

**Effekte von Astaxanthin und Canthaxanthin
auf die Zell-Zell-Kommunikation
über Gap Junctions**

Inaugural-Dissertation
zur

Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Felicitas Ulrike Daubrawa

aus Düsseldorf

Dezember 2005

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. W. Stahl

Koreferent: Prof. Dr. H.-D. Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2006

Für meine Mutter
und
zum Andenken an meine Tante (Dr. Gertrud Schaller)

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BHT	Butylhydroxytoluol
Cx	Connexin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DDT	Dichlor-diphenyl-trichlorethan
DMEM	Eagle's Medium, nach Dulbecco's Modifikation
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	extracellular signal-regulated kinase
EGFR	extracellular signal-regulated kinase receptor
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
GJ	Gap Junction
GJs	Gap Junctions
HdF	humane Hautfibroblasten (human dermal fibroblasts)
HFFF2	human foetal foreskin fibroblast (humane Vorhautfibroblasten)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
MeOH	Methanol
MAPK	mitogen-activated protein kinase (mitogenaktivierte Proteinkinase)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
PBS	Phosphate-buffered Saline (Natriumphosphatpuffer)
PDGF	Platelet derived growth factor
PKC	Proteinkinase C
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor
RAR	Retinsäurerezeptor
RARE	Retinsäurespezifisches responsives Element
RS	Retinsäure
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte isotonische Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte isotonische Salzlösung mit 0,1 % (v/v) TritonX 100
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WB-F344	<i>hier:</i> WB-F344 Zellen (s.a. 2.2.1.1)
ZNS	Ziegennormalserum
ZZK	Zell-Zell-Kommunikation

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Carotinoide	1
1.1.1. Allgemeines	1
1.1.1.1. Vorkommen	1
1.1.1.2. Struktur und Eigenschaften	
1.1.2. Wirkung von Carotinoiden auf molekularer, regulatorischer Ebene	6
1.1.3. Astaxanthin und Canthaxanthin	9
1.2. Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions	14
1.2.1. Grundlagen der Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions	15
1.2.1.1. Aufbau der Gap Junctions	15
1.2.1.2. Zellulärer Lebenszyklus von Connexinen	19
1.2.1.3. Regulation der Zell-Zell-Kommunikation	20
1.2.2. Funktion und Bedeutung der Zell-Zell-Kommunikation	28
1.2.3. Wirkung von Carotinoiden auf die Zell-Zell-Kommunikation	31
1.3. Dicumarol	33
1.4. Zielstellungen	35
2. MATERIAL UND METHODEN	36
2.1. Materialien	36
2.1.1. Geräte	36
2.1.2. Software	36
2.1.3. Chemikalien	36
2.1.4. Sonstiges	38
2.1.5. Strukturen der Testsubstanzen	39
2.1.5.1. Carotinoide	39
2.1.5.2. All-trans-Retinsäure	40
2.1.5.3. Dicumarol	40
2.2. Methoden	41
2.2.1. Zellkultur	41
2.2.1.1. Zelltypen	41
2.2.1.2. Biopsie von humanen Hautfibroblasten	42
2.2.1.3. Stammhaltung und Anzucht der Zellen	42
2.2.1.4. Kryokonservieren und Auftauen von Zellen	42
2.2.1.5. Inkubation von Zellen mit Testsubstanzen	43
2.2.2. Zellvitalitätsassay (MTT-Test)	44
2.2.3. Bestimmung der Zell-Zell-Kommunikation mittels Fluoreszenzfarbstoff-Transfer-Assay (Kommunikationsassay)	46
2.2.4. Immunohistochemischer Nachweis von subzellulären Strukturen	48
2.2.4.1. Gap Junction Protein Connexin43	48
2.2.4.2. Zellkern	48
2.2.5. Proteinbestimmung in Zelllysaten	49
2.2.6. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und immunologischer Nachweis von Proteinen (Western Blot)	49
2.2.6.1. Probenaufarbeitung für Cx43-Analyse mittels Western Blot	49
2.2.6.2. SDS-PAGE	50
2.2.6.3. Western Blot (Semi-Dry-Blotting)	51

2.2.7. Bestimmung von Carotinoidgehalten in Zelllysaten und –überständen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	53
2.2.7.1. Probenaufarbeitung der Zelllysate und –überstände	53
2.2.7.2. HPLC	54
2.2.8. Bestrahlung von Zellen mit UVA-Strahlung	54
3. ERGEBNISSE	56
3.1. Einfluß von Carotinoiden auf die Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions in Zellkultur	56
3.1.1. Einfluß von Carotinoiden auf die Zell-Zell-Kommunikation in WB-F344 (Rattenleberepithelzellen)	56
3.1.1.1. Messung der Zell-Zell-Kommunikation in WB-F344 im Fluoreszenzfarbstoff-Transfer-Assay	57
3.1.1.2. Effekte von Carotinoiden auf die Zellvitalität von WB-F344	62
3.1.1.3. Einfluß von Carotinoiden auf Transport, Zusammenlagerung und subzelluläre Lokalisation des Kanalproteins Connexin43 in WB-F344	63
3.1.2. Vergleich des Effekts von Astaxanthin von zwei unterschiedlichen Herstellern auf die Zell-Zell-Kommunikation in WB-F344 und humanen Hautfibroblasten	69
3.1.3. Vergleich der Effekte der Xanthophylle Astaxanthin und Canthaxanthin auf die Zell-Zell-Kommunikation in humanen Hautfibroblasten	73
3.1.3.1. Astaxanthin und Canthaxanthin wirken unterschiedlich auf die Zell-Zell-Kommunikation in humanen Hautfibroblasten	74
3.1.3.2. Einfluß von Astaxanthin und Canthaxanthin auf das Kanalprotein Connexin43	77
3.1.3.2.1. Einfluß auf die subzelluläre Lokalisation von Connexin43	78
3.1.3.2.2. Einfluß auf die Expression und den Phosphorylierungsstatus von Connexin43	81
3.1.4. Sonderstellung des Astaxanthins: ein starker Inhibitor der Zell-Zell-Kommunikation	85
3.1.4.1. Zeitlicher Verlauf des inhibitorischen Effekts von Astaxanthin auf die Zell-Zell-Kommunikation	85
3.1.4.2. Inhibitorischer Effekt von Astaxanthin auf die Zell-Zell-Kommunikation in humanen Hautfibroblasten ist reversibel	87
3.1.5. Aufnahme von Astaxanthin und Canthaxanthin in humanen Hautfibroblasten	89
3.2. Einfluß von Dicumarol auf die Zell-Zell-Kommunikation in WB-F344 und HFFF2	92
3.2.1. Dicumarol – ein starker Inhibitor der Zell-Zell-Kommunikation	92
3.2.2. Mechanismus des inhibitorischen Effekts von Dicumarol auf die Zell-Zell-Kommunikation	97
3.2.3. Das inhibitoische Potential von Dicumarol	98
3.3. Carotinoide als Mikronährstoffe mit potentiell protektiver Wirkung gegen schädigende Effekte von UVA-Strahlung	100
3.3.1. Dosis-Zeit-Abhängigkeit des Effekts von UVA-Strahlung auf die Zell-Zell-Kommunikation in humanen Hautfibroblasten	101
3.3.2. UVA-protective Wirkung von Carotinoiden auf die Zell-Zell-Kommunikation in humanen Hautfibroblasten	102

4. DISKUSSION	105
4.1. Einfluß von Carotinoiden auf die Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions in Zellkultur	105
4.1.1. Einfluß von Carotinoiden auf die Zell-Zell-Kommunikation in Rattenleberepithelzellen (WB-F344)	105
4.1.2. Einfluß von Carotinoiden auf Expression und subzelluläre Lokalisation des Kanalproteins Connexin43 in Rattenleberepithelzellen (WB-F344)	109
4.2. Vergleich der Effekte der Xanthophylle Astaxanthin und Canthaxanthin auf die Zell-Zell-Kommunikation in humanen Hautfibroblasten und mechanistische Erklärungsansätze	112
4.3. Einfluß von Dicumarol auf die Zell-Zell-Kommunikation in Rattenleberepithelzellen (WB-F344) und humanen Hautfibroblasten (HFFF2)	119
4.4. Carotinoide als Mikronährstoffe mit potentiell protektiver Wirkung gegen schädigende Effekte von UVA-Strahlung	120
5. ZUSAMMENFASSUNG	124
6. LITERATUR	126
DANKSAGUNG	143
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	144

1 Einleitung

1.1 Carotinoide

1.1.1 Allgemeines

1.1.1.1 Vorkommen

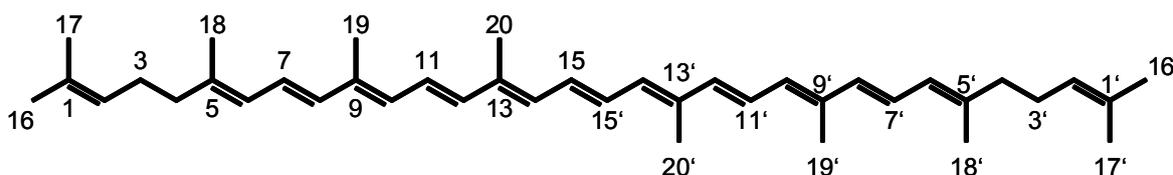
Carotinoide sind natürlich vorkommende Farbstoffe (Pigmente), die in Bakterien, Hefen, Algen, Pilzen, Pflanzen, Tieren und im menschlichen Organismus zu finden sind. Diese natürlichen Farbstoffe, von denen bisher über 600 bekannt sind, verleihen vielen Pflanzen und Tieren ihre Farbenpracht, angefangen bei strahlend gelben, über orange bis hin zu tiefen Rottönen. So sind sie z.B. für die Farbe von Lachsfleisch und Hummerschalen oder auch für so manches farbenprächtige Federkleid bei Vögeln (z.B. von Flamingos) verantwortlich. Auch in grünen Pflanzen kommen Carotinoide vor, sind dort jedoch nicht anhand der gelb-orange-roten Farbgebung zu erkennen, da sie durch das Chlorophyll in den grünen Pflanzengewebe überdeckt werden. Lediglich im Herbst, wenn das Chlorophyll abgebaut wird, werden die Carotinoide sichtbar [Britton 1995 a, S. 13f, Mortensen 2004].

Menschen können keine Carotinoide *de novo* synthetisieren, sondern müssen diese mit der Nahrung aufnehmen. In der menschlichen Ernährung sind sie in Obst und Gemüse, wie z.B. Paprika, Tomate, Möhre, Pfifferling, Spinat, Orange, Grapefruit u.v.m. zu finden. Hauptcarotinoide in der Nahrung des Menschen sind α -Carotin, β -Carotin, β -Cryptoxanthin, Lycopin, Zeaxanthin und Lutein [Mayne 2003]. Im menschlichen Plasma bzw. in menschlichen Geweben findet man von den mehr als 600 natürlich vorkommenden Carotinoiden lediglich 34. Dabei handelt es sich um 25 Carotinoide, die ebenfalls in der Nahrung zu finden sind, und um 9 Metabolite von Nahrungscarotinoiden (2 von Lycopin, 5 von Lutein/ Zeaxanthin, 2 von Lutein infolge nicht-enzymatischer Dehydration) [Khachik 2002]. α -Carotin, β -Carotin, Cryptoxanthin, Lycopin, Zeaxanthin und Lutein, die Hauptcarotinoide im Humanplasma, kommen in einer Größenordnung von 10^{-7} - 10^{-8} mol/L im Plasma vor [Sowell 1994, Olmedilla 2001].

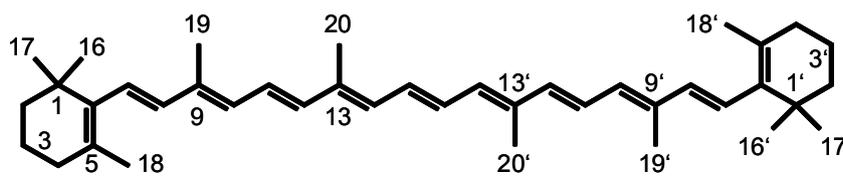
1.1.1.2 Struktur und Eigenschaften

Die Carotinoidstruktur zeichnet sich durch ein C_{40} -Grundgerüst, aufgebaut aus Isopreneinheiten, mit einem mehr oder weniger ausgeprägten konjugierten

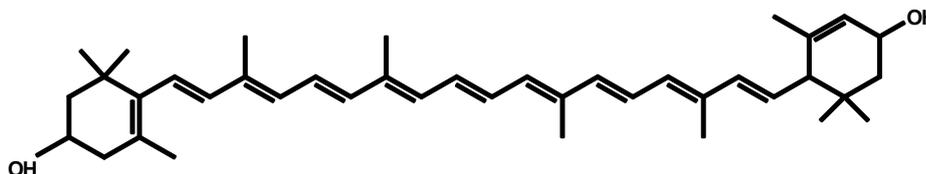
Doppelbindungssystem aus. Carotinoide werden in zwei Hauptgruppen klassifiziert: die Carotine und Xanthophylle. Bei den Carotinen handelt es sich um reine Polyen-Kohlenwasserstoffe, wohingegen in Xanthophyllen Sauerstofffunktionen (Hydroxy-, Epoxy-, Oxogruppen) enthalten sind. Zusätzlich gliedert man die Carotine in lineare, acyclische und mono- bzw. bicyclische Carotine. In Abb. 1 sind charakteristische Vertreter der Carotine (Lycopin, β -Carotin) und Xanthophylle (Lutein) einschließlich ihrer Numerierung dargestellt [Belitz 1992, S. 215f; Britton 1995 a, S. 27ff].



Lycopin (Carotin, linear, acyclisch)



β -Carotin (Carotin, bicyclisch)



Lutein (Xanthophyll, Hydroxygruppen)

Abb. 1: Beispiele für Carotinoide aus den beiden Hauptgruppen Carotine und Xanthophylle [Straub 1987].

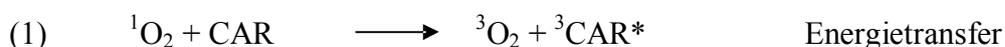
Das Polyengerüst und strukturelle Faktoren wie z.B. Ringsysteme, funktionelle Gruppen am Ring, cis-/trans-Isomerie beeinflussen die Eigenschaften der Carotinoide. Insbesondere die funktionellen Gruppen bestimmen die Polarität und Löslichkeit eines Carotinoids. Im Allgemeinen besitzen Carotinoide lipophile Eigenschaften und sind daher unlöslich in hydrophilen Solventien, ausgenommen Carotinoide mit extrem stark polaren Gruppen.

Mit ihrem konjugierten Doppelbindungssystem verfügen sie über ein Chromophor, das zur Lichtabsorption im sichtbaren Bereich bzw. in einigen Fällen im UV-Bereich (z.B. Phytoen, Phytofluen) des Spektrums führt. Daraus resultieren die gelb-orange-roten Farbgebungen vieler Carotinoide. Die Absorptionsmaxima liegen bei fast allen Carotinoiden in einem Wellenlängenbereich von 400 nm bis 500 nm (Beispiel s. 2.2.1.5). Die absorptiven Eigenschaften der Carotinoide sind abhängig vom jeweiligen Medium und die Absorptionsspektren können sich *in vivo* aufgrund von Interaktionen der Carotinoide mit Proteinen, Lipiden, etc. von denen in organischen Lösungsmitteln unterscheiden. Diese Interaktionen mit anderen Molekülen können allgemein zu veränderten chemischen und physikalischen Eigenschaften der Carotinoide führen und insbesondere Carotinoid-Protein-Interaktionen können entscheidend die Funktion oder Aktivität von Carotinoiden beeinflussen [Britton 1995 a, S. 18; Britton 1995 b, S. 13 und 17].

Einige Carotinoide, wie z.B. β -Carotin, sind Vorläufer von Vitamin A und für Organismen hinsichtlich der Vitamin A-Versorgung von Bedeutung [Krinsky 2004, S. 279; Stahl 2003]. Carotinoide sind außerdem natürlich vorkommende Antioxidantien, die aufgrund ihres konjugierten Doppelbindungssystems Singuletsauerstoff ($^1\text{O}_2$) inaktivieren und Radikale abfangen können [El-Agamey 2004, Stahl 2003]. Die verschiedenen möglichen Mechanismen der antioxidativen Wirkung von Carotinoiden sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tab. 1: Mechanismen der antioxidativen Wirkung von Carotinoiden [Krinsky 2004 S.107ff, El-Agamey 2004].

Quenchen



Abfangen von freien Radikalen (Kettenabbruch)



Auf diese Weise werden hochreaktive Moleküle (reaktive Sauerstoffspezies (ROS): $^1\text{O}_2$ und v.a. Peroxylradikale) abgefangen, die sonst zu Schädigungen von Biomolekülen (Lipide, Proteine, DNA) in Organismen führen könnten. Neben $^1\text{O}_2$ und Peroxylradikalen deaktivieren Carotinoide auch elektronisch angeregte Sensibilisatoren, die an der Bildung von Radikalen und $^1\text{O}_2$ beteiligt sind [Stahl 2003]. Die Interaktion von Carotinoiden mit $^1\text{O}_2$ basiert hauptsächlich auf einem physikalischen Prozess: Energie wird direkt zwischen beiden Molekülen transferiert. Chemische Reaktionen zwischen $^1\text{O}_2$ und Carotinoiden sind weniger bedeutsam, da sie nur 0,05 % der gesamten Quenchrage ausmachen. Von den unter oxidativen Bedingungen gebildeten Radikalen reagieren Carotinoide v.a. mit Peroxylradikalen, die während der Lipidperoxidation entstehen. Wahrscheinlich werden hierbei resonanzstabilisierte Radikaladdukte gebildet.

In biologischen Systemen kann Lichteinstrahlung (UV-Strahlung) zur Bildung von ROS führen, die dann Biomoleküle schädigen können (s.o.). Photooxidative Prozesse spielen eine wichtige Rolle in der Pathobiochemie mehrerer Erkrankungen von lichtexponierten Geweben, wie z.B. von Auge und Haut. Wenn die Haut dem UV-Licht ausgesetzt wird, dann wird zuallererst ein Sonnenbrand (Erythembildung) als Reaktion des Körpers auf die exogene Noxe UV-Licht beobachtet [Stahl 2003]. Ergebnisse von *in vitro*- und *in vivo*-Studien weisen daraufhin, daß β -Carotin vor photooxidativen Schädigungen und Sonnenbrand schützt [Stahl 2003]. Nach einer 12-wöchigen Behandlung mit β -Carotin bzw. mit β -Carotin in Kombination mit α -Tocopherol war die mit einem Sonnenlichtsimulator induzierte Erythembildung ab der achten Behandlungswoche signifikant erniedrigt [Stahl 2000]. Dieser photoprotektive Effekt wurde auch bei anderen Carotinoiden beobachtet: eine 10-wöchige Zufuhr einer Menge an Tomatenpaste, die 16 mg Lycopin pro Tag entsprach, erhöhte die Serumkonzentration von Lycopin und den Gesamtcarotinoidgehalt in der Haut [Stahl 2001]. In der Gruppe, die Tomatenpaste aß, war die Erythembildung im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Ähnliche Resultate lieferte eine Intervention mit β -Carotin bzw. mit einer Carotinoide Mischung aus β -Carotin, Lutein und Lycopin [Heinrich 2003]. Die Mikronährstoffe Carotinoide eignen sich daher zum Schutz gegen Erythembildung nach UV-Lichtexposition, d.h. sie stellen endogene Sonnenschutzmittel dar, die mit der Nahrung zugeführt werden können [Sies 2004].

Mehrere Studien weisen außerdem daraufhin, daß Lutein und Zeaxanthin, die Hauptpigmente in der *Macula lutea* der menschlichen Retina, das Auge vor Lichtschäden schützen. Je höher der Gehalt an Lutein/ Zeaxanthin in der *Macula*, desto geringer ist das

Risiko, an einer altersbedingten Makuladegeneration zu erkranken [Landrum 1997, Bone 2000, Krinsky 2003]. Die Carotinoide wirken zum einen antioxidativ und zum anderen modulieren sie durch UV-Licht induzierte Signalwege [Stahl 2005, Wertz 2005].

Epidemiologische Studien haben gezeigt, daß obst- und gemüsereiche, d.h. carotinoidreiche, Ernährung korreliert ist mit einer präventiven Wirkung hinsichtlich verschiedener Erkrankungen, wie z.B. bestimmter Krebsarten, kardiovaskulärer Erkrankungen, Katarakt oder altersbedingter Makuladegeneration (Abb. 2) [Mayne 1996, Gann 1999, Donaldson 2004, Wu 2004, Ito 2005, Nkondjock 2005].

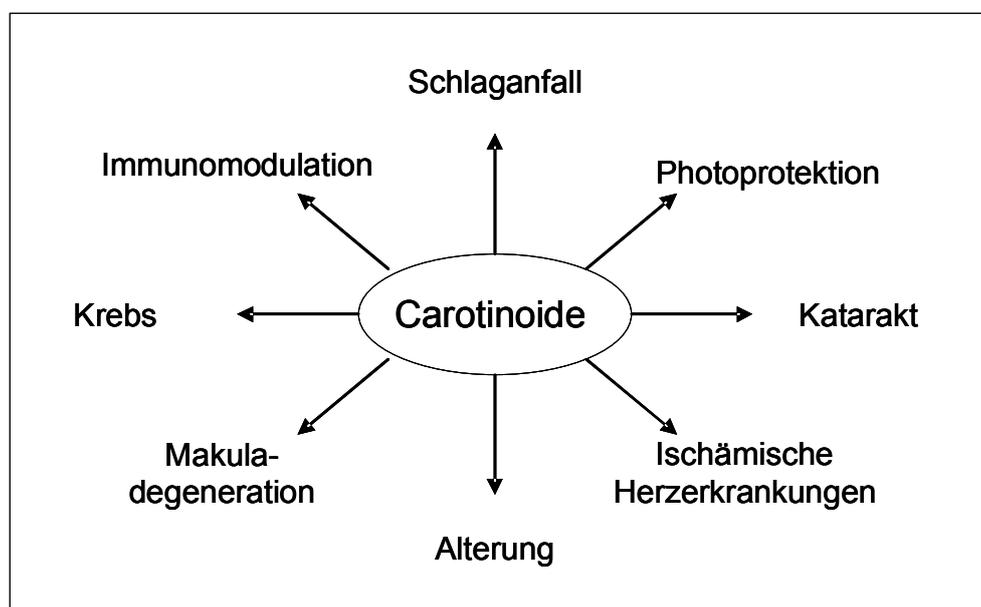


Abb. 2: Am Menschen beobachtete protektive Effekte von Carotinoiden (modifiziert nach [Mayne 1996]).

Die präventive Wirkung wird zum einen der antioxidativen Eigenschaft, zum anderen der Provitamin A-Aktivität zugeschrieben. Überdies beeinflussen einige Carotinoide Signaltransduktionswege (s. 1.1.2). Zurzeit sind die Wirkmechanismen der Carotinoide und ihrer krankheitspräventiven Wirkungen noch nicht endgültig geklärt und werden intensiv erforscht.

Neben der antioxidativen Wirkung, die für die chemopräventive Wirkung von Carotinoiden mit verantwortlich sein soll, sind auch prooxidative Effekte der Carotinoide bekannt. So wurde in zwei Interventionsstudien zur chemopräventiven Wirkung von Carotinoiden

(CARET¹, ATBC²) beobachtet, daß β -Carotin und Vitamin A bei Rauchern und Asbest exponierten Personen zu einer erhöhten Inzidenz von Lungenkrebs führen [Mayne 1996, Krinsky 2004 S. 127, Schmidt 2004 S. 11f]. Eine erhöhte Lungenkrebsinzidenz nach einer Supplementierung mit β -Carotin beobachteten Wang et al. auch bei Frettchen, die Tabakrauch ausgesetzt waren [Wang 1999], allerdings nur bei höheren β -Carotinkonzentrationen. Bei den Frettchen war die Carotinoidsupplementierung und Tabakexposition mit einer Störung des Retinoid-Signalwegs assoziiert.

1.1.2 Wirkung von Carotinoiden auf molekularer, regulatorischer Ebene

Neben den beschriebenen antioxidativen Eigenschaften besitzen Carotinoide auch nicht-antioxidative, die der Literatur zufolge ebenfalls zu den in vielen Studien beobachteten anticancerogenen Wirkungen von Carotinoiden beitragen. Carotinoide wirken auf vielfältige Weise auf unterschiedliche Zellfunktionen. Sie beeinflussen Mechanismen der Zellproliferation, die Signalweiterleitung von Wachstumsfaktoren (z.B. IGF-System), die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions (s.a. 1.2, v.a. 1.2.3) und Enzyme des Entgiftungsapparates (z.B. Cytochrom P450), indem sie die Expression von Proteinen, die in diese Prozesse involviert sind, verändern. Dieser Einfluß auf die Expression vieler verschiedener Proteine legt nahe, daß Carotinoide und/ oder deren Metabolite hinsichtlich ihres initialen Effekts Transkriptionssysteme modulieren. Entweder handelt es sich hierbei um eine direkte Interaktion von Carotinoidmolekülen bzw. Carotinoide derivaten mit Transkriptionsfaktoren (z.B. mit Liganden aktivierten Kernrezeptoren) oder um eine indirekte Modifikation der transkriptionellen Aktivität (beispielsweise über Änderung des zellulären Redoxstatus), die redox-sensitive Transkriptionssysteme, wie z.B. AP-1 (activator protein-1), NF- κ B (nuclear factor- κ B) oder ARE (antioxidant response element) betrifft [Krinsky 2004, S. 165-196].

Grundsätzlich wurde davon ausgegangen, daß Carotinoide derivate Kernrezeptoren aktivieren. Aber bis vor kurzem war dies nur für Retinsäure, die aus β -Carotin oder anderen Vitamin A-Vorläufern gebildet wird, bewiesen. Inzwischen gibt es Anzeichen, daß auch Derivate anderer Carotinoide bzw. Carotinoide selbst die Aktivität von Transkriptionsfaktoren modulieren.

¹ CARET-Studie: β -Carotene and Retinol Efficacy Trial.

² ATBC: Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Trial.

Retinsäure ist die Stammsubstanz der als Retinoide bekannten Liganden. Sie übt verschiedene Wirkungen auf die Zellproliferation und –differenzierung über zwei Klassen von Kernrezeptoren (Großfamilie der Steroidhormonrezeptoren) aus, die als Retinsäure-Rezeptoren (RARs) und Retinoid-X-Rezeptoren (RXRs) bezeichnet werden. Retinsäure bindet nur an RAR, wohingegen das Isomer 9-cis-Retinsäure an beide Rezeptortypen bindet. Wie auch andere ligandenabhängige Rezeptoren (Schilddrüsenhormon-, Vitamin D-Rezeptor) können diese Rezeptoren (RAR, RXR) die entsprechenden Zielgene nur als Heterodimere aktivieren. RAR bildet nur mit RXR ein Heterodimer, RXR kann dagegen auch mit anderen Mitgliedern der nukleären Hormonrezeptor-Familie Heterodimere bilden [Krinsky 2004, S. 179f; Löffler 2003, S. 729]. Acylco-Retinsäure, ein hypothetisches Oxidationsprodukt von Lycopin transaktivierte ein Reporterogen, das eine RARE-Sequenz (retinoic acid responsive element) enthält, allerdings 100fach schwächer als Retinsäure [Ben-Dor 2001]. Zugleich inhibierte es in gleichem Maße wie Retinsäure und Lycopin das Zellwachstum von humanen Brustkrebszellen (MCF-7). Außerdem wurde durch die Inkubation mit diesen Substanzen das Fortschreiten des Zellzyklus verlangsamt. Da Acyclo-Retinsäure nur sehr schwach mit RAR interagiert, wird seine wachstumsinhibierende Wirkung offenbar nicht durch RAR vermittelt. Andere acyclische Retinoide, mit ein oder zwei Doppelbindungen weniger als Acyclo-Retinsäure, transaktivierten ein Reporterogen in gleichem Maße wie Retinsäure. Bei diesen acyclischen Retinoiden handelt es sich um mögliche Derivate von Phytoen und Phytofluen, zwei Carotinoide, die in der Tomate vorkommen und in Studien die Proliferation von verschiedenen Krebszellen inhibierten [Krinsky 2004, S. 179f].

Die anticancerogene Aktivität von Carotinoide derivaten wird nicht nur durch die Aktivierung der Retinoidrezeptoren vermittelt. Mehrere Spaltungsprodukte von β -Carotin inhibierten beispielweise stark die Aktivität von AP-1 [Tibaduiza 2002], ebenso wie Lycopin selbst [Karas 2000]. Im Allgemeinen wird angenommen, daß Carotinoide oder ihre oxidierten Derivate mit einem ganzen Netzwerk an Transkriptionsfaktoren wechselwirken, die durch verschiedene Liganden mit geringer Affinität bzw. Spezifität aktiviert werden. Die Aktivierung mehrerer Systeme von Transkriptionsfaktoren durch verschiedene Carotinoide ist möglicherweise die Ursache für die synergistische Inhibierung des Zellwachstums durch Carotinoide. Neben Retinoidrezeptoren und AP-1 zählen vermutlich auch Transkriptionssysteme wie z.B. PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors), das ARE (antioxidant response element), NF- κ B und bisher nicht näher identifizierte Rezeptoren (Orphan Rezeptoren, z.B. xenobiotische Rezeptoren) zu den zellulären

Zielsystemen von Carotinoiden [Krinsky 2004, S. 180-183]. Orphanrezeptoren haben eine ähnliche Struktur wie nukleäre Hormonrezeptoren, interagieren aber nicht mit den bisher bekannten physiologischen Liganden [Xie 2001].

Neuere Studien haben gezeigt, daß Rezeptoren, die zur Familie der bisher nicht näher identifizierten Rezeptoren zählen und als xenobiotische Rezeptoren bezeichnet werden, ein Teil des Verteidigungssystems gegen lipophile Fremdstoffe (Xenobiotika) wie z.B. Umweltgifte, Carcinogene, Nahrungsbestandteile oder Medikamente sind. Sie sind vermutlich beteiligt an der Regulation der Expression der Cytochrom P450 Enzyme (CYP), die die Oxidation von Xenobiotika katalysieren und eine wichtige Rolle im Metabolismus und in der Eliminierung der Xenobiotika aus dem Körper spielen. Einige Carotinoide induzieren CYP-Enzyme, die Bestandteile des Phase-I-Entgiftungsweges sind [Xie 2001]. Canthaxanthin und Astaxanthin induzierten CYP1A1 und CYP1A2 in der Rattenleber und ähnliche Effekte wurden auch für β -Apo-8'-Carotenal beobachtet. Dahingegen zeigten β -Carotin, Lutein und Lycopin keine Aktivität [Gradelet 1996 a und b, Astorg 1994]. Der Mechanismus, der der Induktion der CYP-Enzyme durch Carotinoide zugrunde liegt, ist noch nicht bis ins Detail verstanden. Aber es gibt Anzeichen, daß der AhR-abhängige Signalweg darin involviert ist. AhRs (aryl hydrocarbon receptors) werden den xenobiotischen Rezeptoren zugeordnet [Gradelet 1997, Denison 2003]. In einer anderen Studie induzierte Lycopin in der Leber von Ratten, denen Lycopindosen von 0,001 bis 0,1 g/kg verabreicht worden war, dosisabhängig die in der Leber vorkommenden Enzyme CYP1A1/2, 2B1/2 und 3A. Da die Enzymaktivitäten schon bei niedrigem Lycopin-Plasmalevel induziert wurden, wird vermutet, daß die Modulation dieser Enzyme des Entgiftungsapparates durch Carotinoide auch beim Menschen eine Rolle spielen könnte [Breinholt 2000]. Untersuchungen zum direkten Effekt von Carotinoiden auf ein xenobiotisches Rezeptorsystem in einem *in vitro*-Transkriptionssystem (HepG2 Hepatoma Zellen) zeigten, daß β -Carotin das PXR-Reportergen in ähnlicher Weise wie Rifampicin transaktiviert, das bekannterweise CYP-Enzyme induziert. Es wird auch diskutiert, daß Carotinoide nicht nur mit xenobiotischen Rezeptoren, sondern auch mit anderen, bisher unbekanntem Typen der Orphanrezeptoren interagieren [Krinsky 2004, S. 182f].

Die in *in vitro*, *in vivo* und epidemiologischen Studien beobachtete anticancerogene Wirkung von Lycopin wurde im Zusammenhang mit dem Plasmaspiegel des IGF-I (insulin-like growth factor-I) untersucht [Krinsky 2004, S. 174-176]. Hohe IGF-I-Plasmaspiegel werden mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Darmkrebs, Brustkrebs bzw. Prostatakrebs assoziiert. Eine erhöhte Zufuhr von Lycopin bzw. ein erhöhter Lycopin-

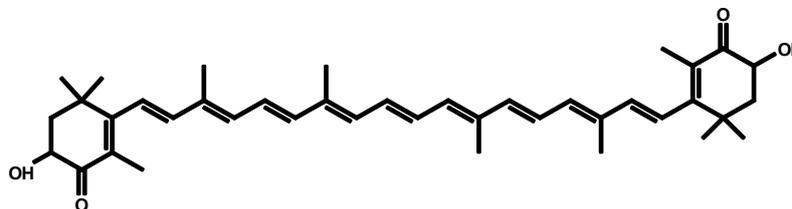
Plasmaspiegel ist mit einem geringeren Prostatakrebsrisiko assoziiert. Aufgrund verschiedener Studienresultate wird vermutet, daß die inhibierende Wirkung von Lycopin auf das Zellwachstum dadurch zu erklären ist, daß Lycopin in den mitogenen Signalweg von IGF-I eingreift. IGF-I aktiviert nach der Bindung an den IGF-I-Rezeptor eine Signalkaskade, die auch zur Aktivierung von Transkriptionssystemen wie dem AP-1-Komplex führt, der auch Bestandteil von Signalkaskaden anderer Wachstumsfaktoren ist. AP-1 wiederum beeinflusst u.a. die Expression von Proteinen, die für den Zellzyklus-Apparat wichtig sind, z.B. Cyclin D₁. Karas et al. [Karas 2000] fanden heraus, daß die Behandlung von Brustkrebszellen (MCF7) mit Lycopin zu einer Inhibierung der IGF-I vermittelten Stimulation der Thyrosinphosphorylierung des IRS-1 (insulin-receptor-substrate-1) und der DNA-Bindungskapazität des AP-1-Transkriptionskomplexes führte. Diese Effekte waren nicht mit einer Veränderung der Anzahl oder der Affinität der IGF-I-Rezeptoren assoziiert, sondern vielmehr mit einer Zunahme der membranassoziierten IGF-Bindungsproteine (IGFBPs), die negativ mit der IGF-Wirkung korreliert sind. Außerdem wird vermutet, daß Lycopin die Konzentration an Cyclin D₁ reduziert, was in einer verminderten Phosphorylierung des Retinoblastomaproteins resultiert [Nahum 2001]. Die Inhibierung dieser Phosphorylierung ist wahrscheinlich mit einem Wachstumsstopp assoziiert, da die Phosphorylierung des Retinoblastomaproteins eine Schlüsselreaktion in der Progression von der G₁-Phase in die S-Phase darstellt [Stahl 2002].

