001; Trebak 2009). STIM1 interagiert in seiner Funktion als zentraler Regulator des SOCE dabei sowohl mit Orai1, als auch mit den TRPC Kanälen. Zusätzlich ist die Integrität von *lipid raft domains* für die Aktivierung von SOCEs nötig (Pani et al. 2008). *Lipid raft domains* sind Cholesterol- und Sphingolipid-reiche Mikrodomänen in der Plasmamembran.

Als Isoform ist neben STIM1 auch STIM2 in vielen Zelltypen co-exprimiert nachgewiesen (Williams et al. 2001). STIM2 zeichnet sich im Vergleich durch eine niedrigere Calcium-Sensitivität aus und kann daher erst bei höheren ER-Calciumkonzentration aktiviert werden (Rosado et al. 2015). Die Funktion von STIM2 wird kontrovers diskutiert und seine direkte Beteiligung am SOCE ist bisher unklar. STIM2 könnte bei Fluktuationen in der ER-Ca²⁺-Konzentration nahe der *steady-state* Calciumkonzentration aktiv werden und diese ausgleichen, um den *steady state* zu erhalten (Brandman et al. 2007). Für Orai1 sind ebenfalls die Isoformen Orai2 und Orai3 beschrieben. Alle Isoformen können nach einer Entleerung der ER-Calciumspeicher durch STIM1 aktiviert werden. Die Funktion von Orai2 und Orai3 ist ebenfalls noch unklar. In *knockdown*-Studien wurden bezüglich des SOCE durch das Fehlen von Orai2 oder Orai3 nur geringe Effekte nachgewiesen (Islam 2012). Alle Orai-Isoformen sind hochspezifisch für Calcium-Ionen. TRP-Kanäle sind im Gegensatz permeabel für viele monovalente und divalente Kationen und damit unspezifischer (Choi et al. 2014). Basierend auf der aktuellen Datenlage scheint der SOCE ein Resultat des Zusammenspiels zwischen

STIM1, Orai1 und TRPC Proteinen zu sein. Teilbereiche des ER in Plasmamembrannähe beteiligen sich im Sinne von Mikrodomänen spezifisch an der Regulation der Plasmamembran SOCE Kanäle (Orci et al. 2009).

Ein Effekt des SOCE ist das Auffüllen der intrazellulären Calciumspeicher (Prakriya et al. 2015). Physiologische Effekte, die über das reine Auffüllen der Speicher hinausgehen, werden aktuell untersucht. Unterschiedliche Funktionen, wie Proliferation, Transkription pro-inflammatorischer Gene oder Plättchenaggregation, werden unter anderem diskutiert (Prakriya und Lewis 2015). Beispielsweise konnten Zhou *et al.* zeigen, dass der *knockdown* von Stim1 oder Orai1 die Histamin-induzierte Aktivierung des *calcineurin/ nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) und die Produktion von Interleukin-8 (IL-8) verhindert (Zhou et al. 2014). Darüber hinaus sind STIM1 und Orai1 potentielle Ziele in der Tumorthherapie. Neben der nachgewiesenen Überexpression in Tumoren, wie zum Beispiel dem Kolorektalen Karzinom, ist die Rolle der SOCE-abhängigen Transkriptionsfaktoren NFAT, c-Myc, c-Jun, and c-Fos bei der Tumorprogression von Interesse (Fiorio Pla et al. 2016). Zusätzlich ist die immunologische Funktion des SOCE ein weiteres viel beforschtes Feld. Im Fokus steht dabei die Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen in der Immunabwehr. So zeigen Patienten mit mutiertem Orai1-Gen (R91W) Symptome im Sinne einer *severe combined immune deficiency* (SCID) (Lacruz und Feske 2015).

Zusammenfassend kann man sagen, dass SOCE nahezu ubiquitär einen Mechanismus für extrazellulären Calciumeinstrom bildet und eine herausragende Stellung innerhalb der Calciumhomöostase einnimmt.

1.3.3 Weitere Mechanismen der Calciumhomöostase

Neben der IP₃ Kaskade und dem SOCE existieren diverse weitere Mechanismen der eukaryontischen Calciumhomöostase. Ein wichtiger Mechanismus in Endothelzellen neben dem SOCE ist der *receptor operated Ca²⁺ entry* (ROCE). Der ROCE ist ein Ergebnis Liganden-aktivierter-Ionenkanäle, wie zum Beispiel der P2X-Rezeptoren, die nach Aktivierung durch ATP zu einem Calciumeinstrom über die Plasmamembran führen (MacKenzie et al. 1996).

Endothelzellen sind trotz der fehlenden Expression von *voltage dependend Ca²⁺ channel* (VDCC) sensibel auf Änderungen des elektrochemischen Gradienten, wobei eine Hyperpolarisation (bzw. Depolarisation) zu einem verstärkten (bzw. verminderten) Calciumeinstrom führt. Eine endotheliale Hyperpolarisation kann durch direkte myo-endotheliale *gap junctions* zu glatten Muskelzellen zusätzlich zu einer Vasodilatation des Gefäßes führen (Sandow 2004).

Neben extrazellulären Stimuli spielen auch intrazelluläre Mechanismen eine Rolle. Zusätzlich zu sensitiven intrazellulären Calciumspeichern können *second messenger* Systeme auch Plasmamembrankanäle aktivieren. Ein *second messenger operated Ca²⁺ entry* (SMOCE) ist im Falle der Aktivierung von TRPC Kanälen durch das PIP₂-Spaltprodukt DAG zu beobachten (Hofmann et al. 1999).

Physikalische Stimuli, wie Hitze, Kälte oder mechanische Reize, können Calciumkanäle, wie die TRPV oder TRPM Isoformen, aktivieren (McKemy et al. 2002).

Unter Umständen können auch Mitochondrien als intrazellulärer Calciumspeicher fungieren. Zum einen sind sie fähig, zytosolische Calciumkonzentrationserhöhungen über ihren membranständigen Uniporter abzapuffern. Der Uniporter reagiert zwar unspezifisch auf Kationen, arbeitet aber schnell und effizient entlang des Konzentrationsgefälles zwischen Zytosol und Mitochondrium. Das intramitochondrial akkumulierte Calcium kann über den

wesentlich langsameren mitochondrialen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (mNCX) zurück ins Zytosol gepumpt werden. Mitochondrien sind durch dadurch in der Lage, zytosolische Calciumsignale zu modulieren und zu verlängern (Contreras et al. 2010).

Bei hohen zytosolischen Calciumkonzentrationen stellen Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPasen (PMCA), Plasmamembran $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) und die sarko-/ endoplasmatische Retikulum-ATPase (SERCA) die ursprüngliche Calciumkonzentration wieder her, indem Calcium in den ER-Speicher oder in den Extrazellulärraum gepumpt wird. Zusätzlich kann Calcium auch in den Kern diffundieren oder von Proteinen abgepuffert werden. Einige dieser

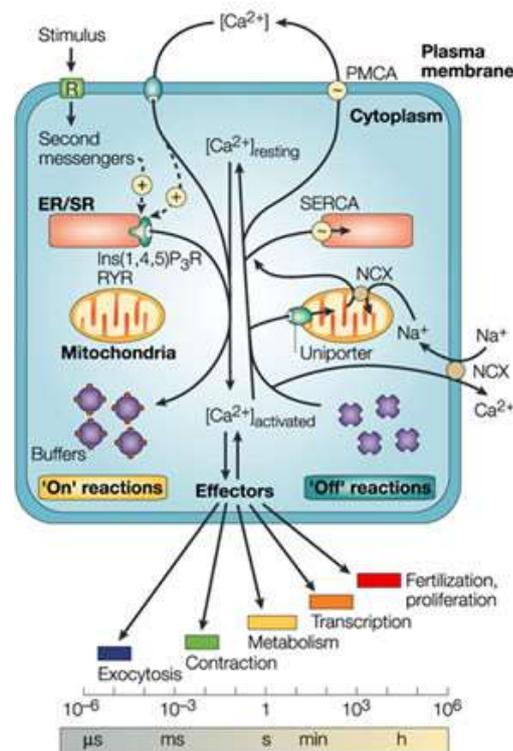


Abbildung 1-2: Mechanismen der Calciumsignalgebung. Ein Stimulus induziert sowohl den Eintritt von extrazellulärem Calcium, als auch die Bildung von *second messengern*, die Calcium aus Speichern des Sarko-/ Endoplasmatischen Retikulums (ER/ SR) freisetzen. Das Calcium wird aus dem Zytosol über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher (NCX), die Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase (PMCA) in den Extrazellulärraum und über die Sarko-/ Endoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA) ins ER entfernt. Zusätzlich puffern Mitochondrien hohe Calciumkonzentrationen mit ihrem schnellen Ca^{2+} -Uniporter ab. Inositol-1,4,5-Triphosphatrezeptor (Ins(1,4,5)P₃R); [Ca²⁺]_{resting} (Calcium im steady state); [Ca²⁺]_{activated} (Calciumanstieg im Zytosol); Ryanodinrezeptor (RyR) (Verändert nach Berridge et al. 2003).

Proteine vermitteln zudem Calcium-spezifische Effekte, wie die Calmodulin (CaM) Isoformen oder die Proteinkinase C (PKC) Isoformen (Berridge et al. 2003; Islam 2012).

1.4 Calciumoszillationen

Neben singulären Calciumsignalen lassen sich in erregbaren und nicht-erregbaren Zellen auch komplexere Signale von zyklisch wiederkehrenden, zytoplasmatischen Calciumkonzentrationsanstiegen, in der Regel als Oszillationen bezeichnet, beobachten. Die am häufigsten in der Literatur beobachteten Oszillationen werden als *baseline spikes* beschrieben und sind als kurzlebige, schnelle Erhöhungen der zytosolischen Calciumkonzentration definiert (Putney und Bird 2008). In dieser Arbeit wurde jeder Anstieg des zytosolischen Calciums unabhängig von der Morphologie als *baseline spike* gewertet, der nach Abklingen des initialen Calciumsignals nach ATP Stimulation auftrat.

Obwohl die Fragestellung seit über zwanzig Jahren untersucht wird, ist die Unsicherheit über die zugrundeliegenden Mechanismen groß. Zwei gegensätzliche Modelle werden diskutiert. Woods *et al.* postulierten ein Modell, in dem Calciumoszillationen als direkte Folge einer oszillierenden IP₃-Konzentration gesehen werden (Woods et al. 1987). Die Oszillationen würden folglich hauptsächlich aus den ER-Calcium-Speichern generiert. Meyer und Stryer erweiterten das Modell um die Idee einer Vorwärtsaktivierung der Phospholipase C (PLC) durch Calcium (Meyer und Stryer 1988). Die durch das erste Calciumsignal aktivierte PLC löst in dem Fall bei wieder befüllten ER-Calciumspeichern ein erneutes Calciumsignal in Kooperation mit dem IP₃R aus (Meyer und Stryer 1988).

Berridge hingegen entwarf das Modell des *calcium induced calcium release* (CICR) für Calciumoszillationen. Er postulierte, dass bei gleichbleibenden IP₃-Leveln

Calciumoszillationen als Folge der IP₃-Rezeptor Regulation durch zytosolische Calciumkonzentrationsänderungen entstehen (Berridge 1990; Putney und Bird 2008). Minimale Calcium-Leakströme aus dem ER reichen aus, um ein zytosolisches Calciumsignal entweder aus dem ER selber oder aus anderen Speichern zu generieren.

Beide Modelle werden mit supportiven Daten begründet, was den Schluss zulässt, dass sich Calciumoszillationen in ihren Mechanismen je nach Zelltyp und Agonist unterscheiden. In Endothelzellen wird ein CICR als Grundlage für Agonist-induzierten Oszillationen vermutet (Jacob 1991; Paltauf-Doburzynska et al. 2000; Tran 2000).

Mitochondrien und Calcium-puffernde Proteine im Zytosol spielen ebenfalls eine Rolle und können innerhalb des CICR-Modells zu Oszillationen beitragen. In diesen Überlegungen wird Calcium wiederholt zwischen ER, Mitochondrien und Calcium-bindenden Proteinen ausgetauscht (Marhl et al. 2000). Das Resultat sind oszillierende zytosolische Calciumkonzentrationen.

Neben der Beteiligung von intrazellulären Organellen spielt auch extrazelluläres Calcium eine Rolle. Calciumoszillationen scheinen sich bezüglich des extrazellulären Calciums sehr heterogen zu zeigen. Es konnte gezeigt werden, dass in einem Milieu, in dem extrazelluläres Calcium fehlt, Oszillationen nicht aufrechterhalten werden können (Kawanishi et al. 1989). Konträr dazu wurde Calciumoszillationen beschrieben, die nicht von extrazellulärem Calcium abhängig sind (Bird und Putney 2005).

Weiter ist für die HEK293-Zelllinie exemplarisch die Notwendigkeit von extrazellulärem Calcium und SOCE, speziell von STIM1 und Orai1, an zytosolischen Calciumoszillationen gezeigt (Wedel et al. 2007). Es bleibt unklar, ob das fehlende Auffüllen der ER-

Calciumspeicher durch das Fehlen von STIM1 und Orai1 zu dem beobachteten Effekt geführt hat oder ob sie eine ER-unabhängige Rolle für zytosolische Calciumoszillationen einnehmen. Spontane Calciumoszillationen werden in der Literatur zum Beispiel für endokrine Pankreaszellen beschrieben (Bode et al. 1994) Für die in dieser Arbeit verwendeten humanen umbilikalvenösen Endothelzellen (HUVEC) ist eine solche Grundaktivität bisher nicht bekannt.

Im Gegensatz dazu sind Agonisten-induzierte Calciumoszillationen als weitläufig bekanntes Phänomen in Endothelzellen unter anderem für Carbachol (Mumtaz et al. 2011), VEGF (Yokota et al. 2015), Bradykinin, ATP (Carter et al. 1991), Histamin (Jacob et al. 1988) und EGF (Moccia et al. 2003) beschrieben. Zusätzlich zu den Agonisten-spezifischen Unterschieden ist die Heterogenität der beobachteten Calciumoszillationen in der Literatur sehr hoch bezüglich der Abhängigkeit zu Faktoren, wie extrazellulärem Calcium, IP3 Konzentration, Synchronität oder beteiligten Signalkaskaden. Selbst unter endothelialen Subtypen variieren die Mechanismen stark.

Allgemein wird davon ausgegangen, dass Calciumoszillationen eine Art digitales Signal für *downstream*-Effektoren darstellen und gegenüber singulären Signalen den Vorteil einer hohen *signal-to-noise* Diskrimination haben. Sie weisen somit eine höhere Spezifität auf. Die Unterscheidung zwischen einem „richtigen“ Signal und zufälligen Fluktuationen wird dadurch erleichtert (Dupont et al. 2011).

Als potentielle *downstream*-Mechanismen kommen wie bei singulären Calciumsignalen im Prinzip alle bekannten Calcium-sensiblen Prozesse in Betracht. Exemplarisch wurden Calciumoszillationen mit der Aktivierung des Calcineurin/ NFAT-Komplexes mit kritischer SOCE Beteiligung (Oh-hora und Rao 2009), Calcium-sensibler mitochondrialer Enzyme

(Csordas et al. 2006), der Regulation der endothelialen Barriere im Endothel (Sun et al. 2017), Rezeptordesensibilisierung (Dupont et al. 2011) oder Kontrolle des Blutflusses (Jacob 1991) in Verbindung gebracht.

Zusammenfassend ist die bisherige Datenlage zu zytosolischen Calciumoszillationen sehr heterogen. Eine genaue Einordnung neuer Erkenntnisse fällt durch das bisher sehr lückenhafte Verständnis von Calciumoszillationen mitunter schwer.

1.5 ATP als Botenstoff und seine Homöostase

ATP ist bekannt als Form der intrazellulären Speicherung von Energie aus umgesetzten Kohlehydraten, Fetten oder anderen Energieträgern. Darüber hinaus kann ATP als extrazelluläre, parakrine bzw. autokrine Mediatorsubstanz fungieren. Zum Beispiel setzen Blutplättchen, Erythrozyten oder Endothelzellen unter anderem als Reaktion auf Hypoxie oder verstärkte Scherkräfte ATP nach extrazellulär frei (Beigi et al. 1999; Bergfeld und Forrester 1992). Auch ATP selbst kann eine erhöhte Freisetzung von ATP aus Endothelzellen bewirken (Bodin und Burnstock 1996). ATP löst am Endothel die calciumsensitive Freisetzung von NO, *endothelium derived hyperpolarizing factor* (EDHF) und PGI₂, sowie eine Hyperpolarisation der Extrazellulärmembran aus. Dadurch werden eine Vasodilatation sowie eine Inhibierung der Plättchenaggregation induziert (Burnstock und Ralevic 2014). Extrazelluläre ATP Konzentrationen können teilweise bis zu 100 µM erreichen. Endothelständige Ektonukleasen sind in der Lage, ATP zu ADP bzw. weiter zu AMP oder Adenosin zu degradieren (Coade und Pearson 1989).

Die membranständigen ATP-Rezeptoren lassen sich in die beiden Hauptklassen P2Y und P2X einteilen. P2Y-Rezeptoren sind an heterotrimere G-Proteine gekoppelte Rezeptoren. Als

direkte Folge einer Aktivierung wird die IP3-Kaskade ausgelöst. P2X-Rezeptoren sind Liganden-aktivierte Ionenkanäle für positive Kationen im Sinnes eines ROCE. Die Expression der verschiedenen Subtypen unterscheidet sich je nach Endothellokalisation. In Endothelzellen wurden die Subtypen P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11 und P2Y14 (Zemskov et al. 2011), sowie P2X1, P2X4, P2X5, P2X7 (Burnstock und Ralevic 2014) nachgewiesen. P2X4, P2Y1, P2Y2 und P2Y11 bilden dabei die dominanten und am meisten exprimierten P2 Rezeptoren im Gefäßendothel (Wang et al. 2002). Für die ATP-induzierte Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und die Hyperpolarisation der Membran ist der P2Y2 Subtyp entscheidend (Raqeeb et al. 2011). Die Expression von P2X4 und P2X7 wird unter inflammatorischen Bedingungen hoch reguliert und spielt vor allem in diesem Kontext eine Rolle (Wilson et al. 2007).

Nach Aktivierung der P2Y-Rezeptoren kommt es zu einem zusätzlichen Calciumeinstrom durch den SOCE (Bishara et al. 2002). Die beteiligten Akteure für ATP ausgelöster SOCE im Endothel sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Starke Hinweise gibt es für eine Beteiligung von STIM1 und Orai1. Über die Rolle von TRPC1 bzw. TRPC4 wird diskutiert (Islam 2012). Ein *downstream* Effekt von ATP ist, wie bereits in Abschnitt 1.2.1 besprochen, die Verstärkung der endothelialen Barriere. Gegensätzlich dazu wurden allerdings auch widersprüchliche Daten publiziert, wonach unter anderem in HUVEC eine Hyperpermeabilität der endothelialen Barriere nach Stimulation mit ATP beobachtet wurde (Tanaka et al. 2004).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Gegensatz zu einfachen Calciumsignalen scheinen Calciumoszillationen heterogener und komplexer zu sein. Ihr Verständnis ist immer noch sehr rudimentär und die biologische Signifikanz ihrer Multimodalität weiter ungeklärt. Bisher lag der Fokus stets auf intrazellulären Mechanismen. Über die Beeinflussung von Calciumoszillationen durch extrazelluläre oder interzelluläre Faktoren ist noch wenig bekannt.

In Voruntersuchungen konnten wir einen Zusammenhang zwischen der Konfluenz kultivierter Endothelzellen und der Entstehung von zytosolischen Calciumoszillationen im Anschluss an eine Stimulation mit ATP beobachten. Eine interzelluläre Diffusion von Calcium ist zwar weitläufig bekannt, aber die Rolle von Zell-Zell-Kontakten in der Entstehung von Calciumoszillationen ist noch ungeklärt.

Ziel der Arbeit war zum einen eine Charakterisierung der zytosolischen Calciumoszillationen nach ATP Stimulation in HUVEC. Dabei standen vor allem die Purinrezeptoren und der SOCE im Fokus. Zum anderen soll die mögliche Rolle von ATP und der Oszillationen im Besonderen in der Regulation der vaskulären Barriere *in vitro* untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Carl Roth (Karlsruhe) und Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen.

2.2 Primäre humane umbilikale Endothelzellen (HUVEC)

Die primären humanen umbilikalen Endothelzellen (HUVEC) wurden kommerziell von Promocell GmbH (Heidelberg) bezogen. Die verwendeten HUVEC wurden von je drei unterschiedlichen Spendern männlichen und weiblichen Geschlechts isoliert und gepoolt.

2.3 Material Zellkultur

Sterile Laminar Flow Bank „Hera Safe“	Heraeus Holding GmbH, Hanau
CO ₂ Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau
CO ₂ Inkubator	Sanyo Electric Biomedical Co., Osaka, Japan
Zentrifuge „Universal 32“	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Accu-jet Pipettierhilfe	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Eppendorf Research Pipette 10	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research Pipette 20	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research Pipette 50	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research Pipette 100	Eppendorf AG, Hamburg

Eppendorf Research Pipette 1000	Eppendorf AG, Hamburg
Endothelial Cell Growth Media	Promocell GmbH, Heidelberg
Endothelial Cell Growth Supplementmix	Promocell GmbH, Heidelberg
Trypsin/ EDTA Lösung (Detach Kit)	Promocell GmbH, Heidelberg
Trypsin Neutralisierende Lösung (TNS, Detach Kit)	Promocell GmbH, Heidelberg
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom AG, Berlin
Falcon 75 cm ² Zellkulturflaschen (T75)	VWR International, Radnor, USA
Falcon 25 cm ² Zellkulturflaschen (T25)	VWR International, Radnor, USA
Fibronektin 0,1 %, aus humanem Plasma	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
14 ml Round-Bottom Tube	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Falcon 50 ml Conical Centrifuge Tubes	VWR International, Radnor, USA
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
C-Chip Neubauer improved Zählkammer	NanoEnTek, Seoul, Korea
1 ml/5 ml/10 ml/25 ml sterile serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

2.4 Material Epifluoreszenzmikroskopie

Axiotech Vario Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss GmbH, Jena
Filterrad und Shutter Lambda 10-2	HEKA Electronic, Ludwigshafen
Objektiv „Achromplan“ 40x/ 80w	Carl Zeiss GmbH, Jena

HBO 103/ W2 Quecksilberdampflampe	Carl Zeiss GmbH, Jena
CCD Kamera	Cool Snap HQ, Roper Scientific, Planegg
BX-40 Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Tokio, Japan
Filterrad und Shutter Lambda 10-2	HEKA Electronic, Ludwigshafen
Objektiv WN-Achroplan 40x/ 0,75	Olympus, Tokio, Japan
USH-1030L Quecksilberdampflampe	Olympus, Tokio, Japan
CCD Kamera	Cool Snap HQ, Roper Scientific, Planegg
pH 7110 (pH Meter)	Inolab, Weilheim i.OB.
SenTix 41 Elektrode	Inolab, Weilheim i.OB.
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Thapsigargin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fura-2 AM	Promokine GmbH, Heidelberg
Pluronic F-127 (20% Lösung in DMSO)	Promokine GmbH, Heidelberg
Ionomycin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Falcon 6-Well Zellkultur Platte	VWR International, Radnor, USA
ThinCert Cell Culture Inserts 6 Well	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster
Porendurchmesser: 0,4 µm, Porendichte: 2 x 10 ⁶ , transparent	
Center-Well Organ Culture Dish	Corning Inc., New York, USA
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine-5'-triphosphate (bzATP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Uridintriphosphat (UTP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
α,β -Methyleneadenosine 5'-triphosphate (α,β -meATP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.5 Material Molekularbiologie

Thermal Cycler Px2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gelkammer MGU-402T	C.B.S Scientific, San Diego, USA
Electrophorese Power Supply EC231	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Bioimaging System Gene Genius	VWR International, Radnor, USA
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrowelle	Bosch GmbH, Gerlingen
MiniZentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg
NanoDrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNeasy Plus mini Kit	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Omniscript Reverse Transcription Kit	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
HotStarTaq PCR	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
RNase freies H ₂ O	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
TAE-Puffer	Merck KGaA, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, Carlsbad, USA
Roti-Safe GelStaining	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
6x Loading-Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.6 Primer

Alle Primer wurden mit dem *Primer-BLAST designing tool* des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) gewählt und bei Eurofins Scientific (Luxemburg) bezogen.

Alle Primerpaare sind spezifisch für das jeweilige Produkt.

Bezeichnung	Vorwärts (5'-3')	Rückwärts (3'-5')
Hu-Orai1	GAG TTT GCC CGC TTA CAG GA	ACA CAC TCA ATG CTG GACGG
Hu-TRPC1	CGA TCA TCC TTT TTC CAG CC	ATC TGC AGA CTG ACA ACC GT
Hu-TRPC3	ATG CTG CTT TTA CCA CTG TAG	TCC TTC TGC ATT TGG GAA A
Hu-TRPC4	GGC GGA CTT CAG GAC TAC AT	GCT GTG CTT TGA CAT TGG TC
Hu-TRPC5	GTG CCA CTT TGC TGG TCT TG	AGA TGG GCA GGG TAG TTT GC
Hu-TRPC6	GGG ATC TTG ACG GAG AGT GC	TGG TGG TAG CGA AGC GTA AG
Hu-TRPC6_	CTT ACG CTT CGC TAC	ATA GTC CTG GCT CTC TCG

	CAC CA	TTG C
Hu-TRPC7	GGA GAG CGG TAC ATC CTT GG	CTT CTC CCT CAG CGT TGT GT
Hu-GAPDH	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA
Hu-P2Y1	CCC TGG GCC GGC CTC AAA AAG AAG AAT G	CAA GCC GGG CCC TCA AGT TCA TCG TTT TC
Hu-P2Y2	GCT ACA GGT GCC GCT TCA ACG AGG ACT TC	GGC AGG CCA GCA CCA ACA CCC ACA C
Hu-P2Y4	TTA TGC AGC CCA CAA CCA CT	TGT CTT TGC TGT CTG CTT CG
Hu-P2Y6	CCC TGC TGG CCT GCT ACT GTC TCC TG	CTA ATT CTC CGC ATG GTT TGG GGT TGG
Hu-P2Y11	CCC CCG CTG GCC GCC TAC CTC TAT CC	CGC AGC CCA ACC CCG CCA GCA CCA G
Hu-P2Y12	CTA AGA TTC TCT CTG TTG TCA TCT G	ACA GAG TGC TCT CTT TCA CAT AG
Hu-P2Y13	TGT GTC GTT TTT CTT CGG TG	TGC TGC CAA AAA GAG AGT TG
Hu-P2Y14	TCA TTG CGG GAA TCC TAC TC	CCC AAA GAA CAC AAT GCT GAC
Hu-P2X1	CTG GCT GAG AAG GGT GGA GTG GTT GG	TGG CCC CAT GTC CTC AGC GTA TTT G

Hu-P2X2	GCT GCT CAT CCT GCT CTA CTT CGT GTG G	GGG GTA GTG GAT GCT GTT CTT GAT GAG G
Hu-P2X3	ATC AAC CGA GTA GTT CAG C	GAT GCA CTG GTC CCA GG
Hu-P2X4	GAG ATT CCA GAT GCG ACC	GAC TTG AGG TAA GTA GTG G
Hu-P2X5	AGC ACG TGA ATT GCC TCT GCT TAC	ATC AGA CGT GGA GGT CAC TTT GCT C
Hu-P2X6	AGT TCA ACT TCT CTA AGT CCA ATG C	CTC TAT CCA CAT ACA GCA GTA GC
Hu-P2X7	CCC CGG CCA CAA CTA CAC CAC GAG AAA C	CCG AAG TAG GAG AGGGTTGAG CCG ATG

2.7 Material Proteinbiochemie

Bench Mark Prestained Protein Ladder	Invitrogen, Carlsbad, USA
Magic Mark XP Western Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
Nu Page Sample Reducin Agent (10x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Nu Page LDS Sample Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Nu Page 4-12% Bis-Tris-Gel	Invitrogen, Carlsbad, USA
Nu Page MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
PVDF Membrane Filter Paper Sandwich 0,2 µm Pore	Invitrogen, Carlsbad, USA

Gel Knife	Invitrogen, Carlsbad, USA
BCA-Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BupH Tris Buffered Saline Packs	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ELC Plus Western Blotting Detection Reagenz	GE Healthcare (Amersham), Chalfont St Giles, UK
Amersham Hyperfilm	GE Healthcare (Amersham), Chalfont St Giles, UK
Blot-Kammer, Novex Mini-Cell	Invitrogen, Carlsbad, USA
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa Healthcare, Mortsel, BE
Multiscan Spectrum Plattenphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Radioimmunoprecipitation Analysepuffer (RIPA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nu Page Reduktionsmittel (10x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Blot-Schwamm	Invitrogen, Carlsbad, USA
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Complete Tablets Mini EDTA-free Proteaseinhibitor	Roche Life Sciences, Basel, Schweiz

2.8 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Kaninchen Anti-P2X4, #APR-002	1 : 200	Alamone Labs, Jerusalem, Israel
Kaninchen Anti-P2X7, #APR-004	1 : 500	Alamone Labs, Jerusalem, Israel
Kaninchen Anti-P2Y1, #18- 461-10492	1 : 200	GenWay Biotech, San Diego, USA
Kaninchen Anti-P2Y2, #APR-010	1 : 200	Alamone Labs, Jerusalem, Israel
Kaninchen Anti-P2Y11, #18-46-10112	1 : 200	GenWay Biotech, San Diego, USA

Der sekundäre Antikörper wurde von Jackson ImmunoResearch Lab. (West Grove, USA) bezogen. Er war mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert und wurde in einer Verdünnung von 1 : 10000 in mit Milchpulver blockierten Assays und 1 : 20000 in mit BSA blockierten Assays verwendet.

2.9 Material Transwell Flux Assay

Albumin-fluorescein isothiocyanate (FITC-BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
12-Well Zellkultur Platte	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster

ThinCert Cell Culture Inserts 12 Well	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster
Porendurchmesser: 0,4 µm, Porendichte: 1 x 10 ⁶ , transluzent	
96-Well Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster
Microplate Reader Infinite pro 200	Tecan, Männedorf, Schweiz

2.10 Kultivierung von humanen umbilikalen Endothelzellen (HUVEC)

Die HUVEC wurden in einem für Endothelzellen optimiertem Medium der Promocell GmbH (Heidelberg) kultiviert. Dem Medium wurde der Supplementmix hinzugegeben. Es wurden kein Antibiotikum und keine anderen Additiva verwendet.

Kulturmedium: *Endothelial Cell Growth Medium, ready-to-use*, Promocell (Heidelberg)
 Endothelial Cell Growth Supplementmix, Promocell (Heidelberg)

Tabelle 2: Finale Konzentration der Bestandteile des *Endothelial Cell Growth Supplementmix* im *Endothelial Cell Groth Medium*.

Bestandteil	Konzentration
FKS	0,02 ml/ml
ECGS	0,004 ml/ml
EGF	0,1 ng/ml
BFGF	1 ng/ml
Heparin	90 µg/ml
Hydrocortison	1 µg/ml

Die HUVEC wurden in 75 cm² (T75) bzw. 25 cm² (T25) Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Dafür wurden 12 ml Kulturmedium für die T75-Flasche und 7 ml Kulturmedium für die T25-Flasche verwendet. Bei 80-90 % Konfluenz wurden die Flaschen

subkultiviert und gesplittet. Dazu wurden nach Entfernung des Mediums und zweimaligem Waschen mit je 10 ml PBS-Lösung die Zellen 3 min mit 2 ml der Trypsin-/ EDTA-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Das vollständige Ablösen der Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Die Trypsinreaktion wurde mit 2 ml TNS-Lösung gestoppt, in ein Reagenzglas überführt und 5 Minuten bei 1410 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 9 ml Kulturmedium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen überführt oder für Experimente verwendet. Für die T25-Flaschen wurde der Fläche entsprechend 0,66 ml der Trypsin/EDTA-Lösung bzw. TNS-Lösung verwendet und die HUVEC anschließend in 3 ml Kulturmedium resuspendiert.

2.11 Beschichtung der 6-Well und 12-Well Inserts

Die Inserts wurden mit einer sterilen Pinzette in eine 6-Well bzw. 12-Well Zellkulturplatte überführt und mit 500 µl (6-Well) bzw. 200 µl (12-Well) Fibronectin/ PBS-Lösung in einer Endkonzentration von 10 µg/ml eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Fibronectinlösung entfernt und die Inserts zweimal mit PBS gewaschen.

2.12 Vorbereitung der HUVEC für Calciumimaging

Die HUVEC wurden nach dem Subkultivieren in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Es wurden jeweils 4 Großquadrate erfasst.

$$\text{Zellen/mL} = \frac{\text{Anzahl der Zellen} * \text{Verdünnungsfaktor}}{4 \text{ Großquadrate}} * 10.000$$

Anschließend wurden für die Versuche an Monolayer 20.000 HUVEC/cm² pro Insert ausgesät und 48-72 h bis zur Konfluenz kultiviert. Die 6-Well-Inserts wurden mit 2 ml Kulturmedium im unteren und oberen Kompartiment, die 12-Well-Inserts mit je 1 ml Kulturmedium und die *center well dishes* mit 1 ml Kulturmedium bedeckt. Die Einzelzellversuche wurden bei 30-40 % Konfluenz durchgeführt. Dementsprechend wurden nur 5.000 HUVECs/cm² ausgesät.

2.13 *In vitro* Epifluoreszenzmikroskopie

Die Messungen am Epifluoreszenzmikroskop wurden mit einer Bildrate von fünf Sekunden durchgeführt. Für die Anregung wurde eine Quecksilberdampfampe (100 Watt) verwendet. Alle Experimente wurden mit MetaFluor *fluorescence imaging software* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) analysiert.

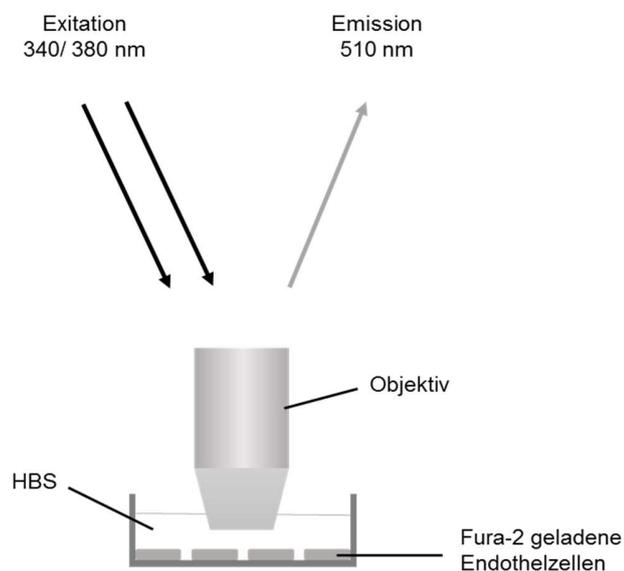


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des Aufbaus für die *in vitro*-Epifluoreszenzmikroskopie.

2.14 Ca²⁺-imaging mit Fura-2

Die Fura-2 Färbung wurde von Grynkiewicz *et al.* 1985 entwickelt. Die hydrophile Esterform (Fura-2/AM) wird von den Zellen durch passive Diffusion aufgenommen und der Esterrest im Zytosol durch unspezifische Esterasen abgespalten. Intrazellulär ist Fura-2 nach Abspaltung des Esterrestes ein hochspezifischer Calciumchelator. Je nach Bindungszustand besitzt Fura-2 zwei Excitationsmaxima mit den Wellenlängen $\lambda=340$ nm und $\lambda=380$ nm. Mit $\lambda=340$ nm kann die Calcium-gebundene Form angeregt werden, mit $\lambda=380$ nm die Calciumungebundene Form. Das Emissionsmaximum liegt für beide Zustände bei $\lambda=510$ nm. Die zytosolische Calciumkonzentration kann nach Kalibrierung aus der Ratio von $\lambda=340$ nm/ $\lambda=380$ nm abgeleitet werden, da Ratio und Calciumkonzentration in einem proportionalen Zusammenhang stehen.

2.14.1 Kalibrierung der Calciumkonzentration

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d * \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}}\right) * \left(\frac{R - \text{Visc} * R_{\min}}{\text{Visc} * R_{\max} - R}\right)$$

Tabelle 3: Kalibrierung der Intensitäts- und Ratio-Werte zur Bestimmung der zytosolischen Calciumkonzentration (Grynkiewicz et al. 1985).

[Ca ²⁺]	Calciumkonzentration	Wird berechnet
K _d	Fura-2 -Dissoziationskonstante	140 (entspricht 22°C)
S _{f2}	Intensität bei $\lambda=380$ nm in Calcium-freiem Milieu	In Kalibrierung gemessen
S _{b2}	Intensität bei $\lambda=380$ nm in Calcium-haltigem Milieu	In Kalibrierung gemessen
R	Aktuelle Ratio	Im Versuch gemessen
R _{min}	Kleinstmögliche Ratio für Fura-2	In Kalibrierung gemessen
R _{max}	Größtmögliche Ratio für Fura-2	In Kalibrierung gemessen
Visc.	Viskosität	Festgesetzt auf 0,8

Die kleinst- und größtmögliche Ratio für Fura-2, sowie die Intensität bei $\lambda=380$ nm in Calcium-haltiger und Calcium-freier Umgebung wurden experimentell bestimmt. Nach der Applikation von 100 μM Ionomycin wurde S_{b2} und R_{max} bestimmt. Anschließend wird mit 8 mM EGTA das in der Lösung vorhandene Calcium gebunden, und so S_{f2} und R_{min} bestimmt

2.14.2 Messpuffer

Alle Calciummessungen wurden in HBS Puffer, alle Calcium-freien Versuche in Calcium-freien HBS Puffer durchgeführt.

Tabelle 4: Zusammensetzung des HBS-Messpuffers.

Substanz	MWt [g/mol]	c [mM]
HEPES	238,30	20
CaCl ₂	111,00	1
MgCl ₂	203,31	1
KCl	74,55	5
NaCl	58,44	135
D-(+)Glukose	180,16	10

Tabelle 5: Zusammensetzung des Ca²⁺-freien HBS-Messpuffers.

Substanz	MWt [g/mol]	c [mM]
HEPES	238,30	20
MgCl ₂	203,31	1
KCl	74,55	5
NaCl	58,44	135
D-(+)Glukose	180,16	10

Die Pufferlösungen wurden mit Natronlauge (NaOH) bzw. Salzsäure (HCl) auf einen pH-Wert von 7,4 titriert und anschließend steril filtriert. Vor der Verwendung wurde der Calcium-freie HBS-Puffer zusätzlich mit 2 mM EGTA versehen.

2.14.3 Experimentelles Versuchsprotokoll Ca²⁺-imaging

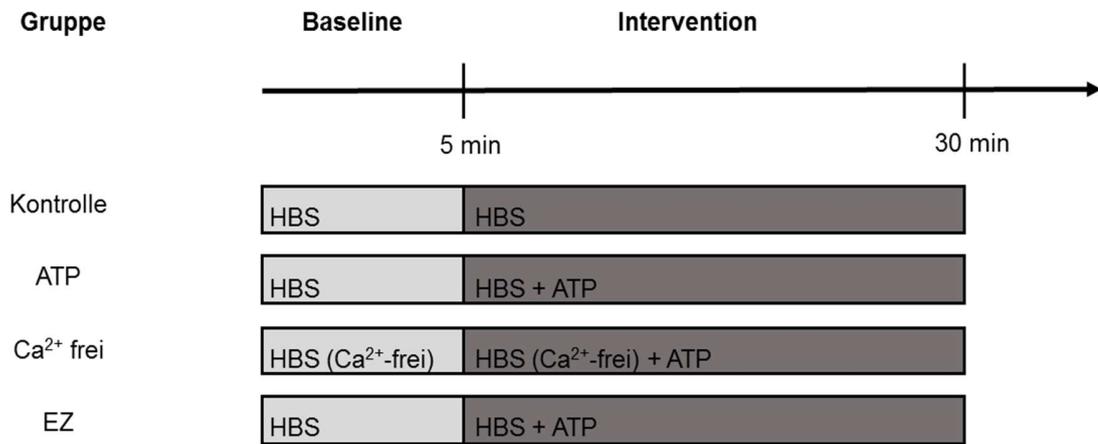
Alle Experimente, sofern nicht anders angegeben, wurden an konfluenten HUVEC Monolayern oder 30-40 % konfluenten HUVEC-Zellen (Einzelzellversuche) auf Fibronectin beschichteten 6-Well-Inserts durchgeführt. Die Entscheidung zur Verwendung von Inserten erfolgte auf Grund von Überlegungen, die Versuchsreihen auch in einer *liquid flow chamber*, die ebenfalls die Inserten verwendet, durchzuführen. Dort hätten zusätzlich die apikale bzw. basale Verteilung der Purinrezeptoren unter Flussbedingungen untersucht werden sollen. Uns gelang es nicht, die Methodik ausreichend zu etablieren, sodass die Ergebnisse in dieser Arbeit fehlen.

Alle Proben wurden zunächst 40 Minuten mit 10 µM Fura-2/AM in 500 µl Gesamtvolumen unter Brutschrankbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Fura-2/AM liegt in Pluronic und HBS gelöst vor. ATP wurde in einer Konzentration von 10 µM in einem Stimulationsvolumen von 500 µl verwendet.

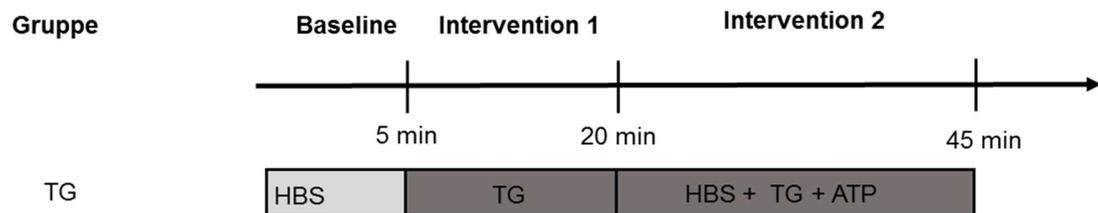
Tabelle 6: Darstellung der Versuchsgruppen für das Calciumimaging.

Gruppe	Anzahl der Versuche	Definition
Kontrolle	3	Kontrolle mit HBS
ATP	11	10 µM ATP
Ca ²⁺ frei	6	10 µM ATP in Ca ²⁺ -freiem Milieu
EZ	6	10 µM ATP an Einzelzellen
2-APB100	6	100 µM 2-APB + 10 µM ATP
2-APB50	6	50 µM 2-APB + 10 µM ATP
TG	6	10 µM Thapsigargin + 10 µM ATP
ATP + EGTA	6	10 µM ATP + 2 mM EGTA
BTP-2	3	5 µM BTP-2 + 10 µM ATP
SKF-96365	3	25 µM SKF-96365 + 10 µM ATP

A)



B)



C)

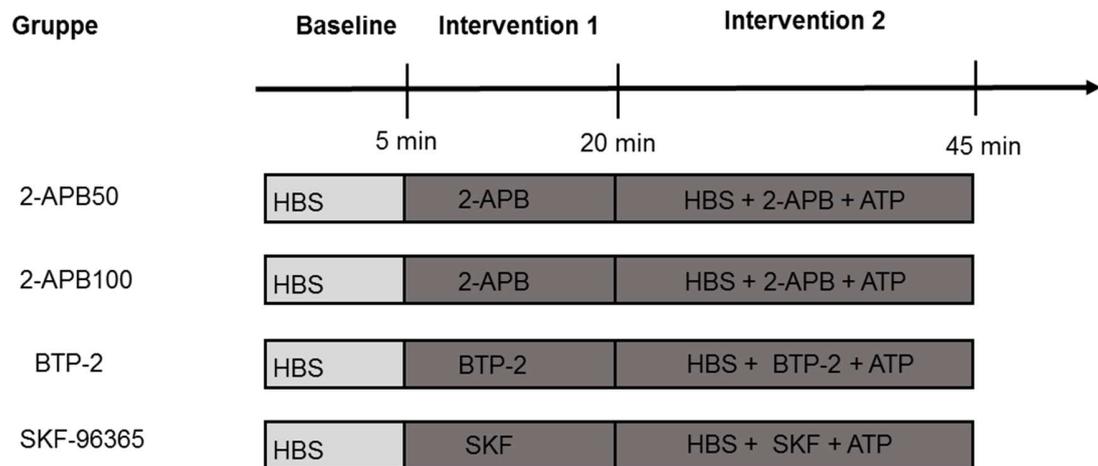


Abbildung 2-2: Experimentelles Versuchsprotokoll für die epifluoreszenzmikroskopischen Versuche. Die Ausgangskonzentration des zytosolischen Calciums wurde in den ersten 5 Minuten der Messung bestimmt (*baseline*). **A:** Die HUVEC wurden nach Schema 25 Minuten mit 10 μM ATP stimuliert (ATP, Ca²⁺-frei und EZ). **B:** Die HUVEC wurden zunächst 15 Minuten mit 10 μM Thapsigargin inkubiert und anschließend 25 Minuten mit 10 μM ATP stimuliert (TG). **C:** Analog zu B) wurde 15 Minuten mit 50 μM 2-APB (2-APB50), 100 μM 2-APB (2-APB100), 5 μM BTP-2 (BTP-2) oder 25 μM SKF-96365 (SKF) inkubiert und anschließend 25 min mit 10 μM ATP stimuliert.