Carotinoide beeinflussen auf unterschiedlichste Weise zelluläre Mechanismen. Parallele Effekte mehrerer Substanzen auf mehrere dieser Mechanismen (Transkriptionssysteme, Signalkaskaden) ist eine mögliche Erklärung auf molekularer Ebene für die synergistische anticancerogene Wirkung von Wirkstoffkombinationen aus verschiedenen Carotinoiden bzw. aus Carotinoiden mit anderen Nahrungs- und pharmakologischen Substanzen [Krinsky 2004, S. 165-196].

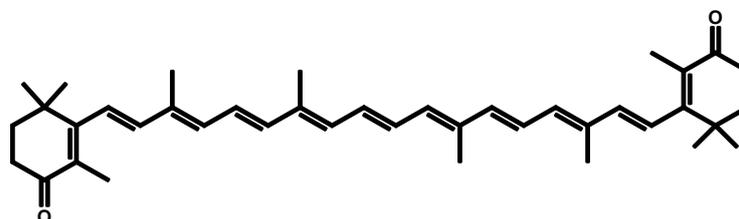
1.1.3 Astaxanthin und Canthaxanthin

Astaxanthin (3,3'-Dihydroxy- β,β -Carotin-4,4'-dion, s. Abb. 3) ist ein α -Hydroxyketon (Xanthophyll), das insbesondere in Tieren, die im Wasser leben (Lachs, Forelle, Brasse, Krustaceen, z.B. Hummer, Shrimps [Guerin 2003]) zu finden ist, aber auch in Vögeln (Flamingos, Wachteln [Guerin 2003]), einigen Blumen (z.B. *Adonis annua* [Krinsky 2004, S. 18] und Mikroorganismen (*Haematococcus pluvialis* [Boussiba 1991], *Phaffia rhodozyma* [Andrewes 1976]) vorkommt (s.a. Abb. 4).

Canthaxanthin gehört ebenfalls zu den Xanthophyllen und kommt natürlicherweise in Fischen, Krustentieren, Pfifferlingen, Algen und Flamingofedern vor [<http://www.zusatzstoffe-online.de/html/zusatz.php?nr=161g>] (Abb. 3 und 4).



Astaxanthin



Canthaxanthin

Abb. 3: Strukturen von Astaxanthin und Canthaxanthin.

Astaxanthin ist verantwortlich für die intensive Färbung des Lachsflisches und von gekochtem Hummer. In lebenden Hummern kommt Astaxanthin gebunden an ein Protein als α -Crustacyanin vor. Durch seine Freisetzung aus dem Carotinoprotein erfolgt ein intensiver Farbumschlag von blau ($\lambda_{\max} = 632 \text{ nm}$) nach rot ($\lambda_{\max} \sim 480 \text{ nm}$). Dieser bathochrome Shift zählt zu den stärksten, die in der Natur bekannt sind [Weesie 1997]. In freier Form ist Astaxanthin sehr oxidationsanfällig, daher ist es in der Natur durch Bindung an Proteine (s. Crustacyanin) oder Veresterung seiner Hydroxygruppen mit Fettsäuren (Mono- oder Diester) stabilisiert [Britton 1995a, S. 287ff, Britton 1995b, S. 48, Guerin 2003].

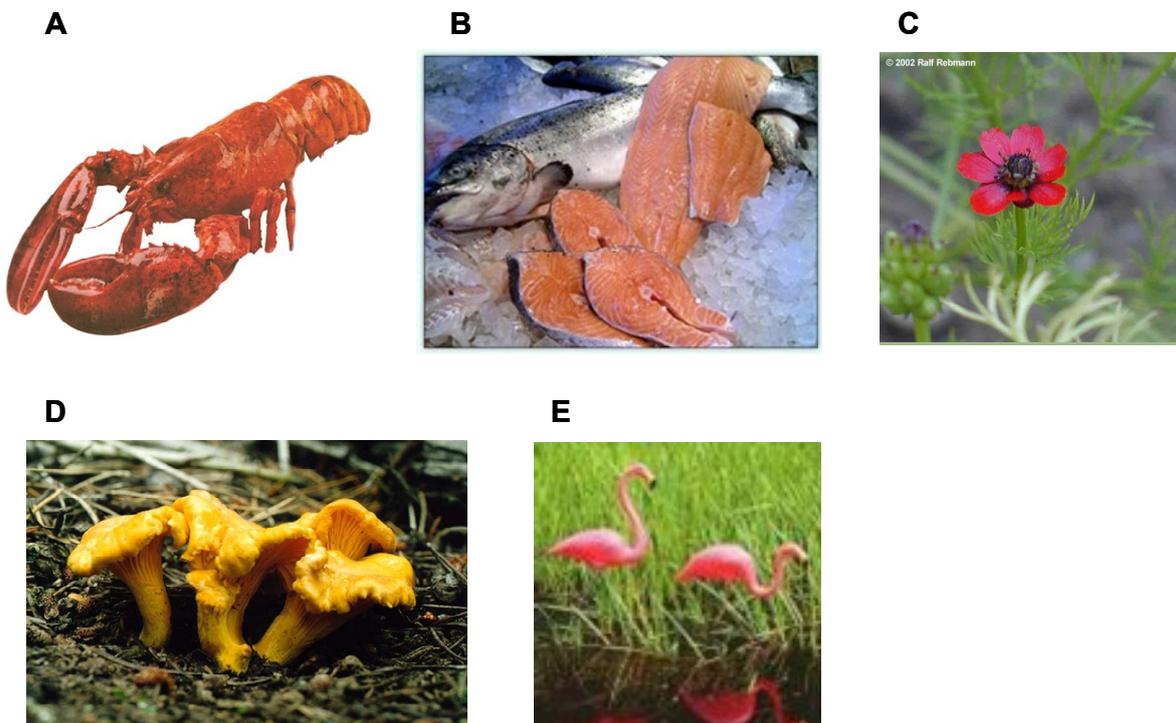


Abb. 4: Vorkommen von Astaxanthin und Canthaxanthin in der Natur.

- A** Hummer (Astaxanthin)
 [<http://charlestonseafood.com/images/Amazon/Lobster-500.jpg> (15.08.05)]
- B** Lachs (Astaxanthin und Canthaxanthin)
 [<http://www.rienow-fisch.de/kundenbilder/frischfisch-lachssammlung2.jpg> (15.08.05)]
- C** *Adonis annua* (Herbstfeurröschen) (Astaxanthin).
 [http://www.gifte.de/Giftpflanzen/adonis_annua_bild01.htm (15.08.05)]
- D** Pfifferling (Canthaxanthin)
 [http://www.gifte.de/Giftpflanzen/adonis_annua_bild01.htm (15.08.05)]
- E** Flamingo (Canthaxanthin)
 [<http://www.rienow-fisch.de/kundenbilder/frischfisch-lachssammlung2.jpg> (15.08.05)]

Astaxanthin kann weder von Tieren noch von Pflanzen synthetisiert werden. Die Biosynthese von Astaxanthin ist auf wenige Mikroorganismen wie z.B. die Hefe *Phaffia rhodozyma* [Andrewes 1976], die Frischwasseralge *Haematococcus pluvialis* [Boussiba 1991] und die Meeresbakterien *Agrobacterium aurantiacum* und *Alcaligenes sp. PC-1-*

Strang [Yokoyama 1994] limitiert [Fraser 1997, Guerin 2003]. Daher sind andere Organismen darauf angewiesen, Astaxanthin mit der Nahrung aufzunehmen [Guerin 2003].

Im Unterschied zu β -Carotin besitzen Astaxanthin und Canthaxanthin keine Provitamin A-Aktivität [Jyonouchi 1995, Guerin 2003, Chew 2004].

In der 3- und 3'-Position besitzt Astaxanthin jeweils ein Chiralitätszentrum. Daher sind prinzipiell drei isomere Formen von Astaxanthin möglich: (3R, 3'R), (3S, 3'S) und die optisch inaktive *meso*-Form (3R, 3'S). In der Natur kommen alle drei Isomeren vor. In Shrimps und Lachs findet sich eine Mischung aller Isomeren, jedoch in unterschiedlichem Verhältnis (Tab. 2). Die Hefe *Phaffia rhodozyma* synthetisiert optisch rein das (3R,3'R)-Isomer, *Haematococcus pluvialis* und *Adonis annua* hingegen das (3S,3'S)-Isomer. Industriell hergestelltes Astaxanthin wird meist als 1:2 (*meso*):1-Mischung produziert. Inzwischen sind aber auch die reinen isomeren Formen kommerziell erhältlich.

Tab. 2: *Verhältnis der Astaxanthin-Isomeren in Shrimps und Lachs [Krinsky 2004, S. 18]. In % Gesamtastaxanthin.*

	Shrimps	Lachs
3R,3'R	25 %	12 – 17 %
3R,3'S (<i>meso</i>)	50 %	2 – 6 %
3S,3'S	25 %	75 – 85 %

Astaxanthin zählt zu den Carotinoiden mit dem höchsten antioxidativen Potential [Miki 1991, Yousry 2000, Beutner 2001]. In einem Modellsystem hat es sich als stärkster Radikalfänger verglichen mit anderen Antioxidantien erwiesen, zweimal effizienter als Canthaxanthin, fünfmal effizienter als β -Carotin und zehnmals stärker als α -Tocopherol. Auch als $^1\text{O}_2$ -Quencher ist es stärker als Canthaxanthin [Miki 1991]. Dies scheint in seiner besonderen Struktur (Hydroxyketocarotinoid) begründet. Diese ermöglicht ihm z.B. in Biomembranen eine spezielle Orientierung, so daß sowohl die Polyenkette im hydrophoben Membraninnern als auch die Ringsysteme an der Membranoberfläche zur antioxidativen Wirkung beitragen können. Die Ausrichtung der Astaxanthinmoleküle in der Membran trägt zu einem besseren Schutz der Zelle vor oxidativer Schädigung bei. Zudem nimmt es

damit eine Art Verbindungsfunktion zwischen der polaren zytoplasmatischen Seite und den lipophilen Kompartimenten der Zelle ein: es wird diskutiert, daß von Astaxanthin im Lipophilen abgefangene Radikalfunktionen an Moleküle im Zytoplasma weitergegeben werden können, wo sie dann für wasserlösliche Antioxidantien (z.B. Vitamin C) zugänglich sind [Goto 2001].

Im Gegensatz zu Canthaxanthin, eines der Hauptcarotinoide in der menschlichen Ernährung sowie im Humanplasma, kommt Astaxanthin üblicherweise nicht in nennenswerten Mengen in der menschlichen Ernährung vor, außer man konsumiert eine astaxanthinreiche Nahrung (viel Lachs, Shrimps) [Sowell 1994, Olmedilla 2001, Mayne 2003]. Daher ist Astaxanthin normalerweise auch nicht im menschlichen Plasma zu detektieren. Als Nahrungsergänzungsmittel gewinnt Astaxanthin aufgrund seiner positiven Eigenschaften [Guerin 2003] mehr und mehr an Bedeutung und hat sich in den bisherigen Studien als toxikologisch unbedenklich erwiesen. Sowohl eine Supplementierung mit einer Einzeldosis Astaxanthin (100 mg synthetisches Astaxanthin) [Østerlie 1999a, 1999b] als auch eine Gabe von 3,85 mg / d bzw. 19,25 mg / d (Astaxanthin aus *Haematococcus pluvialis*) über einen Zeitraum von 29 Tagen [Mera Pharmaceuticals 1999] war unbedenklich und ohne gesundheitliche Risiken für den Menschen. Canthaxanthin ist laut Zusatzstoff-Zulassungsverordnung in Deutschland ausschließlich als Zusatzstoff (Farbstoff, E 161 g) für die Färbung von Saucisses de Strasbourg (Wurstwaren) mit einer Höchstmenge von 15 mg/kg zugelassen (Begründung s.w.u.) [<http://www.zusatzstoffe-online.de/html/zusatz.php?nr=161g>, Bundesgesetzblatt 1998].

Canthaxanthin und Astaxanthin werden als Futtermittelzusatz, v.a. in der Fischzucht (Lachse) verwendet, da es den Fischen die vom Verbraucher erwünschte intensive rosa Fleischfarbe verleiht. Astaxanthin ist außerdem essentiell für das Wachstum von Fischen und wirkt vitaminähnlich [<http://www.zusatzstoffe-online.de/html/zusatz.php?nr=161g>, <http://www.astaxanthin.org/astax-foods.htm>]. Canthaxanthin ist laut Futtermittelverordnung gemäß EU-Recht in Deutschland als Futtermittel (z.B. für Legehennen, Lachse und Forellen) nur mit Einschränkungen zugelassen, da es in wissenschaftlichen Studien bei höheren Dosierungen von Canthaxanthin zu Einlagerungen in der Netzhaut des Auges (Retinopathie) kam [Amtsblatt 2003].

1.2 Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions

Im Laufe der Evolution schlossen sich Einzeller zu arbeitsteilig organisierten Mehrzellern (Organismen) zusammen. Grundvoraussetzung für die Aufrechterhaltung der Homöostase und Koordination biochemischer Prozesse in einem multizellulären Organismus ist die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und die interzelluläre Kommunikationsfähigkeit [Löffler 2003, S. 790 + 814].

Zell-Zell-Kontakte (sog. *Junctions*) können in drei Subtypen unterteilt werden [<http://www.unifr.ch/histologie/elearningfree/allemand/epithel/epithel05.html>; Faller 2004 S. 76]:

1. Tight Junctions (*zonula occludens*): undurchlässige Verbindungen
2. Desmosomen: adhäsive Verbindungen
 - a. *macula adhaerens*: Punktdesmosom
 - b. *zonula adhaerens*: Gürteldesmosom
3. Gap Junctions (*nexus*): kommunizierende Verbindungen.

Über Gap Junctions (GJs) können in den meisten Geweben von Invertebraten und Vertebraten Substanzen, die kleiner als 1000 Da sind, zwischen dem Zytoplasma zweier benachbarter Zellen ausgetauscht werden. Die transferierten Substanzen können unterschiedlicher Natur sein, z.B. Metabolite, Nährstoffe, Signalmoleküle, Abbauprodukte [Söhl 2004, Sáez 2003] (s.a. 1.2.2). In einem Organismus werden Signale aber nicht nur mittels direkten Austauschs von Signalmolekülen (z.B. second messenger) über GJs übermittelt, sondern auch auf humoralem Weg. Hierbei werden Signalmoleküle (Hormone, Zytokine) sezerniert, die nach Bindung an einen Rezeptor (membranständig oder frei im Zytosol) die Signalantwort in der Zelle auslösen, meist mittels Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden [Löffler 2003, S. 790ff].

Neben dem direkten Molekülaustausch zwischen zwei benachbarten Zellen, erfolgt über die GJs auch die Weiterleitung elektrischer Signale, z.B. bei Herzmuskel- und Nervenzellen [Sáez 2003].

1.2.1 Grundlagen der Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions

1.2.1.1 Aufbau der Gap Junctions

Die ersten Hinweise für die Existenz einer direkten, physischen Zell-Zell-Kopplung fand Weidman 1952 in Myocardgewebeproben [Weidmann 1952]. Er vermutete, daß ein bisher unbekannter Zell-Zell-Kanal die elektrische Kopplung zwischen benachbarten Zellen bewerkstelligte. Nach und nach fand man sowohl in erregbaren (Herzmuskelzellen [Weidmann 1952, Barr 1965], Neuronen [Sipe 1976, Sloper 1978]) als auch in nicht-erregbaren Zelltypen das Phänomen der ZZK in Form von elektrischer bzw. metabolischer Kopplung [Saéz 2003].

Diese Zell-Zell-Kommunikation wird über Zell-Zell-Kanäle, sog. Gap Junction Kanäle (GJs), realisiert. Größere Ansammlungen von solchen GJs in der Zellmembran werden als Gap Junctions bzw. Gap Junction Plaques bezeichnet. Bei den GJs handelt es sich um Proteinkanäle, die zwischen zwei benachbarten Zellen ausgebildet werden und eine hydrophile, mit Wasser gefüllte Pore (Porendurchmesser ca. 2 – 4 nm [Laird 1996]) bilden. Jede der beiden benachbarten Zellen steuert jeweils einen Halbkanal (Connexon) bei, der aus 6 Protein-Untereinheiten zusammengesetzt ist (s. Abb. 5) [Goodenough 1996]. Die ZZK über GJs ist ein weit verbreiteter Mechanismus und findet sich sowohl in Invertebraten als auch in Vertebraten. Allerdings werden die Kanalproteine durch völlig unterschiedliche Genfamilien codiert: durch Connexine in Vertebraten und durch Innexine in Invertebraten. Sie besitzen keine primäre Sequenzhomologie und ihre strukturellen Ähnlichkeiten begrenzen sich gemäß dem derzeitigen Wissensstand darauf, daß die Kanalproteine vier transmembrane Bereiche und hochkonservierte Cystein-Reste in der extrazellulären Schleife gemeinsam haben (Erläuterungen zur Proteinstruktur am Beispiel der Connexine s.w.u.). Die gebildeten interzellulären Kanäle jedoch besitzen ähnliche Eigenschaften [Stout 2004]. Die Genfamilie der Connexinproteine umfaßt bislang 20 Mitglieder in der Maus und 21 im Humangenom [Goodenough 1996].

Bei Connexinen handelt es sich um Transmembranproteine mit vier α -helicalen Transmembranbereichen (M1-M4), einer zytoplasmatischen (CL – cytoplasmatic loop) und zwei extrazellulären (EL – extracellular loop) Schleifen und einem zytoplasmatischen N- und C-Terminus (s. Abb. 5). Die extrazellulären Schleifen enthalten jeweils drei, hochkonservierte Cysteinreste, deren Position zueinander entscheidend für die

Funktionalität der Gap Junctions ist. Sie sind maßgeblich an der Ausbildung der GJs beteiligt, d.h. an den interzellulären Interaktionen der Connexone zwischen den benachbarten Zellen über den extrazellulären Spalt (ca. 35 Å) hinweg. Die Zusammenlagerung der Connexine zu GJ scheint mit bestimmten Zelladhäsionssystemen gekoppelt zu sein. In mehreren Zellsystemen war die Adhäsion über Cadherin Voraussetzung für die Ausbildung von GJs. Umgekehrt führte eine blockierte ZVK dazu, daß adhärente Zellverbindungen entweder nicht gebildet wurden oder instabil waren. Üblicherweise wird bei der Nomenklatur der Connexine die Spezies, in der das Connexin (Cx) vorkommt, und das Molekulargewicht angegeben: so wird z.B. das am meisten vorkommende Connexin in der Ratte mit einem Molekulargewicht von 43 000 Da als Ratten-Connexin43 (rCx43) bezeichnet [Goodenough 1996].

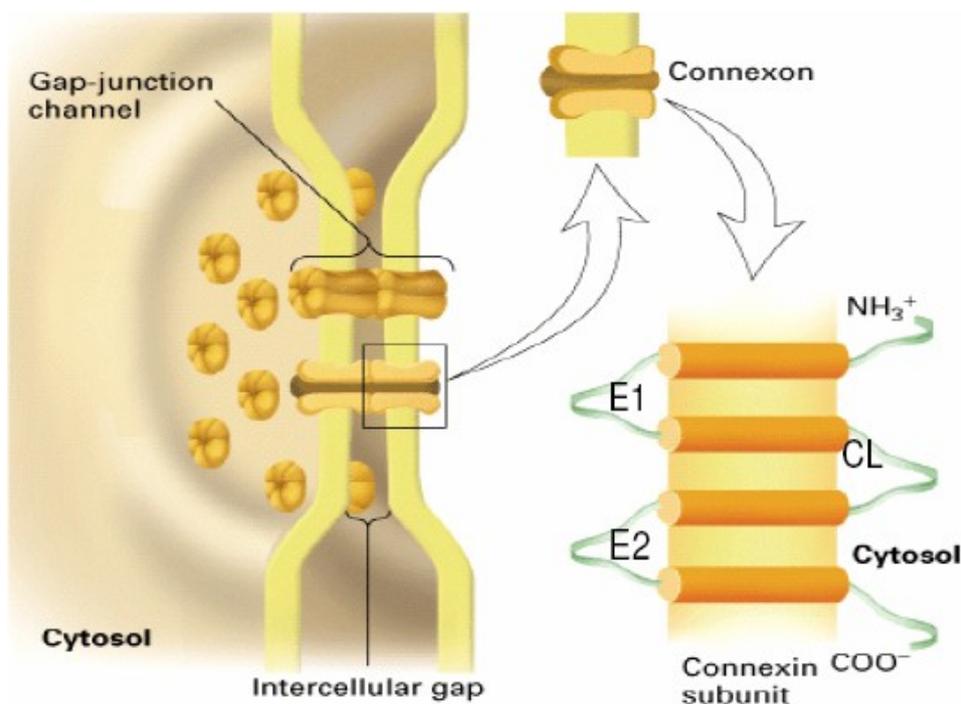


Abb. 5: Schematische Darstellung der transmembranen Struktur von Connexinen.

*E1, E2 – extrazelluläre Schleife 1 bzw. 2
CL – zytoplasmatische Schleife.*

Die chromosomale Lokalisierung der Connexingene ist in Mensch und Maus unterschiedlich (s. Beispiel Cx43 Tab. 3). Gemeinsam ist ihnen, daß sie dazu neigen, in Clustern auf bestimmten Chromosomen aufzutreten. Die genomische Struktur ist relativ einfach (Abb. 6): die 5'-nichttranslatierte Region (5'-untranslated region, 5'UTR, Exon1)

ist von der Kodierungsregion ("coding region") des Connexingens, die sich im Exon2 befindet, durch ein Intron von variabler Länge getrennt. An die Kodierungsregion schließt sich eine 3'-nichttranslatierte Region (3'-untranslated region, 3'-UTR) an. Bis jetzt sind mehrere Ausnahmen und Abweichungen von diesem einfachen Schema der Connexingenstruktur bekannt [Söhl 2004].

Tab. 3: Lokalisation von Cx43 im Genom [Söhl 2004, NCBI
<http://www.pubmed.de/data/nlm.link.html>]

Organismus	Chromosom	Lokalisation	Genname
Homo sapiens	6	6q21-q23.2	GJA1
Mus musculus	10	10 B4 10 29.0 cM	Gja1
Rattus norvegicus	20	20q11	Gja1

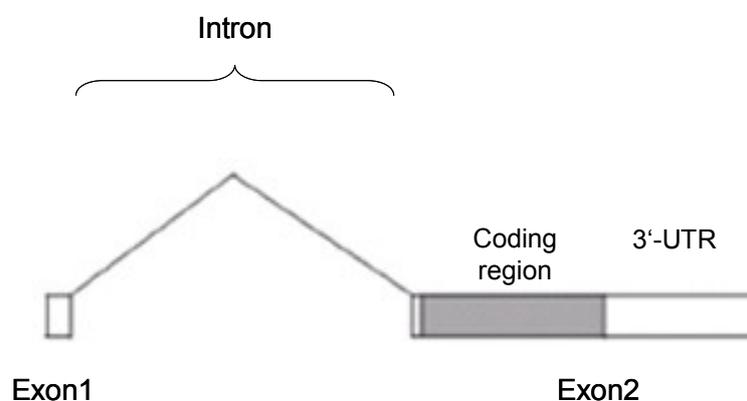


Abb. 6: Schematische Darstellung der allgemeinen Genstruktur von Connexinen (modifiziert nach [Söhl 2004]).

Exon1: 5'-UTR (untranslated region)

Exon2: Kodierungsregion (graue Box) und 3'-UTR

Intron: besitzt variable Länge.

Die Connexine sind eng miteinander verwandt (50-80 %) und die Unterschiede sind hauptsächlich in den zytoplasmatischen Anteilen der Connexinmoleküle zu finden [Goodenough 1996]. Mit Ausnahme von Cx26 handelt es sich nach derzeitigem

Wissensstand bei allen Connexinen um Phosphoproteine [Traub 1989, Sáez 2003, Lampe 2000] (s.a. 1.2.1.3).

In fast allen Geweben von Vertebraten läßt sich ZZK über GJs beobachten, wobei einige Zelltypen im ausdifferenzierten Zustand (z.B. rote Blutkörperchen, Skelettmuskeln) keine GJs mehr bilden. Die jeweiligen Stammzellen exprimieren jedoch Connexine mit anschließender Bildung von GJs [Sáez 2003]. Das Connexinexpressionsmuster unterscheidet sich je nach Gewebetyp und Entwicklungsstand. Manche Connexine werden spezifisch nur in wenigen Geweben exprimiert, andere wie z.B. Cx43 sind weit verbreitet [Carruba 2002, Lampe 2004].

Die verschiedenen Connexin-Isoformen können eine Vielfalt an unterschiedlichen Kanaltypen ausbilden, die sich in ihrer Leitfähigkeit, molekularen Permeabilität und ihrer elektrischen wie auch chemischen Sensitivität hinsichtlich des Schließ- und Öffnungsmechanismus ("gating") unterscheiden. In Abb. 7 sind die möglichen Kanaltypen je nach Kombination der Connexin-Isomeren bzw. der Connexone dargestellt, beginnend bei homomer/ homotypisch bis hin zu heteromer/ heterotypisch [Goodenough 1996, Harris 2001, Hulser 2001, Cottrell 2005].

- homomer – einheitlicher Connexintyp im Connexon
- heteromer – verschiedene Connexintypen innerhalb eines Connexons
- homotypisch – gleiche Zusammensetzung der beiden Connexone
- heterotypisch – unterschiedliche Zusammensetzung der Connexone

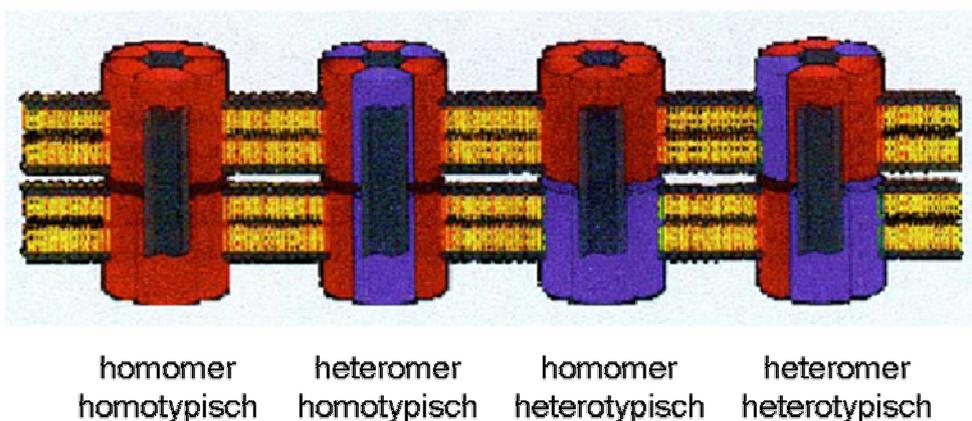


Abb. 7: Schematische Darstellung der möglichen Kanaltypen je nach Kombination von Connexintypen bzw. Connexonen (aus [Stuhmann 2004]).

Für rekombinantes Cx26 und Cx32 konnte die Bildung heteromerer Connexone gezeigt werden [Stauffer 1995], und für Cx46 und Cx50 *in vivo* an Augenlinsen von Schafen [Jiang 1996]. Heterotypische Connexon-Interaktionen wurden sowohl in mit verschiedenen Connexinen transfizierten HeLa Zellen [Elfgang 1995]) als auch in Oozytenpaaren von *Xenopus laevis* für Cx32 und Cx43 [Werner 1989], Cx26 und Cx32 [Barrio 1991] bzw. Cx37 und Cx40 [Hennemann 1992] gefunden. Nicht alle Connexin-Kombinationen führen zu funktionellen Kanälen. Für Cx31 wurden bisher nur homotypische funktionelle Kanäle beobachtet [Elfgang 1995].

1.2.1.2 Zellulärer Lebenszyklus von Connexinen

GJs sind dynamische Plasmamembran-Strukturen mit schnellem Umsatz und nicht wie früher angenommen statische, langlebige Zellstrukturen. Während ihre Anzahl, Größe und Verteilung unter physiologischen Bedingungen im Allgemeinen konstant bleibt, verläuft der Ein- und Ausbau der GJ-Proteine, der Connexine, extrem schnell [Hervé 2004]. Fallon et al. [Fallon 1981] fanden 1981 für GJs in der Mausleber eine Halbwertszeit von 5 h. In späteren *in vitro* Studien zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, daß Cx26 und Cx43 einen Umsatz von sogar nur 1,0 – 3,5 h haben [Traub 1987, Laird 1991 + 1995, Beardslee 1998].

Morphologische, genetische und funktionale Studien haben gezeigt, daß Connexine - vergleichbar zu anderen Transmembranproteinen - hinsichtlich ihrer Synthese, Zusammenlagerung ("assembly") und ihres Transports ("trafficking") dem allgemeinen sekretorischen Weg folgen [Hervé 2004]. Zunächst werden sie im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, im Golgi- und im *trans*-Golgi-Apparat weiter prozessiert, ehe sie dann mittels vesikulärem Transportmechanismus vom *trans*-Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert und dort eingebaut werden [Laird 1996]. Die Oligomerisierung der Connexine zu Connexonen erfolgt nicht im ER, sondern erst später, höchstwahrscheinlich im *trans*-Golgi-Apparat [Musil 1993].

Frühe post-translationale Modifikationen im sekretorischen Pathway beobachteten Crow et al. [Crow 1990] für Cx43 in Maus-Fibroblasten. Die Bedeutung der Phosphorylierung für den Transport bzw. die korrekte Zusammenlagerung ist bislang nicht eindeutig geklärt. Fest steht, daß Cx43 beim Einbau in die Plasmamembran die höchste Phosphorylierungsstufe erreicht hat, fraglich bleibt, ob dies Ursache, Folge oder ein gleichzeitiges unabhängiges Ereignis bzgl. der Zusammenlagerung in GJ-Plaques in der Plasmamembran ist [Laird

1996]. Entscheidend für die interzellulären Connexon-Interaktionen mit dem Ziel der Ausbildung von GJs sind die in den extrazellulären Schleifen in Vertebraten genetisch hoch konservierten Cystein-Reste. In einer Mutationsstudie tauschten Dahl et al. die Cystein-Reste gegen Serin aus und beobachteten einen totalen Funktionsverlust der Connexine [Dahl 1992].

Der Ausbau der GJ-Plaques aus der Plasmamembran sowie deren intrazellulärer Abbau ist bislang wenig verstanden. In verschiedenen Studien fand man intrazelluläre Doppelmembranstrukturen, sog. ringförmige GJs. Dies legt nahe, daß die GJs als Ganzes ausgebaut werden. Es gibt bislang keine Hinweise, daß GJs oder ihre Connexine wiederverwertet und wieder in die Plasmamembran eingebaut werden [Laird 1996]. Der Abbau der GJs und Connexine erfolgt entsprechend bisherigen Studienergebnissen offenbar auf lysosomalem und/oder proteasomalem Weg [Laird 1996, Berthoud 2004]. Verschiedene Arbeitsgruppen fanden GJs und/oder Connexine in Lysosomen [Rahman 1993, Naus 1993]. Andere zeigten, daß der Einsatz von Inhibitoren lysosomaler bzw. proteasomaler Enzyme in einer Akkumulation von intrazellulärem Cx43 in BICR-M1Rk-Zellen bzw. in BWEM-Zellen resultiert [Laird 1996].

1.2.1.3 Regulation der Zell-Zell-Kommunikation

Ursprünglich hatte man angenommen, daß es sich bei den GJs um einfache, nicht-selektive Poren handelt [Cottrell 2005]. Nach und nach entpuppte sich dieser Weg der interzellulären Kommunikation als komplexer, vielseitiger und hochregulierter Prozess. Ausschlaggebend für die Feinregulation der interzellulären Kopplung ist [Hossain 2000, Cascio 2005, Cottrell 2005]:

- 1) die Menge an Connexonen bzw. GJs in der Plasmamembran,
- 2) deren funktionaler Zustand (offener oder geschlossener Kanal) sowie
- 3) deren Permeabilität und
- 4) deren Kanaltyp.

Allgemein determinierend hierfür sind die Kanalproteine, die Connexine, sowie ihre Interaktionen mit Proteinen und / oder Lipiden.

Die Menge an Connexonen bzw. GJs in der Plasmamembran resultiert aus der Summe diverser zellulärer Prozesse (Expression, Transport, Zusammenlagerung und Umsatz der Connexine; s.a. 1.2.1.2). Nach der Expression der Connexine muß ein korrekter Transport

der Connexine zur Plasmamembran, ein korrekter Einbau der Connexine in die Plasmamembran sowie eine korrekte Zusammenlagerung in der Plasmamembran gewährleistet sein. Diese Prozesse sowie der Ausbau aus der Plasmamembran ("internalization") und der intrazelluläre Abbau der GJs stellen relativ schnelle zelluläre Abläufe dar, die innerhalb weniger Stunden von einem Connexinmolekül (Halbwertszeiten s. 1.2.1.2) durchlaufen werden und ebenfalls sehr fein reguliert sind [Cascio 2005]. An ihrer Regulation – mit Ausnahme der Expression – sind posttranslationale Modifikationen, insbesondere Phosphorylierungen, beteiligt. Dieser Mechanismus der Phosphorylierung spielt auch in der Regulation des weiter unten erläuterten Schließ- und Öffnungsmechanismus der GJs ("gating") eine entscheidende Rolle [Laird 2005, Moreno 2005, Solan 2005].