Tabelle 7: Verwendete Inhibitoren mit Zielen

Antagonist	Ziel
Thapsigargin	SERCA-Isoformen
2-APB	IP3-Rezeptor SOCE (ab 50 μM) SERCA (ab 300 μM) mNCX
BTP-2	SOCE TRPC3 TRPC5
SKF-96365	TRPC-Isoformen STIM1

Thapsigargin entleert zunächst die Calcium-Speicher des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und verhindert die Wiederbefüllung durch nichtkompetitive Inhibition der sarko-/endoplasmatischen Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA). Es wird weithin genutzt, um die Rolle der intrazellulären Calciumspeicher im ER bei der Untersuchung zytosolischer Calciumsignale zu bestimmen (Thastrup et al. 1989) (Lytton et al. 1991).

2-APB wurde als IP3-Inhibitor eingeführt, hat sich als solcher aber als unzuverlässig und inkonsistent herausgestellt. Vielmehr findet er Verwendung als zuverlässiger Inhibitor des SOCE ab einer Konzentration von 50 μM . (Bootman et al. 2002; Varnai et al. 2009). Zusätzlich inhibiert 2-APB die SERCA ab einer Konzentration von über 300 μM (Bilmen et al. 2002) und potentiell die mitochondriale Calciumausschüttung wahrscheinlich durch Inhibition des mitochondrialen Natrium-Calcium Austauschers (mNCX) (Prakriya und Lewis 2001). 2-APB ist ein nützliches Werkzeug zur Untersuchung von SOCE, die Ergebnisse können aber nur im Kontext seiner zusätzlichen Effekte gesehen werden.

BTP-2 ist ein vergleichsweise spezifischer SOCE Inhibitor. Als Nebeneffekt werden jedoch TRPC3 und TRPC5 inhibiert, die nach aktuell beschriebener Datenlage aber nicht auf HUVEC exprimiert werden (Ohga et al. 2008).

SKF-96365 inhibiert den SOCE in einer Konzentration von 20-30 μM . Hauptsächlich werden dabei die TRPC Kanäle inhibiert, zusätzlich wird auch eine Inhibition von STIM1 beschrieben (Varnai et al. 2009; Singh et al. 2010).

2.15 Experimentelles Versuchsprotokoll zur Charakterisierung von P2-Rezeptoren

Tabelle 8: Verwendete selektive P2R-Agonisten mit Zielrezeptor.

Gruppe/ Agonist	Anzahl der Versuche	Zielrezeptor
ATP	5	Alle
Ca ²⁺ -frei	3	Alle P2Y
ADP	3	P2Y1
UTP	3	P2Y2
bzATP	3	P2Y11/ P2X4
bzATP Ca ²⁺ -frei	3	P2Y11
α,β -meATP	3	P2X7

Alle Versuche wurden an konfluenten HUVEC-Monolayer auf *centerwell*dishes durchgeführt. Die Wahl der *centerwell*dishes wurde aus praktischen Erwägungen getroffen, da diese Versuchsreihe ein gesondertes Experiment darstellt und nicht mit den Untersuchungen, die mit Inserts durchgeführt wurden, verglichen werden sollte. Alle Proben wurden 40 Minuten mit 10 μM Fura-2/AM in 500 μl Gesamtvolumen unter Brutschrankbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. In allen Versuchen lag die Agonistenkonzentration bei 100 μM in einem Stimulationsvolumen von 250 μl .

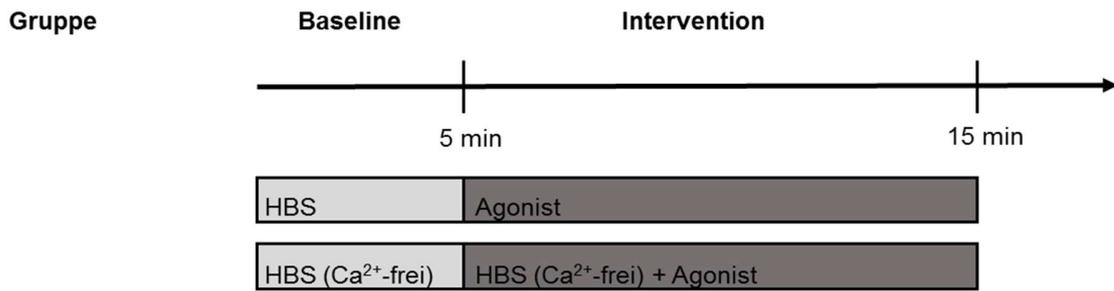


Abbildung 2-3: Experimentelles Versuchsprotokoll für die funktionale P2R-Charakterisierung. Die Ausgangskonzentration des zytosolischen Calciums wurde in den ersten 5 Minuten während der baseline bestimmt. Danach wurden die Zellen 15 Minuten mit dem jeweiligen Agonisten in einer Konzentration von 100 μ M stimuliert.

2.16 Molekularbiologie

Der Nachweis der Calciumkanäle und der Purinrezeptoren wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Agarosegelelektrophorese auf mRNA-Ebene erbracht. Für die mRNA Isolierung, die cDNA Synthese und die PCR wurden alle Verbrauchsmaterialien als Kits von Qiagen N.V. (Venlo, Niederlande) bezogen.

2.16.1 mRNA-Isolierung

Eine konfluente 75 cm² Kulturflasche wurde nach Standardprotokoll subkultiviert, statt in Medium in PBS resuspendiert und bei 1410 U/min fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 630 μ l RLT-Puffer und 70 μ l β -Mercaptoethanol lysiert. Zur Homogenisierung wurde das Lysat auf eine QIAshredderfiltersäule gegeben und zwei Minuten bei 10.000 U/min zentrifugiert. Das Lysat wurde danach auf DNA-Filtersäulen gegeben und 30 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert. Nun erfolgte die Zugabe von 700 μ l Ethanol. Nach gründlichem Mischen wurde das Lysat auf zwei RNeasy-Filtersäulen

gegeben und bei 10.000 U/min 20 Sekunden zentrifugiert. Die RNA befand sich nun in der Filtersäule und wurde in verschiedenen Waschschrritten aufgereinigt. Zunächst mit 700 µl RW-1-Puffer und Zentrifugation bei 10.000 U/min (20 Sekunden), danach mit 500 µl RPE-Puffer und Zentrifugation bei 10.000 U/min (20 Sekunden). Die Filtersäule wurde erneut mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und zwei Minuten bei 10.000 U/min zentrifugiert. Um die Filtersäule von möglichst aller Flüssigkeit zu befreien, wurde sie trocken bei 20.000 U/min eine Minute zentrifugiert. Die RNA konnte dann mit 50 µl RNase-freiem Wasser ausgefällt werden. Die Filtersäule wurde bei 10.000 U/min abschließend eine Minute zentrifugiert. Die Menge an gewonnener RNA wurde zuletzt mit dem NanoDrop 2000 Spektrophotometer quantifiziert.

2.16.2 cDNA Synthese

Tabelle 9: cDNA Synthese Mix.

	30 µl Ansatz
10x Puffer-RT	3 µl
dNTP Mix (5 mM)	2 µl
Oligo-dT Primer (10 mM)	1 µl
RNase Inhibitor (10 U/µl)	1 µl
Omniscript RT (0,2 U/µl)	1 µl
H ₂ O RNase-frei	7 µl
Template RNA (2 µg)	15 µl

Die Template-RNA wurde anhand der Konzentrationsbestimmung als eine Menge von 2 µg definiert und entsprechend mit RNase-freiem Wasser auf 15 µl aufgefüllt. Der Synthese Mix wurde 30 Sekunden bei 4 °C und 10.000 U/min zentrifugiert und anschließend eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

2.16.3 Polymerasekettenreaktion

Die PCR dient der Vervielfältigung der nachzuweisenden Genfragmente aus der zuvor gewonnenen cDNA und wird vollautomatisiert im *Thermal Cycler* durchgeführt. Dabei wird die cDNA zuerst denaturiert. Im nächsten Schritt binden die beiden Primer und die hitzebeständige Polymerase synthetisiert den Komplementärstrang. Welcher Abschnitt amplifiziert wird, wird durch die Lokalisation der beiden Primer bestimmt. Die Menge an synthetisierter DNA verdoppelt sich bei jeder Wiederholung des Zyklus.

Tabelle 10: Zusammensetzung PCR-Mix. Ansatz für eine PCR.

50 µl Ansatz	
10x PCR Puffer	5 µl
<i>Q-Solution</i>	10 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
Primer A (vorwärts)	1 µl
Primer B (rückwärts)	1 µl
HotStar Taq Polymerase	0.25 µl
H ₂ O	28.75 µl
<i>Template-DNA</i>	3 µl

2.16.4 Agarose-Gelelektrophorese

Tabelle 11: Zusammensetzung Agarose-Gel.

1000 ml Ansatz	
TAE-Puffer	20 ml
Aqua dest.	980 ml

Die Gelelektrophorese trennt Molekülen nach ihrer Größe und Ladung, da diese beim Anlegen einer definierten elektrischen Spannung in einem Agarosegel unterschiedlich weit über die Zeit laufen. Für die Überprüfung der PCR wurde ein 1,5 % Agarose Gel mit 70 ml TAE-Puffer angefertigt. Zur besseren Löslichkeit der Agarose wurde die Lösung kurz in der Mikrowelle aufgeköcht. Anschließend wurden 6 µl Roti-Safe GelStaining, ein interkalierender

DANN-Farbstoff, hinzugegeben, das Gel in einen Schlitten gegossen und mit Kämmen die Taschen geformt. Nach dem Erkalten konnte das Gel in die Gelkammer überführt, Kamm und Seitenteile entfernt und das Gel mit Laufpuffer übergossen werden. In die Taschen wurden zur Größenbestimmung der DNA Fragmente 6 µl einer GeneRuler-DNA-Ladder und jeweils 6 µl DNA-Probe mit 3 µl Loading-Puffer aufgetragen. Über eine Laufzeit von 50 Minuten wurden 120 V Spannung und 70 mA Stromstärke angelegt. Die Überprüfung der Elektrophorese erfolgte im GeneGenius Bioimaging System.

2.17 Proteinbiochemie

2.17.1 Proteinextraktion

Tabelle 12: Zusammensetzung des RIPA-Puffers.

Tris	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
DOC	0,5 %
TritonX 100	0,5 %
SDS	0,1 %

Zur Vorbereitung wurde eine halbe Tablette Proteaseinhibitor in 3,5 ml RIPA Puffer gelöst. Eine T75 Zellkulturflasche HUVECs wurde nach zweimaligem Waschen mit PBS in 800 µl der zuvor angefertigten Lösung aus RIPA Puffer und Proteaseinhibitor 30 Minuten auf Eis inkubiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und anschließend 20 Minuten bei 4 °C und 12000 U/min zentrifugiert. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 50 µl aus dem Überstand entnommen. Die Probe wurde bei -80 °C gelagert.

2.17.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit einem BCA-Proteinassay. Der Assay kombiniert die Biuret-Reaktion von Cu^{2+} zu Cu^+ und die photometrische Bestimmung von Cu^+ mit einem BCA-basierten Reagenz. Dabei fungiert BCA als Chelator der Cu^+ -Ionen, wobei je zwei BCA-Moleküle ein Cu^+ -Ion binden. Der Komplex zeigt ein Extinktionsmaximum bei 562 nm.

Das Arbeitsreagenz wurde zunächst in 50:1 Verdünnung aus dem BCA-Reagenz A und BCA-Reagenz B hergestellt. Anschließend wurden je 25 μl der Proben und des Standards zu 200 μl Arbeitsreagenz gegeben und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben im Plattenphotometer bei 562 nm quantifiziert. Die Proteinkonzentration wurde mit einer parallel angefertigten Standard-Verdünnungsreihe abgeleitet. Der Mittelwert der Doppelbestimmung wurde als Konzentration gesetzt.

2.17.3 SDS-Gelelektrophorese

20 g Protein wurde auf ein Gesamtvolumen von 25,5 μl mit 5 μl LDS Sample Buffer, 0,5 μl Reducin-Agent *buffer* und *aqua dest.* pipettiert und für 5 Minuten bei 95 °C auf dem Wärmeblock denaturiert. Nach der Abkühlung auf Eis wurden je 20 μl der Proben auf das 4-12 % Bis-Tris-Gel übertragen und über 50 Minuten bei 200 V aufgetrennt. Als Molekulargewichtsmarker wurden 5 μl Bench Mark Prestained Protein Ladder und 2,5 μl Magic Mark XP Western Standard in einer Tasche aufgetragen.

2.17.4 Western Blot

Tabelle 13: Zusammensetzung des Transferpuffers.

1000 ml Ansatz	
Transfer Buffer	50 ml
Methanol	100 ml
<i>aqua dest.</i>	850 ml

Tabelle 14: Zusammensetzung des Waschpuffers.

1000 ml Ansatz	
10x TBS	100 ml
Tween 20 (0,1%)	1 ml
<i>aqua dest.</i>	900 ml

Tabelle 15: Zusammensetzung des Blockierpuffers.

Milchpulver (bzw. BSA)	5% in Waschpuffer
------------------------	-------------------

Das fertige Gel wurden in der Anordnung Schwamm-Filter-Gel-Membran-Filter-Schwamm luftbasenfrei in die *blotting*-Kammer Übertragen. Die Kammer wurde mit dem Transferpuffer gefüllt und 30 V für 75 Minuten angelegt.

2.17.5 Antikörperdetektion

Im Anschluss wurde die Membran für eine Stunde im Blockierpuffer auf dem Rüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Entfernen des Blockierpuffers wurden 10 ml der Primärantikörperverdünnung auf die Membran gegeben und 18 h bei 4 °C ebenfalls auf dem Rüttler inkubiert. Die Membran wurde im Anschluss viermalig mit Waschpuffer gespült. Der sekundäre Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:10000 in Blockierpuffer angesetzt. Die Membran wurde mit der Sekundärantikörperlösung eine Stunde im Rüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer und einmaligem Waschen mit PBS wurde die Membran fünf Minuten in einem ECL Detektions Reagenz,

bestehend aus 1 ml Reagenz A und 25 µl Reagenz B, inkubiert. Anschließend wurde die Membran in eine Klarsichthülle überführt und im Entwickler Curix entwickelt.

2.18 *In vitro*-Transwell Flux Assay

Der Transwell Flux Assay ist eine Methode zur Quantifizierung der parazellulären Permeabilität eines endothelialen bzw. epithelialen Monolayer *in vitro* für größere Moleküle, wie Albumine oder Dextrane. Zur Messung werden *tracer*-Moleküle, wie zum Beispiel Fluorophor gekoppeltes Albumin (FITC-BSA), verwendet.

Die vorbereiteten 12-Well-Inserts wurden im inneren Kompartiment mit 800 µl und im äußeren Kompartiment mit 1000 µl Kulturmedium gefüllt und fünf Minuten mit 10 µM ATP stimuliert. Für die Versuche mit 2-APB wurden die Zellen vor dem Stimulieren 15 min mit 100 µM 2-APB inkubiert. Das FITC-BSA wurde in einer Endkonzentration von 0,625 mg/µl in das apikale Kompartiment gegeben. An 3 Messpunkten (20 min, 30 min und 45 min nach FITC-BSA Zugabe) konnte jeweils 150 µl aus dem oberen und dem unteren Kompartiment entnommen, in eine 96-Well µ-clear Mikroplatte überführt und in einem Tecan Fluoreszenzreader quantifiziert werden. Alle Versuche wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank durchgeführt. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und jeweils der Mittelwert für die weitere Auswertung genommen.

2.19 Statistik

Die Daten wurden mit SigmaStat als Komponente von SigmaPlot 13.0 auf ihre statistische Signifikanz hin untersucht und als Standard-BoxPlot, Mittelwerte ± SD oder Mittelwerte ± SE angezeigt. Zwei unabhängige Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test,

mehrere unabhängige Gruppen mit der Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks und der anschließenden Dunn's Methode untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Effekt von ATP auf die zytosolische Calciumkonzentration in HUVEC

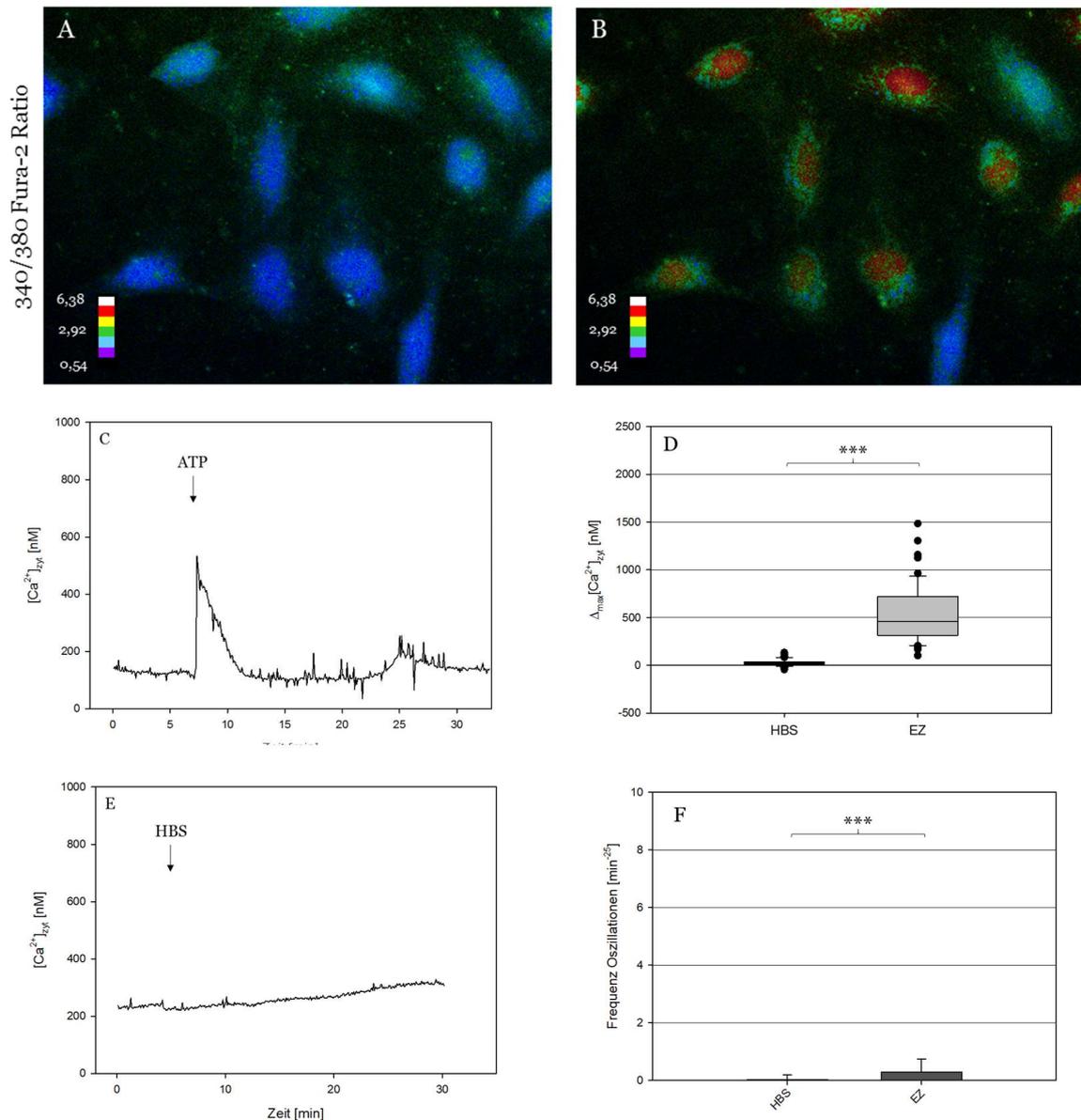


Abbildung 3-1: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HUVEC-Einzelnzellen. Dargestellt ist die 340/380 nm Fura-2-Ratio unter Ausgangsbedingungen (A) und nach der Applikation von 10 μM ATP (B) in Falschfarbendarstellung. Eine repräsentative Darstellung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ einer HUVEC vor und nach der Applikation von 10 μM ATP (C), sowie eine Analyse des maximalen Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration nach Stimulation mit 10 μM ATP (D). Eine repräsentative Darstellung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ einer HUVEC vor und nach der Applikation von HBS im Sinne einer Vehikelkontrolle (E) und ein Vergleich der Frequenz der Calciumoszillationen zwischen Einzelzellen (EZ) und der Kontrolle (HBS). n=3 (HBS), n=6 (EZ), Mittelwert ± SD (F), ***=p<0,001.

Zunächst untersuchten wir den direkten Effekt von ATP auf die zytosolische Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) in HUVEC-Einzelnzellen bei einer Konfluenz von 30-40 %. In diversen Zelltypen induziert extrazelluläres ATP bekannterweise ein zytosolisches Calciumsignal, so auch in Endothelzellen (Lückhoff und Busse 1986).

In den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen bewirkte eine Stimulation mit ATP in HUVEC-Einzelnzellen einen deutlichen Farbumschlag in der 340/380 nm Fura-2 Ratio, folglich auch ein Anstieg von $[Ca^{2+}]_{zyt}$.

Das initiale Calciumsignal wurde zunächst mit einer Negativkontrolle (HBS) verglichen (Abbildung 3-1: D). Der Anstieg von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ war mit $522,718 \text{ nM} \pm 288,219$ signifikant höher als in der Kontrollgruppe mit HBS. Die mittlere Veränderung in der Kontrollgruppe betrug $21,357 \pm 35,990 \text{ nM}$.

Zusätzlich zum initialen Calciumsignal lassen sich in Reaktion auf ATP in HUVEC-Einzelnzellen im Anschluss nur vereinzelt Calciumoszillationen beobachten. Die Oszillationen nach dem initialen Signal traten nur sporadisch auf. Die Frequenz in den Einzelzellen betrug im Mittel $0,286 \pm 0,455 / \text{min}^{25}$. Das bedeutet zur Negativkontrolle mit HBS, in der keine Oszillationen auftraten, einen signifikanten Unterschied. Zu beachten ist allerdings, dass obwohl der Unterschied zur Negativkontrolle hochsignifikant ist, die Frequenz der Oszillationen mit weit unter einem Calciumspike pro 25 Minuten äußerst niedrig ist.

3.2 Effekt von ATP auf die zytosolische Calciumkonzentration in HUVEC - Monolayer

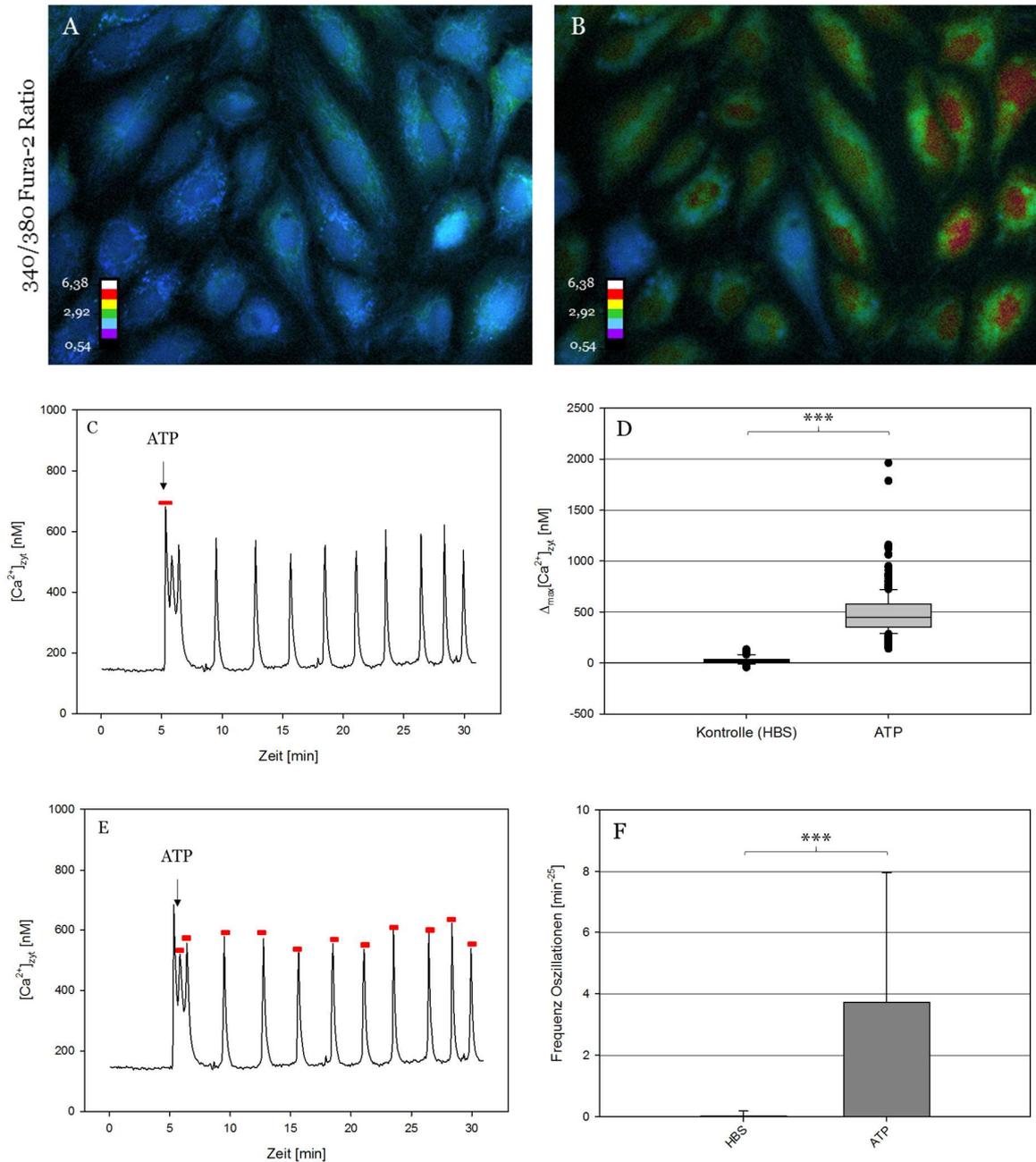


Abbildung 3-2: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HUVEC Monolayer. Dargestellt ist die 340/380 nm Fura-2 Ratio in Ausgangsbedingungen (**A**) und nach der Applikation von 10 μM ATP (**B**) in Falschfarbendarstellung. Eine repräsentative Darstellung von [Ca²⁺]_{ᵢₓₜ} einer HUVEC vor und nach der Applikation von 10 μM ATP (**C;E**), sowie eine Analyse des maximalen Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration nach Stimulation mit 10 μM ATP (**D**) und ein Vergleich der Frequenz der Calciumoszillationen zwischen Einzelzellen (EZ) und der Kontrolle (HBS). n=3 (HBS), n=11 (ATP), Mittelwert ± SD (**F**), ***=p<0,001.

Wir führten analog zu den Einzelzellversuchen dieselben Experimente an HUVEC-Monolayer mit einer Konfluenz von 90-100 % durch. Zunächst wurde das initiale Calciumsignal die Reaktion auf ATP mit einer Negativkontrolle (HBS) verglichen (Abbildung 3-2: D). Der Anstieg von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ war mit $486,35 \pm 208,65$ nM signifikant höher als in der Kontrollgruppe mit HBS. Hier betrug die mittlere Veränderung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ $21,357 \pm 35,990$ nM. Weiter zeigte sich kein signifikanter Unterschied mit dem Anstieg des zytosolischen Calciums bei den Einzelzellversuchen.

Im weiteren zeitlichen Verlauf lassen sich Calciumoszillationen als *baseline spikes* beobachten, nachdem sich die zytosolische Calciumkonzentration wieder in Ausgangskonzentrationen eingependelt hatte (Abbildung 3-2: E). Die Frequenz nach $10 \mu\text{M}$ ATP Stimulation betrug im Mittel $3,73 \pm 4,24$ /min²⁵. Das bedeutet zur Negativkontrolle mit HBS einen signifikanten Unterschied. Vor allem aber im Vergleich mit der Oszillationsfrequenz der Einzelzellen imponiert eine deutlich erhöhte Frequenz der Oszillationen.

Die Oszillationen stellten sich in unterschiedlichen Mustern in den verschiedenen Experimenten dar und zeigten keine offensichtliche Synchronisation der Zellen.

3.3 Rolle von P2X- und P2Y-Purinrezeptoren

ATP in seiner Rolle als Mediator vermittelt seine Wirkung über eine Bindung an membranständige Purinrezeptoren an der Extrazellulärmembran. Wir untersuchten die Expression und die Rolle der verschiedenen Rezeptortypen in HUVEC sowohl in Bezug auf das initiale Calciumsignal, als auch auf die Oszillationen.

Um die beteiligten Purinrezeptoren zu identifizieren, wurde zunächst ein PCR-Screening auf alle bekannten in humanen Zellen exprimierten P2X- und P2Y-Purinrezeptoren durchgeführt (Abbildung 3-3: A). Wir fanden in den untersuchten humanen umbilikalvenösen Endothelzellen (HUVEC) einen positiven Nachweis sowohl für die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren P2Y1, P2Y2 und P2Y11, als auch für die Calciumionenkanäle P2X4 und P2X7. P2X7 war allerdings nur schwach positiv bzw. nur inkonsistent nachweisbar.

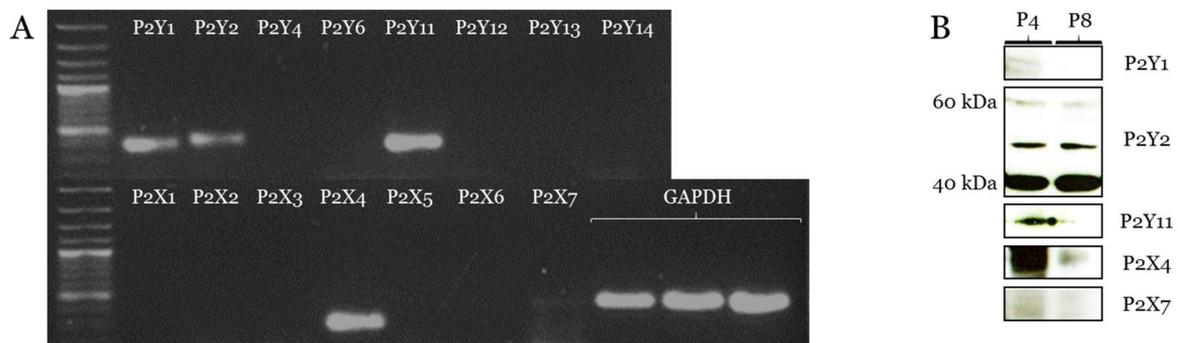


Abbildung 3-3: Expression der mRNA von Purinrezeptoren in HUVEC. Nachweis der Purinrezeptoren P2Y1, P2Y2, P2Y11, P2X4 und P2X7 mittels semiquantitaver PCR und Agarose-Gelelektrophorese (A). Das konstitutiv exprimierte Gen GAPDH wurde als Positivkontrolle verwendet. Expression der Purinrezeptoren P2Y1, P2Y2, P2Y11 und P2X4 in Western-Blot-Analyse der Zelllysate von HUVEC in den Passagen 4 (P4) und 8 (P8) (B).

Durch die PCR können nur Aussagen über die Expression der Proteine auf RNA-Ebene getroffen werden. Wir überprüften die positiven Ergebnisse aus der PCR daher im Western Blot auf Proteinebene (Abbildung 3-3: B). Ein Nachweis für P2Y1, P2Y2, P2Y11 und P2X4 konnte so erbracht werden. Nicht gezeigt werden konnte eine Expression von P2X7. Weiter scheint sich, mit Ausnahme des P2Y2-Rezeptors, die Expression der Rezeptoren in höherer Passage zu verringern.

Anschließend an den Nachweis der Expression in HUVEC wurden die identifizierten Rezeptoren einer funktionalen Kontrolle mit Rezeptoragonisten unterzogen. In separaten

Calciummessungen am Fluoreszenzmikroskop wurde der maximale Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration in Reaktion auf die Agonisten untersucht.

Tabelle 16: Übersicht über die Rezeptorensensitivität der verwendeten Agonisten (modifiziert nach Burnstock 2012).

Agonist	Rezeptor
ATP	alle
ADP	P2Y2
UTP	P2Y2
BzATP	P2Y11, P2X7
α,β -meATP	P2X4

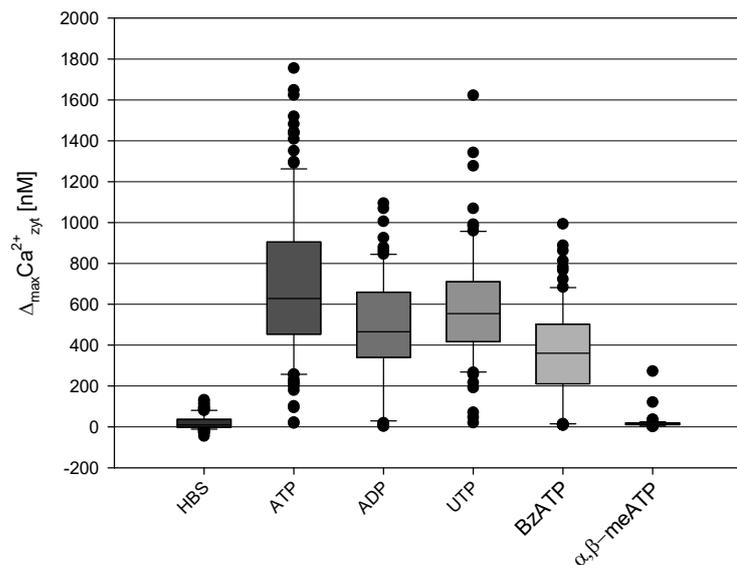


Abbildung 3-4: Analyse des maximalen Anstiegs von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ nach Stimulation mit 100 μ M ATP bzw. Agonisten für die exprimierten Rezeptoren in gleicher Konzentration. Nachweis eines Calciumsignals für ATP, ADP, UTP, bzATP, sowie für ATP in Calcium-freien Milieu (nicht gezeigt) und bzATP in Calcium-freien Milieu (nicht gezeigt). Für α,β -meATP konnte kein Nachweis eines Calciumsignals erbracht werden. $n=5$ (ATP), $n=3$ (Alle anderen Gruppen).

Tabelle 15 zeigt die Rezeptoraktivität der verwendeten Agonisten in Bezug auf die in den verwendeten HUVEC exprimierten Purinrezeptoren. Wir können mit hoher Wahrscheinlichkeit für ADP, UTP und α,β -meATP eine gewisse Spezifität bezogen auf ein Purinrezeptor-vermitteltes Calciumsignal auf Grund des Expressionsprofils und der bekannten Agonistenwirkung voraussetzen. BzATP ist in der Lage, sowohl P2Y11 als auch P2X7 zu aktivieren. Beide sind auf den verwendeten HUVEC exprimiert (Abbildung 3-3). In Calcium-freiem Milieu kann kein Calcium-Einstrom über die als Ionenkanäle fungierenden

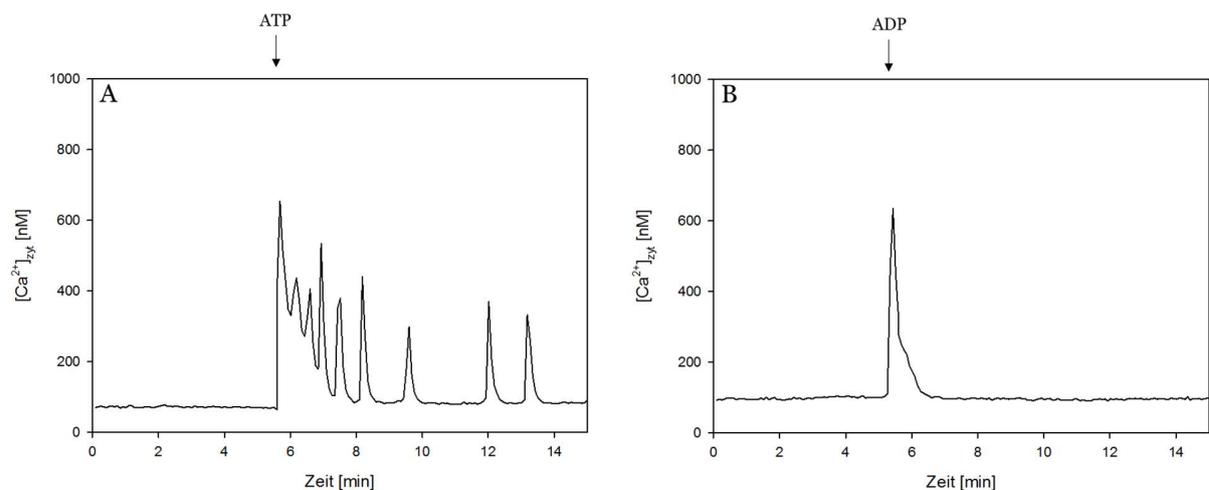
P2X-Rezeptoren stattfinden. Folglich ist eine Differenzierung trotz der Doppelaktivität des Agonisten möglich.

Die Agonisten für P2Y1 (ADP), P2Y2 (UTP) und P2Y11 (BzATP) waren in der Lage, ein initiales Calciumsignal zu generieren. Für BzATP in Calcium-freiem Milieu konnte kein Unterschied zu BzATP in Calcium-haltigem Milieu gezeigt werden. α,β -meATP konnte kein Signal generieren.

Für die Agonisten der Calciumionenkanäle P2X4 und P2X7 konnten wir zusammenfassend keine Unterschiede zu den Vergleichsgruppen feststellen, sodass wir bezüglich des initialen Calciumsignals von einer kombinierten Rolle der die G-Protein gekoppelten Rezeptoren P2Y1, P2Y2 und P2Y11 ausgehen.

3.3.1 Oszillationen nach P2-Rezeptor Agonisten

Um zu klären, ob die Aktivierung der unterschiedlichen P2-Rezeptoren eine Rolle für die Oszillationen spielt, wurden das Verhalten im Calciumimaging nach Stimulation mit den Agonisten untersucht.



Ergebnisse

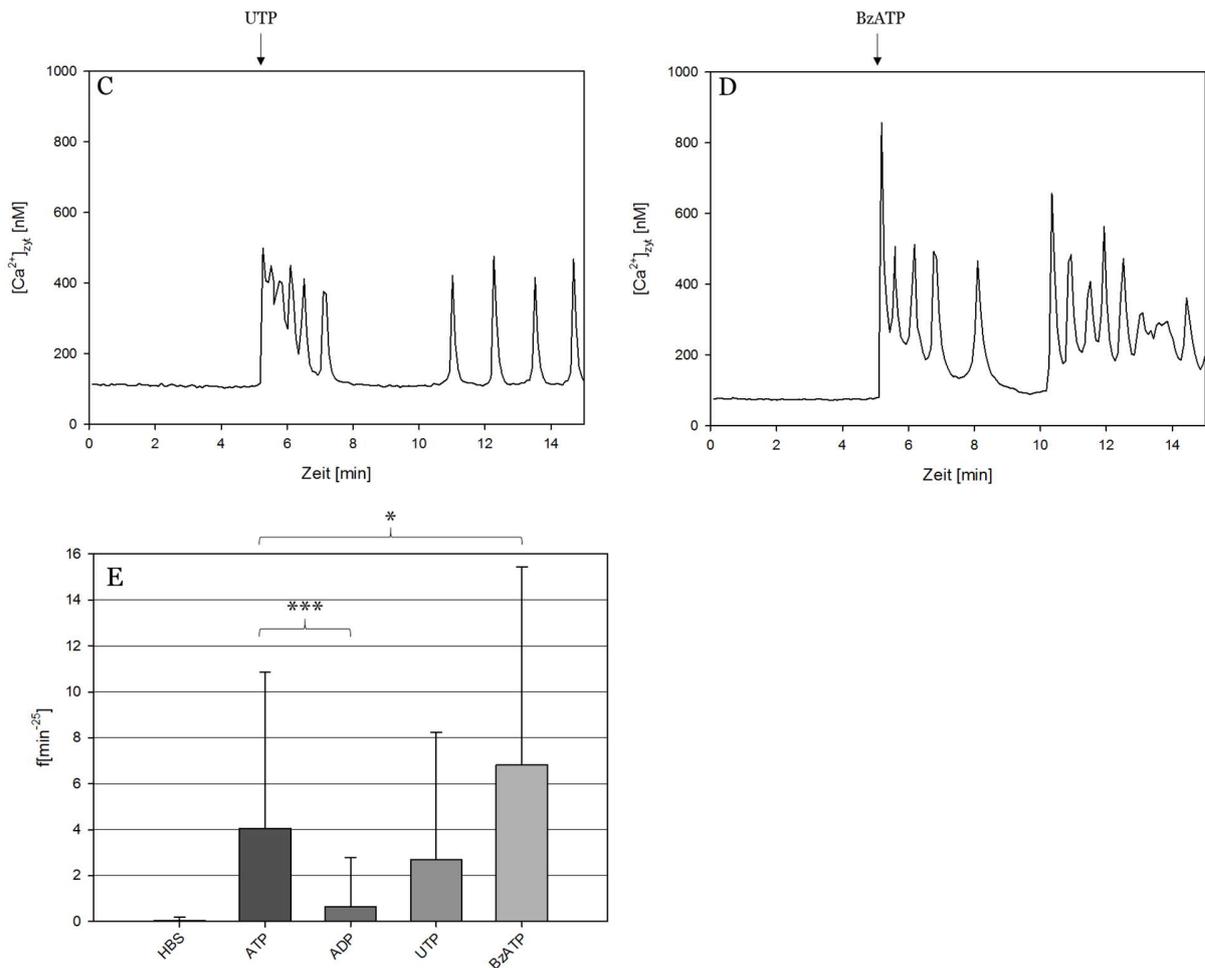


Abbildung 3-5: Repräsentative Darstellung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ einer HUVEC vor und nach der Stimulation mit Agonisten. **A:** 100 μ M ATP, **B:** 100 μ M ADP, **C:** 100 μ M UTP, **D:** 100 μ M BzATP und Vergleich der Oszillationsfrequenzen der Calciumoszillationen (**E**). $n=5$ (ATP), $n=3$ (ADP, UTP, BzATP), Mittelwert \pm SD, $*=p<0,5$, $***=p<0,01$

Dabei zeigte sich morphologisch, dass die Oszillationen nach Stimulation mit ATP sowie mit dem P2Y2-Agonist UTP und dem P2Y11-Agonist BzATP auftraten. Nach Stimulation mit dem P2Y1-Agonisten ADP traten signifikant weniger Oszillationen auf, als nach Stimulation mit ATP (Abbildung 3-5: A-D). Der Vergleich der Oszillationsfrequenzen zeigt eine stark erniedrigte Frequenz nach Stimulation mit ADP, eine mit ATP vergleichbare Frequenz nach Stimulation mit UTP, sowie eine erhöhte Frequenz nach einer Stimulation mit BzATP (Abbildung 3-5: E).