Substanzen wie cAMP und der Tumorpromotor 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) führen durch Aktivierung von Phosphorylierungsreaktionen an Cx43 zu einer erhöhten bzw. verminderten GJ-Menge in der Plasmamembran. Ein erhöhter interzellulärer cAMP-Spiegel erhöht die Anzahl und Größe an GJs in der Plasmamembran und dadurch die ZZK. Im Falle von TPA werden alle GJs internalisiert bzw. neu synthetisiertes Cx43 wird nicht mehr in die Membran eingebaut. Daher werden in Immunofluoreszenzexperimenten die GJs im Zytoplasma der Zellen detektiert (s. Abb. 8) [Lampe 2004, Ale-Agha 2002].

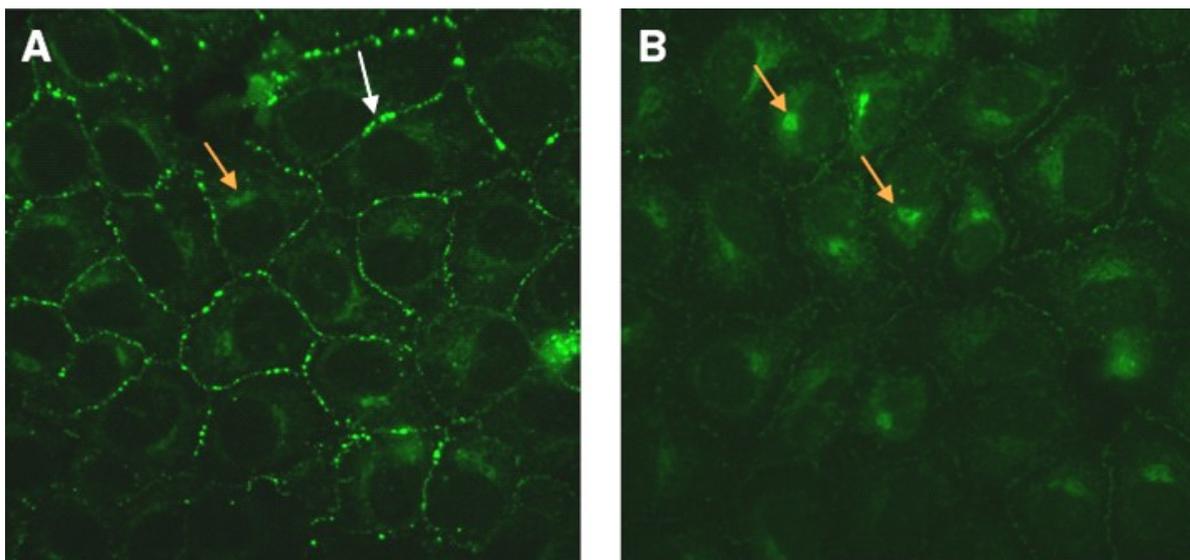


Abb. 8: Immunofluoreszenzaufnahmen von Cx43 in TPA behandelten Rattenleber-epithelzellen (WB-F344) (aus [Ale-Agha 2003]). Internalisation von Cx43. **A** Kontrollzellen **B** TPA behandelte Zellen. Cx43 grün, weißer Pfeil: Cx43 in Plasmamembran, oranger Pfeil: Cx43 im Zytoplasma.

Der Einbau von GJs in die Plasmamembran ist jedoch nicht alleinige Voraussetzung für eine intakte interzelluläre Kommunikation. Die eingebauten Kanäle müssen auch funktionsfähig sein. Ihr Öffnungsgrad wird durch pH, Ca^{2+} -, Glucosespiegel, Membranpotential und Phosphorylierungen an den Connexinen beeinflusst [Cascio 2005]. In unterschiedlicher Weise verändern diese Faktoren den Schließ- und Öffnungsmechanismus, das "gating", der GJs. Im Allgemeinen werden beim Schließ- und Öffnungsmechanismus von Membrankanälen Konformationsänderungen an den Kanalproteinen induziert, die rasche und reversible Änderungen der Kanaleigenschaften, wie z.B. der Leitfähigkeit oder Permeabilität, verursachen. Neben den beiden extremen Kanalzuständen – geschlossen und ganz geöffnet – sind mehrere Öffnungs-, d.h. Kommunikationsgrade möglich [Moreno 2005] (Abb. 9).

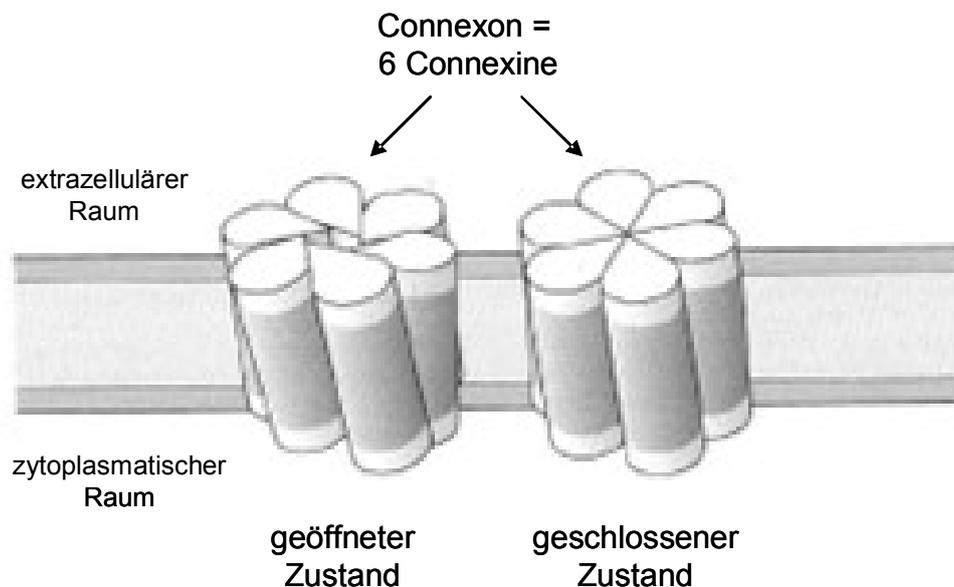


Abb. 9: Schematische Darstellung des vermuteten Schließ-Öffnungsmechanismus von Connexinen (modifiziert nach [Söhl 2004]).

Wie bereits erwähnt sind die meisten Connexine Phosphoproteine, d.h. sie können post-translational phosphoryliert werden. Diese Modifikation ist durch zahlreiche Stimuli induzierbar und stellt einen sehr wichtigen Regulationsmechanismus der ZZZ, sowohl für die Funktionalität der GJs als auch für Transport, Zusammenlagerung, Internalisation und Abbau der Connexine, Connexone bzw. GJs dar [Lampe 2004, Moreno 2005, Solan 2005, Laird 2005]. Mögliche Phosphorylierungsstellen in Connexinen sind Serin-, Thyrosin- und

Threoninreste, die von einer Vielzahl unterschiedlicher Kinasen phosphoryliert werden können (s. Abb. 10). Der zytoplasmatische C-Terminus scheint der wichtigste Molekülabschnitt für die Phosphorylierungen an Connexinen zu sein, wengleich Cx56 im Gegensatz zu Cx43 auch zusätzlich innerhalb der zytoplasmatischen Schleife phosphoryliert werden kann [Berthoud 1997, Lampe 2004].

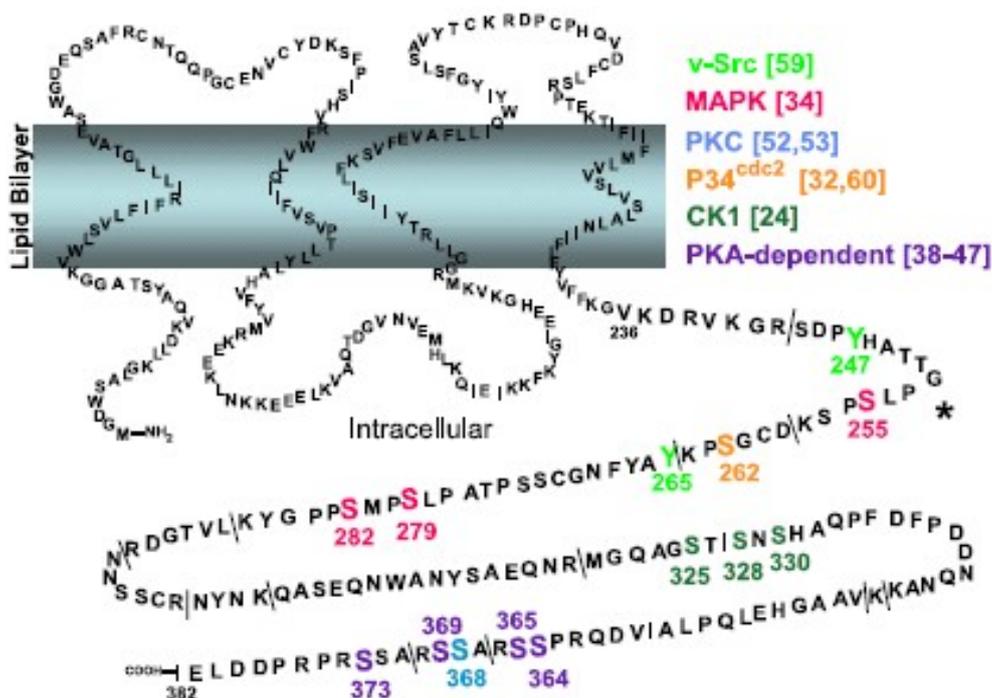


Abb. 10: Phosphorylierungsstellen in Cx43. Spezifische Phosphorylierungsstellen bestimmter Kinasen sind farbig markiert. Die Trennstriche repräsentieren Spaltstellen nach Trypsin-Behandlung. Das mit * markierte Fragment ist in S-Phase-Zellen signifikant vermehrt phosphoryliert verglichen zu G₀-Phase-Zellen (nach [Solan 2005]).

In Experimenten zur Bedeutung des C-Terminus am Beispiel von Cx43 (Aminosäuren 227-382) wurden *Xenopus* Oozyten mit einem C-terminal gekürzten Cx43-Mutanten transfiziert. Die inhibierende Wirkung der Tyrosinkinase v-Src auf die ZZK konnte erst nach der unabhängigen Expression der C-terminalen Region (Aminosäuren 246-382) in den Cx43-Mutanten exprimierenden Oozyten beobachtet werden. Dies lieferte einen klaren Hinweis darauf, daß die Phosphorylierungsreaktionen und die damit verbundenen Veränderungen der ZZK vom C-Terminus abhängen [Zhou 1999]. Je nach Cx-Isotyp variiert die Länge und die Sequenz des C-Terminus. Cx26 stellt eine Ausnahme dar: es ist kein Phosphoprotein [Traub 1989], bildet aber dennoch funktionsfähige GJs. Ebenso sind

C-terminal gekürzte Cx43-Mutanten in der Lage, funktionelle GJs zu bilden, allerdings besitzen sie veränderte elektrophysiologische und Permeabilitätseigenschaften. Phosphorylierungen am N-Terminus der Connexine sind bislang nicht bekannt.

Cx43 ist ein weit verbreitetes und das bisher am intensivsten untersuchte Connexin. Es kann an mindestens 12 der 21 Serin- und 2 der 6 Thyrosinreste in der C-terminalen Region phosphoryliert werden [Lampe 2004] (s. Abb. 10).

Verschiedene Modulatoren der ZZZ, zu denen Onkogene (ras, raf, src, neu, mos), Tumorpromotoren (Phorbolster, DDT, Phenobarbital, Saccharin) und Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF, VEGF) zählen, bewirken, meist nach Aktivierung bestimmter Signalkaskaden, Phosphorylierungen an unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen der Connexine. Sie aktivieren Kinasen, aber auch Phosphatasen, die ebenfalls den Phosphorylierungszustand von Connexinen verändern und damit die ZZZ beeinflussen können. Eine Phosphorylierungsstelle kann auch von mehreren Kinasen phosphoryliert werden: beispielsweise wird S255 im Cx43-Molekül (s. Abb. 10) sowohl von MAPK als auch von Cyclin B/p34^{cdc2} phosphoryliert [Trosko 2001, Lampe 2004, Solan 2005] (Tab. 4).

Tab. 4: Phosphorylierung unterschiedlicher Phosphorylierungsstellen im C-Terminus [Lampe 2004].

Phosphorylierungsstelle	verantwortliche Kinase oder Signalweg
Y247	pp60src
S255	MAP-K und Cyclin B/p34 ^{cdc2}
S262	Cyclin B/p34 ^{cdc2}
Y265	pp60src
S279	MAP-K
S282	MAP-K
S325	CK1
S328	CK1
S330	CK1
S364	PKA oder PKA-abhängige Kinasen
S365	FSH Stimulation (PKA?)
S368	PKC
S369	FSH Stimulation (PKA?)
S373	FSH Stimulation (PKA?)

Einige Modulatoren wirken über Rezeptoren (z.B. EGF, PDGF), andere wie das Onkogen src besitzen selbst Kinaseaktivität. Viele Stimuli aktivieren den MAPK-Signalweg (s. Abb. 11A), der zu einer Cx43-Phosphorylierung und in der Folge meist zur Inhibierung der ZZK führt (s. Abb. 11B). Die ligandeninduzierte Aktivierung der EGF- und PDGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Aktivität verursachte eine rasche, vorübergehende Inhibierung der ZZK und zugleich eine erhöhte Cx43-Phosphorylierung an Serinresten [Hossain 1998, Kanemitsu 1993, Rivedal 2001]. Im Falle des EGF-Rezeptors war dies unabhängig von der Proteinkinase C (PKC)-Aktivität, jedoch abhängig von der Aktivierung des MAPK-Signalwegs [Kanemitsu 1993]. In den EGF behandelten Zellen phosphorylierte die MAPK vermutlich direkt Cx43. Die Wirkung von PDGF gestaltet sich komplexer. Zunächst spielen offensichtlich zwei Serinprotein-Kinasen, PKC und MAPK, in der Vermittlung der PDGF-Wirkung auf die ZZK eine Rolle. Cx43 besitzt für beide Kinasen Phosphorylierungsstellen, dennoch ist bisher nicht klar, ob diese Kinasen Cx43 direkt phosphorylieren. Allerdings sind neben PKC und MAPK offensichtlich weitere Signalkomponenten von Bedeutung und der jeweils ausgelöste Signalweg hängt vom Zelltyp ab [Hossain 2000]. Auch die Wirkung von EGF variiert je nach Zelltyp: in Rattenleberepithelzellen wurde die ZZK infolge von MAPK (ERK1/2) vermittelter Cx43-Phosphorylierung an S255, S279 und S282 blockiert [Lau 1996, Warn-Cramer 1998]. In humanen epithelialen Nierenzellen war die ZZK trotz Aktivierung der MAPK und Cx43-Phosphorylierung nicht erniedrigt [Vikhamar 1998]. Auch Vitamin K3 (Menadion) verminderte die ZZK durch eine MAPK vermittelte Cx43-Phosphorylierung nach Aktivierung des EGF-Rezeptors [Klotz 2002]. Die Veränderung des Phosphorylierungszustands von Cx43 durch die Behandlung mit dem Tumorpromotor TPA führte in vielen Zellen (z.B. WB-F344) nicht nur durch Schließen der Kanäle, sondern durch die induzierte Internalisation der GJs ins Zytoplasma zu einer totalen Inhibierung der ZZK [Ale-Agha 2002, Lau 1996, Hossain 1998, Cruciani 1997]. Die PKC ist der interzelluläre Mediator von TPA und führt zu einer Phosphorylierung von Cx43 an S368 [Lampe 2000]. Allerdings ist bislang nicht geklärt, ob PKC alleine oder eventuell auch MAPK-induzierte Reaktionen daran beteiligt sind [Hossain 2000]. Ruch et al. [Ruch 2001] beobachteten in WB-F344 (Rattenleberepithelzellen) eine TPA induzierte MAPK (ERK1/2)-Aktivierung und anschließende Cx43-Phosphorylierung mit gleichzeitiger Inhibierung der ZZK. Möglicherweise sind mehrere Signalwege bzw. Signalkomponenten involviert.

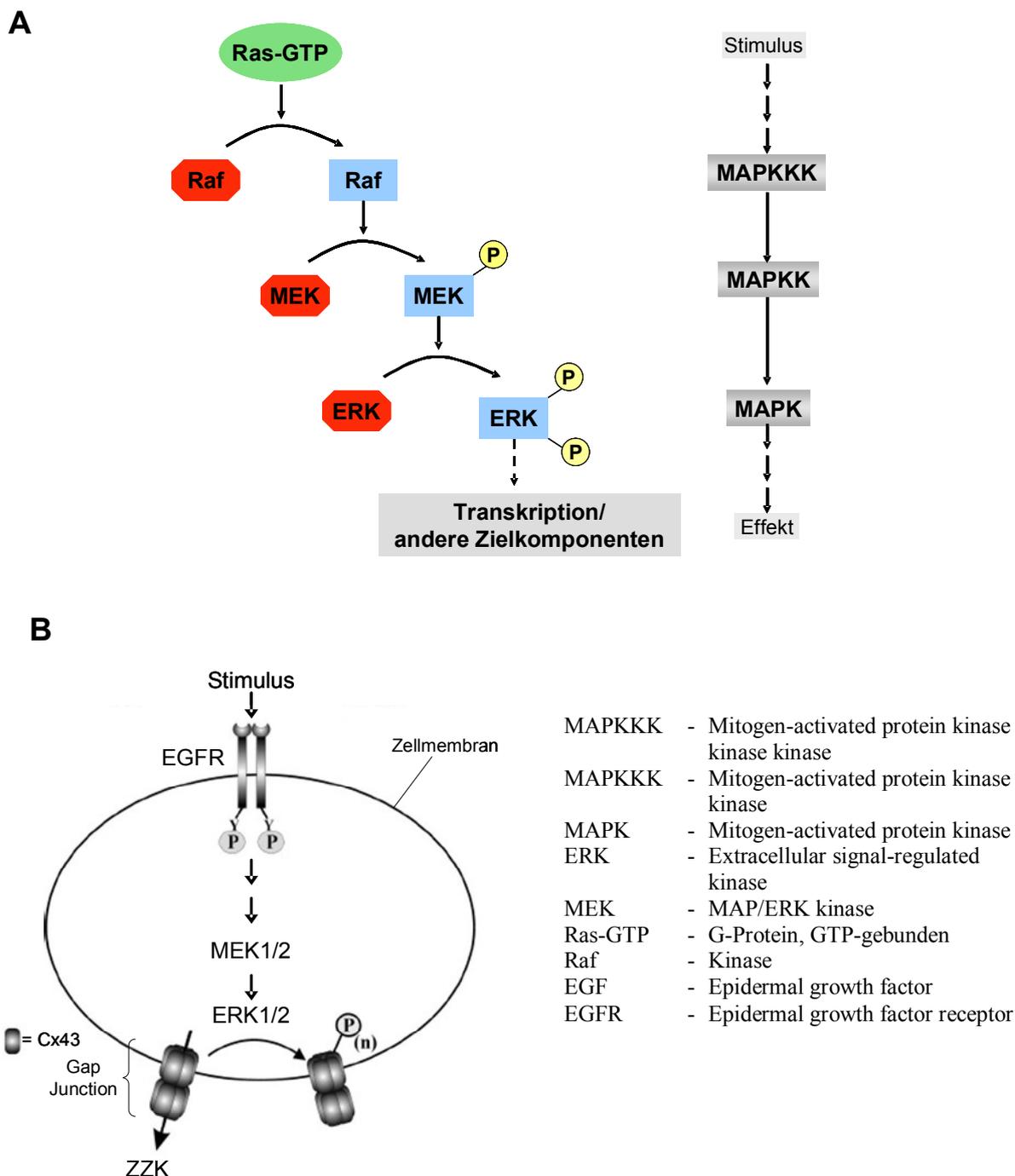


Abb. 11: MAPK-Signalweg.

- A** Darstellung des allgemeinen Schemas des MAPK-Signalwegs und ein Beispiel für einen MAPK-Signalweg mit ERK als MAPK (modifiziert nach [http://www.cellsignal.com/category.asp?catalog_name=CellSignal&category_name=MAPK+Signaling])
- B** Induktion des MAPK-Signalwegs durch Aktivierung des EGFR, anschließende Phosphorylierung von Cx43 in Gap Junctions in der Zellmembran. Daraus resultiert eine Hemmung der ZZK (modifiziert nach [Abdelmohsen 2003]).

Das Onkogen src löst über eine direkte Phosphorylierung der Tyrosinreste Y265 und Y247 im C-Terminus von Cx43 eine Inhibierung der ZBK aus. Die MAPK spielt hier offensichtlich keine Rolle. Die alleinige Phosphorylierung von Y265 reicht nicht aus, um die GJs zu schließen. Vielmehr scheint nach bisherigen Untersuchungen src zunächst mit einer SH3-Domäne an eine prolinreiche Region im Cx43 (P274-P284) zu binden, so daß src und Cx43 sich räumlich sehr nahe kommen. Nun kann Y265 durch die src-Kinase-Domäne phosphoryliert werden. Anschließend wird die Bindung zwischen den beiden Molekülen durch die Interaktion einer SH2-Domäne von src und dem phospho-Y265 stabilisiert. Daraufhin wird Y247 phosphoryliert und die Inhibierung der ZBK ausgelöst. Dieser Ablauf zeigt, daß die Phosphotyrosine wahrscheinlich unterschiedliche Aufgaben haben: phospho-Y265 ist wichtig für die Interaktion von Cx43 und src, phospho-Y247 hingegen erzwingt das Schließen der Cx43-GJs [Lampe 2004, Giepmans 2004].

Die interzelluläre Kommunikation wird außerdem limitiert und kontrolliert durch die Permeabilität (Permeabilität und Selektivität) und die Leitfähigkeit der GJs. Bestimmende Faktoren sind die Größe der Kanalöffnung (Pore) und die elektrostatische Ladung innerhalb sowie im Eingangsbereich dieser Pore. Außerdem spielen der jeweilige Cx-Isotyp und der Kanaltyp (s. 1.2.1.1) eine Rolle [Lampe 2004, Cottrell 2005]. Beispielsweise wurde ATP von Zellen mit Cx43-Kanälen 300 mal, ADP und AMP 8 mal besser ausgetauscht als in Zellen mit Cx32-Kanälen [Goldberg 2002]. Elfgang et al. beobachteten, daß der Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow homomere Kanäle verschiedener Connexine (Cx26, Cx31, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43 bzw. Cx45), die in HeLa-Zellen exprimiert wurden, passieren konnte. Propidiumiodid und Ethidiumbromid dagegen wurden kaum oder gar nicht über Cx31- bzw. Cx32-Kanäle, aber über Kanäle anderer Connexine ausgetauscht [Elfgang 1995].

Heterogen zusammengesetzte GJs weisen oftmals ein anderes Verhalten hinsichtlich des Schließ-Öffnungsmechanismus, der Leitfähigkeit, Permeabilität und ihrer Regulation auf als homogene GJs [Elfgang 1995, Mills 1995, Cottrell 2005].

Für eine umfassende Sicht auf die Regulationsmechanismen, die der interzellulären Kommunikation zugrunde liegen, dürfen die Connexone bzw. GJs nicht isoliert betrachtet werden, sondern müssen im subzellulären Kontext gesehen werden. Die GJs sind in die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran eingebettet. Daher ist es denkbar, daß neben den oben erläuterten Regulationsmechanismen der interzellulären Kommunikation auch Protein-Lipid-Interaktionen bzw. die Zusammensetzung der Lipiddoppelschicht eine Rolle

spielen. Die dynamische Natur der Komponenten der Lipiddoppelschicht, insbesondere der Proteine und Lipide, führt zur gegenseitigen Beeinflussung und Veränderung von Struktur und Funktion [Cascio 2005, Giepmans 2004]. Auch sind weitere Protein-Protein-Interaktionen, abgesehen von denen zwischen Connexinen und Kinasen, möglich. Wie weiter oben erwähnt, beeinflussen Zelladhäsionsmoleküle die ZZK wie es für E- und N-Cadherin in epidermalen Mauszellen bzw. in Novikoff Zellen beschrieben ist [Laird 1996].

Am Beispiel von Cx43 konnte gezeigt werden, daß die Cx43-Phosphorylierung und damit die ZZK eng mit dem Zellzyklus verknüpft und je nach Zellzyklusphase hochreguliert ist [Lampe 2004]. Beim Übergang von der G₀-Phase in die S-Phase nimmt die ZZK ab, einhergehend mit einer Zunahme der Cx43-Phosphorylierung und in Abhängigkeit von PKC. In G₁/S ist die ZZK relativ niedrig, nimmt in der S-Phase dann zu, um in G₂/M drastisch abzunehmen. Diese extreme Abnahme der ZZK während G₂/M ist mit einer erhöhten p34^{cdc2}-Kinase-abhängigen Phosphorylierung von Cx43 und Internalisierung der GJs korreliert. Für einen normalen Verlauf des Zellzyklus sind diese Veränderungen in der ZZK offensichtlich erforderlich.

1.2.2 Funktion und Bedeutung der Zell-Zell-Kommunikation

Wie eingangs bereits erläutert ermöglicht die ZZK via GJs die passive Diffusion hydrophiler Substanzen unterschiedlichster Natur (< 1000 Dalton) zwischen benachbarten Zellen. Darüberhinaus werden auch elektrische Signale weitergeleitet. Die Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen) sind im Bereich der Glanzstreifen durch GJs verbunden, über die die im Sinusknoten des Herzens entstandene Erregung zunächst fächerförmig über die Vorhöfe des Herzens ausgebreitet werden [Faller 2004, S.242]. In Kardiomyozyten werden Cx40, Cx43 und Cx45 exprimiert. Veränderungen in der Cx-Expression oder in der GJ-Organisation bzw. -Struktur sind ein auffälliges Begleitmerkmal von menschlichen Herzerkrankungen, die durch arrhythmische Tendenzen gekennzeichnet sind [Severs 2004]. Die ZZK über GJs ist für viele verschiedene zelluläre Funktionen wie z.B. die Regulation von Wachstum, Differenzierung und Entwicklung der Zelle von Bedeutung. Mutationen in Connexinogenen werden mit einer Vielzahl von menschlichen Erkrankungen wie z.B. kardiovaskulären Anomalien, peripheren Neuropathien, Taubheit / Schwerhörigkeit, Hauterkrankungen, Katarakt und Krebs in Verbindung gebracht [Kelsell 2001, Carruba 2002, Gerido 2004, Wei 2004]. Knock-out von Cx43 führt bei Mäusen zur neonatalen Letalität und daher sind Untersuchungen bzgl. weiterer Auswirkungen solcher Mutationen nicht möglich [White

2001]. Die meist autosomal dominante, X-gebundene, erbliche Charcot-Marie-Tooth-Krankheit (CMT) wird mit Cx32-Mutationen assoziiert. Hierbei handelt es sich um eine meist im Kindesalter beginnende, chronisch fortschreitende neurale Muskeldystrophie, die durch die Degeneration der peripheren Nerven sowie einer Hypertrophie der SCHWANN-Scheiden gekennzeichnet ist. CMT-Patienten werden mit normalen Muskeln geboren, die dann atrophieren, da die von CMT beeinträchtigten Nerven die Befehle des Gehirns für bestimmte Muskelbewegungen nicht exakt übertragen können [Gerido 2004, http://www.kaikracht.de/cmt/text_cr1.htm; Hoffmann-La Roche 2003, S.307f].

Cx26 ist wie Cx32 und Cx43 ein in vielen Geweben exprimiertes Connexin, dessen dominante Mutation zu epidermalen Erkrankungen, z.B. einer *Keratosis palmoplantaris*, einer erblichen Verhornungsstörung mit Verdickung der Haut an Handtellern und Fußsohlen, führt [Kelsell 2001, Gerido 2004, Hoffmann-La Roche 2003, S.993]. Außer bei epidermalen Erkrankungen scheint eine Mutation des in der Gehörgangsschnecke (*cochlea*) hoch-exprimierten Cx26 auch bei der genetisch bedingten nicht-syndromalen, sensorineuralen Schwerhörigkeit eine Rolle zu spielen [Gerido 2004, Kelsell 2001, Petersen 2001, <http://www.crg.es/deafness>].

Studien zeigten, daß auch Mutationen an den Innenohr-Connexinen Cx30 bzw. Cx31 non-syndromale Schwerhörigkeit verursachen [Kelsell 2001]. Je nach Mutationsart sind für Cx31 unterschiedliche Krankheitsbilder beobachtet worden: neben der non-syndromalen Schwerhörigkeit können auch Hauterkrankungen (*Erythrokeratoderma variabilis*, EKV) oder Schwerhörigkeit in Verbindung mit einer Neuropathie die Folge sein. Im Gegensatz zu den von Cx26-Mutationen ausgelösten Hauterkrankungen geht die durch eine Cx31-Mutation verursachte EKV nicht mit der Beeinträchtigung des Hörvermögens einher.

Mutationen von Cx46 bzw. Cx50 (Connexine in der Linse) führen zu autosomal dominant vererbtem kongenitalen Katarakt beim Menschen [Kelsell 2001, Gerido 2004]. Dieser Zusammenhang von kongenitalem Katarakt und Mutationen an Cx46 und/oder Cx50 wurde auch durch knock-out-Experimente in Mäusen gefunden. Allerdings ist der Vererbungsgang bei Mäusen autosomal rezessiv [Gerido 2004].

Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, daß die ZZK auch bei Gewebeverletzungen, in der Entzündungsantwort und für Immunzellen bzw. die Immunantwort von Bedeutung sein kann [De Maio 2002, Chanson 2005, Oviedo-Orta 2004, Wong 2004].

Vieles weist daraufhin, daß die ZZK eine notwendige, wenn nicht sogar unabdingbare biologische Funktion für die Regulation der Wachstumskontrolle, Differenzierung und Apoptose normaler Stammzellen ausübt [Trosko 2002]. Daher spielt sie offensichtlich eine entscheidende Rolle in der Kanzerogenese, allerdings nicht in der Initiationsphase. Krebszellen zeichnen sich durch den Verlust dieser regulatorischen Prozesse aus: sie wachsen unkontrolliert, differenzieren nicht mehr aus und zeigen auch kein apoptisches Verhalten. Bei fast allen Tumorzellen und durch Onkogene transformierten Zellen ist die heterologe ZZK komplett inhibiert (Abb. 12). Während der Krebsentstehung ist es offensichtlich erforderlich, daß sich die Tumorzelle dem Einfluß der sie umgebenden Zellen entzieht und dadurch nicht mehr unter der Wachstumskontrolle normaler Zellen steht. Sie realisiert dies durch den Verlust der heterologen ZZK mit den normalen Nachbarzellen, indem keine Connexine mehr exprimiert werden oder keine funktionsfähigen GJs gebildet werden. Die Transformation von Zellen ist eindeutig mit einer verminderten ZZK zwischen den transformierten und den normalen Nachbarzellen korreliert (heterologe ZZK). Darüberhinaus ist oftmals auch die homologe ZZK zwischen den Tumorzellen bzw. zwischen transformierten Zellen vermindert [Hotz-Wagenblatt 1993, Trosko 2001 + 2002, Vine 2002].

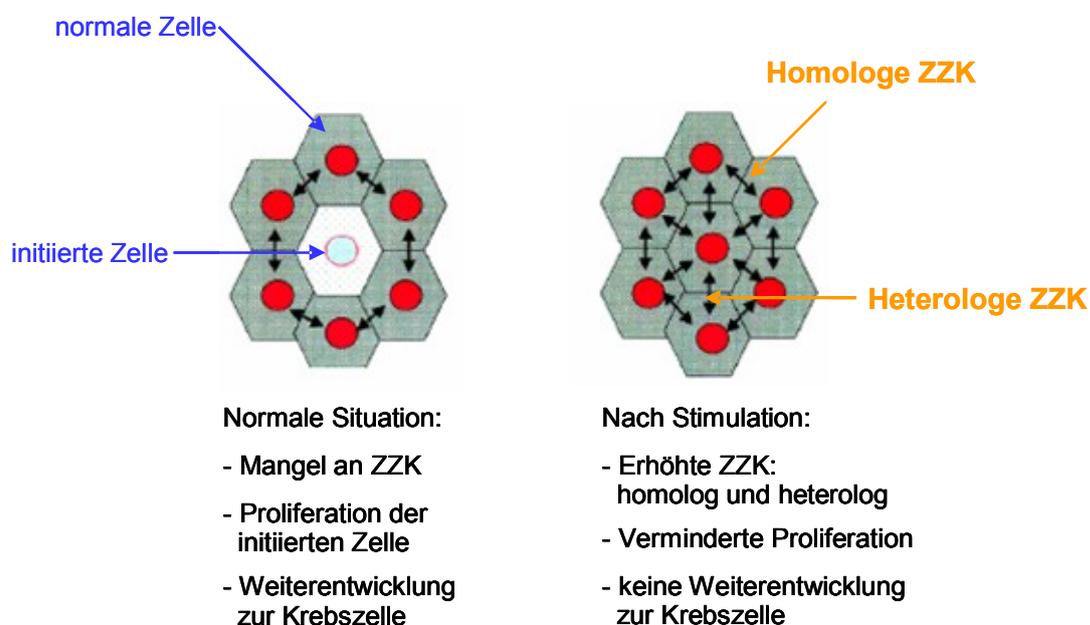


Abb. 12: Homologe und heterologe ZZK (modifiziert nach [Bertram 2004]). Situation bei carcinogen-induzierter Zelle (weiss). Normale Zellen (grau). Zellkern (rot).