3.4 Untersuchung der Calciumoszillationen

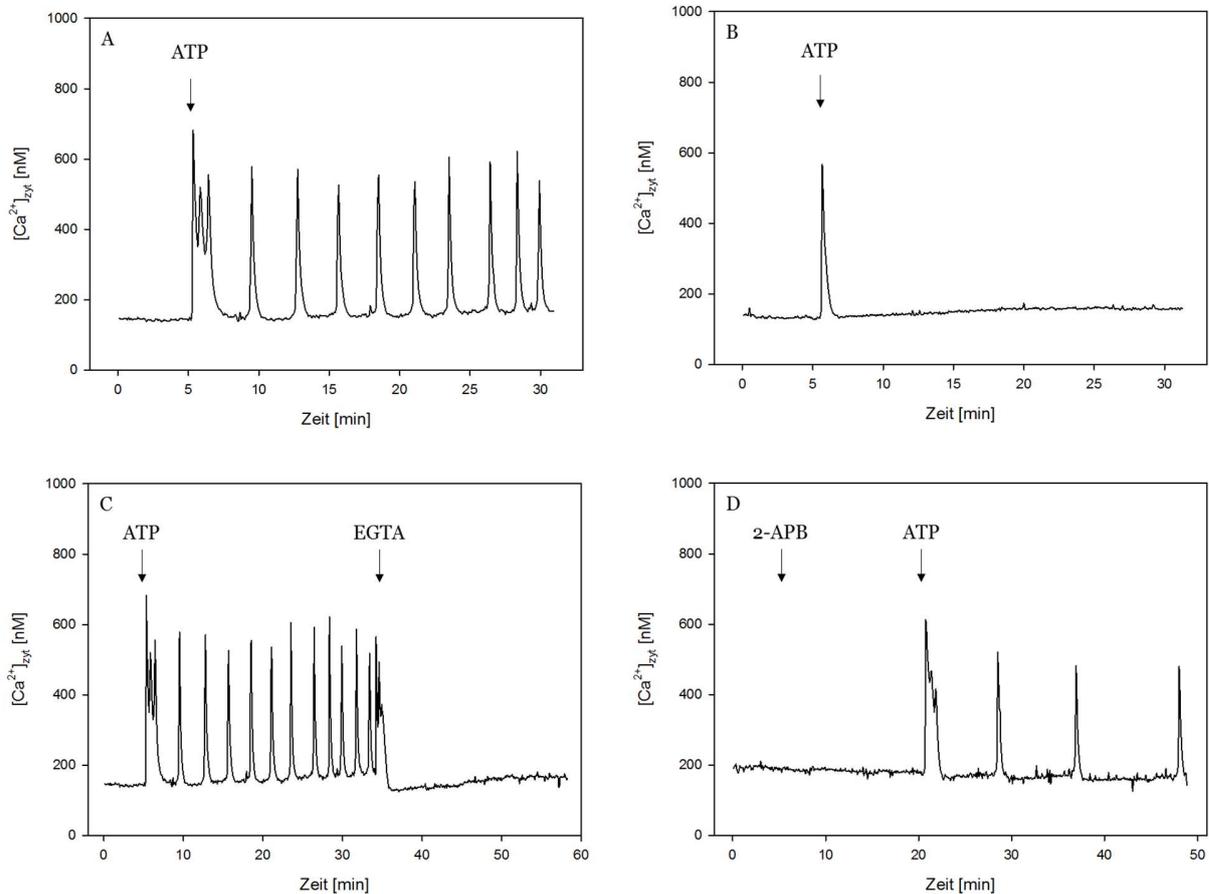


Abbildung 3-6: Repräsentative Darstellung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in HUVEC vor und nach der Stimulation mit Agonisten. Stimulation mit $10 \mu M$ ATP (**A**), $10 \mu M$ ATP in Ca^{2+} -freiem Milieu (**B**), nach Applikation von $10 \mu M$ ATP und $2 mM$ EGTA (**C**) und $10 \mu M$ ATP nach $15 min$ Inkubation mit $50 \mu M$ 2-APB (**D**).

Zur Objektivierung der Calciumoszillationen wurde zunächst die Frequenz der Oszillationen bestimmt (Abbildung 3-7: A). Die Frequenz lag nach der Applikation von $10 \mu M$ ATP im Mittel bei $3,73 \pm 4,24 / min^{25}$. In Calcium-freiem Milieu zeigte sich die Frequenz signifikant erniedrigt bei $0,37 \pm 0,72 / min^{25}$. Um die Abhängigkeit der Oszillationen von extrazellulärem Calcium zu validieren, wurde oszillierenden HUVEC durch die Zugabe von EGTA das extrazelluläre Calcium entzogen. Dadurch verringerte sich die Oszillationsfrequenz ebenfalls deutlich auf $0,36 \pm 0,64 / min^{25}$. Eine Präinkubation mit dem SOCE-Inhibitor 2-APB führte in

beiden eingesetzten Konzentrationen von 50 und 100 μM zu einer signifikant niedrigeren Frequenz. Dabei reduzierte sich die Frequenz in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise. Für 50 μM 2-APB lag sie bei $1,85 \pm 1,87 / \text{min}^{25}$, für 100 μM 2-APB bei $0,50 \pm 0,92 / \text{min}^{25}$. Im Gegensatz dazu wurde die Oszillationsfrequenz durch die SOCE Inhibitoren BTP-2 und SKF-96365 nicht signifikant verändert (Abbildung 3-7: A).

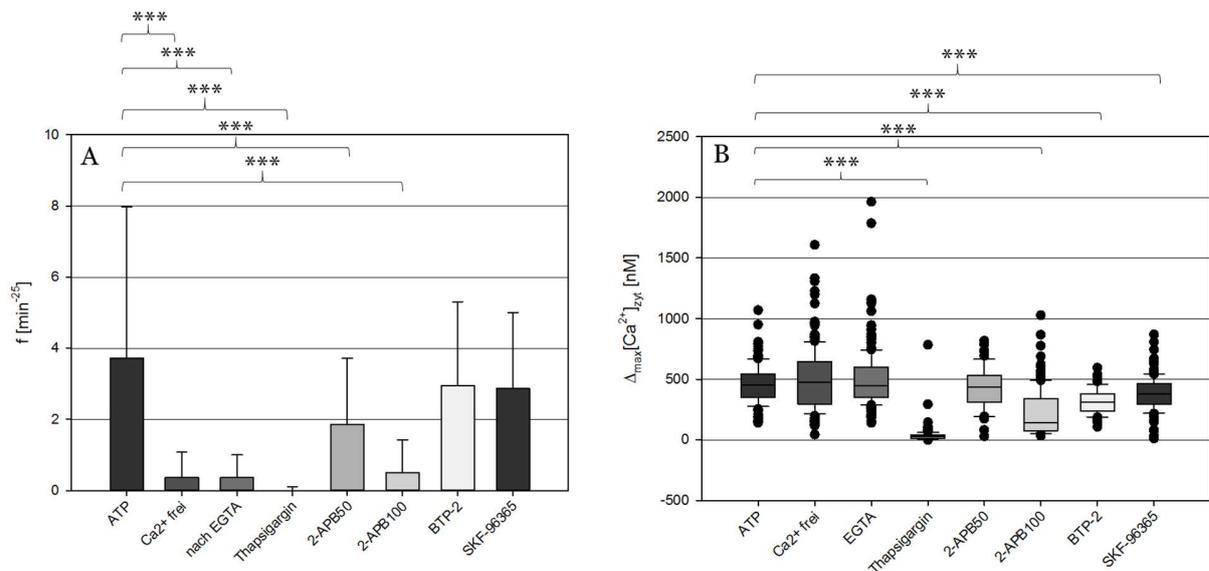


Abbildung 3-7: A: Vergleich der Oszillationsfrequenzen der Calciumoszillationen. Nach Stimulation mit ATP, mit ATP in Calcium-freien Milieu (Ca^{2+} frei), nach Entfernen von extrazellulärem Calcium (ATP/ EGTA), mit ATP nach Inkubation mit Thapsigargin (Thapsi), mit ATP nach Inkubation mit 50 μM 2-APB (2-APB50), mit ATP nach Inkubation mit 100 μM 2-APB (2-APB100), mit ATP nach Inkubation mit 5 μM BTP-2 (BTP-2) und mit ATP nach Inkubation mit 25 μM SKF-96365 (SKF-96365). **B:** Analyse des maximalen Anstiegs von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ nach Stimulation mit ATP in den gleichen Gruppen. $n=11$ (ATP), $n=6$ (Ca^{2+} frei, ATP/EGTA, EZ, 2-APB50, 2-APB100), $n=3$ (BTP-2, SKF-96365), Mittelwert \pm SD, ***= $p<0,001$

Zur Vergleichbarkeit der Oszillationsanalyse wurden die maximalen Anstiege der initialen Signale verglichen (Abbildung 3-7: B). Hier zeigte sich ein verringertes initiales Signal nach der Inkubation mit 100 μM des SOCE-Inhibitors 2-APB. Nach der Inkubation mit den alternativen SOCE-Inhibitoren BTP-2 und SKF-96365 verringerte sich das initiale Signal ebenfalls leicht. Im Vergleich mit den restlichen Gruppen, insbesondere nach Inkubation mit 50 μM 2-APB, ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen.

Neben den Experimenten mit SOCE Inhibitoren wurden darüber hinaus Experimente mit Thapsigargin (TG) durchgeführt. Thapsigargin entleert zunächst die Calciumspeicher des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und verhindert eine Wiederbefüllung der Speicher durch Inhibition der sarko-/endoplasmatischen Retikulum- Ca^{2+} -ATPase (SERCA). Nach Inkubation mit Thapsigargin reagierten die HUVEC gar nicht bzw. nur vereinzelt auf ATP mit einem signifikant niedrigeren Anstieg von $34,94 \pm 59,06$ nM in der zytosolischen Calciumkonzentration. Das initiale Calciumsignal ist folglich von dem Calcium-Speicher des ER abhängig. Calciumoszillationen traten im Anschluss an die Zugabe von ATP nach Vorinkubation mit Thapsigargin nicht auf.

3.5 SOCE-Aktivität in HUVEC nach ATP-Stimulation

Store operated calcium entry (SOCE) sorgt für das langsame Abklingen des Calciumsignals in Endothelzellen und verstärkt damit die Wirkung von Calcium als *second messenger*.

Um die Aktivität des SOCE in HUVEC nach ATP Stimulation zu untersuchen, wurde in Anlehnung an Zhou *et al.* der Unterschied von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ bei $t = 4$ min in Vergleich zu den Ausgangsbedingungen bestimmt. $t = 4$ min bezieht sich dabei auf die Zeit nach ATP

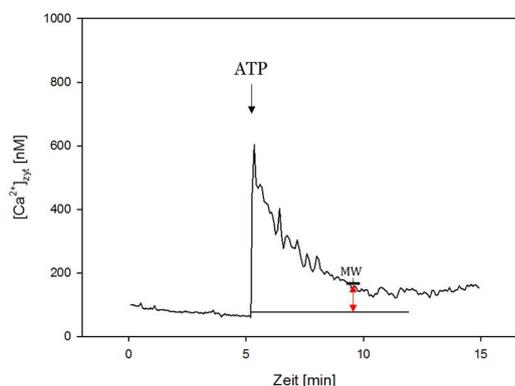


Abbildung 3-8: Darstellung der Auswertungsmethodik. Gezeigt ist $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ in HUVEC vor und nach der Stimulation $10 \mu\text{M}$ ATP. Verglichen wird der mittlere baseline $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Wert mit dem Mittelwert zwischen $t = 4$ min und $t = 4,4$ min nach ATP-Stimulation. Auswertung nach (Zhou et al. 2014).

Stimulation. Dadurch lässt sich feststellen, ob $[Ca^{2+}]_{zyt}$ zu diesem Zeitpunkt über den Ausgangsbedingungen liegt und folglich eine verlängerte Konzentrationserhöhung von Calcium im Zytosol vorliegt.

Aus Abbildung 3-9: A wird ersichtlich, dass sich nach Stimulation mit ATP bei $t=4$ min erhöhte Calciumwerte um durchschnittlich $65,90 \pm 67,31$ nM zeigten.

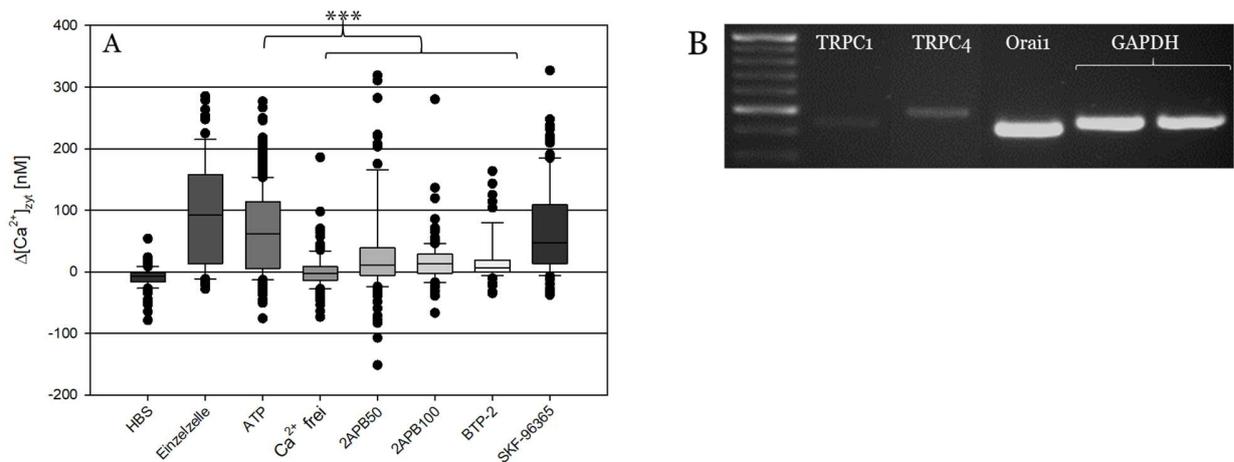


Abbildung 3-9: Analyse von Änderungen in $[Ca^{2+}]_{zyt}$ nach Stimulation mit $10 \mu M$ ATP bei $t=4$ min nach Gabe von ATP in Relation zu den jeweiligen Ausgangswerten. $n=11$ (ATP), $n=6$ (Ca^{2+} -frei, ATP/EGTA, EZ, 2-APB50, 2-APB100), $n=3$ (BTP-2, SKF-96365), $***=p<0,001$ (A). Expression der mRNA von SOCE-Calciumkanälen in HUVEC. Nachweis von Orai1, TRPC1 und TRPC4 mittels semiquantitaver PCR und Agarose-Gelelektrophorese. Das Housekeeping-Gen GAPDH wurde als Positivkontrolle verwendet (B).

An Einzelzellen konnten bei $t=4$ min erhöhte Calciumwerte von $94,240 \pm 86,310$ nM nach ATP-Stimulation beobachtet werden. Die Güte des Auswerteverfahren offenbarte sich in den signifikant verringerten Calciumwerten in Calcium-freien-Milieu mit $-0,63 \pm 27,62$ nM, da ohne extrazelluläres Calcium kein Calcium über die SOCE-Kanäle von extrazellulär nach intrazellulär fließen kann. 2-APB als SOCE-Inhibitor zeigte in beiden verwendeten Konzentrationen ebenfalls signifikant erniedrigte Werte in konzentrationsabhängiger Steigerung. Nach Inhibierung mit $50 \mu M$ 2-APB lag die $t=4$ min Calciumkonzentration bei $33,26 \pm 81,13$ nM und nach Inhibierung mit $100 \mu M$ 2-APB bei $15,27 \pm 34,71$ nM über den

Ausgangswerten. Eine Präinkubation mit 5 μM BTP-2 führte im Mittel zu einer $t=4$ min Calciumkonzentration von $19,36 \pm 40,20$ nM und damit signifikant niedrigeren Werten als in der Vergleichsgruppe. Einzig 25 μM SKF-96365 zeigte keinen Effekt auf die SOCE Aktivität nach ATP-Stimulation mit $71,49 \pm 75,10$ nM im Mittel. Die Expression der SOCE-Kanäle in HUVEC wurde mittels PCR und Agarose-Gelelektrophorese untersucht (Abbildung 3-9B). Wir konnten die Expression von Orai1, TRPC1 und TRPC4 in HUVEC nachweisen. Nicht gezeigt werden konnte eine Expression von TRPC3, TRPC5, TRPC6 und TRPC7 (Daten nicht gezeigt).

3.6 ATP beeinflusst Permeabilität von HUVECs *in vitro*

Die Wirkung von ATP auf die Permeabilität der Endothelzellen im Monolayer wurde mittels parazellulärem *tracer flux* (PTF) untersucht. Die Messung des PTF ist ein Maß für die Funktionalität der endothelialen Barriere für größere Moleküle. FITC-BSA kann durch den Konzentrationsgradienten in das untere Kompartiment para- bzw. tanszellulär über den Monolayer diffundieren. Um neben der Wirkung von ATP zu untersuchen, ob speziell die Calciumoszillationen nach einer Stimulation mit ATP eine regulatorische Funktion in Bezug auf die Barrierefunktion des Endothels einnehmen, wurden auch Experimente mit 2-APB-präinkubierten HUVEC durchgeführt. Wir konnten zuvor zeigen, dass 2-APB die Frequenz der Oszillationen signifikant erniedrigt (Abschnitt 3.4).

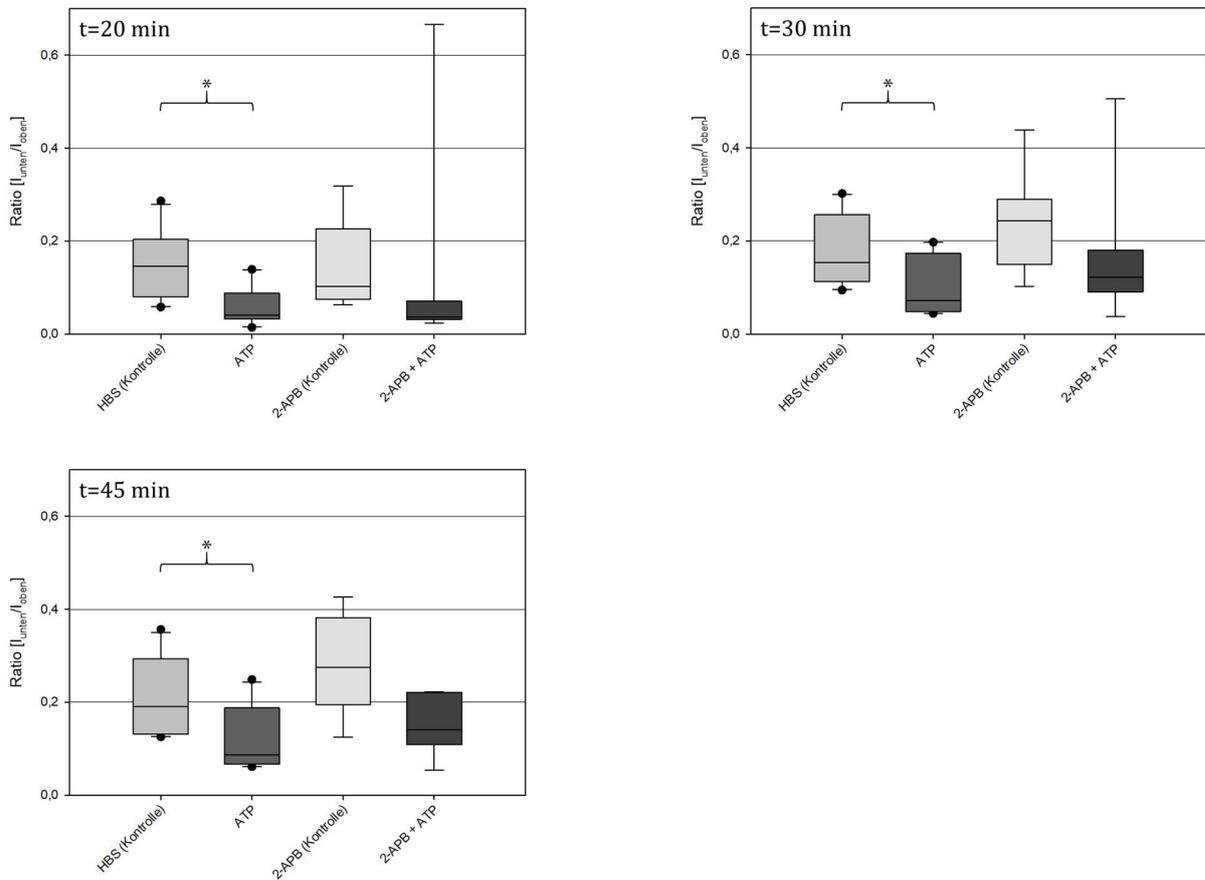


Abbildung 3-10: Einfluss von ATP und 2-APB auf den parazellulären *tracer flux* (PTF). Die Diffusion von FITC-BSA wurde bei 20 min, 30 min und 45 min bestimmt und als Ratio zwischen den Kompartimenten aufgetragen. n=10 (Kontrolle, ATP), n=7 (2-APB, 2-APB + ATP), *=p<0,05

Zwischen den beiden Kontrollgruppen, HBS und 2-APB, lässt sich kein signifikanter Unterschied nachweisen, wodurch die Vergleichbarkeit zwischen den beiden Stimulationsgruppen gewährleistet wird. Nach Stimulation mit ATP lässt sich ein signifikanter Unterschied in der Ratio des PTF zur Kontrolle mit HBS nachweisen. Bereits nach 20 Minuten zeigte sich ein um 61,88 % erniedrigter PTF, der über den gesamten Messzeitraum nahezu konstant blieb. Eine Reduktion des PTFs bedeutet eine erniedrigte Diffusion von FITC-BSA über den endothelialen Monolayer.

Es konnte keine Veränderung des ATP-Effekts auf die Barrierefunktion durch 2-APB nachgewiesen werden. In beiden Gruppen kam es zu einer vergleichbaren relativen Reduktion des PTF.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

HUVEC wurden vielfach als Modell für das pulmonale mikrovaskuläre System benutzt, da *in situ* in der Umbilikalvene ähnliche Druck- und Flussbedingungen vorherrschen, aber noch wichtiger, da sie besser verfügbar und leichter zu isolieren sind. In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass endotheliales Verhalten und Funktion stark vom Ursprungsort abhängt und die einzelnen gefäßendothelialen Kompartimente sich stark voneinander unterscheiden (Sherelton et al. 2006). Eine Übertragung von Erkenntnissen dieser Arbeit auf das pulmonale mikrovaskuläre System ist daher nicht ohne weiteres möglich. Unser Ziel war es zunächst, die Calciumoszillationen nach ATP Stimulation in einem einfachen Modell zu untersuchen und zu charakterisieren. Für eine Übertragung der Ergebnisse auf Pathologien, wie das hydrostatische pulmonale Ödem, wären Untersuchungen mit z.B. mikrovaskulären pulmonalen Endothelzellen oder komplementäre Experimente im Tiermodell nötig.

4.1.1 Ca^{2+} -*imaging* mit Fura-2

Alle Ca^{2+} -*imaging*-Versuche wurden mit Fura-2 durchgeführt, das seit seiner Einführung durch Grynkiewicz *et al.* einer der am meisten eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe für die Darstellung von zytosolischem Calcium ist (Grynkiewicz et al. 1985). Der herausragende Vorteil gegenüber vergleichbaren Farbstoffen, wie z.B. Indo-1 oder Fluo-4, besteht in der ratiometrischen Messmethode, die durch die zwei verschiedenen Excitationsmaxima für die Calcium-gebundene- und ungebundene Form, möglich wird. Dadurch ist die Messung der zytosolischen Calciumkonzentration nicht rein Intensitätsbasiert, sondern kann nach einer Kalibrierung abgeleitet werden. Zusätzlich können so Messungenauigkeiten durch ungleiche

Farbstoffverteilung oder *bleaching* möglichst verhindert werden (O'Connor et al. 2007). In unseren Experimenten blieb die Intensität des Signals über die Dauer der Experimente konstant, wodurch sich eine Verfälschung durch *bleaching* ausschließen lässt. Im physiologischen Bereich von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ zwischen 0,1–1 μ M ist Fura-2 sehr calciumspezifisch und zeigt sich unempfindlich gegen physiologische pH-Schwankungen (O'Connor et al. 2007). Neueste Erkenntnisse deuten auf deutlichere Beeinträchtigung zellulärer Funktionen durch Fura-2 selber hin, als bisher gedacht. So konnte gezeigt werden, dass Fura-2 die für die Lebensfähigkeit und Funktionalität wichtige Na^+/K^+ -ATPase inhibiert (Smith et al. 2018). Die Autoren mahnen zur Vorsicht bezüglich der Verwendung niedermolekularer Calciumfarbstoffe und schlagen alternativ genetisch kodierte Farbstoffen, wie zum Beispiel Calcium-chelatierende Farbstoffe auf *green fluorescent protein* (GFP)-Basis, vor (Smith et al. 2018). Auch wenn die Studie keine Endothelzellen verwendete, könnte es für die Zukunft eine kritische Überprüfung der Daten mit niedermolekularen Calciumfarbstoffen bedeuten.