Durch die Transfektion von Krebszellen, von chemisch transformierten oder von src-transformierten Zellen mit Connexinen konnte in verschiedenen Experimenten die heterologe ZZK wiederhergestellt werden. Zugleich war die Wiederherstellung der ZZK mit einer Suppression des unkontrollierten Wachstums und der Tumorgenese in diesen Untersuchungen assoziiert [Trosko 2001, Hotz-Wagenblatt 1993, Mehta 1999]. Ähnliche Effekte wurden durch den Einsatz von Stimulatoren der ZZK (z.B. Retinoide, Carotinoide) oder anti-onkogenen Wirkstoffen (z.B. Lovastatin) erreicht [Livny 2002, Pung 1993, Zhou 2003]. Diese Daten legen nahe, daß Connexine als Tumorsuppressoren fungieren. Daher hat die ZZK in den letzten Jahren mehr und mehr an Bedeutung als potentieller Ansatzpunkt in der Chemoprävention und –therapie gewonnen.

1.2.3 Wirkung von Carotinoiden auf die Zell-Zell-Kommunikation

Eine eindeutige Korrelation existiert zwischen der Stimulation der Cx43 Expression durch Carotinoide und der erhöhten Wachstumskontrolle sowie der Inhibierung der neoplastischen Transformation karzinogen-initiiertes Zellen nach Carotinoid-Behandlung [Hossain 1993, Bertram 1993 + 1995, Hieber 2000, Livny 2002]. β -Carotin und Canthaxanthin verhinderten in der Post-Initiationsphase der Kanzerogenese die neoplastische Transformation von Zellen, die mit dem chemischen Carcinogen 3-Methylcholanthren initiiert worden waren [Bertram 1993]. Allerdings war dies ein reversibler Effekt, denn 3-5 Wochen nach Entfernen der Carotinoide aus dem Inkubationsmedium der Zellen, wurde ein weiteres Wachsen der transformierten Zellen detektiert. Als Mechanismus wird vermutet, daß die Carotinoide die Cx43-Expression stimulieren und dadurch zunächst die homologe ZZK zwischen den normalen Zellen, aber zusätzlich auch die heterologe ZZK zwischen der initiierten Zelle und den sie umgebenden normalen Zellen erhöht wird. In immunohistochemischen Experimenten wurden nach einer Carotinoid-Behandlung von Zellkulturen, die aus normalen und vereinzelt initiierten Zellen zusammengesetzt waren, mehr GJs in der Plasmamembran beobachtet. Durch die Aufrechterhaltung der heterologen ZZK kann das Wachstum der initiierten Zelle weiterhin kontrolliert werden. Sobald die Carotinoide entfernt werden, nimmt die heterologe ZZK infolge fehlender Stimulation der Cx43-Expression ab. Die initiierte Zelle unterliegt keiner Wachstumskontrolle mehr durch die normalen Nachbarzellen, wächst ungehemmt und kann sich zur transformierten Zelle entwickeln.

Die Effekte der Carotinoide auf die ZZK sind unabhängig von ihrer Provitamin A-Aktivität bzw. ihrem antioxidativen Potential [Zhang 1991, Bertram 1993, Stahl 1997]. Nicht alle Carotinoide stimulieren die ZZK. Einige beeinflussen die ZZK nur geringfügig oder überhaupt nicht [Stahl 1997, Zhang 1991]. Zhang et al. fanden in Mausfibroblasten (C3H/10T1/2) mittels Fluoreszenzfarbstoff-Transfer-Assay unterschiedlich starke stimulatorische Effekte für verschiedene Carotinoide in der Reihenfolge β -Carotin > Canthaxanthin > Lutein > Lycopin > α -Carotin. Dahingegen beeinflusste Methylbixin [Zhang 1991, Bertram 1993] ebenso wenig die ZZK wie Capsorubin [Stahl 1997]. Die unterschiedliche Wirkweise von Carotinoiden auf die ZZK beruht zumindest teilweise auf strukturellen Charakteristika. Stahl et al. [Stahl 1997] zeigten, daß Carotinoide mit 6-Ringsystemen die ZZK stärker stimulierten als solche mit 5-Ringsystemen (Dinor-Canthaxanthin < Canthaxanthin). Die Position eines Sauerstoff-Substituenten hatte hingegen wenig Einfluß: die 3-Hydroxy- und 4-Hydroxy-Derivate des β -Carotin differieren kaum in ihrer Wirkung auf die ZZK. Canthaxanthin und Echinenon, die sich hinsichtlich der Anzahl der Sauerstoff-Substituenten unterscheiden, stimulierten in gleichem Maße die ZZK in C3H/10T1/2 Zellen [Stahl 1997].

Der Mechanismus, der der Wirkung der Carotinoide auf die ZZK zugrunde liegt, ist bislang nicht eindeutig geklärt. Carotinoide beeinflussen die ZZK nicht immer auf die gleiche Weise. Retinoide sind ebenfalls als starke Stimulatoren der ZZK bekannt. Provitamin A-Carotinoide, wie beispielsweise β -Carotin, entfalten ihre Wirkung aber bisherigen Ergebnissen zufolge nicht über den Metabolismus zu ihren Retinoid-Derivaten. [Hieber 2000, Bertram 2004]. Für andere Carotinoide, z.B. Canthaxanthin und Lycopin, wird angenommen, daß nicht unbedingt die Muttersubstanzen, sondern Metabolite die Stimulation der ZZK vermitteln. Hanusch et al. fanden, daß die biologische Aktivität von Canthaxanthin auf die ZZK zumindest teilweise durch die Bildung des Oxidationsderivats 4-Oxo-Retinsäure (all-trans- und 13 cis-Isomer) vermittelt wird [Hanusch 1995]. Hierbei handelt es sich um ein Produkt der zentralen, oxidativen Spaltung von Canthaxanthin. Dieses Spaltprodukt nimmt vermutlich über den Retinoid-Signalweg Einfluß auf die ZZK [Teicher 1999]. Produkte der exzentrischen Spaltung von Canthaxanthin, sog. Apo-Carotinoide, zeigten keine stimulatorische Aktivität auf die ZZK [Teicher 1999]. Im Falle von Lycopin jedoch verhält es sich anders: ein Spaltprodukt der zentralen Spaltung von Lycopin, acyclo-Retinsäure, stimulierte die ZZK nur schwach. Dahingegen wies das durch Oxidation gebildete Apo-Carotinoide 2,7,11-Trimethyl-tetradecahexaen-1,14-dial fast die gleiche biologische Aktivität wie die Muttersubstanz Lycopin auf. Daher wird vermutet,

daß an der stimulatorischen Wirkung von Lycopin zumindest teilweise auch Metaboliten von Lycopin beteiligt sind. β -Carotin und Canthaxanthin stimulierten die ZZK in C3H/10T1/2 Zellen durch eine Erhöhung der Cx43-Expression [Bertram 1993]. Lycopin erhöhte ebenfalls signifikant die Cx43-Expression in menschlichen Mundhöhlenkrebszellen (KB-1 Zellen). β -Carotin war jedoch weniger potent bzgl. der Stimulation der ZZK in diesen Tumorzellen [Livny 2002]. Auch die Dosis spielt eine Rolle bei der Wirkung der Carotinoide auf die ZZK [Zhang 1991, Bertram 1993, Krutovskikh 1997]. In C3H/10T1/2 Zellen stimulierten β -Carotin, Canthaxanthin, Lutein und Lycopin die ZZK dosisabhängig [Zhang 1991, Bertram 1993]. In der Leber von männlichen F344-Ratten erhöhten α -Carotin, β -Carotin und Lycopin die ZZK *in vivo* signifikant in einer Konzentration von 5mg/kg. Bei einer zehnfach höheren Konzentration (50 mg/kg) inhibierten alle drei Carotinoide die ZZK und bei 0,5 mg/kg zeigten sie keinen Einfluß [Krutovskikh 1997]. Möglicherweise beruht dieses ambivalente Verhalten, zumindest im Falle von β -Carotin, auf der Wirkung von Oxidationsprodukten, die bei höheren Konzentrationen von β -Carotin *in vivo* gebildet werden. Die Inkubation einer menschlichen Lungenadenokarzinom-Zelllinie (A549) mit einem Gemisch von Oxidationsprodukten des β -Carotin hatte eine Inhibierung der ZZK zur Folge, einhergehend mit einer Delokalisation von Cx43 von der Plasmamembran sowie einer Phosphorylierung von Cx43 [Yeh 2003].

1.3 Dicumarol

Neben Carotinoiden beeinflussen auch andere (natürlich) vorkommende Substanzen die ZZK, z.B. Retinoide, Cholecalciferol, 3,3',5-Triiodo-L-Thyronin, L-Thyroxin [Stahl 1998] und Chinone (z.B. Vitamin K₃) [Klotz 2002, Abdelmohsen 2003].

Chinone hemmen die ZZK, indem sie mit dem EGF-Rezeptor interagieren, so daß der ERK-Signalweg (MAPK-Signalweg s. Abb. 11) aktiviert und schließlich Cx43 phosphoryliert wird. Dies hat zur Folge, daß die ZZK abnimmt. Die Chinon-induzierte Abnahme der ZZK konnte mit einer spezifischen Inhibierung der ERK-Aktivierung verhindert werden. Von Dicumarol ist bekannt, daß es die ERK-Aktivierung durch Chinone (wie z.B. Vitamin K₃) verhindert. Durch die Inhibierung der NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase-1 (NQO-1, DT-Diaphorase) blockiert es außerdem die Regeneration von Vitamin K und wirkt auf diesem Wege antikoagulativ [<http://www.emedicine.com/emerg/topic872.htm>, Klotz 2002, Abdelmohsen 2003].

Dicumarol (3,3'-methylen-bis(4-hydroxycumarin)) gehört zur Substanzklasse der Cumarine, von denen einige therapeutisch als Antikoagulantien bzw. als Rodentizide eingesetzt werden. Cumarine inhibieren die hepatische Synthese der Vitamin K abhängigen Koagulationsfaktoren II, VII, IX, X und der Antikoagulationsproteine C und S. Vitamin K spielt eine entscheidende Rolle in der postribosomalen Synthese dieser Faktoren und ist in Carboxylierungsschritte von Glutaminsäureresten involviert. Hierfür ist in der Regel die Regeneration von Vitamin K erforderlich. Cumarine verhindern jedoch die Reduktion von Vitamin K in seine aktive Form. Das am häufigsten eingesetzte Antikoagulans ist Warfarin und findet einen breiten Einsatz in der Behandlung von mechanischen Klappen, chronischen Vorhoffibrillationen (Behandlung und Prävention), Lungenembolien, fortgeschrittenen Kardiomyopathien [<http://www.emedicine.com/emerg/topic872.htm>].

1.4 Zielstellungen

Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte von Carotinoiden und Dicumarol auf die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions (ZZK) auf makroskopischer und molekularer Ebene zu untersuchen.

1. Zunächst sollten vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von ausgewählten, natürlich vorkommenden Carotinoiden (Mikronährstoffe) auf die ZZK in Rattenleberepithelzellen (WB-F344) durchgeführt werden.
2. Anschließend sollte im Detail die Konzentrationsabhängigkeit der Effekte der strukturell eng verwandten Carotinoide Astaxanthin und Canthaxanthin auf die ZZK in humanen Hautfibroblasten untersucht werden. Des Weiteren sollten molekularbiologische Experimente Aufschluß geben über die molekularen Mechanismen, die der Wirkung von Astaxanthin und Canthaxanthin auf die ZZK zugrunde liegen.
3. Außerdem war der Einfluß des zellulären Stressors UV-Strahlung auf die ZZK sowie die potentielle protektive Wirkung der antioxidativ und chemopräventiv wirkenden Carotinoide von Interesse. Daher sollte die ZZK in UV-gestresten, Carotinoid behandelten humanen Hautfibroblasten näher untersucht werden.
4. Schließlich sollte Dicumarol aus der Familie der Cumarine, das therapeutisch als Antikoagulans von Bedeutung ist, hinsichtlich seiner Wirkung auf die ZZK in zwei unterschiedlichen Zellsystemen (Rattenleberepithelzellen WB-F344, humane Hautfibroblasten HFFF2) getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Mikroinjektionsanlage		
FemtoJet	Eppendorf	Hamburg
InjectMan	Eppendorf	Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 TV	Zeiss	Jena
Digital Camera C4742	Hamamatsu	Herrsching a. Ammersee
Camera Controller C4742	Hamamatsu	Herrsching a. Ammersee
Begasungsbrutschrank	Binder GmbH	Tuttlingen
Elektrophoresekammer X Cell Sure Lock™	Invitrogen	Karlsruhe
Semi-Dry-Blotter	Roth	Karlsruhe
Power Supply Consort E835	VWR	Darmstadt
HPLC-Anlage	Merck Hitachi	Darmstadt
Autosampler L-2200		
Pumpe L-7100		
UV/ VIS –Detektor L-7420		
UV/VIS Spektrophotometer DU® 530	Beckman, Inc.	Fullerton (CA,USA)
Milli-Q académic	Millipore	Billerica (Mass., USA)
UVA-Lampe UVA700	Waldmann	
Diana III Camera	Raytest	Straubenhardt
Vortexer Reax 2000	Heidolph	Kelheim

2.1.2 Software

Aqua Cosmos Version 1.2.	Hamamatsu	Herrsching a. Ammersee
AIDA		
HPLC System Manager, D-7000 Multi HSM	Merck Hitachi	Darmstadt

2.1.3 Chemikalien

Methanol, p.a.	Merck	Darmstadt
Ethanol, p.a.	Merck	Darmstadt
Acetonitril, p.a.	Merck	Darmstadt
Tetrahydrofuran, p.a.	Fluka	Buchs (CH)

n-Hexan, p.a.	Merck	Darmstadt
Diethylether	Merck	Darmstadt
Dichlormethan	Merck	Darmstadt
DMSO, > 99,9 % (GC)	Fluka	Buchs (CH)
Stickstoff	Linde	Höllriegelskreuth
MTT	Sigma	Deisenhofen
Lucifer Yellow CH, Dilithium Salz	Sigma	Deisenhofen
Lithiumchlorid, p.a.	Merck	Darmstadt
Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)	Roth	Karlsruhe
SDS ultra pure, > 99 %, f. Elektrophorese	Roth	Karlsruhe
APS, p.a.	Serva	Heidelberg
TEMED	Serva	Heidelberg
TRIS Pufferan®, >99,9 %	Roth	Karlsruhe
D _c Protein-Assay	BioRad	Hercules (CA, USA)
Prestained Protein Molecular Weight Marker	BioMol	Hamburg
Milchpulver, blotting grade	BioRad	Hercules (CA, USA)
Tween 20®, f. Molekularbiologie	Sigma	Deisenhofen
anti-Connexin43 (Kaninchen)	Sigma	Deisenhofen
anti-β-Tubulin (Maus; 200 µg/ ml)	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz (CA, USA)
stabilisiertes HRP-konjugiertes IgG, Ziege-anti-Kaninchen (10 µg/ ml)	Pierbio Science	Bonn
stabilisiertes HRP-konjugiertes IgG, Ziege-anti-Maus(10 µg/ ml)	Pierbio Science	Bonn
AlexaFluor® 546, Ziege-anti-Kaninchen IgG (2 mg/ ml)	Molecular Probes	s. Invitrogen
Chemilumineszenz-Kit (SuperSignal West Femto)	Pierbio Science	Bonn
Fixierer-Konzentrat	Adefo-Chemie GmbH	Dietzenbach
Entwickler-Konzentrat	Adefo-Chemie GmbH	Dietzenbach
DMEM-Medium	Sigma	Deisenhofen
Hanks' balanced salt solution	Sigma	Deisenhofen
PBS ³	selbst hergestellt	
Penicillin/ Streptomycin-Lösung	PAA Laboratories GmbH	Pasching (A)
L-Glutamax I (100 x)	Gibco	s. Invitrogen
Trypsin/ EDTA (1x)	PAA Laboratories	Pasching (A)

³ 0,2 g KCl, 0,2 g KH₂PO₄, 8 g NaCl, 1,44 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O wurden in 1Liter bidestilliertem Wasser gelöst und autoklaviert.

	GmbH	
FCS ⁴	Greiner Bio-One	Kremsmünster (A)
ZNS	Dianova	Hamburg
Triton-X 100	Böhringer Ingelheim	Ingelheim a. Rhein
Ponceau S-Lösung	Sigma	Deisenhofen
0,1 % Ponceau S (w/ v) in 5 % Essigsäure	Sigma	Deisenhofen
NaCl, p.a.	Merck	Darmstadt
DAPI	Sigma	Deisenhofen
Fluoromount G	Shandon	
Carotinoide ⁵	BASF	Ludwigshafen
Dicumarol	Sigma	Deisenhofen
Bidestilliertes Wasser ⁶		

2.1.4 Sonstiges

Femtotips®	Eppendorf	Hamburg
Microloader	Eppendorf	Hamburg
Gelkassetten (10 x 10 cm, Dicke 1,5 mm)	Invitrogen	Karlsruhe
Nitrocellulose-Membran Hybond™-C Extra	Amersham Biosciences	Freiburg
Gel-Blotting Papiere (580 x 580 mm)	Roth	Karlsruhe
Glasplättchen (Ø 25 mm)	Greiner	Solingen
Chemiluminescence BioMax Light Film	Kodak (bei Sigma)	Deisenhofen
HPLC-Säule Suplex pKb-100	Supelco	Bellfonte (Pennsylvania, USA)

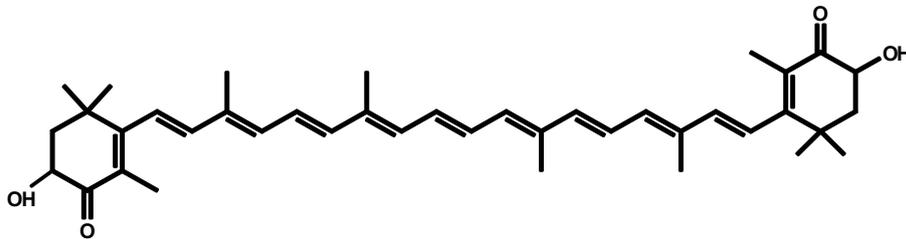
⁴ Fötale Kälberserum wurde vor Verwendung bei 56°C 30 min hitzeinaktiviert.

⁵ Die verwendeten Carotinoide wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. Ernst (BASF) zur Verfügung gestellt.

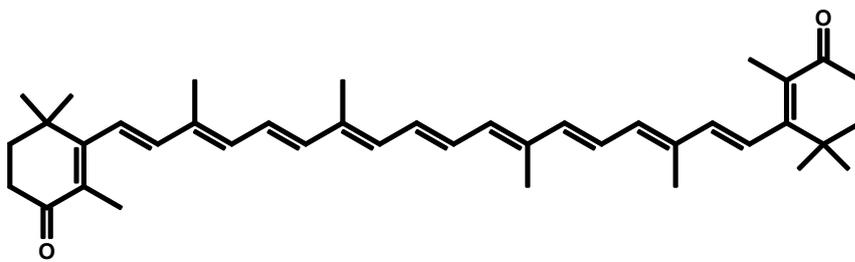
⁶ Zur Herstellung von bidestilliertem Wasser wurde eine Millipore-Anlage verwendet.

2.1.5 Strukturen der Testsubstanzen

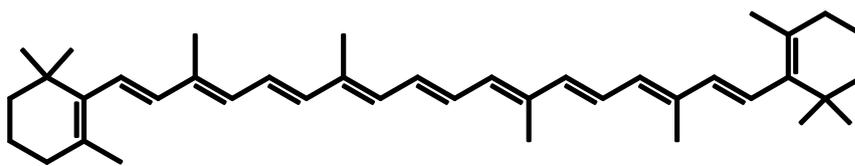
2.1.5.1 Carotinoide



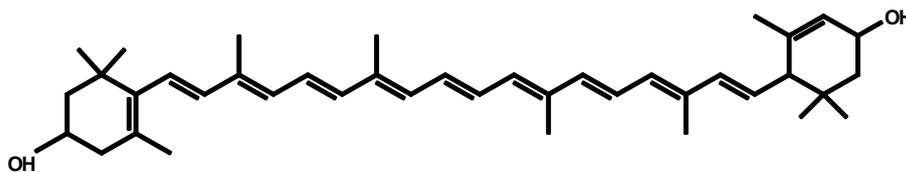
Astaxanthin



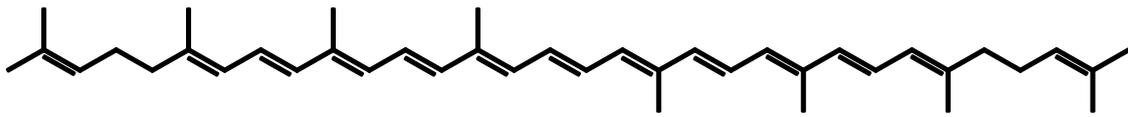
Canthaxanthin



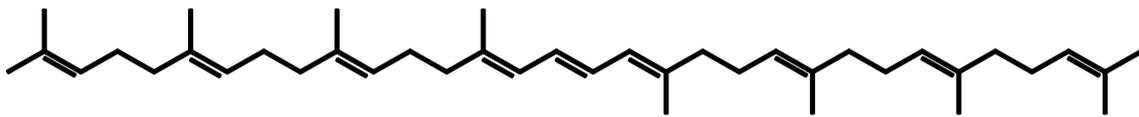
β -Carotin



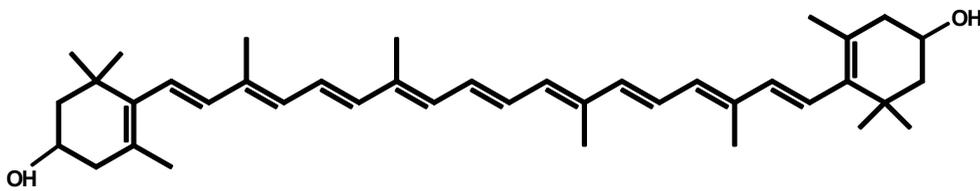
Lutein



Lycopin

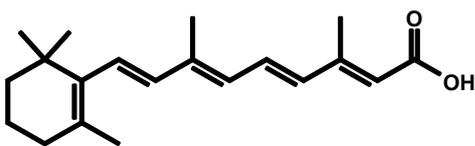


trans-Phytoen

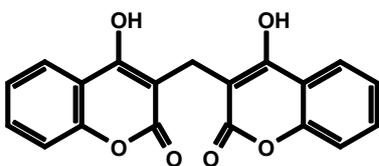


Zeaxanthin

2.1.5.2 All-trans-Retinsäure



2.1.5.3 Dicumarol



2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zelltypen

WB-F344

WB-F344 sind Rattenleberepithelzellen, die phänotypisch von einer normalen Leber einer erwachsenen Ratte (Fischer-Ratte) stammen. Es handelt sich um eine diploide Zelllinie [Tsao 1984]. Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine sehr hohe Connexin-Expression aus [Zhang 1994].

Die Zellen wurden bis zur Passage 32 kultiviert.

WB-F344 Zellen wurden freundlicherweise von Dr. James E. Trosko (East Lansing, MI, USA) zur Verfügung gestellt.

HFFF2

Diese Zelllinie wurde bei ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK; ECACC-Nr.: 86031405) bezogen. Es handelt sich um humane fötale Vorhautfibroblasten, die von einem 14-18 Wochen alten kaukasischen Fötus stammen und eine begrenzte Lebensdauer besitzen.

Humane Hautfibroblasten (HdF = human dermal fibroblasts)

Hierbei handelt es sich um humane primäre Hautfibroblasten, die von Praeputien 5-12 jähriger Knaben des kaukasischen Menschentyps stammen. Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Peter Brenneisen (Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Zellen wurden bis zur Passage acht verwendet.

2.2.1.2 Biopsie von humanen Hautfibroblasten

Die Biopsien werden einmal in kaltem PBS, anschließend 1 min in PBS mit 20 µg/ml Gentamycin gewaschen. Mit einem Skalpell wird das Fettgewebe großzügig entfernt. Hierbei muß darauf geachtet werden, daß die Biopsie nicht austrocknet. Dann wird die Biopsie in Stücke kleiner als 5 mm geschnitten und diese auf eine Petrischale gelegt. Nachdem die Biopsiestücke mit der Dermisseite nach unten 10 min angetrocknet sind, wird DMEM mit 20 % FCS zugegeben. Nach einigen Tagen Kultivierung wachsen zunächst epitheliale Zellen aus der Biopsie nach außen, danach die Fibroblasten. Zu diesem Zeitpunkt kann trypsinisiert werden. Es wird weiterhin mit dem hohen Serumanteil kultiviert, den nur die Fibroblasten überleben.

2.2.1.3 Stammhaltung und Anzucht der Zellen

Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), das mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS, 2 mM Glutamax und Penicillin/Streptomycin (Komplettmedium) supplementiert ist, in einer Wasserdampf gesättigten, auf 37 °C temperierten Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid in einem Inkubator kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80 – 90 % wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, anschließend mit einer Trypsin-EDTA : PBS – Lösung (1:1) trypsinisiert. Nach einer Inkubation von ca. 2 - 5 min. wurde die Trypsinaktivität mit FCS-haltigem Medium⁷ abgestoppt, die Zellen resuspendiert und auf die entsprechende Anzahl von Kulturflaschen bzw. -schalen verteilt. Die Zellen wurden entweder 1:4, 1:5 oder 1:10 in Kulturflaschen passagiert. Für die Anzucht auf kleinen Kulturschalen (Ø 35 bzw. 90 mm) wurden entsprechend höhere Verdünnungen der Zellsuspensionen im Komplettmedium hergestellt. Bis zum Erreichen der gewünschten Konfluenz wurde alle 3 Tage das Medium gewechselt.

Für die immunohistochemischen Untersuchungen wurden die Zellen auf Glasplättchen (Ø 25 mm) angezüchtet.

2.2.1.4 Kryokonservieren und Auftauen von Zellen

Zum längeren Konservieren von Zellen wurden diese in möglichst frühen Passagen trypsinisiert, in Einfriermedium (DMEM, 20 % FCS, 10 % DMSO) eingefroren und bei -80 °C gelagert. Hierfür wurde nach dem Trypsinieren die Enzymaktivität mit Komplettmedium abgestoppt, die Zellzahl in einer Neubauer-Kammer bestimmt und die

⁷ Volumen (FCS-haltiges Medium) : Volumen (Trypsin-PBS-Gemisch) = 3:2.

Zellsuspension zentrifugiert (2000 U/ min, 5 min). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in Einfriermedium (ca. 10^{-6} Zellen/ ml) resuspendiert und in speziellen Kryoröhrchen eingefroren.

Für das Anzichten kryokonservierter Zellen wurden diese bei Raumtemperatur schnell angetaut und in Kulturschalen (\varnothing 10 cm) oder 75 cm³ Kulturflaschen überführt. Nach 4-5 h sowie nach 24 h wurde das Medium gewechselt, um den DMSO-Gehalt im Medium auf unter 1 % zu reduzieren und damit Membranschädigungen zu verhindern.

2.2.1.5 Inkubation von Zellen mit Testsubstanzen

WB-F344 Zellen wurden in Kulturschalen bis zur 70 - 90 % igen Konfluenz in Kompletmedium kultiviert. Im Anschluß wurden die Zellen 24 h in einem FCS-freien Medium kultiviert, um eine durch FCS erhöhte Grundkommunikation zu vermeiden.

HFFF2-Zellen wurden bei einer ca. 90 % igen Konfluenz 24 h mit serumfreiem Medium inkubiert.

HdF wurden hingegen nach Erreichen einer ca. 90 % igen Konfluenz 24 h in einem Medium mit 3 % FCS inkubiert.

Von Retinsäure und den Carotinoiden wurden Stammlösungen hergestellt, die bei -28 °C gelagert werden konnten und die für die Experimente 1:1000 in das Inkubationsmedium (WB-F344: 0 % FCS; HdF: 3 % FCS) verdünnt wurden. Die Konzentrationen der Stammlösungen wurden photometrisch eingestellt (UV/ VIS-Spektrophotometer, Extinktionskoeffizienten, s. Tab. 5) Für Dicumarol wurde eine 10 mM Stammlösung angesetzt, die dann entsprechend den benötigten Konzentrationen in das serumfreie Inkubationsmedium verdünnt wurde. Als Solubilisationsmittel wurde für die Stammlösung von Retinsäure Ethanol, für die Carotinoide THF und für Dicumarol DMSO verwendet. Um Pipettierfehler durch Interaktion der Substanzen mit dem Pipettenmaterial zu minimieren, wurden im Falle der Carotinoide und Retinsäure zum Pipettieren der Stammlösungen eine Hamiltonspritze und der Carotinoide bzw. Retinsäure enthaltenden Medien sterile Glaspipetten verwendet.

Die Arbeiten wurden in abgedunkelter Umgebung durchgeführt, um photooxidativen Abbau der Testsubstanzen zu vermeiden.

Tab. 5: Extinktionskoeffizienten von Carotinoiden (nach [Britton 1995 b]) und Retinsäure [Sporn 1994, S.188].

Carotinoide	ϵ , M ⁻¹ cm ⁻¹	Absorptionswellenlänge, nm	Lösungsmittel
Astaxanthin	125100	470	n-Hexan
Canthaxanthin	124100	466	n-Hexan
β -Carotin	139000	451	n-Hexan
Lycopin	184575	472	n-Hexan
Lutein	136600	450	n-Hexan
cis-Phytoen	49800	276	n-Hexan
trans-Phytoen	85500	348	n-Hexan
Zeaxanthin	132900	452	n-Hexan
all-trans-Retinsäure	45300	350	Ethanol

2.2.2 Zellvitalitätsassay (MTT-Test)

Im sog. MTT-Test wird die Zellvitalität von Zellen über die Aktivität der Succinatdehydrogenase, einer mitochondrialen Dehydrogenase, bestimmt. Der angewandte MTT-Test liefert Informationen darüber, wie die Vitalität von Zellen in der Zellkultur durch Inkubation mit bestimmten Substanzen beeinflusst wird.

Das wasserlösliche Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) wird in lebenden, metabolisch aktiven Zellen von der mitochondrialen Succinatdehydrogenase in ein blaues Formazansalz umgewandelt (Abb. 13). Die Menge des gebildeten Formazansalzes dient als Maß für die Vitalität der Zellen und wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt.

Die zu untersuchenden Zellen wurden nach Waschen mit PBS mit MTT-Komplettmedium (0,5 g/l)⁸ für 1-2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Formazanbildung (Kontrolle unter dem Mikroskop) wurde die Inkubation durch Absaugen des MTT-haltigen Mediums beendet. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit DMSO solubilisiert. Für die quantitative Auswertung wurde der Gehalt des in DMSO gelösten Formazans

⁸ MTT-Stammlösung: 5 g/l (PBS), 1:10 in Komplettmedium verdünnt.

2.2.3 Bestimmung der Zell-Zell-Kommunikation mittels Fluoreszenzfarbstoff-Transfer-Assay (Kommunikationsassay)

Die relative Zell-Zell-Kommunikation wurde durch die intrazelluläre Mikroinjektion einer 10 % igen (w/v) Lösung des nichttoxischen Fluoreszenz-Farbstoffs Lucifer Yellow CH (Abb. 15) bestimmt.

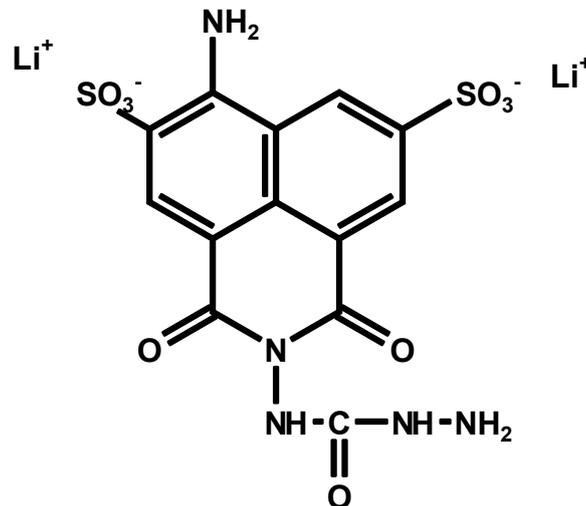


Abb. 15: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffs Lucifer Yellow CH.

Im sog. Fluoreszenzfarbstoff-Transfer-Assay diffundiert der Fluoreszenzfarbstoff nach Injektion in eine ausgewählte Zelle über die Gap Junctions in die benachbarten Zellen (Abb. 16). Nach einer Minute werden die fluoreszierenden Zellen, ausgenommen die injizierte Zielzelle, gezählt. Die Anzahl der fluoreszierenden Zellen ist ein Maß für die ZZK.

Aufgrund der Farbstoff-Struktur können unspezifische Membrandiffusionen ausgeschlossen werden: Lucifer Yellow besitzt zwei Sulfonatgruppen mit niedrigem pK_a -Wert, die bei physiologischem pH-Wert als Anion vorliegen. Intakte Membranen sind daher impermeabel für diesen wasserlöslichen Farbstoff.

Für die Mikroinjektions-Messung wurde eine Gerätekombination aus einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Köln), einem Mikromanipulator (FemtoJet, Eppendorf, Hamburg) und einem semiautomatischen Mikroinjektor (Inject Man, Eppendorf, Hamburg) verwendet. 50 - 200 Femtoliter einer 10 % igen (w/v) Lucifer Yellow CH-Lösung in einer 0,33 M LiCl-Lösung wurden mittels Femtotip bei einem Injektionsdruck von 150 hPa, einem Kompensationsdruck von 50 hPa und einer Injektionsdauer von 0,5 Sekunden in das Zytoplasma einer Zielzelle injiziert.

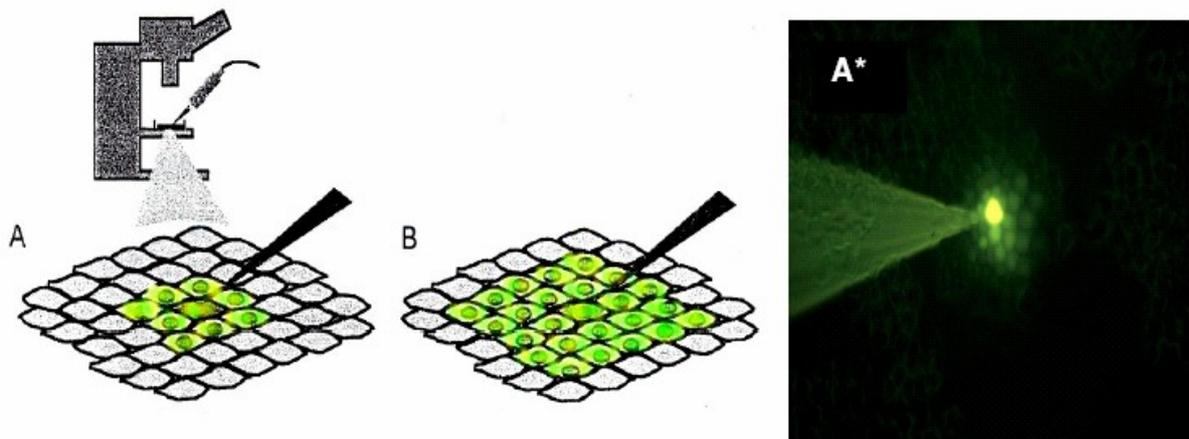


Abb. 16: *Fluoreszenz-Farbstoff-Assay*
A Kontrolle, A Injektionsnadel und fluoreszierende Zellen im Mikroskop,*
B erhöhte ZZK nach Stimulation der ZZK.

Die Anregungswellenlänge von Lucifer Yellow liegt bei 428 nm und das Emissionswellenlängenmaximum bei 536 nm.

Die Zellen wurden für den Farbstoff-Transfer-Assay in Ø 35 mm-Kulturschalen bis zur geeigneten Konfluenz kultiviert und mit den entsprechenden Testsubstanzen inkubiert. Pro Kulturschale wurden zehn zufällig ausgewählte Zellen mit der Farbstoff-Lösung injiziert und die ZZK bestimmt.

Pro dargestelltem Wert wurden 4-6 Messungen ($n = 4-6$) à 10 Injektionen durchgeführt. Die Rohdaten wurden gemittelt und mittels t-Test (Signifikanzniveau s. jeweilige Diagramme) statistisch ausgewertet.

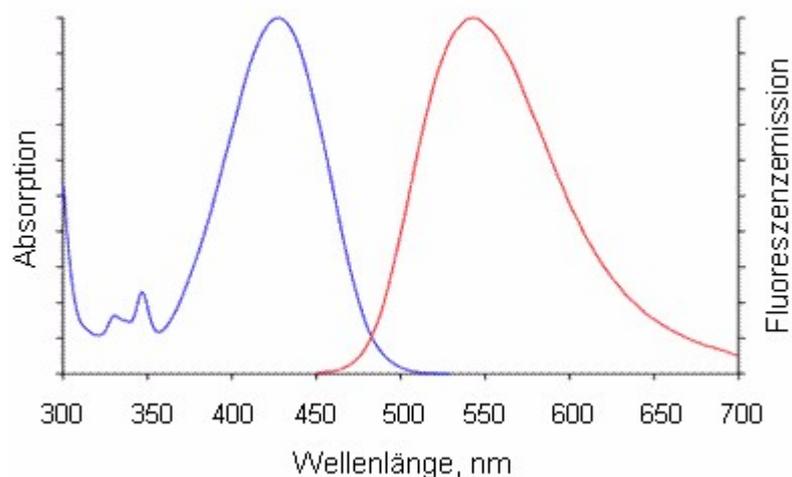


Abb. 17: *Absorptions- und Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffs Lucifer Yellow CH.*

2.2.4 Immunohistochemischer Nachweis von subzellulären Strukturen

Zellen wurden auf Glasplättchen (Ø 25 mm) kultiviert. Das Medium wurde nach der Behandlung entfernt, die Zellen zweimal vorsichtig mit kaltem PBS gewaschen und durch eine 10-minütige Inkubation mit -20 °C kaltem Methanol bei -20 °C auf den Glasplättchen fixiert.

2.2.4.1 Gap Junction Protein Connexin43

Zur Detektion des Gap Junction Proteins Cx43 wurden die Zellen nach der Fixierung zweimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml der Blockierlösung (3 % ZNS, 0,3 % Triton X-100, PBS) für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Über Nacht erfolgte dann bei 4 °C die Inkubation mit je 1 ml Primärantikörper (anti- α -Cx43, Kaninchen; 1:1500 in PBS, 1 % ZNS). Anschließend wurde dreimal je 5 min mit PBS unter Rütteln gewaschen und mit je 1 ml des Sekundärantikörpers (Alexa-546-gekoppeltes α -Maus-IgG; 1:1000 in PBS) für 60 min bei 37 °C inkubiert. Es wurde wieder dreimal je 5 min mit PBS unter Schütteln gewaschen.

2.2.4.2 Zellkern

Die Kern-Färbung wurde im Anschluß an die immunohistochemische Cx43-Kopplung durchgeführt: Die fixierten und gewaschenen Zellen wurden mit je 1 ml 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Lösung (0,5 mg/ ml in PBS) für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal je 5 min mit PBS gewaschen.

Am Ende der immunohistochemischen Behandlung wurden die Glasplättchen mit einem Tropfen Fluoromount G auf einem Objektträger fixiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop (Tab. 6) ausgewertet.

Tab. 6: Absorptions-/ Emissionswellenlängen von DAPI und AlexaFluor®546.

	λ Absorption, nm	λ Emission, nm
DAPI (an dsDNS gebunden)	358	461
Alexa Fluor® 546, Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L)	556	573

2.2.5 Proteinbestimmung in Zelllysaten

Nach Ultraschall-Behandlung wurde der Proteingehalt der Zelllysate mit einem Protein-Detektions-Kit nach Lowry (BioRad) bestimmt. Die Lösungen wurde nach einer 15 minütigen Reaktionszeit photometrisch bei einer Wellenlänge von 750 nm vermessen und die Proteinmenge anhand einer Standardkurve ermittelt. Die Standardkurve wurde mit BSA erstellt. Als Nullabgleich wurde ein Reaktionsansatz mit bidestilliertem Wasser vermessen.

2.2.6 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und immunologischer Nachweis von Proteinen (Western Blot)

Proteine können in der denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot Methode nachgewiesen werden. Die Auftrennung der Proteine basiert auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen durch ein dreidimensionales Netzwerk aus Acrylamid und Bis-Acrylamid im elektrischen Feld in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht. Zugabe von APS und Temed zu einer Acrylamid-Bis-Acrylamid-Lösung führt zur chemischen Kopolymerisierung der Monomeren. Je nach Konzentration der Acrylamidmoleküle ergibt sich eine unterschiedliche Porengröße in der Gelmatrix. Für die durchgeführten Analysen wurden Trenngele mit 10 % Acrylamid verwendet. Vor das Trenngel (pH = 8,8) wurde jeweils ein weitporiges Sammelgel (pH = 6,8) gegossen, um die Bandenschärfe zu erhöhen. Das den Proben zugegebene amphiphile Detergenz SDS lagert sich stöchiometrisch an die Proteine, wodurch alle Proteine eine negative Ladungshülle tragen und als Anionen in die gleiche Richtung im elektrischen Feld von Kathode zu Anode wandern.

Nach der Auftrennung können Proteine im Western Blot immunologisch nachgewiesen werden.

2.2.6.1 Probenaufarbeitung für Cx43-Analyse mittels Western Blot

Nach den Carotinoid-/ Retinsäure-Behandlungen wurden die auf Ø 35 mm-Kulturschalen kultivierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 100 µl 0,5 % iger SDS-Lösung lysiert und bis zur weiteren Analyse bei -28 °C in Eppendorf-Röhrchen gelagert.

Zelllysate wurden mit Ultraschall behandelt, sofort auf Eis gesetzt und jeweils 10 µl davon zur Proteinbestimmung (s. 2.2.5) abpipettiert. Zu dem restlichen Lysat wurde Dithiothreitol-

Blaupuffer⁹ (Tab. 7) hinzugefügt. Anschließend wurden die Lysate 10 min auf 95 °C erhitzt. Der Überschuss an SDS, die Temperatur und Dithiothreitol führen dazu, daß die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine zerstört werden.

Tab. 7: *Blaupuffer*⁹ (5x), pH = 6,8.

SDS	10 %
Tris	0,25 M
Saccharose	30 %
Bromphenolblau	0,1 % (w/ v)

Tab. 8: *Lämmli-Puffer* (2x), pH = 6,8.

SDS	4 %
Tris	125 mM
Glycerin	20 % (w/ v)
Bromphenolblau	0,2 % (w/ v)
DTT *	100 mM

* DTT wird jeweils frisch zugesetzt.

Die mit Dicumarol behandelten Zellen (Ø 90 mm-Kulturschalen) wurden 1 x mit PBS gewaschen und in 600 µl 2x-Lämmli-Puffer (Tab. 8) lysiert. Es wurde keine Proteinbestimmung durchgeführt. Lysate konnten an dieser Stelle eingefroren werden. Vor der elektrophoretischen Auftrennung der Lysate, wurden diese ebenfalls für 10 min auf 95 °C erhitzt.

2.2.6.2 SDS-PAGE

Gele (Tab. 9) wurden in Plastikgellkassetten (10 cm x 10 cm) gegossen und konnten feucht verpackt über Nacht bei 4 °C auspolymerisieren. Gele sind in dieser feuchten Verpackung mehrere Wochen im Kühlschrank haltbar.

Für die Cx43-Analyse nach Carotinoid-Behandlung wurden von den nach 2.2.6.1 aufgearbeiteten Proben definierte Volumina in die Geltaschen pipettiert, die je nach Experiment einem Proteingehalt von 15 – 25 µg (aus vorangegangener Proteinbestimmung berechnet) entsprachen. Von den Lysaten nach Dicumarol-Behandlung wurden jeweils 8 µl aufgetragen. Die Trennung erfolgte in einem SDS-Laufpuffer (50 mM Tris, 384 mM Glycin, 0,1 % (w/ v) SDS) bei 25 mA/ Gel im Sammelgel und nicht mehr als 40 mA/ Gel im Trenngel.

⁹ Der Blaupuffer wird als 5x-Puffer angesetzt und 1:5 in die Lysate verdünnt. Kurz vor der Verwendung des Puffers werden einige Granulatkörner Dithiothreitol zugesetzt.

Tab. 9: Gel-Zusammensetzung.

	Trenngel pH = 8,8	Sammelgel pH = 6,8
Bidestilliertes Wasser	4,8 ml	3,5 ml
Tris	2,5 ml (1,5 M, pH = 8,8)	650 µl (1 M, pH = 6,8)
SDS 10 % (v/v)	100 µl	50 µl
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	2,5 ml	720 µl
Temed	4 µl	5 µl
APS* 10 % (v/v)	100 µl	50 µl

* jeweils frisch hergestellt

Als Protein Marker wurden 10 µl Prestained Protein Molecular Weight Marker (19 – 119 kDa) von BioMol in eine Geltasche pro Gel pipettiert. Cx43 läuft entsprechend seinem Molekulargewicht von 43 kDa zwischen der dritten (31 kDa) und vierten (46 kDa) Markerbande.

2.2.6.3 Western Blot (Semi-Dry-Blotting)

Nach der Protein-Auftrennung im Gel werden die Proteine im elektrischen Feld vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mittels Antikörpern nachgewiesen. Der Proteintransfer wird mit einem diskontinuierlichen Puffersystem (Anode1-, Anode2-, Kathodenpuffer; s. Tab. 10) durchgeführt. Zunächst wurden in jeder der drei Pufferlösungen pro Gel je zwei in Gelgröße zugeschnittene Blottingpapiere getränkt. Die Nitrozellulose-Membran, ebenfalls entsprechend der Gelgröße zugeschnitten, wurde vor dem Tränken im Kathodenpuffer kurz in bidestilliertem Wasser aktiviert. Anschließend wurden für das Semi-Dry-Blotting Gel, Membran und Blottingpapiere wie in Abb. 18 dargestellt zusammengesetzt und die Proteine bei 60 mA/ Gel während einer Dauer von 60 min auf die Membran transferiert. Die Gele wurden vor dem Auflegen auf die Membran kurz in Kathodenpuffer getränkt.

Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Membran nach dem Blotten mit PonceauS-Lösung gefärbt und anschließend in PBS entfärbt. Über Nacht wurde mit 5 % (w/v) fettfreiem Milchpulver in TBST (50 mM Tris, 150 mM, 0,1 % Tween 20, pH = 7,5) bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Tab. 10: Puffer für Semi-Dry-Blotting.

	Anode 1	Anode 2	Kathode
Tris	300 mM	25 mM	25 mM
Methanol (p.a.)	10 %	10 %	10 %
Glycin	---	---	40 mM
pH*	10,4	10,4	9,4

* mit HCl eingestellt

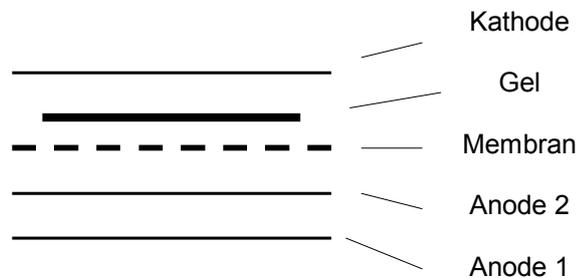


Abb. 18: Schematischer Aufbau für das Semi-Dry-Blotting.

Cx43/ β -Tubulin:

Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst 1 h mit dem Primärantikörper inkubiert, danach 1,5 h mit TBST (ca. 5-6 Mal TBST-Wechsel) gewaschen, 1 h mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert und wie nach Primärantikörper-Inkubation gewaschen.

Verwendete Primärantikörper:

- Anti- α -Cx43 (Kaninchen), 1:1000 in TBST (1 % Milchpulver), Sigma
- Anti- β -Tubulin (Maus), 1:500 in TBST (1 % Milchpulver), Santa Cruz

Verwendete Sekundärantikörper:

- HRP-konjugiertes IgG, Ziege-anti-Kaninchen, 1:10000 in TBST (1 % Milchpulver), Pierce
- HRP-konjugiertes IgG, Ziege-anti-Maus, 1:10000 in TBST (1 % Milchpulver), Pierce

Die Detektion wurde mit einem Chemilumineszenz-Kit (SuperSignal West Femto, Pierce, Biotechnology) durchgeführt. Hierfür wurden die Luminol- und Verstärker-Lösung im Verhältnis 1:1 miteinander gemischt und die in Plastikfolie eingeschweißte Membran 5 – 10 min damit inkubiert. Anschließend wurde die Membran je nach Signalstärke 0,5 – 5 min in einer lichtundurchlässigen Kassette auf einen BioMax Film (Kodak) exponiert und das Signal mit Entwickler- und Fixierer-Lösung (Adefo) entwickelt.

2.2.7 Bestimmung von Carotinoidgehalten in Zelllysaten und –überständen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

2.2.7.1 Probenaufarbeitung der Zelllysate und –überstände

Für die Quantifizierung der Carotinoidgehalte im Mediumüberstand und in den Zelllysaten wurde nach den entsprechenden Inkubationszeiten der Mediumüberstand abpipettiert (2 ml) und die Zellen mit kaltem PBS zweimal gewaschen. Anschließend wurden auf die Zellen 300 µl bidestilliertes Wasser pipettiert. Nach einer Schwellzeit von 15 min auf Eis wurden die Zellen abgeschabt und bei -28 °C gelagert.

Alle Arbeiten für die HPLC-Analysen wurden im abgedunkelten Raum und mit lichtundurchlässigen Gefäßen durchgeführt, um Substanzverluste und Analysenverzerrungen durch ungewollte Reaktionen zu verhindern.

Nach dem Auftauen wurden die Proben 10 s mit Ultraschall behandelt und 150 µl Mediumüberstand bzw. –lysat zur Carotinoidextraktion eingesetzt. Als interner Standard (IS) wurde β-apo-8'-Carotenal verwendet. 1 ml Puffer (KH₂PO₄ 2 mM, K₂HPO₄ 2 mM, EDTA 0,7 M), 20 µl IS und 150 µl Probe wurden in ein Plastikzentrifugenröhrchen pipettiert. Proteine wurden durch Zugabe von 1 ml Ethanol und anschließendem Schütteln ausgefällt. Danach wurden 6 ml Extraktionsmittel (n-Hexan/ Dichlormethan 6:1, 0,01 % BHT) zugefügt und nach maschinelltem Schütteln (1 min, Vortexer), Ultraschall-Behandlung (5 min) und erneutem Schütteln (0,5 min, Vortexer) alle lipophilen Substanzen

aus der wässrigen Phase extrahiert. Nach anschließendem Zentrifugieren (10 min, 5000 U/ min) wurden 5 ml der organischen Phase abpipettiert und unter Stickstoff eingedampft. Dann wurde mit ca. 1 ml Diethylether die Röhrenwand gespült, um Carotinoidreste von der Röhrenwand zu lösen. Anschließend wurde erneut unter Stickstoff eingedampft.

Für die HPLC-Messungen wurde die Trockne mit 20 µl Dichlormethan vorgelöst und in 200 µl Laufmittel (s. 2.2.7.2.) aufgenommen.

2.2.7.2 HPLC

Die HPLC-Messung und –Auswertung wurde an einer HPLC-Anlage von Merck Hitachi (s. 2.1.1.) und mit der Software HPLC System Manager (Merck Hitachi, s. 2.1.2.) durchgeführt. Die Trennung erfolgte isokratisch auf einer pKb-100-Säule von Supelco (250 x 4,6 mm, 5 µM Partikelgröße) in einem Laufmittelgemisch aus Methanol/ Acetonitril/ Dichlormethan (540/ 440/ 20) (v/v/v). Astaxanthin und Canthaxanthin wurden bei einer Wellenlänge von 470 nm im UV/ VIS-Detektor erfaßt. Es wurden jeweils 50 µl der aufgearbeiteten Probe mit einem Autosampler injiziert.

2.2.8 Bestrahlung von Zellen mit UVA-Strahlung

Zellen (HdF) wurden nach Vorinkubation mit Carotinoiden (24 h, 72 h) einmal mit Hanks-Puffer (Sigma) gewaschen und in 0,5 ml Hanks-Puffer mit einer UVA-Lampe (Waldmann) bestrahlt. Die Bestrahlungsdosis betrug 5 J/ cm², 10 J/ cm² bzw. 15 J/ cm². Die für die jeweilige Dosis erforderliche Bestrahlungsdauer wurde zuvor durch Messung der Intensität der Lampe anhand des zur Lampe gehörenden Densitometers ermittelt.

Nach der Bestrahlung wurden 2 ml Medium (ohne Phenolrot, FCS-Gehalt entsprechend den Vorinkubationsbedingungen 3 %) zugegeben und die Zellen sofort in den Inkubator gestellt. Nach definierten Zeitintervallen wurde die ZZK bestimmt und wurden Lysate für die Western Blot Analyse von Cx43 (s. 2.2.6.1) hergestellt.

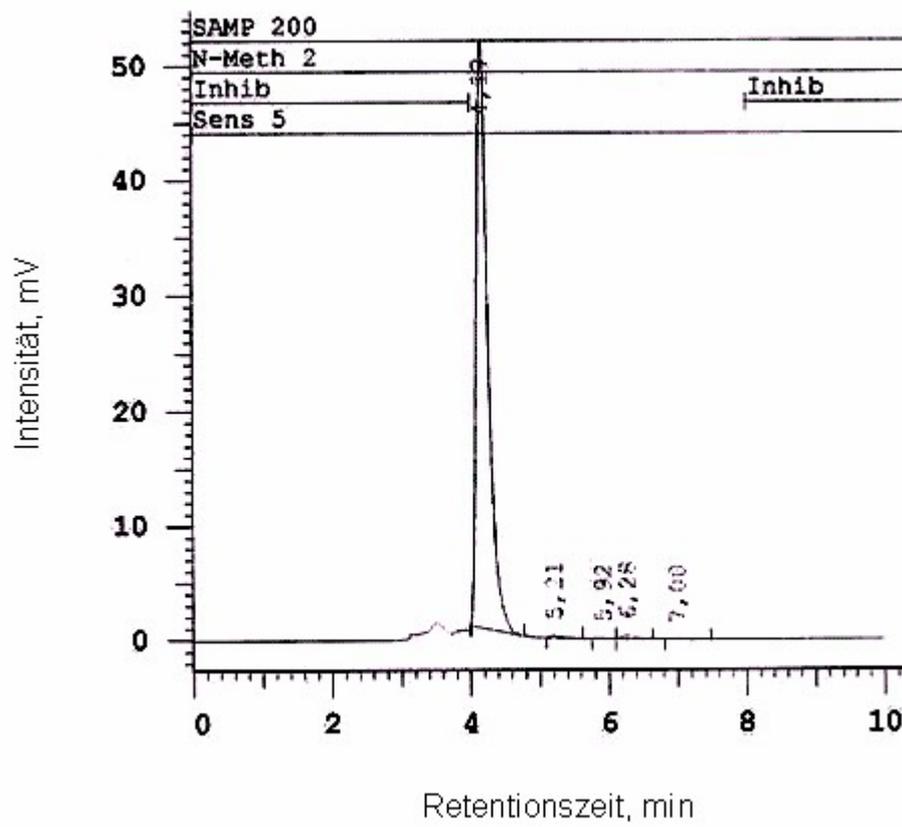


Abb. 19: Exemplarisches HPLC-Chromatogramm. Astaxanthin 10 μ M, Zellysat.

3 Ergebnisse

In epidemiologischen Studien wurde eine positive Korrelation zwischen einer obst- und gemüsereichen Ernährung und krankheitspräventiven bzw. gesundheitsfördernden Wirkungen gefunden [Mayne 1996, Chylack 2002, Miller 2002, Schalch 1992, Mares-Perlman 2002, Mozaffarieh 2003, Gann 1999, Halsted 2003]. U.a. wird angenommen, daß die Mikronährstoffklasse der Carotinoide für diese Effekte verantwortlich ist. Carotinoide besitzen antioxidative Eigenschaften. Sie fangen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ab und verhindern dadurch oxidative Schäden in Zellen. Ihre protektiven Effekte werden neben der antioxidativen Wirkung auch nicht-antioxidativen Eigenschaften (z.B. Einfluß auf Zell-Zell-Kommunikation) zugeschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein breites Spektrum an Carotinoiden hinsichtlich ihres Potentials, die ZZK zu beeinflussen, untersucht. Hierdurch sollten nähere Informationen über die in vielen Obst-, Gemüsearten und verarbeiteten Lebensmitteln vorkommenden Carotinoide und ihre möglichen Effekte auf zellulärer Ebene gewonnen werden.

3.1 Einfluß von Carotinoiden auf die Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions in Zellkultur

Bisherige Zellkulturstudien, z.B. in Mausfibroblasten (C3H/10T1/2 Zellen) und Rattenleberepithelzellen (WB-F344), konnten stimulatorische Effekte einiger Carotinoide auf die ZZK nachweisen [Aust 2003, Stahl 1997, Bertram 1993, Zhang 1991].

In diesen Studien wurden Inkubationszeiten von 1 - 15 Tagen und Carotinoid-Konzentrationen von 1-10 μM untersucht. In Anlehnung daran wurden für die Experimente zur Wirkung von Carotinoiden auf die ZZK Zellen mit Carotinoid-Konzentrationen von 1 μM und 10 μM 0-24 h bzw. 0-72 h inkubiert.

3.1.1 Einfluß von Carotinoiden auf die ZZK in WB-F344 (Rattenleberepithelzellen)

Als Zell-Modell-System wurden WB-F344 Zellen (Rattenleberepithelzellen) gewählt, da sie sich in einigen Studien als geeignetes Modellsystem für ZZK-Experimente erwiesen hatten

[Aust 2003, Ale-Agha 2002]. Sie besitzen eine relativ hohe Basalkommunikation (Mittelwert \pm SD: $15,5 \pm 6,7$)¹⁰, so daß sowohl inhibitorische als auch stimulatorische Effekte auf die ZZK gut nachgewiesen werden können. WB-F344 ist eine diploide, hepatische epitheliale Zelllinie, die aus der Leber einer erwachsenen männlichen Fischer-344-Ratte gewonnen wurde und phänotypisch Ovalzellen aus der Leber am nächsten steht [Tsao 1984]. Ihre Generationszeit hängt von der Passagenzahl ab und liegt bei 20 – 23 h für Passagen kurz nach der Isolation und 12,5 h nach längerem Kultivieren. Diese Zelllinie lässt sich im Allgemeinen sehr gut kultivieren und eignet sich aufgrund ihrer relativ kurzen Generationszeit gut für zeitnahe Laborexperimente. Ein zusätzlicher Vorteil ist ihre unbegrenzte Lebensdauer im Vergleich zu Primärzellen, die meist nur wenige Male passagiert werden können und bei denen donorspezifische Parameter berücksichtigt werden müssen.

Die Gruppe der zu untersuchenden Carotinoide setzte sich zusammen aus β -Carotin, Lycopin, Zeaxanthin, Lutein, Canthaxanthin, Astaxanthin, cis- und trans-Phytoen.

Die Auswahl dieser Carotinoide fußte auf unterschiedlichen Überlegungen: zum einen sollte ein Großteil der Hauptcarotinoide der menschlichen Ernährung (α -Carotin, β -Carotin, β -Cryptoxanthin, Lycopin, Zeaxanthin, Lutein), zum anderen die Hauptcarotinoide im Humanserum (α -Carotin, β -Carotin, Lycopin, Zeaxanthin/Lutein) [Sowell 1994] berücksichtigt werden. Darüber hinaus sind diese Carotinoide interessant wegen ihrer antioxidativen Eigenschaften [Stahl 2003, Yousry 2000, Beutner 2001, Mortensen 1997, El-Agamey 2004].

3.1.1.1 Messung der Zell-Zell-Kommunikation in WB-F344 im Fluoreszenzfarbstoff-Transfer-Assay

Die WB-F344 Zellen wurden mit den jeweiligen Inkubationsmedien (Kontrolle 0,1 % THF, Carotinoide 1 bzw. 10 μ M) über einen Zeitraum von 0 - 24 h bzw. 0 - 72 h behandelt. Der Einfluß der ausgewählten Carotinoide (β -Carotin, Lycopin, Zeaxanthin, Lutein, Canthaxanthin, Astaxanthin, cis- und trans-Phytoen) auf die ZZK in WB-F344 Zellen wurde im Fluoreszenzfarbstoff-Transfer-Assay (s. 2.2.3) bestimmt. Hierbei handelt es sich um eine semi-quantitative Methode zur Bestimmung der ZZK. Die Anzahl kommunizierender Zellen wurde 1 min nach der Injektion des Fluoreszenzfarbstoffs Lucifer Yellow in eine ausgewählte Zielzelle ausgezählt (Abb. 20, s.a. 2.2.3.). In Abb. 20 sind

¹⁰ Eigene Messung.

Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen als Beispiele für die Messung der ZZK im Fluoreszenzfarbstoff-Transfer-Assay dargestellt. Bild A zeigt den Kontrollwert der ZZK in WB-F344 Zellen. Diese sind mit 0,1 % des Carotinoid-Solvens Tetrahydrofuran (THF) behandelt. Diese THF-Konzentration zeigt keinerlei Auswirkungen auf die ZZK (Basalwerte nicht dargestellt; entsprechen der hier gezeigten Kontrolle). In Bild B und C ist eine Stimulation der ZZK, in Bild D eine Inhibierung der ZZK abgebildet. Bei den kommunizierenden Zellen werden primäre und sekundäre kommunizierende Zellen unterschieden. Der Fluoreszenzfarbstoff wird direkt von der injizierten Zelle über Gap Junctions zu einer Nachbarzelle, der primären kommunizierenden Zelle, weitergegeben. Diese gibt den Fluoreszenzfarbstoff über die Gap Junctions an sekundäre kommunizierende Zellen weiter. Sekundäre kommunizierende Zellen haben keinen direkten physikalischen Kontakt zu der injizierten Zelle. Sie nehmen den Fluoreszenzfarbstoff durch die Kommunikation mit primären kommunizierenden Zellen auf. Insbesondere in Bild B und C (Stimulation der ZZK) in Abb. 20 sind sekundäre kommunizierende Zellen gut zu erkennen.

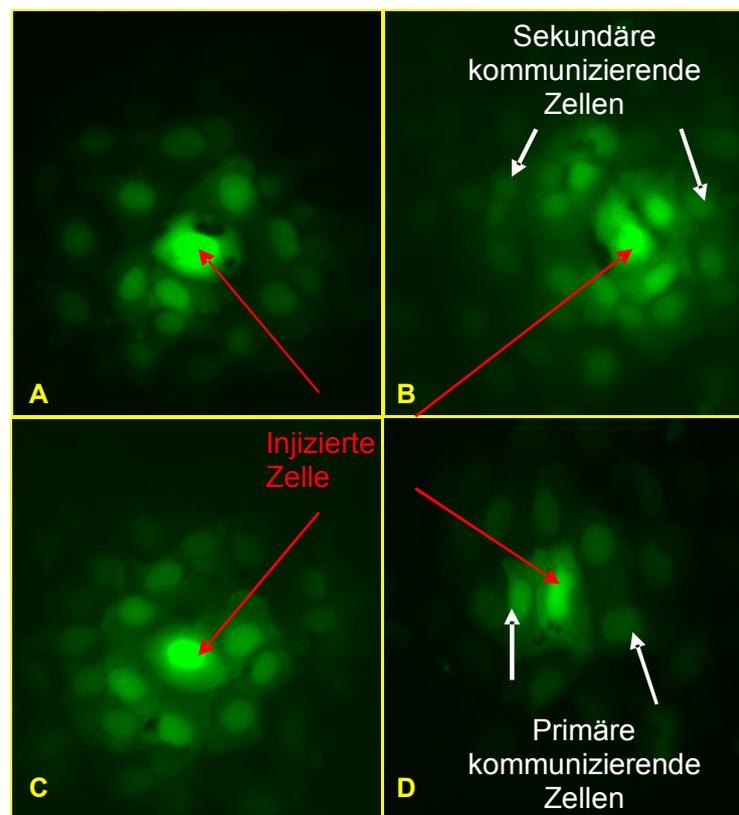


Abb. 20: Beispiel für Fluoreszenzfarbstoff-Transfer-Assay.
72 h Inkubation ($1 \mu\text{M}$):

A Kontrolle (0,1 % THF) **B** β -Carotin (Stimulation)
C Zeaxanthin (Stimulation) **D** Astaxanthin (Inhibierung)

Die ZZK-Daten sind generell in Prozent des jeweiligen Kontrollwertes angegeben. Der absolute ZZK-Wert der Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Im Mittel wurde eine absolute ZZK von $15,5 \pm 6,7$ kommunizierenden Zellen in WB-F344 Zellen gemessen.

Für die bereits in Zellkultursystemen untersuchten Carotinoide Lycopin, β -Carotin und Canthaxanthin wurde ein stimulatorischer Effekt auf die ZZK in WB-F344 Zellen beobachtet (Tab. 11, Nr. 1, 2, 4 und Abb. 21). Dies steht in Einklang mit den Literaturdaten. Canthaxanthin und Lycopin stimulierten die ZZK in beiden getesteten Konzentrationen (1 und 10 μM) sowohl nach 24 h als auch nach 72 h. Allerdings zeigten sich im Detail Unterschiede: im Falle von Canthaxanthin konnte unabhängig von der Konzentration eine Zunahme der Stimulation von der 24 h-Inkubation hin zur 72 h-Inkubation beobachtet werden. Lycopin hingegen zeigte dieses Verhalten nur bei einer Konzentration von 10 μM . 1 μM Lycopin stimulierte zwar generell nach beiden Inkubationszeiten. Allerdings führte eine längere Behandlung (72 h) mit 1 μM Lycopin einer niedrigeren Stimulation der ZZK (119 % des Kontrollwertes) als nach einer 24-stündigen Behandlung (132 % des Kontrollwertes). Dieser Effekt ist durch den semi-quantitativen Charakter der Methode erklärbar und ändert nichts an dem allgemeinen Trend der Stimulation der ZZK in WB-F344 Zellen durch Lycopin. Canthaxanthin und Lycopin stimulierten die ZZK maximal auf ca. 150 % des Kontrollwertes.

10 μM β -Carotin führten nach 24 h und 72 h zu einer Stimulation der ZZK, wobei die stimulatorische Wirkung von β -Carotin nach 72 h ca. dreimal stärker war. 1 μM β -Carotin hatte keinen Einfluß auf die ZZK nach einer 24 h-Inkubation. Nach 72 h dagegen erhöhte β -Carotin die ZZK auf 206 % des Kontrollwertes.

Die Inkubation mit den übrigen Carotinoiden führte mit Ausnahme von Zeaxanthin (1 μM , 72 h) zu keiner nennenswerten Erhöhung der ZZK. Vielmehr wurden für Lutein (10 μM , 72 h) und cis-Phytoen (1 μM , 24 h; 10 μM , 72 h) ein statistisch signifikant erniedrigter ZZK-Wert gemessen. Für die cis/ trans-Isomeren des Phytoen konnte keine einheitliche Wirkweise festgestellt werden. Einzig erkennbarer Trend war, daß eine längere Inkubation (72 h) mit der höheren Konzentration (10 μM) von cis- bzw. trans-Phytoen zu einer erniedrigten ZZK führte. Für 10 μM cis-Phytoen war die Abschwächung der ZZK nach einer 72 h-Inkubation statistisch signifikant.

Völlig unerwartet fiel Astaxanthin (s. Tab. 11, Nr. 3, Abb. 21) aus dem Rahmen der bisherigen Ergebnisse: Astaxanthin wirkte dosis- und zeitabhängig als äußerst starker

Inhibitor der ZVK in WB-F344. Die inhibierende Wirkung betrug je nach Dosis und Zeit ca. 30 - 90 %. Im Falle der Inkubation mit 10 μ M Astaxanthin zeigte sich der gleiche Effekt wie mit 1 μ M Lycopin (s.o.): der durch das Carotinoid verursachte Effekt schwächte bei längeren Inkubationszeiten ab. Wurde nach 24 h eine über 90 % ige Hemmung der ZVK beobachtet, so waren es nach 72 h lediglich ca. 80 %.

Tab. 11: Einfluß von Carotinoiden auf die ZVK in WB-F344 Zellen. 24 h und 72 h Inkubation. Absolute ZVK der Kontrolle (0,1 % THF im Inkubationsmedium) im Mittel: 17,4 \pm 7,2 (1 μ M, 24 h), 18,5 \pm 7,9 (10 μ M, 24 h), 12,6 \pm 6,3 (1 μ M, 72 h), 13,5 \pm 5,5 (10 μ M, 72 h) kommunizierende Zellen.