4.1.1.1 Verwendung von niedermolekularen Inhibitoren

Ein möglicher Kritikpunkt der Methodik ist die Verwendung von vergleichsweise unspezifischen niedermolekularen Inhibitoren. In unserem Fall wurden 2-APB, BTP-2 und SKF-96365 sowie diverse ATP-Analoga verwendet.

2-APB ist mittlerweile als konsistenter SOCE-Inhibitor anerkannt und wird seit seiner Charakterisierung als solcher in diversen Veröffentlichungen bis heute verwendet (Bootman et al. 2002; Chang 2006; Peinelt et al. 2008). Nichtsdestotrotz können die Ergebnisse nur im Hinblick auf die weiteren Effekte von 2-APB betrachtet werden. Insbesondere die IP3R-Inhibition sehen wir in dieser Arbeit durch das erniedrigte initiale Calciumsignal nach

Vorinkubation mit 100 μ M 2-APB bestätigt. Ebenfalls zu bedenken ist die Beeinflussung der mitochondrialen Calciumhomöostase durch Inhibition des mitochondrialen Natrium-/Calcium Austauschers (mNCX) (Prakriya und Lewis 2001). BTP-2 ist ein vergleichsweise neuer und relativ spezifischer Inhibitor der SOCE Komponenten STIM1, Orai1 und TRPC1 (Zitt et al. 2004). Eine Inhibition von SOCE in HUVEC wurde ebenfalls bereits gezeigt (Tsai et al. 2014). SKF-96365 kann als unspezifischer Inhibitor der TRPC-Kanäle angesehen werden (Varnai et al. 2009; Singh et al. 2010).

Die Ergebnisse aus Experimenten mit niedermolekularen Inhibitoren sind mit Vorsicht zu interpretieren. Durch die Verwendung von mehreren SOCE Inhibitoren in verschiedenen Experimenten, die sich in ihren *targets* überschneiden, wird eine Beteiligung des SOCE an den durch ATP ausgelösten Calciumoszillationen bei gleichen Ergebnissen wahrscheinlicher. Unser Vorhaben war es zunächst, die Calciumoszillationen und die SOCE Aktivität in HUVEC auf ihr Verhalten gegenüber bekannten Inhibitoren zu charakterisieren und dadurch potentielle Mechanismen zu identifizieren. Eine Verifikation der Resultate wäre durch spezifischere Methoden, wie etwa mit *knockdown*-Versuchen, möglich. Die funktionelle Charakterisierung des Purinrezeptorstatus durch die Verwendung von spezifischen Agonisten ist durch Geoffrey Burnstock etabliert und durch diverse Veröffentlichungen verifiziert (Burnstock 2007; Burnstock 2012).

4.1.2 Transwell-Flux-Assay

Das Prinzip des Transwell-Flux-Assays wurde 1987 vorgestellt (Siflinger-Birnboim et al. 1987). Es ist ein nützliches Instrument, um die endotheliale Barrierefunktion *in vitro* an kultivierten Monolayern zu untersuchen. Dabei können diverse große Tracermoleküle, wie

Albumin oder Dextrane, eingesetzt werden. Die Geschwindigkeit der Diffusion in das untere Kompartiment wird dabei nur durch die osmotische Diffusionskraft und die zu Verfügung stehende Fläche determiniert. Die Fläche ändert sich relativ, wenn die Zellen dichtere oder losere Zell-Zell Kontakte bilden. In der Übertragbarkeit auf die *in situ*-Situation besitzt der Assay Schwächen. Es kann nicht angenommen werden, dass sich das Endothel unter Flussbedingungen, wie im Transwell-Assay verhält. Dennoch ist er ein guter Einstieg, um die Mechanismen in der Barriereregulation in einem einfachen Aufbau zu untersuchen (Yuan und Rigor 2010).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Effekt von ATP auf die zytosolische Calciumkonzentration in HUVEC

Die vorliegende Arbeit zeigt einen deutlichen Anstieg in zytosolischen Calciumkonzentrationen nach ATP-Stimulation in HUVEC. Dieser Effekt ist für ATP in Endothelzellen mehrfach beschrieben (Lückhoff und Busse 1986; Lynch et al. 1992).

4.2.2 Die Konfluenz der HUVEC beeinflusst die Calciumoszillationen

Obwohl das initiale Calciumsignal auf ATP-Stimulation zwischen Einzelzellen und konfluenten Monolayer in seiner Konzentration vergleichbar ist, können praktisch keine Oszillationen in Einzelzellen beobachtet werden. Ein solches Verhalten ist für HUVEC nach einer Stimulation mit Histamin beschrieben (Neylon und Irvine 1990). In diesem Zusammenhang wurden allerdings auch widersprüchliche Daten publiziert, wonach auch Einzelzellen nach Stimulation mit Histamin Calciumoszillationen zeigen (Jacob et al. 1988). In einer weiteren Arbeit konnten keine Oszillationen nach Histamin Stimulation in

Einzelzellen und Monolayer nachgewiesen werden (Sun et al. 2016). Die HUVEC zeigten hier erst in selbstorganisierten bzw. mikrotechnischen Netzwerken, die der Anordnung in Kapillaren ähneln, Oszillationen auf eine Stimulation mit Histamin.

Die Datenlage in Bezug auf Calciumoszillationen nach Stimulation mit Agonisten ist im Vergleich zu Histamin für ATP bisher schwach. Carter *et al.* beobachteten analog zu unseren Ergebnissen in mit ATP stimulierten HUVEC-Einzelzellen nur vereinzelt Oszillationen (Carter et al. 1990).

Es stellt sich vor allem die Frage, wie die Konfluenz der Zellen die Oszillationen beeinflusst. Zellkultur-Versuche zeigen, dass sobald die HUVEC in räumlicher Nähe wachsen, sich dichte Zell-Zell-Kontakte ausbilden (Hoelzle et al. 2012). Ein verstärkter Einbau mit Zell-Zell-Kontakt assoziierten Calciumkanälen in die Zellmembran könnte dazu beitragen. Exemplarisch konnte für TRPC4 eine solche Abhängigkeit zwischen dem Membraneinbau von TRPC4 und der Konfluenz der Endothelzellen gezeigt werden (Graziani et al. 2010). Räumlich assoziiert zu Zell-Zell-Kontaktproteinen, z.B. wie Catenin, wurde hier der Einbau von TRPC4 bei steigender Konfluenz beobachtet. Die Autoren spekulieren, dass der Membran-assoziierte Einbau von TRPC4 eine Rolle in der Regulation endothelialer Proliferation spielt, da bei Barriere-formierenden, nicht mehr proliferierenden Zellverbänden der verstärkte Membraneinbau von TRPC4 nicht mehr nachweisbar war. Supportiv zu dieser These beschreiben Neylon und Irvine für eine Histamin-Stimulation in hochkonfluenten, also nicht proliferierenden, HUVEC-Monolayer keinen Zusammenhang zwischen Konfluenz und Calciumoszillationsfrequenz (Neylon und Irvine 1990). In der selben Arbeit wurden in dicht ausgesäten HUVEC, denen keine Zeit zur Formierung von Zell-Zell-Kontakten gegeben wurde, ebenfalls keine Oszillationen beobachtet.

In Bezug auf die von uns beobachteten Calciumoszillationen kann eine ähnliche Rolle der Calciumoszillationen vermutet werden. Spekulativ könnten SOCE-Kanäle in Abhängigkeit von Zell-Zell-Kontakten in die Plasmamembran eingebaut werden und so die Oszillationen erst ermöglichen. In unseren Ergebnissen würden sich so der Unterschied zwischen den Einzelzellen und Monolayer erklären lassen. Die Konfluenz der Einzelzellen ist so niedrig, dass die Zellen nur wenig Chancen haben, Zell-Zell-Kontakte zu formieren. Die Monolayer wurden 48-72 h subkonfluent vor den Experimenten ausgesät, sodass von einer erfolgten Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte ausgegangen werden kann.

Alternativ zu der Theorie eines konfluenzabhängigen Einbaus von Transmembrankanälen legt die Abhängigkeit der Calciumoszillationen zu Zell-Zell-Kontakten eine mögliche Rolle von *gap junctions* und der Connexine nahe. Es ist weitgehend akzeptiert, dass *gap junctions* für Calcium und IP₃ permeabel sind und so in Zellverbänden eine koordinierte Calciumwelle entstehen kann (Kameritsch et al. 2012). Für Calciumoszillationen, die aus einem Zusammenspiel von ER, den Mitochondrien und Calcium-bindenden Proteinen generiert werden, ist ein solches Zusammenspiel nicht nur intra-, sondern auch interzellulär spekulativ denkbar. Letztlich können wir bisher keine Hinweise auf den zugrundeliegenden Mechanismus liefern.

4.2.3 Rolle von P2X- und P2Y-Purinrezeptoren

4.2.3.1 Untersuchung der Calciumspeicher des initialen Calciumsignals

Für ATP ist bekannt, dass eine Stimulation von Endothelzellen ein zytosolisches Calciumsignal über eine Aktivierung der IP₃-Kaskade aus intrazellulären Speichern generiert (Bishara et al. 2002). Dieses grundlegende Verständnis können wir bestätigen, da die

Amplitude des Calciumsignals in Calcium-freiem Milieu verglichen mit der Amplitude in Calcium-haltigem Milieu keine signifikanten Unterschiede zeigt. Das komplette Erlöschen des Signals nach einer Präinkubation mit dem SERCA-Inhibitor Thapsigargin bestätigt die herausragende Rolle des ER als Speicher, welches in der Regel durch die Bindung von IP3 an den ER-membranständigen IP3-Rezeptor entleert wird.

4.2.3.2 Expression und Funktion der P2-Rezeptoren in HUVEC

Um das Calciumsignal weiter zu charakterisieren, wurde die Rolle der Purinrezeptoren untersucht. Wir konnten in den untersuchten HUVEC P2Y1-, P2Y2-, P2Y11- und P2X4-Rezeptoren in PCR bzw. Western Blot-Analysen nachweisen. Wang *et al.* identifizierten unterstützend zu unseren Ergebnissen genau diese Rezeptoren als die dominanten, in humanen Endothelzellen exprimierten Purinrezeptoren (Wang et al. 2002).

Eine funktionale Rolle in der Generierung des Calciumsignals in Endothelzellen ist zumindest für P2Y1 und P2Y2 belegt (Tanaka et al. 2004). P2Y2 gilt für ATP induzierte Effekte als wichtigster Rezeptor in HUVEC (Raqeeb et al. 2011). Wir waren in der Lage, ein in der Amplitude vergleichbares Calciumsignal für die spezifischen Agonisten von P2Y1, P2Y2 und P2Y11 nachzuweisen. Einen synergistischen Effekt der Rezeptoren bezüglich des initialen Calciumsignals ist daher sehr wahrscheinlich. Obwohl deutlich exprimiert, ließ sich für P2X4 kein Effekt zumindest in Bezug auf die zytosolische Calciumkonzentration nachweisen. In dem Zusammenhang fanden Yamamoto *et al.*, dass der P2X4-Rezeptor nur bei relativ niedrigen extrazellulären ATP-Konzentrationen (<4 μM) der Hauptweg für Calciumeinstrom in HUVEC ist (Yamamoto et al. 2000).

4.2.3.3 Rolle der P2-Rezeptoren für die Calciumoszillationen

ATP vermittelt an Endothelzellen seine Wirkung hauptsächlich über den P2Y2 Rezeptor. Die Stimulation mit dem P2Y2 Agonisten UTP zeigt dazu kongruent in der Beobachtung Calciumoszillationen, die morphologisch mit den Calciumoszillationen nach ATP Stimulation vergleichbar sind. Zusätzlich lassen sich nach Stimulation mit BzATP (P2Y11-Agonist) Oszillationen beobachten. Für ADP (P2Y1-Agonist) ließen sich fast keine Oszillationen nachweisen. Eine Aktivierung von P2Y2 bzw. P2Y11 Rezeptoren könnte daher entscheidend an der Regulation der Oszillationen durch Calcium-unabhängige Prozesse beteiligt sein, da ATP analog zu P2Y2 und P2Y11 auch über P2Y1 eine IP3-vermittelte Entleerung der ER-Calciumspeicher induziert.

4.2.4 Untersuchung der ATP induzierten Calciumoszillationen

4.2.4.1 Abhängigkeit zu extrazellulärem Calcium

Bei Vergleich der Calciumoszillationsfrequenz in Calcium-haltigem und Calcium-freiem Milieu zeigt sich eine deutliche Verringerung der Oszillationsfrequenz im Calcium-freien Milieu. Die Abhängigkeit von extrazellulärem Calcium lässt verschiedene Schlussfolgerungen auf den zugrundeliegenden Mechanismus zu.

Die Oszillationen könnten spekulativ durch eine abwechselnde Aktivierung und Deaktivierung membranständiger Calciumkanäle, wie den TRPC oder Orai1, entstehen. Erklärt werden könnte so die Abhängigkeit zu extrazellulärem Calcium. Denkbar wäre solch ein Mechanismus auch im Rahmen des *calcium induced calcium release*-Modells (CICR). Minimale Calcium-Leakströme aus dem ER können innerhalb des Modells Oszillationen aus dem ER oder anderen intra- bzw. extrazellulären Speichern generieren. Verantwortlich ist

die Regulation des IP3-Rezeptors durch das intrazelluläre Calcium selbst (Berridge 1990; Putney und Bird 2008; Jacob 1991). Ergo würden die Oszillationen nach abwechselnde Aktivierung und Deaktivierung der SOCE-Kanäle durch die minimalen ER-Leakströme entstehen. Anzumerken ist allerdings, dass innerhalb des Modells die Abhängigkeit von extrazellulärem Calcium und SOCE auch durch das fehlende Auffüllen der ER-Speicher erklärt werden kann.

Die Chelation des extrazellulären Calciums durch EGTA unterbricht die Oszillationen abrupt. Durch diese Ergebnisse kann allerdings nicht differenziert werden, ob die Calciumoszillationen durch eine abwechselnde Aktivierung und Deaktivierung der SOCE-Kanälen entstehen und durch EGTA unterbunden werden oder die fehlende Auffüllung der ER-Calciumspeicher durch die SOCE-Kanäle verantwortlich für das Ausbleiben der Oszillationen nach EGTA-Zugabe ist. Die Oszillationen würden nur indirekt vom SOCE abhängig sein und sich aus den ER-Calciumspeichern generieren. Die ausschlaggebende Bedeutung von extrazellulärem Calcium für die Oszillationen sehen wir aber als gesichert.

4.2.4.2 Die Calciumoszillationen sind sensibel auf 2-APB

Der SOCE-Inhibitor 2-APB reduziert konzentrationsabhängig und konsistent reproduzierbar die Oszillationsfrequenz. Die relativ unspezifische Wirkung von 2-APB lässt mehrere Schlussfolgerungen zu.

Die gezeigte Reduktion der Oszillationsfrequenz durch 2-APB in Verbindung mit der gezeigten Abhängigkeit der Oszillationen zu extrazellulärem Calcium untermauert eine Beteiligung von STIM1, Orai1 und anderen SOCE-Akteuren. Im Kontrast dazu konnte BTP-2 die Oszillationsfrequenz nicht reduzieren, obwohl der SOCE nach dem initialen Signal in unseren Experimenten inhibiert wurde. Folglich kann die Reduktion der Frequenz durch 2-APB über die Schnittmenge mit BTP-2 erklärt werden. 2-APB und BTP-2 inhibieren beide die SOCE-Beteiligten STIM1, Orai1 und TRPC1, aber nur 2-APB inhibiert den IP3R. Entscheidend für das Modell des CICR ist die Regulation des IP3-Rezeptors durch das intrazelluläre Calcium selbst. Die Inhibition des IP3-Rezeptors durch 2-APB könnte folglich die Oszillationsfrequenz

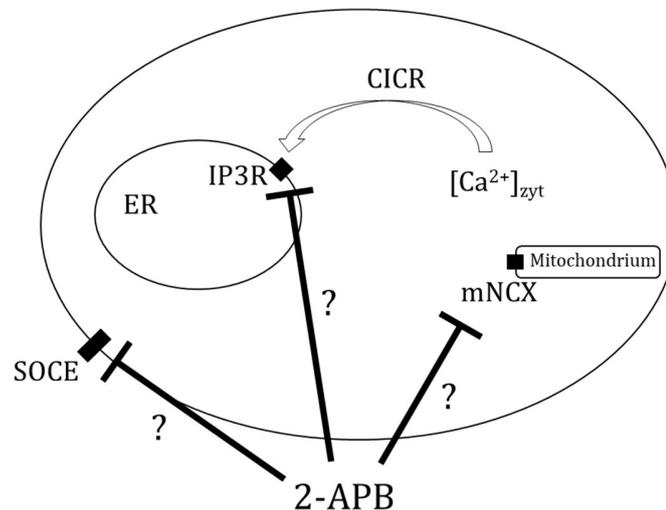


Abbildung 4-1: Wie inhibiert 2-APB die Calciumoszillationen? Die erniedrigte Oszillationsfrequenz könnte durch verschiedene Wirkungsmechanismen von 2-APB erklärt werden. Zum einen inhibiert 2-APB den IP3R-Rezeptor (IP3R) und führt so zu einer herabgesetzten Regulation durch die zytosolische Calciumkonzentration (CICR). Zum anderen käme auch die Inhibition des *store operated calcium entry* (SOCE) oder die Inhibition des mitochondrialen Natrium-/Calcium-Austauschers (mNCX) in Frage. Endoplasmatisches Retikulum (ER); zytosolische Calciumkonzentration ([Ca²⁺]_{zyt}).

verringern. Selbst in IP₃-konstanten Oszillationsmodellen spielt die IP₃R-Regulation durch die zytosolische Calciumkonzentration eine tragende Rolle (Berridge 1990; Putney und Bird 2008). Gegen diese These spricht, dass das initiale Calciumsignal zumindest bei einer Konzentration von 50 μ M 2-APB kein Unterschied in der relativen Calciumkonzentrationserhöhung gegenüber der nativen Probe aufweist. Das initiale Calciumsignal wird über die IP₃-Kaskade generiert. Von einer relevanten IP₃-inhibitorischen Aktivität muss daher bei einer Konzentration von 50 μ M auf Grund der gezeigten Ergebnisse nicht ausgegangen werden. Im Gegensatz wurde bei 100 μ M 2-APB eine relevante IP₃-Inhibition gezeigt, da der initiale Calciumanstieg signifikant verringert wurde. Die Oszillationen nach Inkubation mit 50 μ M 2-APB weisen trotzdem eine erniedrigte Frequenz auf.

Eine weitere spekulative Möglichkeit ist, dass 2-APB durch die Inhibition der mitochondrialen Calciumfreisetzung die Oszillationsfrequenz vermindern kann (Marhl et al. 2000; Prakriya und Lewis 2001).

4.2.5 ATP aktiviert SOCE in HUVEC

Wenn der Effekt des SOCE-Inhibitors 2-APB auf die Calciumoszillationen untersucht wird, liegt es nahe, den SOCE und seine Hauptakteure STIM1 und Orai1 in seiner ursprünglich beschriebenen Form zu untersuchen. TRPC1, TRPC4 und Orai1 werden in HUVEC konstant exprimiert (Brough et al. 2001; Trebak 2009; Villalta und Townsley 2013). Der SOCE wird nach ATP-Stimulation bekannterweise zu großen Teilen durch eine P2Y₂-Aktivierung induziert (Bishara et al. 2002).

Eine Stimulation mit ATP führte in den vorliegenden Ergebnissen zu einer verlängerten zytosolischen Calciumkonzentrationserhöhung im Anschluss an das initiale Calciumsignal (Bishara et al. 2002; Prakriya und Lewis 2015). Diesen Effekt konnten wir in Calcium-freiem Milieu nicht nachweisen, sodass er sehr wahrscheinlich durch einen Calciumeinstrom von extrazellulär verursacht wird. Die Literatur liefert deutliche Hinweise, dass der beobachtete Effekt dem SOCE entspricht (Zhou et al. 2014).

Weiter konnte das verlängerte Signal durch die SOCE-Inhibitoren 2-APB und BTP-2 inhibiert werden. SKF-96365 inhibiert TRPC1 und TRPC4, aber nicht Orai1. Im Gegensatz dazu ist BTP-2 ein hochspezifischer Orai1-Inhibitor, 2-APB inhibiert unspezifisch alle bekannten Akteure.

Schlussfolgernd kann vermutet werden, dass SKF-96365 nicht in der Lage war den SOCE zu unterbinden. Das kann durch eine überlegene Rolle von Orai1 gegenüber TRPC1 und TRPC4 für den SOCE in Endothelzellen erklärt werden (Trebak 2009).

4.2.6 ATP verstärkt die endotheliale Barriere *in vitro*

Es stellt sich die Frage, welche Effekte der SOCE und die Calciumoszillationen in den HUVEC entfalten. Eine zentrale Funktion des Endothels stellt die Regulation der gefäßendothelialen Barriere dar.

In Übereinstimmung mit der Literatur ist ATP in der Lage, die endotheliale Barriere *in vitro* in HUVEC und anderen makrovaskulären Endothelien zu verstärken (Noll et al. 1999; Gunduz et al. 2003; Zemskov et al. 2011), obwohl für HUVEC und andere Endothelien auch gegensätzliche Barriere-schwächende Effekte beschrieben sind (Tanaka et al. 2004; He und Curry 1993).

Trotz gezeigter konsistenter Inhibition von SOCE und Calciumoszillationen durch 2-APB konnten wir keine Unterschiede in der relativen Barriere Verstärkung durch ATP nachweisen. Wir kommen daher zu dem Schluss, dass der Barriere-verstärkende Effekt von ATP wahrscheinlich nicht von den Calciumoszillationen oder der SOCE Aktivität abhängt. Spekulativ könnte die Barriereverstärkung über die auf eine P2Y11-Aktivierung folgende Signalkaskade erfolgen. Nach P2Y11-Aktivierung wird Calcium-unabhängig, aber cAMP-abhängig Rac1 induziert. Folgend würde über Cortaktin ein Re-arrangement des Aktin-Zytoskelett bewirkt werden und damit die Zell-Zell-Kontakte und die endotheliale Barriere gestärkt (Zemskov et al. 2011; Jacobson et al. 2006).

Vor dem Hintergrund, dass Erythrozyten *in situ* gerade bei erhöhten Druckverhältnissen ATP ausschütten, könnte, zum Beispiel bei erhöhten intravasalen Drücken im Lungenkreislauf im Rahmen eines Linksherzversagens, ATP einen Barriere verstärkenden und damit Ödem-protektiven Effekt haben.

Als Anmerkung sei gesagt, dass aus *in vitro*-Ergebnissen mit unpolarisierten HUVEC schwer *in vivo* Aussagen abgeleitet werden können, da die apikale und basale Verteilung der Purinrezeptoren in polarisiertem Endothel, wie sie in der *in vivo*-Situation vorkommt, noch unbekannt ist. Zum Beispiel konnte in *in vivo*-Experimenten unserer Arbeitsgruppe bei physiologischen Druckverhältnissen im Gegensatz zur *in vitro*-Situation keine ATP-induzierten Calciumsignale gezeigt werden (Schulte-Uentrop et al. 2010). Wir vermuten, dass zumindest auf der apikalen Endothelseite unter Fluss die entscheidenden P2Y-Rezeptoren nicht in die Membran eingebaut sind und die Purinrezeptorverteilung eine andere als bei unpolarisierten Endothelzellen *in vitro* ist.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden mittels *in vitro*-Calciumimaging unter Zuhilfenahme eines Fluoreszenzmikroskops neuartige Calciumoszillationen in HUVEC nach ATP-Stimulation beobachtet. Die Calciumoszillationen wurden auf verantwortliche Calciumspeicher, Calciumkanäle und Purinrezeptoren hin analysiert. Zusätzlich wurden das initiale Calciumsignal charakterisiert und die Aktivität des SOCE nach ATP-Stimulation untersucht. Schließlich wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen den Calciumoszillationen und der Regulation der endothelialen Barriere untersucht.

Die Charakterisierung des initialen Calciumsignals bestätigt die Erkenntnisse aus der Literatur, dass ATP eine Signalkaskade über die G-Protein-gekoppelten-Purinrezeptoren P2Y1, P2Y2, P2Y11 und die IP3-Kaskade auslösen kann. Die folgende Entleerung der ER-Calciumspeicher generiert nahezu vollständig das initiale Signal. Des Weiteren exprimieren die HUVEC die Liganden-aktivierten Calcium-Ionenkanäle P2X4 und P2X7 auf mRNA-Ebene. P2X7 war im Western Blot nicht nachweisbar. Eine Rolle bezüglich des initialen Calciumsignals konnte für beide nicht gezeigt werden.

Der SOCE im Anschluss an die ER-Speicherentleerung ist sowohl in Einzelzellen als auch in Monolayer-Zellverbänden gleichermaßen stark. Der SOCE zeigt sich in HUVEC sensibel auf 2-APB und BTP-2, jedoch nicht auf SKF-96365. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der SOCE in Endothelzellen stark vom STIM1/Orai1-Komplex abhängt.

Die Calciumoszillationen sind von extrazellulärem Calcium abhängig, da BAPTA jene inhibierte. Zusätzlich reagierten die Calciumoszillationen sensibel auf den SOCE- und IP3-Inhibitor 2-APB mit einer niedrigeren Frequenz. Interessanterweise traten die Oszillationen nur in konfluenten Monolayer und nicht in Einzelzellen ohne Zell-Zell-Kontakte auf. BTP-2

und SKF-96365 waren nicht in der Lage, die Oszillationsfrequenz zu verringern. Als Nebenbefund in der Analyse der Purinrezeptoren zeigte sich, dass die Oszillationen nur nach Stimulation mit dem P2Y2-Agonisten UTP und dem P2Y11-Agonisten BzATP, nicht aber mit dem P2Y1-Agonisten ADP auftraten.

Eine klare Aussage über die zugrundeliegenden Mechanismen der Oszillationen ist nicht möglich. Es sind aber mehrere Möglichkeiten, wie ein interzelluläres Zusammenspiel zwischen ER, IP3R, SOCE-Kanälen, Mitochondrien und Calcium-bindenden Proteinen denkbar. Die SOCE Kanäle sind wahrscheinlich wichtig für die Aufrechterhaltung der Oszillationen. Die Frage, ob sie sich aktiv-regulatorisch an der Generierung beteiligen oder lediglich zum Auffüllen der ER-Speicher gebraucht werden, kann nicht abschließend geklärt werden.

Im *in vitro* Transwell Flux Assay führt ATP zu einem verminderten parazellulären *tracer flux*. Das Ergebnis stützt die Theorie, dass das von Erythrozyten und Endothelzellen bei Hochdruckverhältnissen ausgeschüttete ATP eine Ödem-protective Funktion erfüllt. Die beobachteten Calciumoszillationen scheinen *in vitro* keine Auswirkungen auf den Barriere-verstärkenden Effekt von ATP haben. Zur Rolle der Calciumoszillationen als Effektor kann keine abschließende Aussage gemacht werden und lässt Raum für weitere Untersuchungen zur physiologischen Funktion.

Summary

In this dissertation we observed via *in vitro* calcium imaging technique cytosolic calcium oscillations in HUVEC in response to ATP stimulation. We investigated the responsible calcium-store, channels and purin-receptors. Additionally, we characterized the initial calcium-signal and looked into SOCE activity following ATP stimulation. Finally, we investigated a presumed connection between the observed calcium oscillations and the regulation of the endothelial barrier.

The characterization of the initial signal confirmed the findings in the literature. ATP starts a signaling process via the g-linked-protein-receptors P2Y1, P2Y2, P2Y11 and the IP3 cascade. The following depletion of the ER calcium store contributes by a vast majority to the initial signal. As well HUVEC show the expression of ligand-activated calcium-ion-channels P2X4 and P2X7 on mRNA level. We failed to confirm the results in western blot relating to P2X7. P2X4 and P2X7 played no part regarding the cytosolic calcium levels in our findings.

The SOCE activity is of comparable strength in single cells and monolayer. We could show a suppressed SOCE activity in reaction to preincubation with 2-APB and BTP-2, but not with SKF-95365. As a conclusion we postulated a strong dependence of SOCE in HUVEC to the STIM1/Orai1 complex.

The calcium oscillations showed clear dependence to extracellular calcium. Further, the frequency of the oscillations declined in response to the SOCE and IP3 inhibitor 2-APB. Most intriguingly the oscillations only occurred in HUVEC monolayer, but not in HUVEC single cells. In additional findings BTP-2 und SKF-96365 were not able to lower the oscillation frequency. Further we observed oscillations only after stimulation with P2Y2 agonist UTP and P211 agonist BzATP, but not after stimulation with the P2Y1 agonist ADP.

We are currently not able to form a valid conclusion regarding the mechanisms of the oscillations. One can think of multiple possibilities. For example, an intercellular interplay between ER, IP3R, SOCE channels, mitochondria and calcium-binding proteins seems possible. We have strong indication, that SOCE channels are important, but cannot say, if they are involved as a regulatory player or simply needed for re-stocking the ER-calcium-store.

Regarding the *in vitro* transwell flux assay we could show a lower paracellular tracer flux in reaction to ATP stimulation. This fits perfectly with the theory, that when released during high-pressure ATP from erythrocytes and endothelial cells fulfils an edema preventing function. In our data the calcium oscillations appear not to play a significant role within the regulation of barrier function. The physiological role of the calcium oscillations remains yet unclear to us, but opens up the opportunity for further research regarding its physiological role.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Mechanismen der endothelialen Barriereregulation	11
Abbildung 1-2: Mechanismen der Calciumsignalgebung	19
Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des Aufbaus für die <i>in vitro</i> Epifluoreszenzmikroskopie	37
Abbildung 2-2: Experimentelles Versuchsprotokoll für die Epifluoreszenzmikroskopischen Versuche	41
Abbildung 2-3: Experimentelles Versuchsprotokoll für die funktionale P2R- Charakterisierung	44
Abbildung 3-1: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HUVEC Einzelzellen	52
Abbildung 3-2: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HUVEC Monolayer	54
Abbildung 3-3: Expression der mRNA von Purinrezeptoren in HUVEC	56
Abbildung 3-4: Analyse des maximalen Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration nach Stimulation mit 100 μ M ATP bzw. spezifischen Agonisten für die exprimierten Rezeptoren in gleicher Konzentration	57
Abbildung 3-5: Repräsentative Darstellung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ einer HUVEC vor und nach der Stimulation mit Agonisten und Vergleich der Oszillationsfrequenzen der Calciumoszillationen	59
Abbildung 3-6: Repräsentative Darstellung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in HUVEC vor und nach der Stimulation mit Agonisten	60
Abbildung 3-7: Vergleich der Oszillationsfrequenzen der Calciumoszillationen und Analyse des maximalen Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration nach Stimulation mit ATP	61
Abbildung 3-8: Darstellung der Auswertungsmethodik SOCE	62

Abbildung 3-9: Analyse der intrazellulären Calciumkonzentrationsänderungen nach Stimulation mit ATP bei t=4 min nach Gabe von ATP und Expression der mRNA von SOCE Calciumkanälen in HUVEC..... 63

Abbildung 3-10: Einfluss von ATP und 2-APB auf den parazellulären tracer flux (PTF)..... 65

Abbildung 4-1: Wie inhibiert 2-APB die Calciumoszillationen? 76

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Legende Starling-Gleichung	7
Tabelle 2: Finale Konzentration der Bestandteile des Endothelial Cell Growth Supplementmix im Endothelial Cell Groth Medium.....	35
Tabelle 3: Kalibrierung der Intensitäts und Ratio Werte zur Bestimmung des zytosolischen Calcium Wertes (Grynkiewicz et al. 1985).	38
Tabelle 4: Zusammensetzung des HBS Messpuffers.	39
Tabelle 5: Zusammensetzung des Ca ²⁺ -freien HBS Messpuffers.	39
Tabelle 6: Darstellung der Versuchsgruppen für das Calciumimaging.....	40
Tabelle 7: Verwendete Inhibitoren mit Zielen.....	42
Tabelle 8: Verwendete selektive P2R-Agonisten mit Zielrezeptor.....	43
Tabelle 9: cDNA Synthese Mix.....	45
Tabelle 10: Zusammensetzung PCR-Mix. Ansatz für eine PCR.....	46
Tabelle 11: Zusammensetzung Agarose Gel.....	46
Tabelle 12: Zusammensetzung des RIPA Puffers.	47
Tabelle 13: Zusammensetzung des Transfer Puffers.....	49
Tabelle 14: Zusammensetzung des Wasch Puffers.....	49
Tabelle 15: Zusammensetzung des Blockier Puffers.	49
Tabelle 16: Übersicht über die Rezeptorensensitivität der verwendeten Agonisten (modifiziert nach Burnstock 2012).	57

6.3 Abkürzungsverzeichnis

[min ²⁵]	Frequenz pro 25 Minuten
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AJ	<i>adhaerens junctions</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
BSA	Albumin aus Kälberserum
CaM	Calmodulin
<i>c</i>	Konzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CICR	<i>calcium induced calcium release</i>
DAG	Diacylglycerol
EDHF	<i>endothelium-derived hyperpolarizing factor</i>
EGF	Endothelialer Wachstumsfaktor
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZ	Einzelzellen
FAK	fokalen Adhäsionskinase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GJ	<i>gap junctions</i>
HCL	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
IP3	Inositoltriphosphat
IP3R	Inositoltriphosphatrezeptor
MLC	Myosin-Leichtkette

Abkürzungsverzeichnis

MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase
MLCP	Myosin-Leichtketten-Phosphatase
mNCX	Mitochondriale Natrium-Calcium Austauscher
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mWT	Molares Gewicht
NaOH	Natronlauge
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCX	Natrium-Calcium Austauscher
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
nM	Nanomol
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
Orai	<i>Calcium release-activated calcium channel protein</i>
P	Phosphat
P2R	Purin-2 Rezeptor
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGI2	Prostaglandin 2
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Proteinlipase C
PMCA	Plasmamembran Calcium ATPase
PTF	<i>paracellular tracer flux</i>
ROCE	<i>receptor operated Ca²⁺ entry</i>
RyR	Ryanodinrezeptor
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SAM	<i>sterile alpha motive</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency syndrome</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SERCA	Sarko-/ Endoplasmatische Retikulum ATPase
SMOCE	<i>second messenger operated Ca²⁺ entry</i>

Abkürzungsverzeichnis

SOCE	<i>store operated calcium entry</i>
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
T25	Zellkulturflasche mit 25 cm ² Fläche
T75	Zellkulturflasche mit 75 cm ² Fläche
TJ	<i>tight junction</i>
TNS	Trypsin neutralisierende Lösung
TRPC	<i>transient receptor potential canonical receptor</i>
TRPV	<i>transient receptor potential vanilloid receptor</i>
TRPM	<i>transient receptor potential melastatin receptor</i>
VDCC	Spannungsabhängiger Calciumkanal
VE-Cadherin	Vasoendotheliales Cadherin
VEGF	Vasoendothelialer Wachstumsfaktor

6.4 Literaturverzeichnis

- 1) Abdullaev, Iskandar F.; Bisaillon, Jonathan M.; Potier, Marie; Gonzalez, Jose C.; Motiani, Rajender K.; Trebak, Mohamed (2008): Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. In: *Circulation research* 103 (11), S. 1289–1299.
- 2) Barritt, G. J. (1999): Receptor-activated Ca²⁺ inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca²⁺ signalling requirements. In: *The Biochemical journal* 337 (Pt 2), S. 153–169.
- 3) Baumer, Y.; Drenckhahn, D.; Waschke, J. (2008): cAMP induced Rac 1-mediated cytoskeletal reorganization in microvascular endothelium. In: *Histochemistry and cell biology* 129 (6), S. 765–778.
- 4) Beigi, R.; Kobatake, E.; Aizawa, M.; Dubyak, G. R. (1999): Detection of local ATP release from activated platelets using cell surface-attached firefly luciferase. In: *The American journal of physiology* 276 (1 Pt 1), S. 78.
- 5) Bergfeld, G. R.; Forrester, T. (1992): Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. In: *Cardiovascular research* 26 (1), S. 40–47.
- 6) Berridge, M. J. (1990): Calcium oscillations. In: *The Journal of biological chemistry* 265 (17), S. 9583–9586.
- 7) Berridge, Michael J. (2012): Calcium signalling remodelling and disease. In: *Biochemical Society transactions* 40 (2), S. 297–309.
- 8) Berridge, Michael J.; Bootman, Martin D.; Roderick, H. Llewelyn (2003): Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 4 (7), S. 517–529.

- 9) Bilmen, Jonathan G.; Wootton, Laura L.; Godfrey, Rita E.; Smart, Oliver S.; Michelangeli, Francesco (2002): Inhibition of SERCA Ca²⁺ pumps by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). 2-APB reduces both Ca²⁺ binding and phosphoryl transfer from ATP, by interfering with the pathway leading to the Ca²⁺-binding sites. In: *European journal of biochemistry* 269 (15), S. 3678–3687.
- 10) Bird, Gary S.; DeHaven, Wayne I.; Smyth, Jeremy T.; Putney, James W. (2008): Methods for studying store-operated calcium entry. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 46 (3), S. 204–212.
- 11) Bird, Gary St J.; Putney, James W. (2005): Capacitative calcium entry supports calcium oscillations in human embryonic kidney cells. In: *The Journal of physiology* 562 (Pt 3), S. 697–706.
- 12) Bishara, Nour B.; Murphy, Timothy V.; Hill, Michael A. (2002): Capacitative Ca⁽²⁺⁾ entry in vascular endothelial cells is mediated via pathways sensitive to 2 aminoethoxydiphenyl borate and xestospongine C. In: *British journal of pharmacology* 135 (1), S. 119–128.
- 13) Bode, H. P.; Yule, D. I.; Fehmann, H. C.; Göke, B.; Williams, J. A. (1994): Spontaneous calcium oscillations in clonal endocrine pancreatic glucagon-secreting cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 205 (1), S. 435–440.
- 14) Bodin, P.; Burnstock, G. (1996): ATP-stimulated release of ATP by human endothelial cells. In: *Journal of cardiovascular pharmacology* 27 (6), S. 872–875.
- 15) Bootman, M. D.; Berridge, M. J. (1995): The elemental principles of calcium signaling. In: *Cell* 83 (5), S. 675–678.
- 16) Bootman, M. D.; Collins, T. J.; Peppiatt, C. M.; Prothero, L. S.; MacKenzie, L.; Smet, P. de et al. (2001): Calcium signalling--an overview. In: *Seminars in cell & developmental biology* 12 (1), S. 3–10.

- 17) Bootman, Martin D.; Collins, Tony J.; Mackenzie, Lauren; Roderick, H. Llewelyn; Berridge, Michael J.; Peppiatt, Claire M. (2002): 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (10), S. 1145–1150.
- 18) Borbiev, T.; Verin, A. D.; Shi, S.; Liu, F.; Garcia, J. G. (2001): Regulation of endothelial cell barrier function by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 280 (5), S. 90.
- 19) Brandman, Onn; Liou, Jen; Park, Wei Sun; Meyer, Tobias (2007): STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. In: *Cell* 131 (7), S. 1327–1339.
- 20) Brough, G. H.; Wu, S.; Cioffi, D.; Moore, T. M.; Li, M.; Dean, N.; Stevens, T. (2001): Contribution of endogenously expressed Trp1 to a Ca²⁺-selective, store-operated Ca²⁺ entry pathway. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (10), S. 1727–1738.
- 21) Burnstock, G. (2007): Purine and pyrimidine receptors. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64 (12), S. 1471–1483.
- 22) Burnstock, Geoffrey (2006): Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. In: *Pharmacological reviews* 58 (1), S. 58–86.
- 23) Burnstock, Geoffrey (2012): Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 34 (3), S. 218–225.
- 24) Burnstock, Geoffrey; Ralevic, Vera (2014): Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. In: *Pharmacological reviews* 66 (1), S. 102–192.

- 25) Carter, T. D.; Bogle, R. G.; Bjaaland, T. (1991): Spiking of intracellular calcium ion concentration in single cultured pig aortic endothelial cells stimulated with ATP or bradykinin. In: *The Biochemical journal* 278 (Pt 3), S. 697–704.
- 26) Carter, T. D.; Newton, J. S.; Jacob, R.; Pearson, J. D. (1990): Homologous desensitization of ATP-mediated elevations in cytoplasmic calcium and prostacyclin release in human endothelial cells does not involve protein kinase C. In: *The Biochemical journal* 272 (1), S. 217–221.
- 27) Chang, Wei-chiao (2006): Store-operated calcium channels and pro-inflammatory signals. In: *Acta pharmacologica Sinica* 27 (7), S. 813–820.
- 28) Cheng, Kwong Tai; Ong, Hwei Ling; Liu, Xibao; Ambudkar, Indu S. (2011): Contribution of TRPC1 and Orai1 to Ca(2+) entry activated by store depletion. In: *Advances in experimental medicine and biology* 704, S. 435–449.
- 29) Chistiakov, Dmitry A.; Ashwell, Kenneth W.; Orekhov, Alexander N.; Bobryshev, Yuri V. (2015): Innervation of the arterial wall and its modification in atherosclerosis. In: *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 193, S. 7–11.
- 30) Choi, Seok; Maleth, Jozsef; Jha, Archana; Lee, Kyu Pil; Kim, Min Seuk; So, Insuk et al. (2014): The TRPCs-STIM1-Orai interaction. In: *Handbook of experimental pharmacology* 223, S. 1035–1054.
- 31) Coade, S. B.; Pearson, J. D. (1989): Metabolism of adenine nucleotides in human blood. In: *Circulation research* 65 (3), S. 531–537.
- 32) Contreras, Laura; Drago, Ilaria; Zampese, Enrico; Pozzan, Tullio (2010): Mitochondria: the calcium connection. In: *Biochimica et biophysica acta* 1797 (6-7), S. 607–618.
- 33) Csordas, Gyorgy; Renken, Christian; Varnai, Peter; Walter, Ludivine; Weaver, David; Buttle, Karolyn F. et al. (2006): Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. In: *The Journal of cell biology* 174 (7), S. 915–921.

- 34) Deanfield, John E.; Halcox, Julian P.; Rabelink, Ton J. (2007): Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. In: *Circulation* 115 (10), S. 1285–1295.
- 35) Dolmetsch, R. E.; Xu, K.; Lewis, R. S. (1998): Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. In: *Nature* 392 (6679), S. 933–936.
- 36) Dudek, S. M.; Garcia, J. G. (2001): Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 91 (4), S. 1487–1500.
- 37) Dupont, Geneviève; Combettes, Laurent; Bird, Gary S.; Putney, James W. (2011): Calcium oscillations. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (3).
- 38) Eisner, David (2014): Calcium in the heart: from physiology to disease. In: *Experimental physiology* 99 (10), S. 1273–1282.
- 39) Fiorio Pla, A.; Kondratska, K.; Prevarskaya, N. (2016): Orai/STIM1 function and cancer. A Review in the Theme: STIM and Orai Proteins in Calcium Signaling. In: *American journal of physiology. Cell physiology*, S. 364.
- 40) Fukuhara, Shigetomo; Sakurai, Atsuko; Sano, Hideto; Yamagishi, Akiko; Somekawa, Satoshi; Takakura, Nobuyuki et al. (2005): Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. In: *Molecular and cellular biology* 25 (1), S. 136–146.
- 41) Fukumura, D.; Gohongi, T.; Kadambi, A.; Izumi, Y.; Ang, J.; Yun, C. O. et al. (2001): Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (5), S. 2604–2609.