Carotinoid		Mittelwert % \pm SD %					
		24 h			72 h		
		1 μ M	10 μ M		1 μ M	10 μ M	
1.	Lycopin	131,6 \pm 40,4 ***	119,4 \pm 49,8 *		120,4 \pm 68,2 -		152,4 \pm 52,0 ***
2.	β -Carotin	96,9 \pm 47,6 -	121,7 \pm 41,6 **		206,0 \pm 75,2 ***		169,0 \pm 62,0 ***
3.	Astaxanthin	76,0 \pm 36,6 **	7,5 \pm 11,5 ***		31,4 \pm 32,0 ***		17,0 \pm 27,0 ***
4.	Canthaxanthin	141,2 \pm 57,2 ***	132,6 \pm 45,0 ***		150,7 \pm 65,6 ***		140,7 \pm 57,2 ***
5.	Zeaxanthin	86,7 \pm 41,6 -	88,5 \pm 40,0 -		154,7 \pm 67,8 ***		96,4 \pm 72,8 -
6.	Lutein	109,1 \pm 37,0 -	89,4 \pm 31,8 -		108,7 \pm 57,7 -		70,3 \pm 39,4 ***
7.	cis-Phytoen	77,3 \pm 54,5 *	106,3 \pm 44,3 -		104,8 \pm 63,4 -		87,8 \pm 37,8 *
8.	trans-Phytoen	92,0 \pm 45,3 -	95,9 \pm 36,8 -		101,4 \pm 46,5 -		79,0 \pm 40,3 -

* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$.

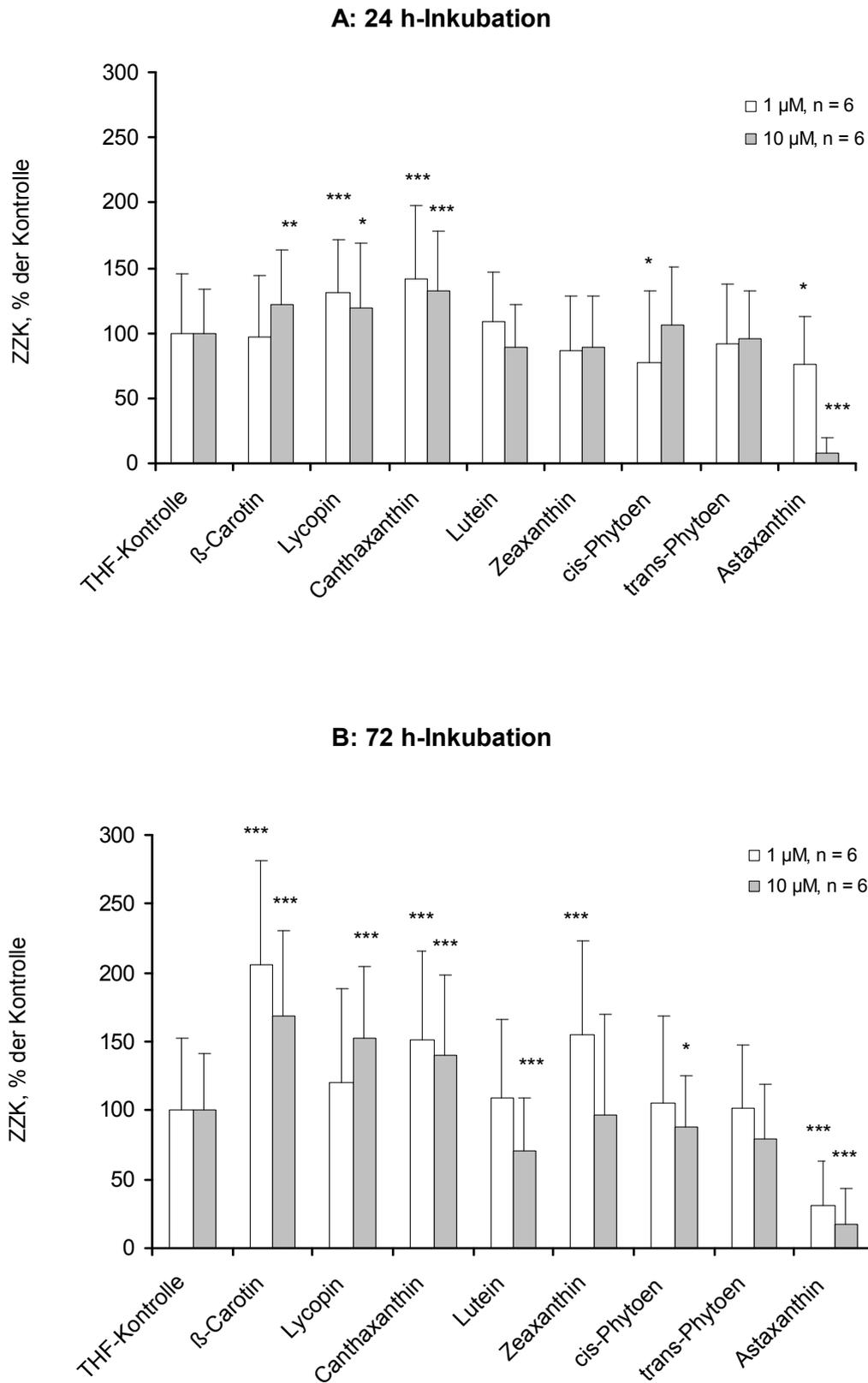


Abb. 21: Einfluß von Carotinoiden auf die ZSK in WB-F344 Zellen. Inkubation mit 1 µM bzw. 10 µM des jeweiligen Carotinoids. **A** 24 h, **B** 72 h. Kontrolle: 0,1 % THF im Inkubationsmedium. ZSK gemessen im Fluoreszenzfarbstoff-Transfer-Assay. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$.

3.1.1.2 Effekte von Carotinoiden auf die Zellvitalität von WB-F344

Im Kommunikationsassay hatten einige Carotinoide (Lutein, cis-Phytoen, Astaxanthin) hemmende Effekte auf die ZZK in WB-F344 Zellen gezeigt. Insbesondere bei Astaxanthin war eine sehr starke inhibierende Wirkung festgestellt worden. Diese Resultate wurden in einem Zellvitalitätsassay (MTT-Test, s. 2.2.2) näher untersucht, um toxische Effekte als Ursache für die Inhibierung auszuschließen.

Die Zellen wurden hierfür auf 24-Kammer-Kulturschalen ausgesät und die Behandlung mit den Carotinoiden analog zu den Kommunikations-Experimenten durchgeführt.

Die verwendeten Konzentrationen der jeweiligen Carotinoide führten, mit Ausnahme des Canthaxanthins, innerhalb des untersuchten Behandlungszeitraums zu keinen toxischen Wirkungen (Tab. 12). Schwankungen um $\pm 30\%$ sind zellsystembedingt.

Tab. 12: Zellvitalität (MTT-Assay) von WB-F344 Zellen nach Behandlung mit Carotinoiden. 24 h und 72 h Inkubation. Kontrolle 0,1 % THF im Inkubationsmedium. Daten angegeben als (Mittelwert \pm SD) in % der Kontrolle.

	Mittelwert % \pm SD %			
	24 h		72 h	
	1 μ M	10 μ M	1 μ M	10 μ M
1. β -Carotin	90,0 \pm 23,3	96,2 \pm 5,2	127,4 \pm 16,2	111,7 \pm 9,6
2. Lycopin	87,3 \pm 18,2	83,4 \pm 7,2	79,8 \pm 10,8	79,4 \pm 26,0
3. Canthaxanthin	51,4 \pm 6,1	60,2 \pm 20,5	43,2 \pm 17,7	66,9 \pm 15,8
4. Lutein	141,5 \pm 9,2	163,1 \pm 9,0	157,8 \pm 9,1	123,1 \pm 11,5
5. Zeaxanthin	94,8 \pm 18,4	93,8 \pm 20,8	110,9 \pm 10,9	110,7 \pm 20,2
6. cis-Phytoen	87,3 \pm 12,7	86,8 \pm 15,3	105,9 \pm 14,2	105,3 \pm 17,3
7. trans-Phytoen	91,3 \pm 22,2	88,3 \pm 5,7	110,8 \pm 25,7	107,2 \pm 5,7
8. Astaxanthin	117,9 \pm 17,9	151,2 \pm 25,5	158,5 \pm 54,6	82,5 \pm 11,4

In Astaxanthin und Lutein behandelten Zellen wurde bei 10 μ M nach 24 h und bei 1 μ M nach 72 h eine im Vergleich zur Kontrolle um über 50 % erhöhte Zellvitalität gemessen. Dies bedeutet, daß die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase, die in diesem Zellvitalitätstest als Maß für die Zellvitalität dient, im Vergleich zu der Aktivität in den Kontrollzellen um 50 % erhöht war.

Auffällig sind die Ergebnisse für Canthaxanthin: Trotz der ausgesprochen stimulatorischen Wirkung auf die ZZK in WB-F344 Zellen erniedrigte Canthaxanthin die Zellvitalität der WB-F344 Zellen in den untersuchten Konzentrationen (1 μ M, 10 μ M) sowohl nach 24 h als auch nach 72 h um ca. 40 - 60 %.

3.1.1.3 Einfluß von Carotinoiden auf Transport, Zusammenlagerung und subzelluläre Lokalisation des Kanalproteins Connexin43 in WB-F344

Im Kommunikationsassay zeigte sich eine unterschiedliche Wirkung von Carotinoiden auf die ZZK über Gap Junctions in WB-F344 Zellen. Als nächstes stellte sich die Frage, über welche Mechanismen diese Veränderungen in der ZZK bewirkt werden.

Gap Junctions (GJs) sind aufgebaut aus Proteinen der Connexin-Familie. Das Hauptconnexin in WB-F344 Zellen ist Connexin43 (Cx43). Eine Beeinflussung des Transports des Kanalproteins Cx43 vom Synthesort (endoplasmatisches Reticulum) zur Zellmembran, seiner dortigen Zusammenlagerung zu Halbkanälen und somit seiner subzellulären Lokalisation kann zu einer veränderten ZZK führen [Lampe 2000, Ale-Agha 2002] (s.a. 1.2.1.). Auch kann eine Stabilisierung der mRNA die ZZK erhöhen [Clairmont 1997, Saez 2003].

In Abb. 23 - 26 sind die Cx43-Verteilung (grün) und die Zellkerne (rot) in WB-F344 Zellen nach Behandlung mit Carotinoiden abgebildet (s. Abb. 22). Die Zellen wurden auf Glasplättchen kultiviert, analog zu den ZZK-Experimenten in 3.1.1.1 behandelt und anschließend Cx43 und der Nucleus wie in 2.2.4 beschrieben immunohistochemisch lokalisiert. Die Auswertung der immunohistochemischen Aufnahmen erfolgte semi-quantitativ. Eine Differenzierung ist nur bedingt möglich.

Die immunohistochemische Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Cx43 in WB-F344 Zellen nach einer Behandlung mit Carotinoiden ließ unterschiedliche Effekte der Carotinoide auf das Kanalprotein erkennen, die jedoch nur teilweise die Wirkungen der Carotinoide auf die ZZK erklären können. In Abb. 23 - 26 ist beispielhaft die subzelluläre Lokalisation von Cx43 nach der Behandlung mit 1 μ M bzw. 10 μ M Carotinoid für einen Inkubationszeitraum von 24 – 72 h dargestellt. Die abgebildeten immunohistochemischen Aufnahmen zeigen die Verteilung von Cx43 in WB-F344 Zellen nach Behandlung mit Carotinoiden. Auch wenn im Kommunikationsassay einige Carotinoide inhibitorisch wirkten, konnte für keines dieser Carotinoide eine komplette Delokalisation von Cx43 von

der Membran ins Cytosol festgestellt werden wie es für den auf die ZZK von WB-F344 Zellen inhibitorisch wirkenden Tumorpromotor TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) bekannt ist [Ale-Agha 2002]. Es sind auf allen Aufnahmen – wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß - Cx43-GJs in der Zellmembran zu erkennen. D.h., GJs sind in der Membran vorhanden, aber ihre Menge variiert. Die Cx43-Menge, gleichbedeutend mit der Anzahl und Größe der GJ-Plaques, kann, wie auch die Cx43-Lokalisation, die ZZK beeinflussen.

Nach Inkubation mit einigen Carotinoiden wurde auf den Aufnahmen eine erhöhte Connexinmenge beobachtet. Die immunohistochemischen Aufnahmen zeigten beispielsweise nach einer Behandlung mit Canthaxanthin (Nr. 4 in Abb. 23 - 26) eine erhöhte Cx43-Menge. Es sind mehr GJs vorhanden und im Schnitt sind die GJ-Plaques größer als bei den Kontrollzellen (Nr. 1 in Abb. 23 - 26). Gleiches läßt sich auch für β -Carotin feststellen (Nr. 2 in Abb. 23 - 26). Astaxanthin verursacht keine Delokalisation des Kanalproteins Cx43 und die Menge an eingelagertem Connexin entspricht der in den Kontrollzellen.

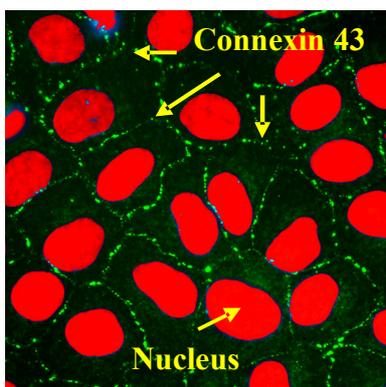


Abb. 22: Beispiel für die Lokalisation von Cx43 in WB-F344 Zellen. Immunohistochemische Detektion von Cx43 (grün) und des Nucleus (rot).

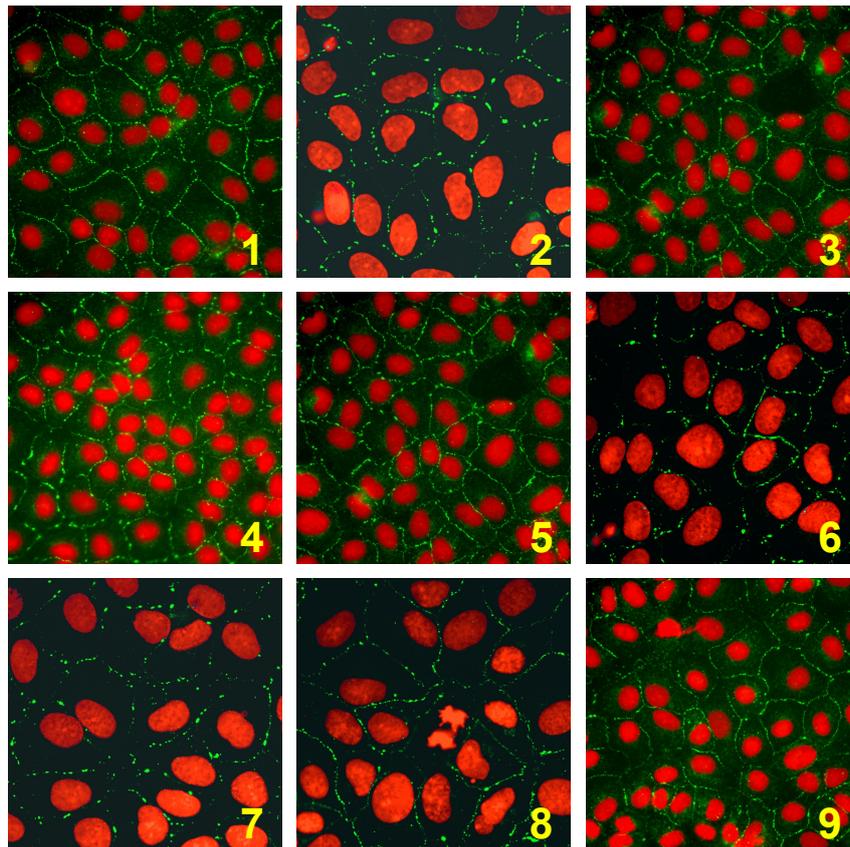
1 μM , 24 h

Abb. 23: Einfluß von Carotinoiden auf die subzelluläre Lokalisation von Cx43. 24 h Inkubation mit 1 μM des jeweiligen Carotinoids.

- | | |
|------------------------|-----------------|
| 1 Kontrolle: 0,1 % THF | 6 Zeaxanthin |
| 2 β -Carotin | 7 cis-Phytoen |
| 3 Lycopin | 8 trans-Phytoen |
| 4 Canthaxanthin | 9 Astaxanthin |
| 5 Lutein | |

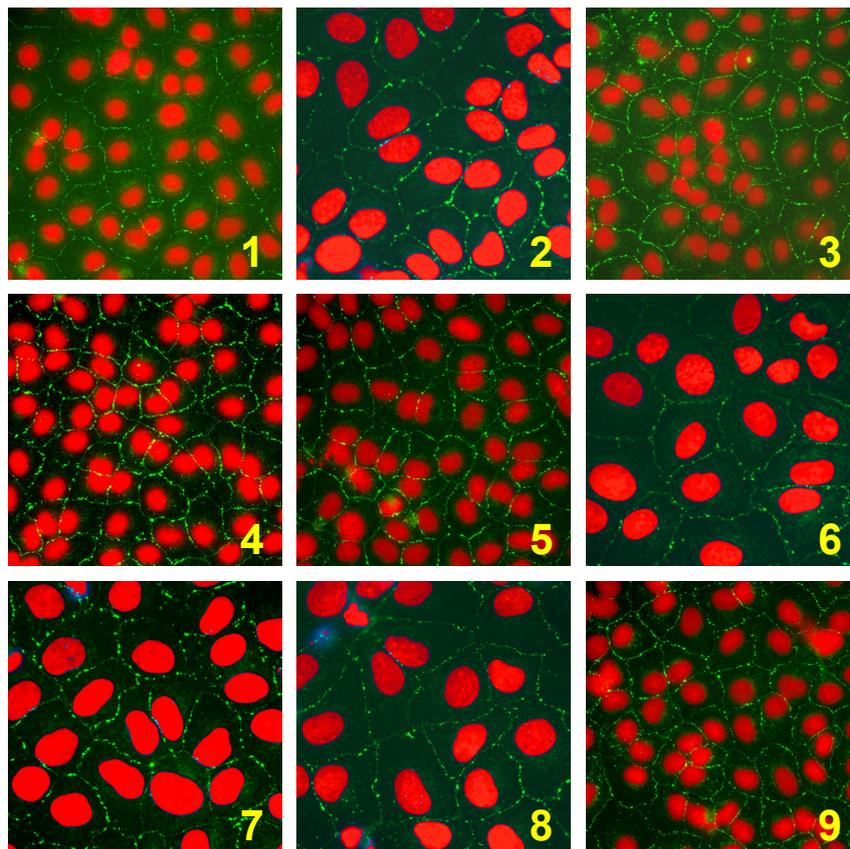
10 μ M, 24 h

Abb. 24: Einfluß von Carotinoiden auf die subzelluläre Lokalisation von Cx43. 24 h Inkubation mit 10 μ M des jeweiligen Carotinoids.

- | | |
|------------------------|-------------------------|
| 1 Kontrolle: 0,1 % THF | 6 Zeaxanthin |
| 2 β -Carotin | 7 <i>cis</i> -Phytoen |
| 3 Lycopin | 8 <i>trans</i> -Phytoen |
| 4 Canthaxanthin | 9 Astaxanthin |
| 5 Lutein | |

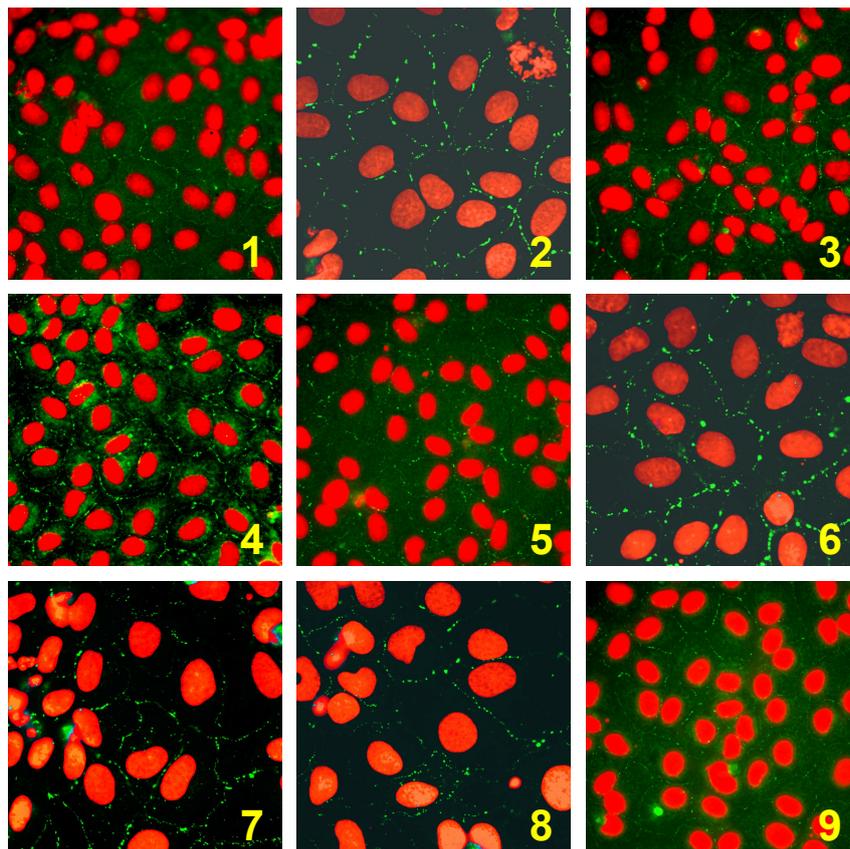
1 μM , 72 h

Abb. 25: Einfluß von Carotinoiden auf die subzelluläre Lokalisation von Cx43. 72 h Inkubation mit 1 μM des jeweiligen Carotinoids.

- | | |
|------------------------|-----------------|
| 1 Kontrolle: 0,1 % THF | 6 Zeaxanthin |
| 2 β -Carotin | 7 cis-Phytoen |
| 3 Lycopin | 8 trans-Phytoen |
| 4 Canthaxanthin | 9 Astaxanthin |
| 5 Lutein | |

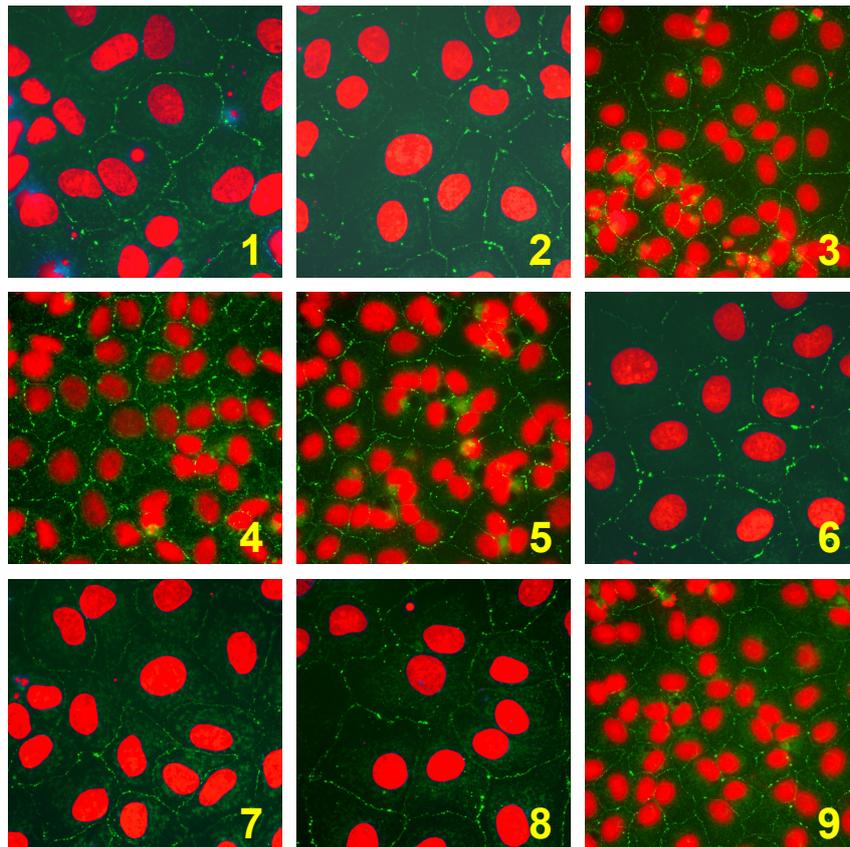
10 μ M, 72 h

Abb. 26: *Einfluß von Carotinoiden auf die subzelluläre Lokalisation von Cx43. 72 h Inkubation mit 10 μ M des jeweiligen Carotinoids.*

- | | |
|------------------------|-----------------|
| 1 Kontrolle: 0,1 % THF | 6 Zeaxanthin |
| 2 β -Carotin | 7 cis-Phytoen |
| 3 Lycopin | 8 trans-Phytoen |
| 4 Canthaxanthin | 9 Astaxanthin |
| 5 Lutein | |

3.1.2 Vergleich des Effekts von Astaxanthin von zwei unterschiedlichen Herstellern auf die Zell-Zell-Kommunikation in WB-F344 und humanen Hautfibroblasten

Astaxanthin hatte sich im Kommunikationsassay als starker Inhibitor der ZZK herausgestellt und zeigte damit eine völlig unerwartete und von den anderen Carotinoiden abweichende Wirkung auf die ZZK in WB-F344. Bis *dato* sind Carotinoide als Stimulatoren der ZZK bekannt gewesen. Daher wurde der Effekt von Astaxanthin auf die ZZK näher untersucht.

Zunächst waren insbesondere zwei Fragestellungen von Interesse:

1. Sind die in den ersten ZZK-Studien erhaltenen Daten über die Wirkung von Astaxanthin auf die ZZK in WB-F344 repräsentativ und tatsächlich Astaxanthin zuzuschreiben? Oder sind sie eventuell durch Nebenprodukte der industriellen Synthese bedingt?
2. Ist die beobachtete inhibitorische Wirkung von Astaxanthin auf die ZZK auf das verwendete Zellsystem der WB-F344 begrenzt?

Zur Klärung dieser Fragen wurde Astaxanthin von einem weiteren Hersteller bezogen und ebenfalls in WB-F344 getestet. Die ersten Versuche waren mit Astaxanthin von BASF (Ludwigshafen) durchgeführt worden. Nun wurde Astaxanthin von SIGMA (Deideshofen) verwendet. Zusätzlich wurden die Daten zur ZZK für Astaxanthin beider Hersteller (BASF, SIGMA) auch in humanen Hautfibroblasten (HdF) erhoben. Damit sollte zum einen die Wirkung von Astaxanthin prinzipiell in einem anderen Zelltyp untersucht werden. Zum anderen stand damit ein humanes Zellsystem zur Verfügung.

Die Versuchsbedingungen orientierten sich an denen der Carotinoid-Versuche in WB-F344 Zellen (s. 3.1.1.1): Zellen wurden mit Astaxanthin (BASF, SIGMA) in einer Konzentration von 1 μM und 10 μM über einen Zeitraum von 24 h bzw. 72 h inkubiert. 1 μM Canthaxanthin wurde als Positivkontrolle verwendet.

Vor den ZZK-Experimenten wurde das Astaxanthin beider Hersteller photometrisch vermessen und verglichen (Abb. 27). Es konnten keine Unterschiede im Absorptionsverhalten innerhalb eines Wellenlängenbereichs von 200-650 nm festgestellt werden.

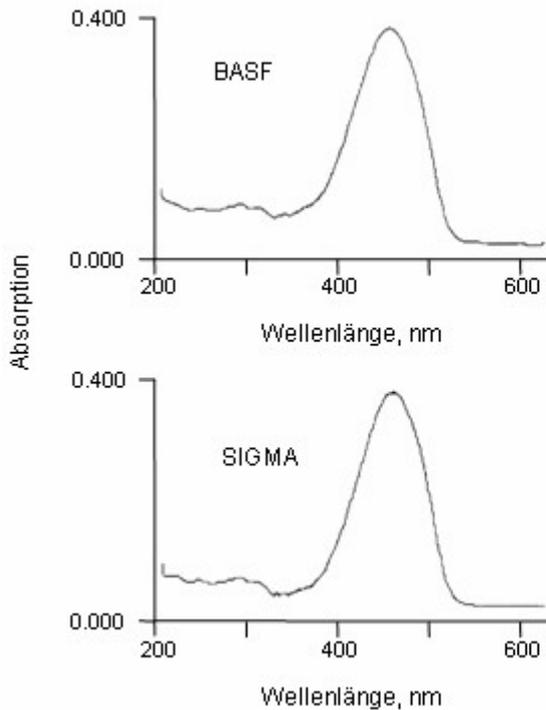


Abb.27: Spektren von Astaxanthin verschiedener Hersteller (BASF, SIGMA). Astaxanthin-Stammlösung (in THF) in *n*-Hexan je nach Konzentration der Stammlösung 1:100 - 1:1000 verdünnt und photometrisch vermessen. *n*-Hexan als Leerwert.

In den durchgeführten Experimenten wurden vier verschiedene Ansätze untersucht:

1. Astaxanthin unterschiedlicher Hersteller (BASF, SIGMA),
2. Astaxanthin-Konzentration (1 μM , 10 μM),
3. die Inkubationszeit (24 h, 72 h),
4. Zelltyp (WB-F344, HdF).

Die Resultate (Abb. 28, Abb. 29, Tab. 13) der Experimente lieferten eindeutige Antworten auf die Fragestellungen (s.o.):

Bzgl. des Zellsystems zeigten die Daten, daß Astaxanthin unabhängig von den hier verwendeten Zelltypen (WB-F344, HdF) in Abhängigkeit von der Konzentration die ZZK hemmte. Je höher die Konzentration von Astaxanthin, desto stärker die Hemmung der ZZK. Astaxanthin unterschiedlicher Hersteller (BASF, SIGMA) zeigte keinen starken Unterschied in der Wirkung auf die ZZK. Astaxanthin von BASF hemmte im Vergleich zu Astaxanthin von SIGMA in WB-F344 die ZZK etwas weniger stark, ebenso in HdF bei einer Konzentration von 10 μM . Der umgekehrte Fall wurde in HdF bei einer

Konzentration von 1 μM Astaxanthin beobachtet: Astaxanthin von BASF verursachte eine stärkere Hemmung als Astaxanthin von SIGMA. Ausschlaggebend ist aber die grundsätzlich beobachtete Wirkung von Astaxanthin beider Hersteller: beide verwendeten Substanzen führen dosisabhängig zu einer ausgeprägten Hemmung der ZZK sowohl in WB-F344 als auch in HdF.

*Tab. 13: Einfluß von Astaxanthin unterschiedlicher Hersteller auf die ZZK in WB-F344 bzw. HdF. 24 h und 72 h Inkubation. ZZK angegeben als Mittelwert % \pm SD %. Absolute ZZK der Kontrolle (0,1 % THF): s.u.; $n = 4$ (WB-F344), $n = 6$ (HdF). * $p < 0,05$.*

24 h¹		
	WB-F344	HdF
BASF-Astaxanthin 1 μM	48,0 \pm 34,8 *	15,5 \pm 22,9 *
BASF-Astaxanthin 10 μM	4,8 \pm 12,1 *	2,4 \pm 5,0 *
SIGMA-Astaxanthin 1 μM	28,5 \pm 30,7 *	23,4 \pm 31,0 *
SIGMA-Astaxanthin 10 μM	1,0 \pm 3,4 *	1,2 \pm 3,3 *
Canthaxanthin 1 μM	121,0 \pm 33,3 *	131,3 \pm 58,8 *
72 h²		
	WB-F344	HdF
BASF-Astaxanthin 1 μM	48,9 \pm 65,2 *	16,4 \pm 20,2 *
BASF-Astaxanthin 10 μM	1,8 \pm 4,7 *	1,7 \pm 4,3 *
SIGMA-Astaxanthin 1 μM	28,5 \pm 40,3 *	40,4 \pm 45,3 *
SIGMA-Astaxanthin 10 μM	0,0 \pm 0,0 *	1,0 \pm 3,1 *
Canthaxanthin 1 μM	187,9 \pm 55,2 *	127,4 \pm 42,4 *

¹ Kontrolle (0,1 % THF), ZZK absolut: 17,7 \pm 6,3 (WB-F344), 9,9 \pm 3,0 (HdF) kommunizierende Zellen.

² Kontrolle (0,1 % THF), ZZK absolut: 12,2 \pm 6,5 (WB-F344), 9,8 \pm 3,8 (HdF) kommunizierende Zellen.

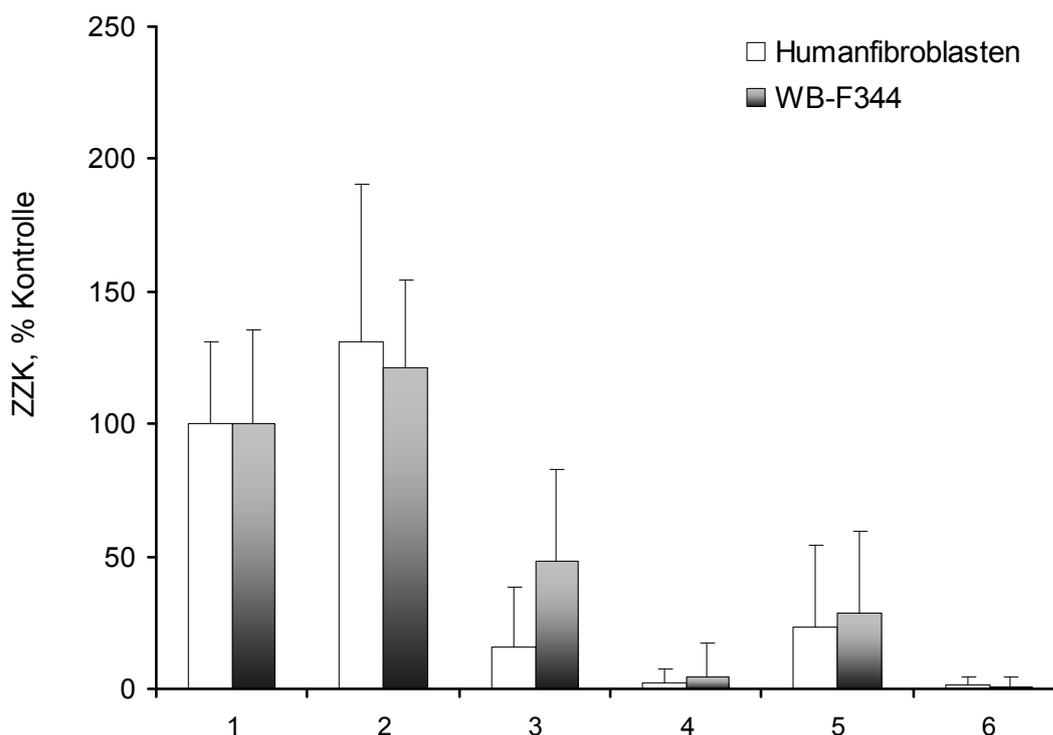


Abb. 28: *Einfluß von Astaxanthin unterschiedlicher Hersteller (BASF, SIGMA) auf die ZZK von WB-F344 Zellen und HdF. 24 h Inkubation. Absolute ZZK der Kontrolle beträgt $17,7 \pm 6,3$ (WB-F344) bzw. $9,9 \pm 3,0$ (HdF) kommunizierende Zellen.*

- | | |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 Kontrolle (0,1 % THF) | 4 BASF-Astaxanthin 10 μM |
| 2 Canthaxanthin 1 μM | 5 SIGMA-Astaxanthin 1 μM |
| 3 BASF-Astaxanthin 1 μM | 6 SIGMA-Astaxanthin 10 μM |

Die Inkubationszeit hatte keinen nennenswerten Einfluß auf die Wirkung von Astaxanthin auf die ZZK. Die Hemmung der ZZK war nach einer 72-stündigen Behandlung mit 10 μM Astaxanthin unabhängig vom Hersteller in beiden Zelltypen am intensivsten. Nach einer 72 h-Inkubation von WB-F344 mit 1 μM Astaxanthin wurde die ZZK in gleichem Maße gehemmt wie nach einer 24 h-Inkubation. Anders jedoch die Wirkung in HdF. SIGMA-Astaxanthin fiel hier aus der Reihe: nach 24 h war die ZZK zu ca. 80 % gehemmt, nach 72 h jedoch nur noch zu ca. 60 %. Wie zuvor erwähnt, setzte sich dieser Trend jedoch nicht bei der höheren Astaxanthin-Konzentration (10 μM) fort.

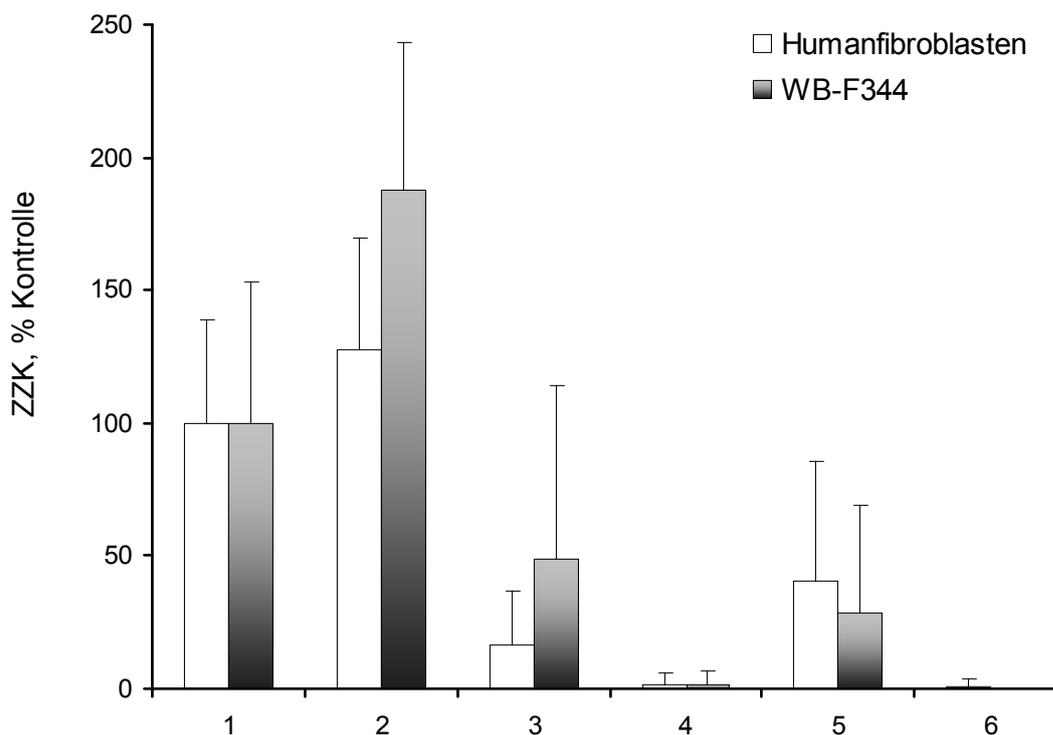


Abb. 29: *Einfluß von Astaxanthin unterschiedlicher Hersteller (BASF, SIGMA) auf die ZZK von WB-F344 Zellen und HdF. 72 h Inkubation. Absolute ZZK der Kontrolle beträgt $12,2 \pm 6,5$ (WB-F344) bzw. $9,8 \pm 3,8$ (HdF) kommunizierende Zellen.*

1 Kontrolle (0,1 % THF)

2 Canthaxanthin 1 µM

3 BASF-Astaxanthin 1 µM

4 BASF-Astaxanthin 10 µM

5 SIGMA-Astaxanthin 1 µM

6 SIGMA-Astaxanthin 10 µM

3.1.3 Vergleich der Effekte der Xanthophylle Astaxanthin und Canthaxanthin auf die Zell-Zell-Kommunikation in humanen Hautfibroblasten

Astaxanthin und Canthaxanthin sind Xanthophylle, d.h. es handelt sich um Carotinoide mit Sauerstoffatomen in ihrer Molekülstruktur (s. 2.1.5.1). Astaxanthin unterscheidet sich von Canthaxanthin lediglich durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe im Iononring in 3- bzw. 3'-Position. In den ZZK-Studien in WB-F344 (3.1.1) zeigte sich, daß diese strukturell sehr ähnlichen Moleküle sich völlig unterschiedlich hinsichtlich ihrer Wirkung auf die ZZK verhielten: Astaxanthin hemmte, Canthaxanthin stimulierte die ZZK in WB-F344. Daher wurde eine detailliertere Vergleichsstudie hinsichtlich der Wirkung von Astaxanthin und Canthaxanthin auf die ZZK durchgeführt. In den Experimenten von 3.1.2 in HdF waren

ähnliche Effekte für Astaxanthin und Canthaxanthin auf die ZZK beobachtet worden wie in WB-F344. Als Zellsystem konnten daher auch HdF verwendet werden. Damit war es möglich, Daten in einem humanen Zellsystem zu erheben.

Im Folgenden wurde zunächst die Dosisabhängigkeit der Effekte der beiden Xanthophylle auf die ZZK in HdF detaillierter untersucht (Konzentrationsbereich 10^{-9} - 10^{-5} M) (3.1.3.1). Anschließend sollte der mögliche Mechanismus, der diesen unterschiedlichen Wirkungen auf die ZZK zugrunde liegt, erarbeitet werden. Hierfür wurden Experimente zur subzellulären Lokalisation, Expression und zum Phosphorylierungsstatus des Kanalproteins Cx43 (3.1.3.2) durchgeführt.

3.1.3.1 Astaxanthin und Canthaxanthin wirken unterschiedlich auf die Zell-Zell-Kommunikation in humanen Hautfibroblasten

Die in vorherigen Experimenten erkannte gegensätzliche Wirkung von Astaxanthin und Canthaxanthin auf die ZZK in HdF bestätigte sich in den Untersuchungen zur Dosis- und Zeitabhängigkeit dieser Effekte in HdF. Die Zellen wurden mit 10^{-9} - 10^{-5} M Astaxanthin bzw. Canthaxanthin 24 – 72 h behandelt und die ZZK im Kommunikationsassay bestimmt (Abb. 30).

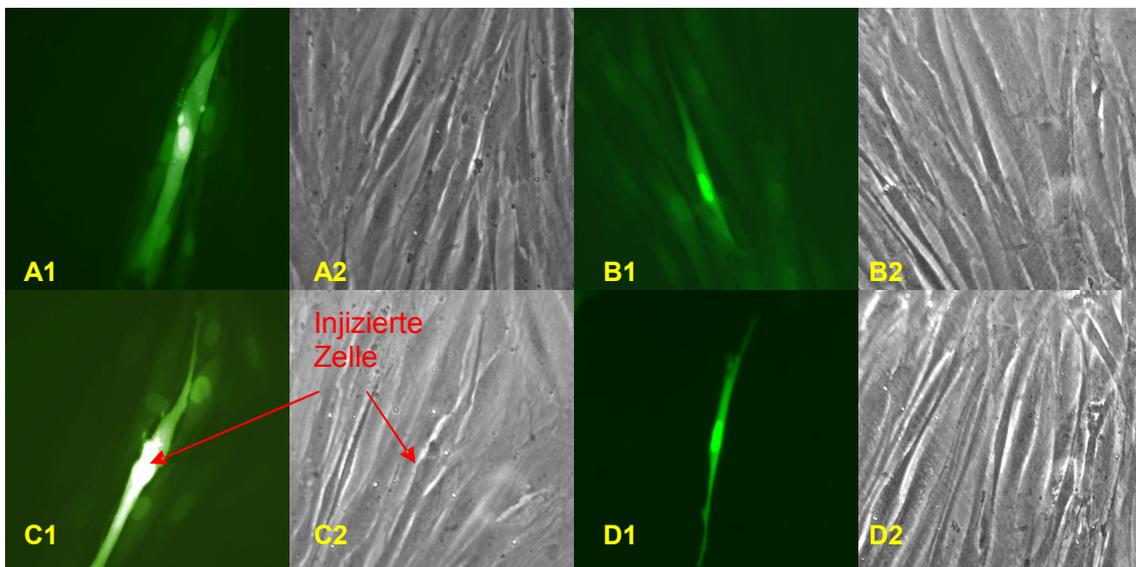


Abb. 30: Beispiele für ZZK in HdF nach Behandlung mit:

- A Kontrolle (0,1 % THF),
- B Retinsäure 0,1 μ M
- C Canthaxanthin 10 μ M,
- D Astaxanthin 10 μ M;

- 1 Fluoreszenzaufnahme der ZZK nach Injektion von Lucifer Yellow CH,
- 2 Kontrastaufnahme des Zellbereichs, in dem die injizierte Zelle lokalisiert ist.

Als Positivkontrolle wurde Retinsäure in einer Konzentration von 0,1 μM verwendet. Sie hatte sich in früheren Studien als starker Stimulator der ZZK erwiesen [Carystinos 2001, Bex 1995, Zhang 2002].

Canthaxanthin stimulierte zeitunabhängig über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich signifikant die ZZK (Abb. 31, Tab. 14). Die stimulatorische Wirkung nahm mit höheren Konzentrationen zu.

Astaxanthin hingegen hemmte dosisabhängig, jedoch zeitunabhängig im untersuchten Zeitrahmen signifikant die ZZK ab einer Konzentration größer als 10^{-6} M (Abb. 32, Tab. 15). Bereits nach einer 72-stündigen Behandlung mit 10^{-7} M Astaxanthin konnte eine signifikante Hemmung der ZZK um ca. 30 % beobachtet werden, die sich auf einen Maximalwert von ca. 98 % nach einer 24 - 72 h-Inkubation mit 10^{-6} M Astaxanthin erhöhte. 10^{-6} M Astaxanthin führte also unabhängig von der Zeit zu einer fast vollständigen Inhibierung der ZZK in HdF. Konzentrationen, die unter 10^{-7} M lagen, zeigten keine signifikante Wirkung auf die ZZK in HdF.

Tab. 14: *Einfluß von Canthaxanthin auf die ZZK in humanen Hautfibroblasten. 24 h + 72 h Inkubation. Kontrolle 0,1 % THF im Inkubationsmedium: im Mittel $8,4 \pm 4,0$ (24 h) bzw. $10,2 \pm 3,2$ (72 h) kommunizierende Zellen. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.*

Substanz	Mittelwert % \pm SD %			
	24 h		72 h	
1. Kontrolle	100,0 \pm 48,0	-	100,0 \pm 31,5	-
2. Retinsäure 0,1 μM	163,1 \pm 45,9	*	159,3 \pm 50,1	*
3. 10^{-9} M Canthaxanthin	132,7 \pm 51,2	*	124,8 \pm 33,1	*
4. 10^{-8} M Canthaxanthin	141,8 \pm 52,1	*	117,0 \pm 33,0	*
5. 10^{-7} M Canthaxanthin	126,1 \pm 49,6	*	130,9 \pm 41,0	*
6. 10^{-6} M Canthaxanthin	137,3 \pm 55,1	*	142,8 \pm 37,0	*
7. 10^{-5} M Canthaxanthin	165,9 \pm 61,2	*	156,7 \pm 55,4	*

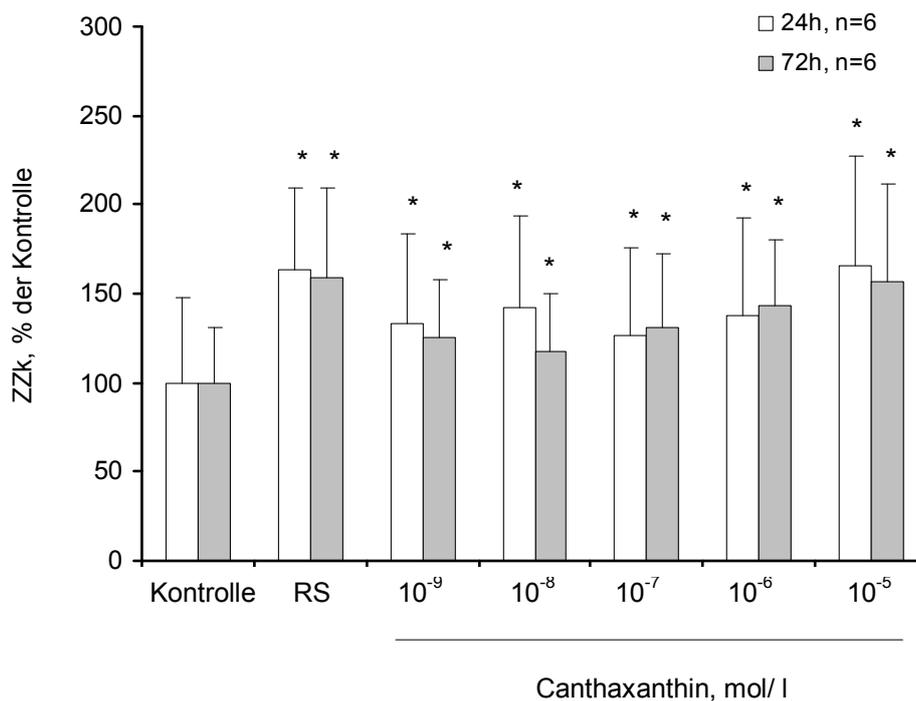


Abb. 31: Konzentrations- und Zeitabhängigkeit des Effekts von Canthaxanthin auf die ZK von humanen Hautfibroblasten. Kontrolle 0,1 % THF, RS Retinsäure 0,1 μM , 10^{-9} – 10^{-5} μM Canthaxanthin. Absolute ZK der Kontrolle beträgt $8,4 \pm 4,0$ (24 h) bzw. $10,2 \pm 3,2$ (72 h) kommunizierende Zellen. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

Tab. 15: Einfluß von Astaxanthin auf die ZK in humanen Hautfibroblasten. 24 h + 72 h Inkubation. Kontrolle 0,1 % THF im Inkubationsmedium: im Mittel $8,6 \pm 2,6$ (24 h) bzw. $7,9 \pm 3,1$ (72 h) kommunizierende Zellen. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

Substanz	Mittelwert % \pm SD %	
	24 h	72 h
1. Kontrolle	100,0 \pm 30,7 -	100,0 \pm 38,7 -
2. Retinsäure 0,1 μM	138,9 \pm 43,2 *	163,5 \pm 49,4 *
3. 10^{-9}M Astaxanthin	100,0 \pm 45,0 -	115,0 \pm 64,8 -
4. 10^{-8}M Astaxanthin	110,5 \pm 55,4 -	107,6 \pm 52,3 -
5. 10^{-7}M Astaxanthin	99,8 \pm 55,2 -	68,6 \pm 42,5 *
6. 10^{-6}M Astaxanthin	15,5 \pm 22,9 *	16,4 \pm 20,2 *
7. 10^{-5}M Astaxanthin	2,4 \pm 5,0 *	1,7 \pm 4,3 *

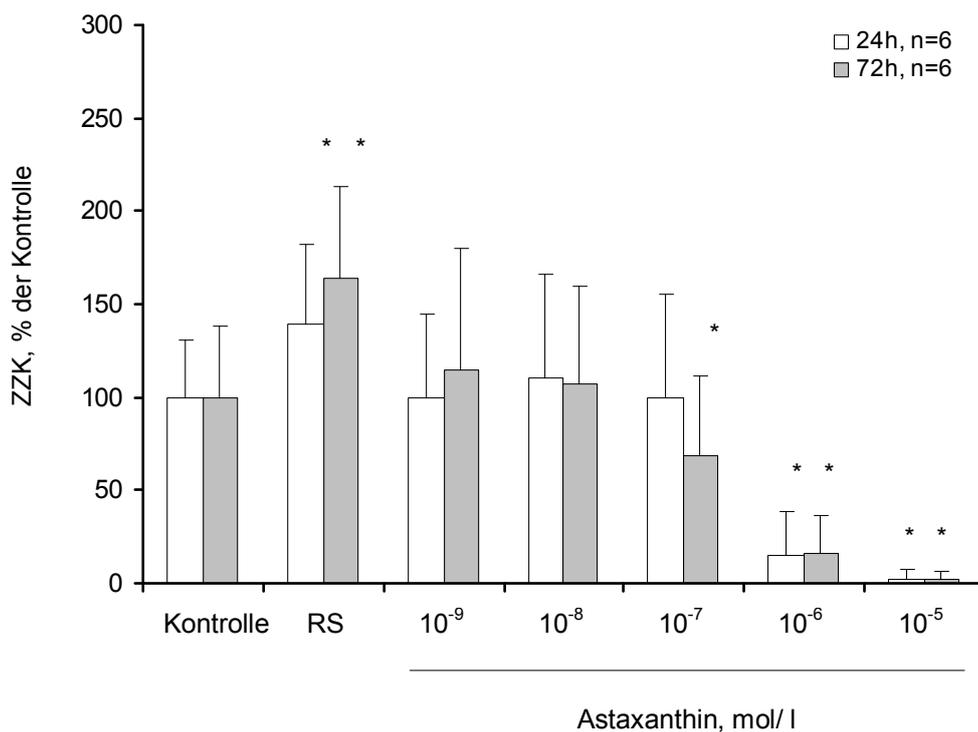


Abb. 32: Konzentrations- und Zeitabhängigkeit des Effekts von Astaxanthin auf die ZSK von humanen Hautfibroblasten. Kontrolle 0,1 % THF, RS Retinsäure 0,1 μM , 10^{-9} – 10^{-5} μM Astaxanthin. Absolute ZSK der Kontrolle beträgt $8,6 \pm 2,6$ (24 h) bzw. $7,9 \pm 3,1$ (72 h) kommunizierende Zellen. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

3.1.3.2 Einfluß von Astaxanthin und Canthaxanthin auf das Kanalprotein Connexin43

Die Proteinkanäle, über die die ZSK erfolgt, sind in den hier verwendeten humanen Hautfibroblasten (HdF) hauptsächlich aus Connexin43 (Cx43) aufgebaut. Einflüsse auf dieses Kanalprotein, beispielsweise auf

- seine Synthese
- seinen Transport vom Synthesort zur Zellmembran
- seine Einlagerung in die Zellmembran und Zusammenlagerung zu Gap Junctions
- sowie auf seine Internalisierung und seinen Abbau

können zu Veränderungen in der ZSK, sei es zu einer Zu- oder Abnahme, führen (s.a. 1.2.1.2 und 1.2.1.3).

3.1.3.2.1 Einfluß auf die subzelluläre Lokalisation von Connexin43

Zunächst wurde in immunohistochemischen Experimenten geklärt, ob Astaxanthin bzw. Canthaxanthin die subzelluläre Lokalisation des Kanalproteins beeinflussen. In Abb. 33 und 34 sind die Cx43-Verteilung (grün) und die Zellkerne (rot) in HdF nach Behandlung mit Canthaxanthin bzw. Astaxanthin abgebildet (s.a. Abb. 22). Die Zellen wurden auf Glasplättchen kultiviert, analog zu den ZZK-Experimenten in 3.1.3.1 behandelt und anschließend Cx43 und der Nucleus wie in 2.2.4 beschrieben immunohistochemisch lokalisiert.

Es konnte weder für Canthaxanthin noch für Astaxanthin eine Wirkung auf die Cx43-Lokalisation beobachtet werden. Cx43 ist auch nach der Behandlung mit diesen Carotinoiden in den Zellmembranen der HdF lokalisiert. Trotz inhibierender Wirkung von Astaxanthin auf die ZZK verursachte es im Gegensatz zum ZZK-Inhibitor TPA (Abb. 8) keine Delokalisation von Cx43. Canthaxanthin behandelte Zellen wiesen jedoch eine größere Anzahl und zudem größere Gap Junction Plaques in der Zellmembran auf, insbesondere bei höheren Konzentrationen und längerer Inkubationszeit (s. Bild Nr. 7 in Abb. 34: 10 µM Canthaxanthin 72 h). Die Positivkontrolle Retinsäure führte zu einer Erhöhung der Cx43-Expression und in der Folge zu einer Zunahme an Cx43-Protein in der Zellmembran. Auch im Zytosol von mit Retinsäure behandelten Zellen fand sich mehr Cx43 (s. Bild Nr. 2 in Abb. 33). Sowohl für Canthaxanthin und Retinsäure läßt sich – wie bereits in der Literatur in verschiedenen Zelltypen [Vine 2005, Zhang 1992 + 1995, Hossain 1989, Hanusch 1995, Clairmont 1997, Bex 1995, Tanmahasamut 2005] beschrieben – die stimulatorische Wirkung auf die ZZK durch eine erhöhte Cx43-Menge erklären: mehr Cx43 in der Zellmembran führt zur Bildung von mehr Zell-Zell-Kanälen, über die ZZK stattfinden kann. Dadurch steigt die ZZK.

Die Aufnahmen zeigen, daß nach einer längeren Inkubationszeit (72 h) mit Canthaxanthin mehr Cx43 in die Zellmembran eingebaut ist als nach 24 h.

Zusammenfassend kann konstatiert werden:

1. Astaxanthin führt nicht zu einer Delokalisation von Cx43. Der Mechanismus der inhibitorischen Wirkung läßt sich nicht durch eine Störung im Cx43-Transport oder in der Cx43-Zusammenlagerung in die Membran erklären.

2. Canthaxanthin bewirkt eine Zunahme der Cx43-Menge in der Zellmembran und stimuliert so die ZZK.

24 h - Inkubation

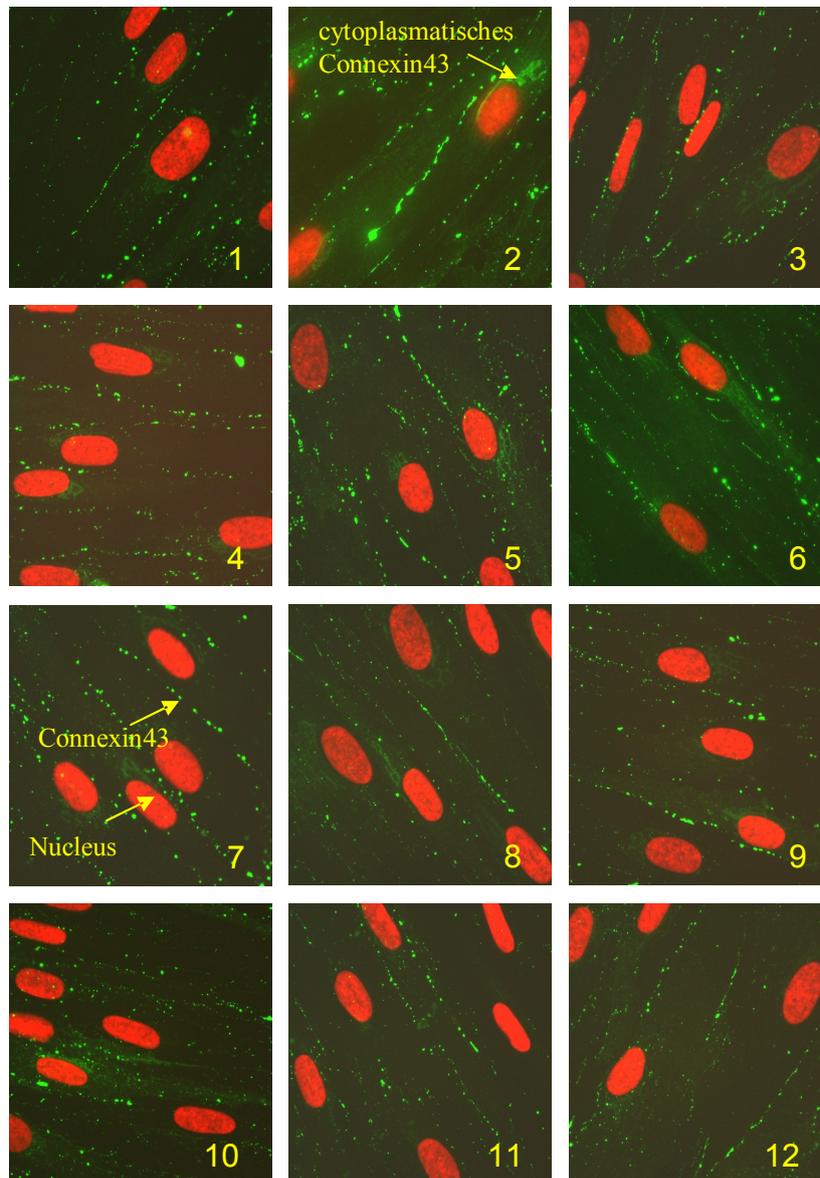


Abb. 33: Subzelluläre Lokalisation von Cx43 in humanen Hautfibroblasten nach 24 h-Inkubation mit Canthaxanthin und Astaxanthin.

1 Kontrolle (0,1 % THF)
2 Retinsäure 0,1 μM

3 - 7 Canthaxanthin $10^{-9} \text{ M} - 10^{-5} \text{ M}$
8 - 12 Astaxanthin $10^{-9} \text{ M} - 10^{-5} \text{ M}$

72 h - Inkubation

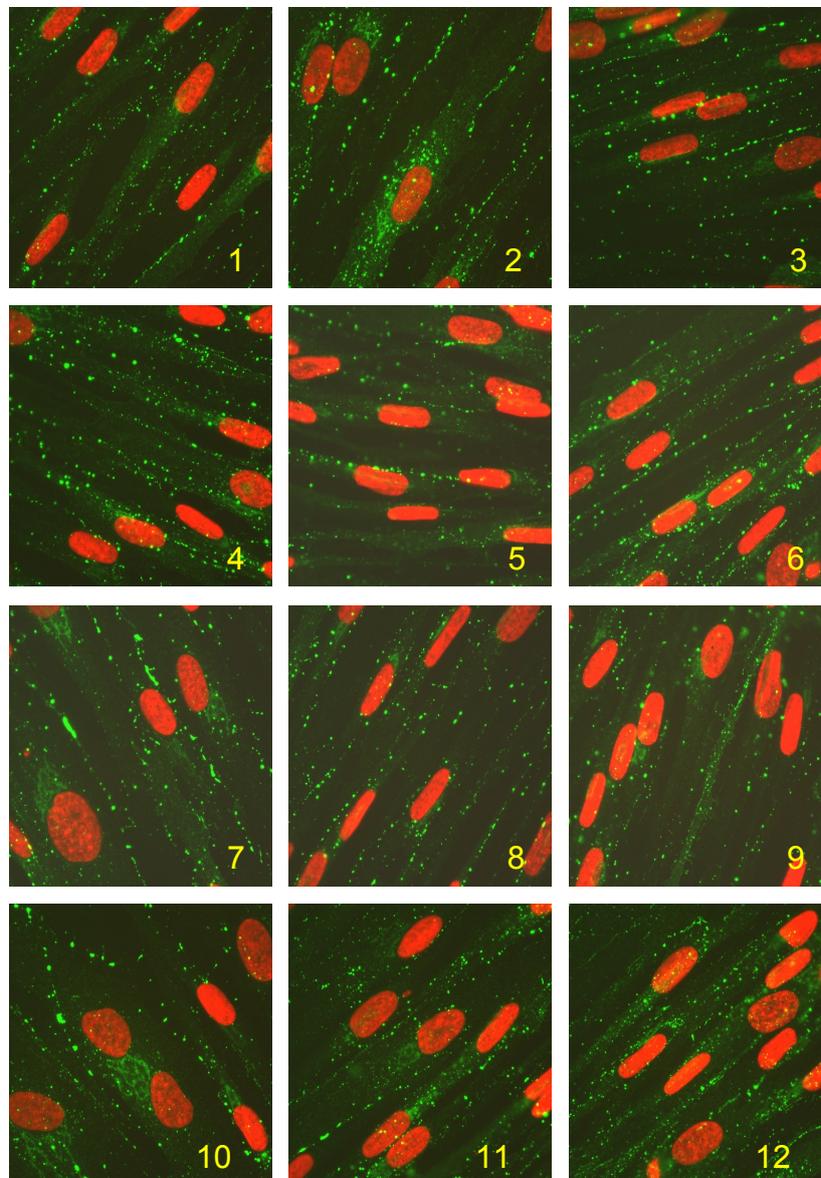


Abb. 34: Subzelluläre Lokalisation von Cx43 in humanen Hautfibroblasten nach 72 h-Inkubation mit Canthaxanthin und Astaxanthin.

1 Kontrolle (0,1 % THF)
2 Retinsäure 0,1 µM

3 - 7 Canthaxanthin 10^{-9} M – 10^{-5} M
8 - 12 Astaxanthin 10^{-9} M – 10^{-5} M

3.1.3.2.2 Einfluß auf die Expression und den Phosphorylierungsstatus von Connexin43

Desweiteren wurde der Einfluß von Astaxanthin und Canthaxanthin auf den Phosphorylierungsstatus von Cx43 untersucht. HdF wurden analog zu den ZZK-Experimenten in 3.1.3.1 kultiviert und behandelt, Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und Cx43 sowie β -Tubulin als Ladungskontrolle im Western Blot bestimmt. Die in Abb. 36 dargestellten Blots sind repräsentativ; die Versuche wurden wenigstens dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

Im Western Blot liefert Cx43 drei nahe beieinander liegende Banden, die die unterschiedlichen Phosphorylierungszustände des Phosphoproteins anzeigen (s. Abb. 35)., P0 repräsentiert den unphosphorylierten Zustand von Cx43 [Abdelmohsen 2005], P1 und P2 sind Banden von Cx43 mit höheren Phosphorylierungszuständen. Die drei Banden im Gel stehen für Molekulargewichte von 43 kDa bis 46 kDa. Als Ladungskontrolle wurde β -Tubulin detektiert, das aufgrund seines höheren Molekulargewichts von 50 kDa langsamer als Cx43 im Gel wandert und dessen Signal daher nicht mit dem des Cx43 überlappt. Es konnte weder β -Actin noch GAPDH - zwei gängige Ladungskontrollen in der Western Blot Analyse - als Ladungskontrolle verwendet werden, da ihr Signal aufgrund ähnlicher Molekulargewichte mit dem des Cx43-Signals überlappt.

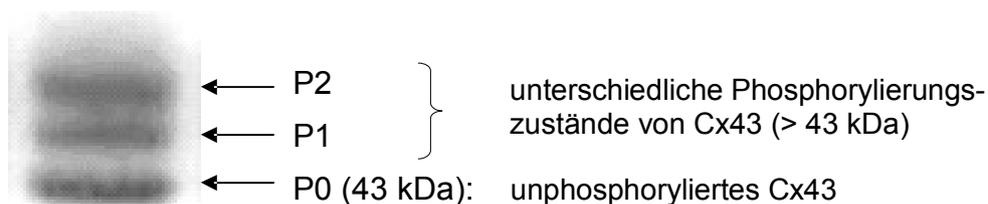


Abb. 35: Beispiel für Cx43-Muster im Westernblot. Cx43 aus HdF mit normaler ZZK (funktionsfähige Kanäle).

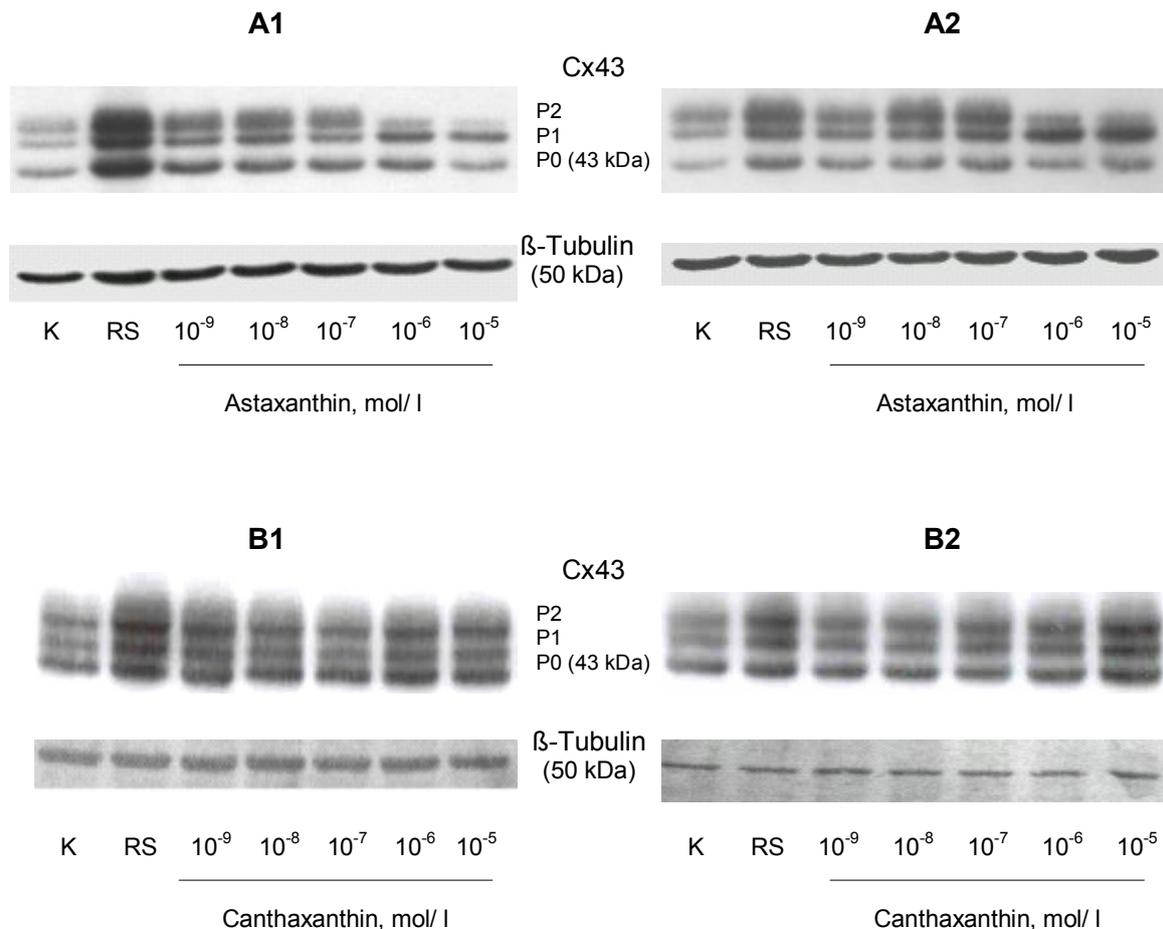


Abb. 36: Expression und Phosphorylierungsmuster von Cx43 in HdF nach Inkubation mit Astaxanthin bzw. Canthaxanthin. **A1**: 24 h-Inkubation Astaxanthin, **A2**: 72 h-Inkubation Astaxanthin, **B1**: 24 h-Inkubation Canthaxanthin, **B2**: 72 h-Inkubation Canthaxanthin. K Kontrolle, RS Retinsäure 0,1 μM, 10⁻⁹ M – 10⁻⁵ M Canthaxanthin bzw. Astaxanthin. P0, P1, P2 Phosphorylierungszustände von Cx43 (s. Abb. 35).

Die Western Blots (Abb. 36) zeigen deutlich, daß sich Astaxanthin und Canthaxanthin grundsätzlich verschieden auf die Expression und den Phosphorylierungszustand von Cx43 auswirken. Die Ergebnisse der Software (AIDA) unterstützten densitometrischen Auswertung sind in Abb. 37 und 38 dargestellt. Sowohl Astaxanthin als auch Canthaxanthin erhöhen die Expression, d.h. die Gesamtmenge, an Cx43 in HdF nach einer 72-stündigen Inkubationszeit. Während allerdings Astaxanthin eine maximale Erhöhung der Gesamt-Cx43-Menge auf das ca. 1,5fache des Kontrollwertes bewirkt, steigt diese in Gegenwart von höheren Konzentrationen Canthaxanthin auf den ca. 2,5fachen Wert an. 10⁻⁶ M Canthaxanthin stimuliert die Expression von Cx43 wesentlich stärker als 10⁻⁷ M

Canthaxanthin. 10^{-6} und 10^{-5} M Canthaxanthin sind am effektivsten und unterscheiden sich nicht voneinander in ihrer Wirkung auf die Expression von Cx43. Die Erhöhung der Expression durch Astaxanthin wird fast über den gesamten Konzentrationsbereich beobachtet: schon bei 10^{-8} M ist die Gesamt-Cx43-Menge in HdF 1,5fach höher als bei den Kontrollzellen und stagniert um diesen Wert bei den höheren Konzentrationen.

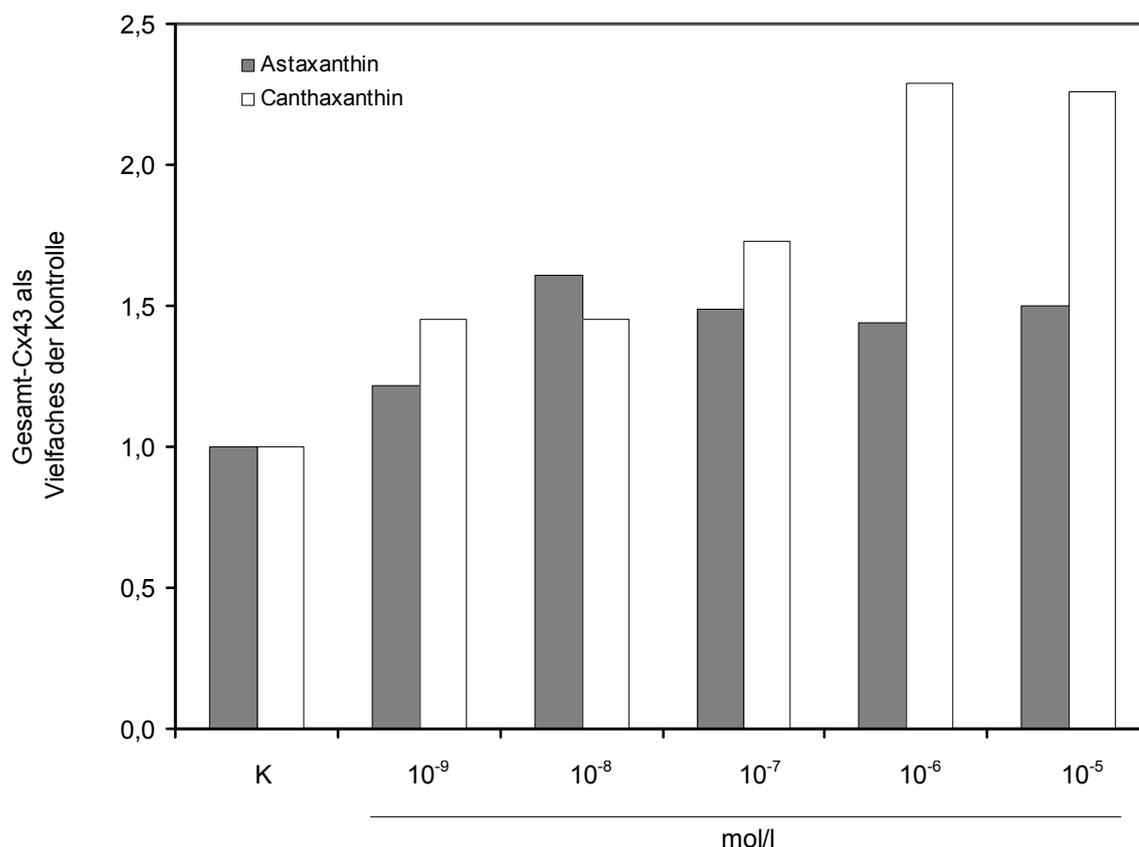


Abb. 37: Einfluß von Astaxanthin und Canthaxanthin auf die Expression von Cx43.

Gesamtmenge an Cx43 in Kontrollzellen (0,1 % THF) und in HdF, die mit 10^{-9} – 10^{-5} mol/l Canthaxanthin bzw. Astaxanthin 72 h behandelt wurden. Werte sind als Vielfaches der Kontrolle (K) angegeben. Alle Werte sind auf β -Tubulin normiert.

Das Phosphorylierungsmuster von Cx43 wird zeitunabhängig durch höhere Konzentrationen von Astaxanthin beeinflusst (Abb. 38). Mit zunehmender Astaxanthin-Konzentration wird die P2-Bande (höher phosphorylierter Zustand des Cx43) immer schwächer bis sie schließlich bei 10^{-5} M fast nicht mehr zu detektieren ist (Abb. 38). Invers dazu ist die Beobachtung im Falle der P1-Bande. Sie wird mit zunehmender Konzentrationen immer intensiver und ist nach einer 72-stündigen Behandlung mit 10^{-5} M

Astaxanthin fast 4,5fach stärker als die P1-Bande der Kontrolle. Die Zunahme der P1-Bande bzw. die Abnahme der P2-Bande ist nicht linear. Ab 10^{-6} M Astaxanthin steigt die Intensität der P1-Bande extrem an bzw. fällt die der P2-Bande stark ab.

Die Intensität der P0-Bande steigt in Anwesenheit von Astaxanthin unabhängig von der jeweiligen Konzentration auf etwa das Doppelte der Kontrolle an.

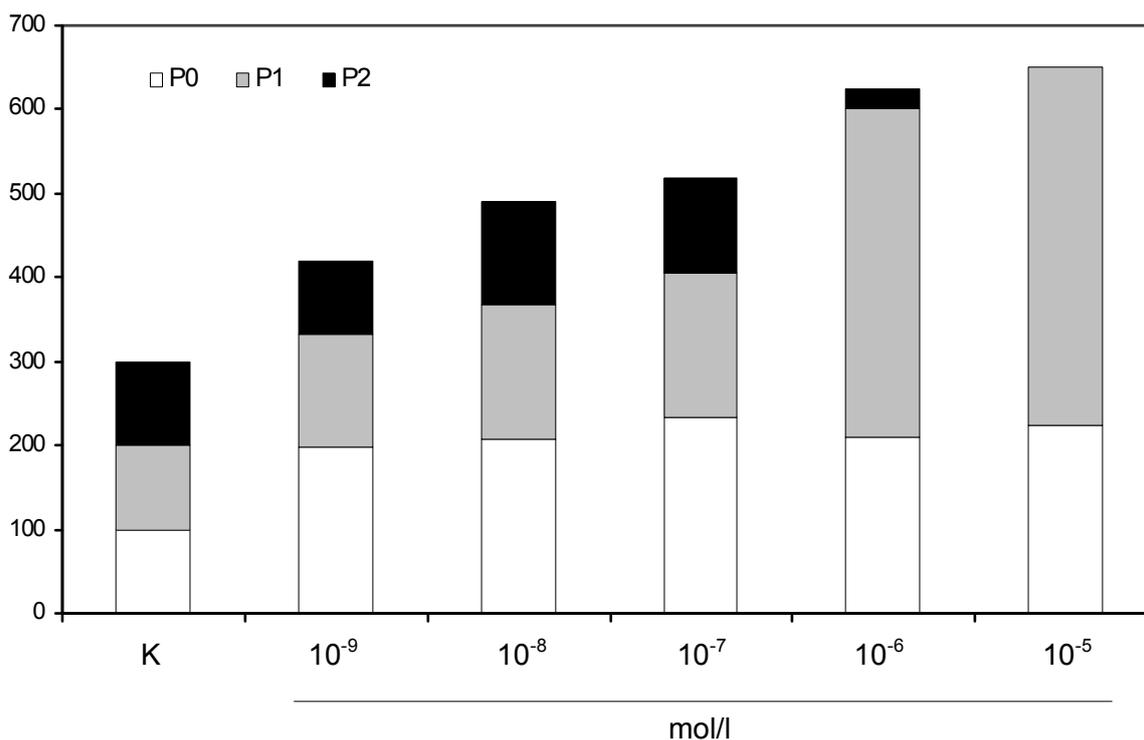


Abb. 38: Einfluß von Astaxanthin auf den Phosphorylierungszustand von Cx43. Veränderung der Intensität der drei Cx43-Banden P0, P1 und P2 im Western Blot nach einer 72-stündigen Behandlung mit 10^{-9} – 10^{-5} M Astaxanthin.

K Kontrolle. P0, P1, P2 der Astaxanthin behandelten Proben sind auf die jeweilige P0, P1, P2 der Kontrolle bezogen. Werte wurden auf die Ladungskontrolle β -Tubulin der Kontrolle normiert.

Die oben dargestellten Einflüsse einer 72 h-Inkubation mit Astaxanthin bzw. Canthaxanthin auf die Expression und den Phosphorylierungszustand von Cx43 sind auch nach einer 24 h-Inkubation zu beobachten (Abb. 36), wenngleich in geringerer Intensität.

Aus den Daten läßt sich letztlich schlussfolgern,

1. daß Canthaxanthin die Cx43-Expression erhöht und zwar in Abhängigkeit von der Konzentration sowie der Zeit und so die ZVK stimuliert. Die Erhöhung der

Proteinmenge wurde auch in den immunohistochemischen Experimenten (s. 3.1.3.2.1) beobachtet.

2. daß Astaxanthin konzentrationsabhängig, aber zeitunabhängig Veränderungen am Phosphorylierungszustand von Cx43 bewirkt. Der Effekt tritt ab einer Konzentration von 10^{-6} M Astaxanthin auf und verstärkt sich bei 10^{-5} M. In den ZZK-Experimenten traten die inhibitorischen Effekte von Astaxanthin ebenfalls bei 10^{-6} M und 10^{-5} M auf. Änderungen im Phosphorylierungsmuster stellen daher einen möglichen Mechanismus dar, der der Inhibierung der ZZK durch Astaxanthin zugrunde liegt: Astaxanthin inhibiert die ZZK, indem es das Phosphorylierungsmuster von Cx43 verändert und dadurch nicht die subzelluläre Lokalisation, sondern die Funktionalität der Cx43-Kanäle (Gap Junctions) moduliert.

3.1.4 Sonderstellung des Astaxanthins: ein starker Inhibitor der Zell-Zell-Kommunikation

3.1.4.1 Zeitlicher Verlauf des inhibitorischen Effekts von Astaxanthin auf die Zell-Zell-Kommunikation

Der inhibitorische Effekt von Astaxanthin war bis hierhin in WB-F344 und in HdF über einen weiten Konzentrationsbereich (10^{-9} M - 10^{-5} M) und bei Inkubationszeiten von 24 h und 72 h untersucht worden. 10^{-5} M Astaxanthin führten sowohl nach 24 h als auch nach 72 h zu einer beinahe kompletten Inhibierung der ZZK in beiden Zellsystemen. Als nächstes sollte geklärt werden, wie der zeitliche Verlauf (0 – 24 h) des inhibierenden Effekts von Astaxanthin ist. Hierfür wurden HdF 3 h, 6 h und 24 h mit 10^{-5} M Astaxanthin bzw. mit 10^{-5} M Canthaxanthin sowie 10^{-7} M Retinsäure als Positivkontrollen inkubiert. Anschließend wurde die ZZK im Farbstoff-Transfer-Assay gemessen (Abb. 39, Tab. 16).

Der Kommunikationsassay zeigte, daß 10 μ M Astaxanthin bereits nach 3 h die ZZK in HdF zu ca. 40 % hemmt, nach 6 h zu ca. 50 % bis hin zu fast 100 % nach 24 h.

Dahingegen wurde die stimulatorische Wirkung von Canthaxanthin erst nach 6 h beobachtet. Retinsäure stimulierte unter den gegebenen Versuchsbedingungen sogar erst nach einer 24 h-Inkubation signifikant die ZZK.

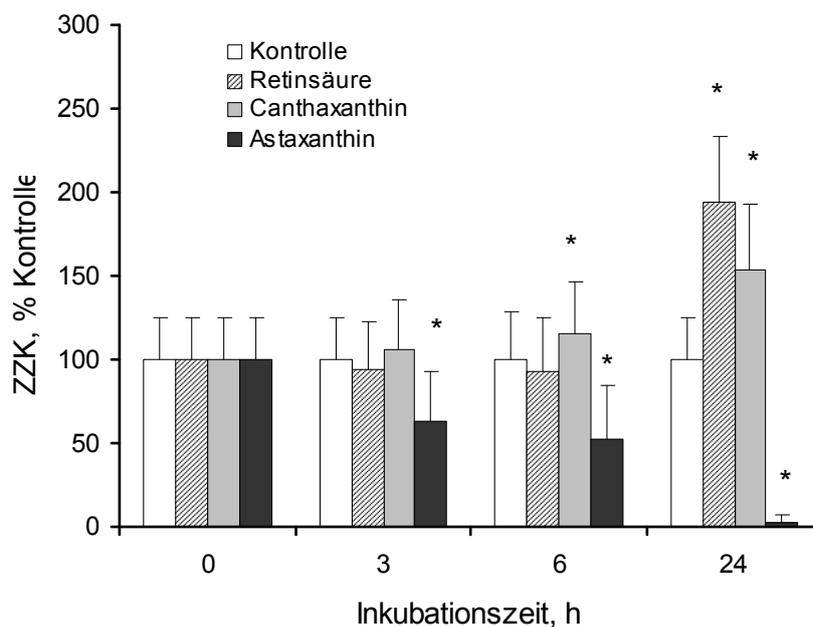


Abb. 39: Zeitabhängigkeit des Effekts von Astaxanthin und Canthaxanthin auf die ZKZ in HdF. Kontrolle 0,1 % THF, Positivkontrolle Retinsäure 0,1 μ M (RS 0,1 μ M), Astaxanthin 10 μ M, Canthaxanthin 10 μ M. Absolute ZKZ der Kontrolle s. Tab. 16. $n = 6$ (0 h, 24 h), $n = 4$ (3 h, 6 h). * $p < 0,05$ im Vergleich zum Kontrollwert.

Tab. 16: Einfluß von Astaxanthin und Canthaxanthin auf die ZKZ in HdF. 0 - 24 h Inkubation. Kontrolle 0,1 % THF im Inkubationsmedium. * $p < 0,05$ im Vergleich zum Kontrollwert.

Substanz	Mittelwert % \pm SD %			
	0 h ¹	3 h ²	6 h ³	24 h ⁴
Kontrolle	100,0 \pm 25,8	100,0 \pm 25,8	100,0 \pm 27,8	100,0 \pm 25,6
Retinsäure 0,1 μ M	100,0 \pm 25,8	93,6 \pm 29,3	92,6 \pm 32,0	193,8 \pm 39,1*
Canthaxanthin 10 μ M	100,0 \pm 25,8	106,0 \pm 29,6	115,3 \pm 30,7*	153,4 \pm 39,8*
Astaxanthin 10 μ M	100,0 \pm 25,8	62,7 \pm 30,5*	52,5 \pm 32,0*	2,0 \pm 5,1*

¹ Kontrolle, ZKZ absolut: 8,9 \pm 2,3 kommunizierende Zellen.

² - „ - : 10,5 \pm 2,7 - „ - .

³ - „ - : 7,9 \pm 2,2 - „ - .

⁴ - „ - : 8,2 \pm 2,1 - „ - .

3.1.4.2 Inhibitorischer Effekt von Astaxanthin auf die ZZK von humanen Hautfibroblasten ist reversibel

Bislang war die Inhibierung der ZZK durch Astaxanthin näher untersucht worden. Als nächster Schritt war von großem Interesse, ob der beobachtete inhibitorische Effekt von Astaxanthin auf die ZZK reversibel ist oder nicht. Dazu wurden HdF 24 h mit 10 μM Astaxanthin inkubiert und anschließend das astaxanthinhaltige Medium entfernt. Nach Waschen der Zellen mit PBS wurden diese in normalem Komplettmedium weiterkultiviert. Nach bestimmten Zeitintervallen (24 h, 48 h) der Regenerationsmöglichkeit für die Zellen nach Entfernen des Astaxanthins wurde die ZZK gemessen (Abb. 40, Tab. 17). Analog wurden HdF mit 10 μM Canthaxanthin und 0,1 μM Retinsäure behandelt.

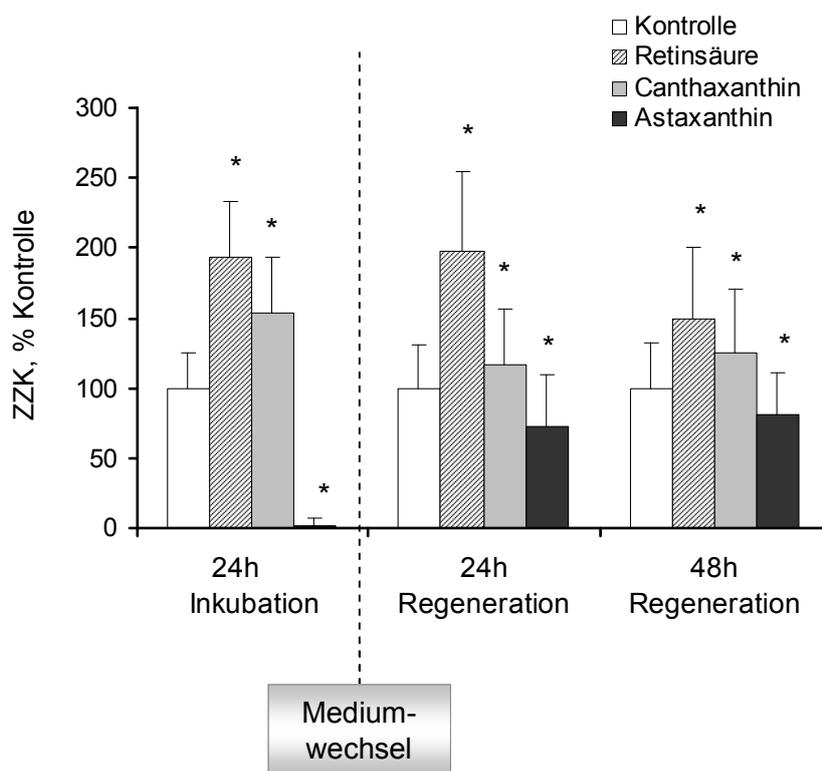


Abb. 40: Reversibilität des inhibitorischen Effekts von Astaxanthin auf die ZZK in HdF. Kontrolle (0,1 % THF), Positivkontrolle Retinsäure (0,1 μM), Astaxanthin (10 μM), Canthaxanthin (10 μM). Absolute ZZK der Kontrolle s. Tab. 17. $n = 6$ (24 h Inkubation), $n = 4$ (24 h, 48 h Regeneration), * $p < 0,05$ im Vergleich zum Kontrollwert.

Tab. 17: Reversibilität des inhibitorischen Effekts von Astaxanthin. Kontrolle 0,1 % THF. * $p < 0,05$ im Vergleich zum Kontrollwert.

Substanz	Mittelwert % \pm SD %		
	24 h Inkubation ¹	24 h Regeneration ²	48 h Regeneration ³
Kontrolle	100,0 \pm 25,6	100,0 \pm 31,3	100,0 \pm 32,3
Retinsäure 0,1 μ M	193,8 \pm 39,1*	197,5 \pm 56,9*	150,0 \pm 50,3*
Canthaxanthin 10 μ M	153,4 \pm 39,8*	117,1 \pm 39,5*	125,5 \pm 45,0*
Astaxanthin 10 μ M	2,0 \pm 5,1*	72,6 \pm 36,9*	80,4 \pm 31,1*

¹ Kontrolle, ZZK absolut: 8,2 \pm 2,1 kommunizierende Zellen.

² -,,- : 8,0 \pm 2,5 -,,- :

³ -,,- : 9,6 \pm 3,1 -,,- :

Es stellte sich heraus, daß die starke Inhibierung nach 24-stündiger Behandlung mit 10 μ M Astaxanthin reversibel ist, sobald das Carotinoid aus dem Inkubationsansatz entfernt wird. Nach einer Regenerationszeit von 24 h hatte sich die ZZK bereits bis auf 70 % des Kontrollwertes wieder erholt. 48 h nach Entfernen des Astaxanthins aus dem Inkubationsmedium wurde eine ZZK von ca. 80 % gemessen. Der ursprünglich stimulierende Effekt von Canthaxanthin war nach dem Entfernen des Canthaxanthins aus dem Inkubationsmedium nach einer 24-stündigen Regeneration ebenfalls abgeschwächt – die stimulatorische Wirkung betrug nur noch ca. 120 % des Kontrollwertes im Vergleich zu ca. 150 % nach 24 h Inkubation. Im Gegensatz dazu hielt der stark stimulatorische Effekt von Retinsäure auch noch 24 h nach Entfernen der Retinsäure aus dem Inkubationsmedium an. Erst nach einer 48-stündigen Regenerationszeit schwächte die Stimulation auf 150 % des Kontrollwertes ab im Vergleich zu einer fast 200 %igen Stimulation nach einer 24 h Inkubation sowie nach 24 h Regeneration.

Diese Beobachtungen legen den Schluß nahe, daß hier unterschiedliche Mechanismen eine Rolle spielen, über die die ZZK beeinflusst wird.

Die ZZK-Hemmung durch Astaxanthin ist in dem verwendeten Zellsystem (HdF) reversibel. In 3.1.3.2.2 war als Mechanismus der ZZK-Inhibierung durch Astaxanthin eine Beeinflussung des Phosphorylierungszustands von Cx43 beobachtet worden. Der Verlust der P2-Bande ging einher mit der Inhibierung der ZZK. Da sich die ZZK-Inhibierung als reversibel gezeigt hatte, sollte auch die P2-Bande in den regenerierten Zellen wieder zu

sehen sein, vorausgesetzt, daß die Veränderung der Phosphorylierung kausal mit der Abnahme der ZZK zusammenhing.

Die Western Blot Analyse von Zellen in der Regenerationsphase nach Entfernen des Astaxanthins aus dem Inkubationsansatz (Abb. 41) zeigte, daß die P2-Bande von Cx43 nach Entfernen des Astaxanthins wieder zu detektieren war. Dies bestärkt die Annahme, daß ein Zusammenhang zwischen der Änderung des Phosphorylierungsmusters und der Kanal-Funktionalität (ZZK) besteht. ZZK und Phosphorylierungsmuster von Cx43 regenerierten sich innerhalb der gleichen Zeitspanne nach Entfernen des Astaxanthins aus dem Inkubationsansatz.

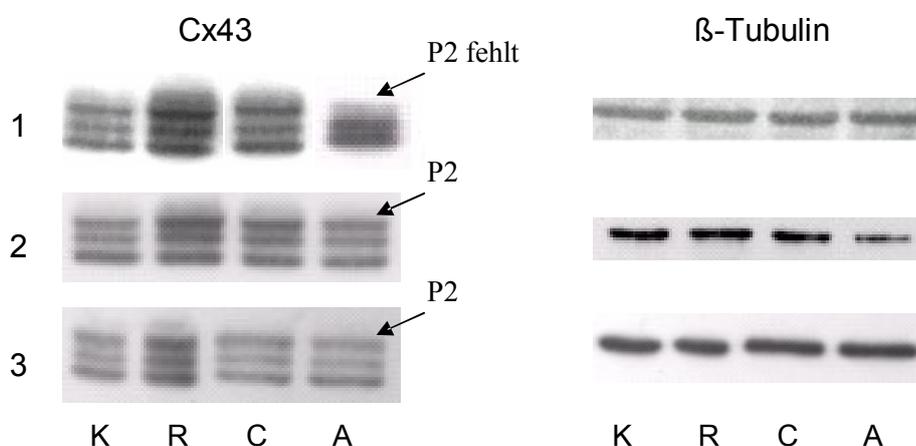


Abb. 41: Reversibilität des inhibitorischen Effekts von Astaxanthin auf die ZZK in HdF: Phosphorylierungsmuster von Cx43. β -Tubulin als Ladungskontrolle.

K Kontrolle (0,1 % THF) **C** Canthaxanthin 10 μ M
R Retinsäure 0,1 μ M **A** Astaxanthin 10 μ M
 (Positivkontrolle)

1 24 h Inkubation
2 24 h Regeneration
3 48 h Regeneration

3.1.5 Aufnahme von Astaxanthin und Canthaxanthin in humanen Hautfibroblasten

Substanzen müssen zur Wirkungsentfaltung mit den Zellen in Kontakt kommen, d.h. sie müssen aufgenommen oder assoziiert werden. Dies gilt auch für die hier untersuchten Carotinoide. In den bisherigen Experimenten waren die Effekte von Carotinoiden auf die ZZK bzw. auf das Kanalprotein Cx43 bei unterschiedlichen Konzentrationen an

Carotinoiden im Inkubationsmedium getestet worden. Die beobachteten Effekte wurden dann in Korrelation zu den jeweiligen Konzentrationen gesetzt. Wieviel der jeweiligen Substanz jeweils aus dem Medium in die Zellen aufgenommen oder mit den Zellen assoziiert wurde, blieb dabei außer acht. Daher wurde in den nächsten Untersuchungen die Resorption bzw. Assoziation von Astaxanthin und Canthaxanthin in den Zellen in einem Konzentrationsbereich von 10^{-9} M bis 10^{-5} M mittels HPLC-Analyse bestimmt. Die Versuchsbedingungen wurden analog zu der Vergleichsstudie der beiden Substanzen in 3.1.3 gewählt.

HdF wurden wie für die ZZK-Experimente (s. 3.1.3) kultiviert und inkubiert. Nach beendeter Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert. Anschließend konnten die Carotinoide extrahiert und per HPLC quantitativ bestimmt werden. Aus den Zellüberständen (Carotinoidmedium) wurden die Carotinoide nach dem gleichen Schema extrahiert und gemessen.

Die Messungen wurden für zwei Versuchsreihen durchgeführt (Tab. 18). Die Resultate variierten stark, dennoch waren das Resorptions- bzw. Assoziationsverhalten der Carotinoide erkennbar: je höher die Konzentration des jeweiligen Carotinoids im Inkubationsmedium war, desto größer war die Menge des resorbierten bzw. assoziierten Carotinoids im Lysat (Tab. 18A) und der Carotinoidgehalt im Medium (Tab. 18B). Die Daten lassen eine Korrelation zwischen angebotener und resorbierter Carotinoidmenge erkennen.

Die Meßergebnisse variierten sehr stark. Daher sind keine detaillierten Aussagen über Carotinoidgehalt (Medium) und resorbierte Carotinoidmenge (Lysat) möglich.

Tab. 18: Quantitative Bestimmung von Astaxanthin und Canthaxanthin im Zelllysate (A) und im Inkubationsmedium (B). nn – nicht nachweisbar.
n = 2.

Standardgleichungen:

$$y_{\text{Astaxanthin}} = 0,2176 x \quad ; \quad R^2 = 0,9638$$

$$y_{\text{Canthaxanthin}} = 0,2187 x \quad ; \quad R^2 = 0,9619$$

(A)

Lysat, µg/ mg*				
24 h	Astaxanthin		Canthaxanthin	
Kontrolle (0,1 % THF)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
10 ⁻⁹ M	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
10 ⁻⁸ M	0,01	n.n.	n.n.	0,03
10 ⁻⁷ M	0,06	0,26	0,06	0,10
10 ⁻⁶ M	1,27	3,21	0,57	0,12
10 ⁻⁵ M	38,39	135,97	79,63	201,54
72 h				
Kontrolle (0,1 % THF)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
10 ⁻⁹ M	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
10 ⁻⁸ M	0,01	n.n.	n.n.	n.n.
10 ⁻⁷ M	0,11	0,29	0,11	0,09
10 ⁻⁶ M	6,51	6,05	0,67	0,06
10 ⁻⁵ M	32,72	156,14	511,54	522,47

* Angegeben in µg Carotinoid pro mg Gesamtprotein im Zelllysate.

(B)

Medium, µmol/ l*				
24 h	Astaxanthin		Canthaxanthin	
Kontrolle (0,1 % THF)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
10 ⁻⁹ M	0,01	0,25	0,02	n.n.
10 ⁻⁸ M	0,06	n.n.	0,11	0,15
10 ⁻⁷ M	0,14	0,86	1,07	1,19
10 ⁻⁶ M	9,10	14,48	8,12	3,04
10 ⁻⁵ M	25,21	94,25	107,06	77,16
72 h				
Kontrolle (0,1 % THF)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
10 ⁻⁹ M	0,01	n.n.	n.n.	0,02
10 ⁻⁸ M	0,08	0,01	0,15	0,10
10 ⁻⁷ M	0,18	0,47	0,97	0,76
10 ⁻⁶ M	7,44	7,44	10,49	1,59
10 ⁻⁵ M	19,46	43,82	46,73	33,39

* Angegeben in µmol Carotinoid pro Liter Medium.

3.2 Einfluß von Dicumarol auf die Zell-Zell-Kommunikation in WB-F344 und HFFF2

Die Zell-Zell-Kommunikation (ZZK) kann durch verschiedene Substanzen stimuliert bzw. gehemmt werden. EGF (epidermal growth factor) [Warn-Cramer 1996, Kanemitsu 1993, Cameron 2003] und Chinone (wie z.B. das Naphthochinon-Derivat Menadion (Vitamin K₃)) [Abdelmohsen 2003, Klotz 2002] sind bekannt als Inhibitoren der ZZK. Zu den vielfältigen Regulationsmöglichkeiten der ZZK zählen auch posttranslationale Modifikationen am Kanalprotein Cx43, beispielsweise Phosphorylierungen (s. 1.2.1.3) [Lampe 2004, Saez 2003]. EGF und Chinone aktivieren eine Signalkaskade, die über die Kinasen ERK-1 und ERK-2 verläuft und die in einer Phosphorylierung von Cx43, einhergehend mit der Abnahme der ZZK, mündet [Abdelmohsen 2003, Klotz 2002] (s.a. Abb. 11). Nach einer Blockierung der Aktivierung dieser Signalkaskade mit Hilfe geeigneter Inhibitoren sollte keine Abnahme der ZZK mehr zu verzeichnen sein. Die durch einige Chinone induzierte ERK-Aktivierung kann durch Dicumarol blockiert werden [Klotz 2002].

Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob die durch Chinone induzierte und über ERK vermittelte Abnahme der ZZK durch Dicumarol verhindert werden kann. In Vorversuchen verhielt sich aber Dicumarol selbst als Inhibitor der ZZK. Daher wurde der unvermutete inhibitorische Effekt des Cumarinderivats auf die ZZK näher untersucht. Hierfür wurde in unterschiedlichen Zellsystemen (WB-F344, HFFF2) die Konzentrations- und Dosisabhängigkeit sowie die Reversibilität der inhibitorischen Wirkung untersucht.

3.2.1 Dicumarol - ein starker Inhibitor der Zell-Zell-Kommunikation

Dicumarol bewirkte sowohl in WB-F344 als auch in HFFF2 eine drastische Verminderung der ZZK (Abb. 42 und