- 42) Garcia, J. G.; Lazar, V.; Gilbert-McClain, L. I.; Gallagher, P. J.; Verin, A. D. (1997): Myosin light chain kinase in endothelium: molecular cloning and regulation. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 16 (5), S. 489–494.
- 43) Garcia, J. G.; Liu, F.; Verin, A. D.; Birukova, A.; Dechert, M. A.; Gerthoffer, W. T. et al. (2001): Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. In: *The Journal of clinical investigation* 108 (5), S. 689–701.
- 44) Graziani, Annarita; Poteser, Michael; Heupel, Wolfgang-Moritz; Schleifer, Hannes; Krenn, Martin; Drenckhahn, Detlev et al. (2010): Cell-cell contact formation governs Ca²⁺ signaling by TRPC4 in the vascular endothelium: evidence for a regulatory TRPC4-beta-catenin interaction. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (6), S. 4213–4223.
- 45) Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y. (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. In: *The Journal of biological chemistry* 260 (6), S. 3440–3450.
- 46) Gunduz, Dursun; Hirche, Frank; Hartel, Frauke Viola; Rodewald, Christoph Walter; Schafer, Matthias; Pfitzer, Gabriele et al. (2003): ATP antagonism of thrombin-induced endothelial barrier permeability. In: *Cardiovascular research* 59 (2), S. 470–478.
- 47) He, P.; Curry, F. E. (1993): Differential actions of cAMP on endothelial Ca²⁺ and permeability in microvessels exposed to ATP. In: *The American journal of physiology* 265 (3 Pt 2), S. 23.
- 48) Hoelzle, Matthew K.; Svitkina, Tatyana (2012): The cytoskeletal mechanisms of cell-cell junction formation in endothelial cells. In: *Molecular biology of the cell* 23 (2), S. 310–323.
- 49) Hofmann, T.; Obukhov, A. G.; Schaefer, M.; Harteneck, C.; Gudermann, T.; Schultz, G. (1999): Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. In: *Nature* 397 (6716), S. 259–263.

- 50) Hogan, Patrick G.; Rao, Anjana (2015): Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation. In: *Biochemical and biophysical research communications* 460 (1), S. 40–49.
- 51) Islam, Md. Shahidul (Hg.) (2012): Calcium Signaling. Dordrecht: Springer Netherlands (Advances in Experimental Medicine and Biology, 740).
- 52) Jacob, R. (1991): Calcium oscillations in endothelial cells. In: *Cell calcium* 12 (2-3), S. 127–134.
- 53) Jacob, R.; Merritt, J. E.; Hallam, T. J.; Rink, T. J. (1988): Repetitive spikes in cytoplasmic calcium evoked by histamine in human endothelial cells. In: *Nature* 335 (6185), S. 40–45.
- 54) Jacobson, Jeffrey R.; Dudek, Steven M.; Singleton, Patrick A.; Kolosova, Irina A.; Verin, Alexander D.; Garcia, Joe G. N. (2006): Endothelial cell barrier enhancement by ATP is mediated by the small GTPase Rac and cortactin. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 291 (2), S. 95.
- 55) Jardín, Isaac; López, José J.; Salido, Ginés M.; Rosado, Juan A. (2008): Functional relevance of the de novo coupling between hTRPC1 and type II IP3 receptor in store-operated Ca²⁺ entry in human platelets. In: *Cellular signalling* 20 (4), S. 737–747.
- 56) Kameritsch, Petra; Pogoda, Kristin; Ritter, Angela; Munzing, Silvia; Pohl, Ulrich (2012): Gap junctional communication controls the overall endothelial calcium response to vasoactive agonists. In: *Cardiovascular research* 93 (3), S. 508–515.
- 57) Kawanishi, T.; Blank, L. M.; Harootunian, A. T.; Smith, M. T.; Tsien, R. Y. (1989): Ca²⁺ oscillations induced by hormonal stimulation of individual fura-2-loaded hepatocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 264 (22), S. 12859–12866.

- 58) Kiefmann, Rainer; Islam, Mohammad N.; Lindert, Jens; Parthasarathi, Kaushik; Bhattacharya, Jahar (2009): Paracrine purinergic signaling determines lung endothelial nitric oxide production. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 296 (6), S. 10.
- 59) Klinke, Rainer; Pape, Hans-Christian; Kurtz, Armin; Silbernagl, Stefan (2010): Physiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- 60) Koninck, P. de; Schulman, H. (1998): Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. In: *Science (New York, N.Y.)* 279 (5348), S. 227–230.
- 61) Kubes, P. (1995): Nitric oxide affects microvascular permeability in the intact and inflamed vasculature. In: *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* 2 (3), S. 235–244.
- 62) Kumar, Puneet; Shen, Qiang; Pivetti, Christopher D.; Lee, Eugene S.; Wu, Mack H.; Yuan, Sarah Y. (2009): Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. In: *Expert reviews in molecular medicine* 11, S. e19.
- 63) Lacruz, Rodrigo S.; Feske, Stefan (2015): Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1356, S. 45–79.
- 64) Lückhoff, A.; Busse, R. (1986): Increased free calcium in endothelial cells under stimulation with adenine nucleotides. In: *Journal of cellular physiology* 126 (3), S. 414–420.
- 65) Lüllmann-Rauch, Renate; Asan, Esther (2015): Taschenbuch Histologie. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- 66) Lynch, M.; Gillespie, J. I.; Greenwell, J. R.; Johnson, C. (1992): Intracellular calcium 'signatures' evoked by different agonists in isolated bovine aortic endothelial cells. In: *Cell calcium* 13 (4), S. 227–233.

- 67) Lytton, J.; Westlin, M.; Hanley, M. R. (1991): Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (26), S. 17067–17071.
- 68) MacKenzie, A. B.; Mahaut-Smith, M. P.; Sage, S. O. (1996): Activation of receptor-operated cation channels via P2X1 not P2T purinoceptors in human platelets. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (6), S. 2879–2881.
- 69) Marhl, M.; Haberichter, T.; Brumen, M.; Heinrich, R. (2000): Complex calcium oscillations and the role of mitochondria and cytosolic proteins. In: *Bio Systems* 57 (2), S. 75–86.
- 70) McKemy, David D.; Neuhausser, Werner M.; Julius, David (2002): Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. In: *Nature* 416 (6876), S. 52–58.
- 71) Mehta, Dolly; Ravindran, Krishnan; Kuebler, Wolfgang M. (2014): Novel regulators of endothelial barrier function. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 307 (12), S. 35.
- 72) Meyer, T.; Stryer, L. (1988): Molecular model for receptor-stimulated calcium spiking. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (14), S. 5051–5055.
- 73) Moccia, Francesco; Berra-Romani, Roberto; Tritto, Simona; Signorelli, Silvia; Taglietti, Vanni; Tanzi, Franco (2003): Epidermal growth factor induces intracellular Ca²⁺ oscillations in microvascular endothelial cells. In: *Journal of cellular physiology* 194 (2), S. 139–150.
- 74) Monti, Martina; Donnini, Sandra; Giachetti, Antonio; Mochly-Rosen, Daria; Ziche, Marina (2010): deltaPKC inhibition or varepsilonPKC activation repairs endothelial vascular dysfunction by regulating eNOS post-translational modification. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 48 (4), S. 746–756.

- 75) Mumtaz, S.; Burdyga, G.; Borisova, L.; Wray, Susan; Burdyga, T. (2011): The mechanism of agonist induced Ca²⁺ signalling in intact endothelial cells studied confocally in in situ arteries. In: *Cell calcium* 49 (1), S. 66–77.
- 76) Neylon, C. B.; Irvine, R. F. (1990): Synchronized repetitive spikes in cytoplasmic calcium in confluent monolayers of human umbilical vein endothelial cells. In: *FEBS letters* 275 (1-2), S. 173–176.
- 77) Noll, T.; Holschermann, H.; Koprek, K.; Gunduz, D.; Haberbosch, W.; Tillmanns, H.; Piper, H. M. (1999): ATP reduces macromolecule permeability of endothelial monolayers despite increasing Ca²⁺_i. In: *The American journal of physiology* 276 (6 Pt 2), S. 901.
- 78) O'Connor, Nathan; Silver, Randi B. (2007): Ratio imaging. Practical considerations for measuring intracellular Ca²⁺ and pH in living cells. In: *Methods in cell biology* 81, S. 415–433.
- 79) Ohga, Keiko; Takezawa, Ryuichi; Yoshino, Taiji; Yamada, Toshimitsu; Shimizu, Yasuaki; Ishikawa, Jun (2008): The suppressive effects of YM-58483/BTP-2, a store-operated Ca²⁺ entry blocker, on inflammatory mediator release in vitro and airway responses in vivo. In: *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 21 (2), S. 360–369.
- 80) Oh-hora, Masatsugu; Rao, Anjana (2009): The calcium/NFAT pathway: role in development and function of regulatory T cells. In: *Microbes and infection* 11 (5), S. 612–619.
- 81) Orci, Lelio; Ravazzola, Mariella; Le Coadic, Marion; Shen, Wei-Wei; Demaurex, Nicolas; Cosson, Pierre (2009): From the Cover: STIM1-induced precortical and cortical subdomains of the endoplasmic reticulum. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (46), S. 19358–19362.

- 82) Paltauf-Doburzynska, Jolanta; Frieden, Maud; Spitaler, Michaela; Graier, Wolfgang F. (2000): Histamine-induced Ca²⁺ oscillations in a human endothelial cell line depend on transmembrane ion flux, ryanodine receptors and endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. In: *The Journal of physiology* 524 (3), S. 701–713.
- 83) Pani, Biswaranjan; Ong, Hwei Ling; Liu, Xibao; Rauser, Kristina; Ambudkar, Indu S.; Singh, Brij B. (2008): Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca²⁺ entry (SOCE). In: *The Journal of biological chemistry* 283 (25), S. 17333–17340.
- 84) Peinelt, Christine; Lis, Annette; Beck, Andreas; Fleig, Andrea; Penner, Reinhold (2008): 2-Aminoethoxydiphenyl borate directly facilitates and indirectly inhibits STIM1-dependent gating of CRAC channels. In: *The Journal of physiology* 586 (13), S. 3061–3073.
- 85) Prakriya, M.; Lewis, R. S. (2001): Potentiation and inhibition of Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors. In: *The Journal of physiology* 536 (Pt 1), S. 3–19.
- 86) Prakriya, Murali; Lewis, Richard S. (2015): Store-Operated Calcium Channels. In: *Physiological reviews* 95 (4), S. 1383–1436.
- 87) Putney, J. W. (1986): A model for receptor-regulated calcium entry. In: *Cell calcium* 7 (1), S. 1–12.
- 88) Putney, James W.; Bird, Gary S. (2008): Cytoplasmic calcium oscillations and store-operated calcium influx. In: *The Journal of physiology* 586 (13), S. 3055–3059.
- 89) Rajendran, Peramaiyan; Rengarajan, Thamaraiselvan; Thangavel, Jayakumar; Nishigaki, Yutaka; Sakthisekaran, Dhanapal; Sethi, Gautam; Nishigaki, Ikuo (2013): The vascular endothelium and human diseases. In: *International journal of biological sciences* 9 (10), S. 1057–1069.

- 90) Raqeeb, Abdul; Sheng, Jianzhong; Ao, Ni; Braun, Andrew P. (2011): Purinergic P2Y2 receptors mediate rapid Ca(2+) mobilization, membrane hyperpolarization and nitric oxide production in human vascular endothelial cells. In: *Cell calcium* 49 (4), S. 240–248.
- 91) Rodrigues, Stephen F.; Granger, D. Neil (2015): Blood cells and endothelial barrier function. In: *Tissue barriers* 3 (1-2), S. e978720.
- 92) Rosado, Juan A.; Diez, Raquel; Smani, Tarik; Jardín, Isaac (2015): STIM and Orai1 Variants in Store-Operated Calcium Entry. In: *Frontiers in pharmacology* 6, S. 325.
- 93) Sandow, Shaun L. (2004): Factors, fiction and endothelium-derived hyperpolarizing factor. In: *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 31 (9), S. 563–570.
- 94) Schulte-Uentrop L.; Heckel K.; Tank S.; Goetz AE.; Kiefmann R. (2010): Erythrozyten induzieren ATP-vermittelt ein Calciumsignal in kapillaren Endothelzellen der Rattenlunge nach linksatrialer Druckerhöhung. In: *Anästhesiologie und Intensivmedizin*. 51:422 2010
- 95) Shelton, Jennifer L.; Wang, Lefeng; Cepinskas, Gediminas; Sandig, Martin; Inculet, Richard; McCormack, David G.; Mehta, Sanjay (2006): Albumin leak across human pulmonary microvascular vs. umbilical vein endothelial cells under septic conditions. In: *Microvascular research* 71 (1), S. 40–47.
- 96) Shen, Qiang; Rigor, Robert R.; Pivetti, Christopher D.; Wu, Mack H.; Yuan, Sarah Y. (2010): Myosin light chain kinase in microvascular endothelial barrier function. In: *Cardiovascular research* 87 (2), S. 272–280.
- 97) Siflinger-Birnboim, A.; Del Vecchio, P. J.; Cooper, J. A.; Blumenstock, F. A.; Shepard, J. M.; Malik, A. B. (1987): Molecular sieving characteristics of the cultured endothelial monolayer. In: *Journal of cellular physiology* 132 (1), S. 111–117.

- 98) Singh, A.; Hildebrand, M. E.; Garcia, E.; Snutch, T. P. (2010): The transient receptor potential channel antagonist SKF96365 is a potent blocker of low-voltage-activated T-type calcium channels. In: *British journal of pharmacology* 160 (6), S. 1464–1475.
- 99) Smith, Nathan A.; Kress, Benjamin T.; Lu, Yuan; Chandler-Militello, Devin; Benraiss, Abdellatif; Nedergaard, Maiken (2018): Fluorescent Ca²⁺ indicators directly inhibit the Na,K-ATPase and disrupt cellular functions. In: *Science signaling* 11 (515).
- 100) Sriwai, Wimolpak; Zhou, Huiping; Murthy, Karnam S. (2008): G(q)-dependent signalling by the lysophosphatidic acid receptor LPA(3) in gastric smooth muscle: reciprocal regulation of MYPT1 phosphorylation by Rho kinase and cAMP-independent PKA. In: *The Biochemical journal* 411 (3), S. 543–551.
- 101) Stolwijk, Judith A.; Zhang, Xuexin; Gueguinou, Maxime; Zhang, Wei; Matrougui, Khalid; Renken, Christian; Trebak, Mohamed (2016): Calcium Signaling Is Dispensable for Receptor Regulation of Endothelial Barrier Function. In: *The Journal of biological chemistry* 291 (44), S. 22894–22912.
- 102) Sukriti, Sukriti; Tauseef, Mohammad; Yazbeck, Pascal; Mehta, Dolly (2014): Mechanisms regulating endothelial permeability. In: *Pulmonary circulation* 4 (4), S. 535–551.
- 103) Sun, Jian; Hoying, James B.; Deymier, Pierre A.; Zhang, Donna D.; Wong, Pak Kin (2016): Cellular Architecture Regulates Collective Calcium Signaling and Cell Contractility. In: *PLoS computational biology* 12 (5), S. e1004955.
- 104) Sun, Mitchell Y.; Geyer, Melissa; Komarova, Yulia A. (2017): IP₃ receptor signaling and endothelial barrier function. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 74 (22), S. 4189–4207.
- 105) Tanaka, Naoko; Kawasaki, Kumiko; Nejime, Namie; Kubota, Yoko; Nakamura, Kazuki; Kunitomo, Masaru et al. (2004): P₂Y receptor-mediated Ca²⁺ signaling increases human vascular endothelial cell permeability. In: *Journal of pharmacological sciences* 95 (2), S. 174–180.

- 106) Thastrup, O.; Dawson, A. P.; Scharff, O.; Foder, B.; Cullen, P. J.; Drøbak, B. K. et al. (1989): Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. In: *Agents and actions* 27 (1-2), S. 17–23.
- 107) Tiruppathi, Chinnaswamy; Ahmmed, Gias U.; Vogel, Stephen M.; Malik, Asrar B. (2006): Ca²⁺ signaling, TRP channels, and endothelial permeability. In: *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* 13 (8), S. 693–708.
- 108) Tran, Q. (2000): Calcium signalling in endothelial cells. In: *Cardiovascular research* 48 (1), S. 13–22.
- 109) Trebak, Mohamed (2009): STIM1/Orai1, ICRAC, and Endothelial SOC. In: *Circ Res* 104 (9), S. e56-e57.
- 110) Tsai, Feng-Chiao; Seki, Akiko; Yang, Hee Won; Hayer, Arnold; Carrasco, Silvia; Malmersjö, Seth; Meyer, Tobias (2014): A polarized Ca²⁺, diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration. In: *Nature cell biology* 16 (2), S. 133–144.
- 111) Tsien, R. Y.; Rink, T. J.; Poenie, M. (1985): Measurement of cytosolic free Ca²⁺ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. In: *Cell calcium* 6 (1-2), S. 145–157.
- 112) Vandembroucke, Emily; Mehta, Dolly; Minshall, Richard; Malik, Asrar B. (2008): Regulation of endothelial junctional permeability. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1123, S. 134–145.
- 113) Varnai, Peter; Hunyady, Laszlo; Balla, Tamas (2009): STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. In: *Trends in pharmacological sciences* 30 (3), S. 118–128.
- 114) Voelkel, Norbert F.; Rounds, Sharon (2009): *The pulmonary endothelium. Functions in health and disease*. Chichester: Wiley-Blackwell.
- 115) Villalta, Patricia C.; Townsley, Mary I. (2013): Transient receptor potential channels and regulation of lung endothelial permeability. In: *Pulmonary circulation* 3 (4), S. 802–815.

- 116) Wan, Jiandi; Ristenpart, William D.; Stone, Howard A. (2008): Dynamics of shear-induced ATP release from red blood cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (43), S. 16432–16437.
- 117) Wang, Lingwei; Karlsson, Lena; Moses, Sara; Hultgårdh-Nilsson, Anna; Andersson, Maria; Borna, Catharina et al. (2002): P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells. In: *Journal of cardiovascular pharmacology* 40 (6), S. 841–853.
- 118) Ware, Lorraine B.; Matthay, Michael A. (2005): Clinical practice. Acute pulmonary edema. In: *The New England journal of medicine* 353 (26), S. 2788–2796.
- 119) Wedel, Barbara; Boyles, Rebecca R.; Putney, James W.; Bird, Gary S. (2007): Role of the store-operated calcium entry proteins Stim1 and Orai1 in muscarinic cholinergic receptor-stimulated calcium oscillations in human embryonic kidney cells. In: *The Journal of physiology* 579 (Pt 3), S. 679–689.
- 120) West, J. B.; Mathieu-Costello, O. (1995): Vulnerability of pulmonary capillaries in heart disease. In: *Circulation* 92 (3), S. 622–631.
- 121) Williams, R. T.; Manji, S. S.; Parker, N. J.; Hancock, M. S.; van Stekelenburg, L.; Eid, J. P. et al. (2001): Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family. Coding for a novel class of transmembrane proteins. In: *The Biochemical journal* 357 (Pt 3), S. 673–685.
- 122) Wilson, H. L.; Varcoe, R. W.; Stokes, L.; Holland, K. L.; Francis, S. E.; Dower, S. K. et al. (2007): P2X receptor characterization and IL-1/IL-1Ra release from human endothelial cells. In: *British journal of pharmacology* 151 (1), S. 115–127.
- 123) Woods, N. M.; Cuthbertson, K. S.; Cobbold, P. H. (1987): Agonist-induced oscillations in cytoplasmic free calcium concentration in single rat hepatocytes. In: *Cell calcium* 8 (1), S. 79–100.

- 124) Yamamoto, K.; Korenaga, R.; Kamiya, A.; Qi, Z.; Sokabe, M.; Ando, J. (2000): P2X(4) receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 279 (1), S. 92.
- 125) Yokota, Yasuhiro; Nakajima, Hiroyuki; Wakayama, Yuki; Muto, Akira; Kawakami, Koichi; Fukuhara, Shigetomo; Mochizuki, Naoki (2015): Endothelial Ca²⁺ oscillations reflect VEGFR signaling-regulated angiogenic capacity in vivo. In: *eLife* 4.
- 126) Yuan, Sarah Y.; Rigor, Robert R. (2010): Regulation of Endothelial Barrier Function. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.
- 127) Zemskov, Evgeny; Lucas, Rudolf; Verin, Alexander D.; Umapathy, Nagavedi S. (2011): P2Y receptors as regulators of lung endothelial barrier integrity. In: *Journal of cardiovascular disease research* 2 (1), S. 14–22.
- 128) Zhang, Wei; Trebak, Mohamed (2011): STIM1 and Orai1: novel targets for vascular diseases? In: *Science China. Life sciences* 54 (8), S. 780–785.
- 129) Zhou, Meng-Hua; Zheng, Hongying; Si, Hongjiang; Jin, Yixin; Peng, Jasmine M.; He, Lian et al. (2014): Stromal interaction molecule 1 (STIM1) and Orai1 mediate histamine-evoked calcium entry and nuclear factor of activated T-cells (NFAT) signaling in human umbilical vein endothelial cells. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (42), S. 29446–29456.
- 130) Zitt, Christof; Strauss, Bettina; Schwarz, Eva C.; Spaeth, Nicola; Rast, Georg; Hatzelmann, Armin; Hoth, Markus (2004): Potent inhibition of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (13), S. 12427–12437.
- 131) Zou, Mengchen; Dong, Hangming; Meng, Xiaojing; Cai, Chunqing; Li, Chenzhong; Cai, Shaoxi; Xue, Yaoming (2015): Store-operated Ca²⁺ entry plays a role in HMGB1-induced vascular endothelial cell hyperpermeability. In: *PloS one* 10 (4), S. e0123432.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Alwin E. Goetz sowie Herrn Prof. Dr. Christian Zöllner bedanke ich mich für die Möglichkeit meine Arbeit am Zentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin bzw. der Klinik für Anästhesiologie durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rainer Kiefmann für die engagierte Betreuung, die Bereitstellung der technischen und finanziellen Mittel und die Hilfe bei der Erhebung der Daten und Verfassen der Arbeit. Seine fachliche Planung, Anleitung und stete Diskussion prägte diese Arbeit und brachte ihr Gelingen in besonderem Maße voran.

Frau Dr. Leonie Schulte-Uentrop danke ich für ihr persönliches Engagement und das offene Ohr bei Problemen.

Frau Dr. Ann-Kathrin Riegel danke ich für den regen wissenschaftlichen Austausch und das engagierte Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Forschungslabors der Arbeitsgruppe Lungenforschung: Anke Schuster, Dr. Christian Börnchen, Dr. Cynthia Olotu, Dr. Martina Kiefmann, Friederike Wilke, Volker Meidl, Bastian Koch, Claudia Lüchau, Andrea Pawelczek, Kirsten Pfeiffer-Drenkhahn und Monika Weber möchte ich mich sehr herzlich für die gute Integration, die wunderbare Arbeitsatmosphäre, die kompetente fachliche und methodische Hilfe und vor allem für die bereichernden Mittags- und Kaffeepausen bedanken.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die außerordentliche Unterstützung während des gesamten Studiums.

8 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: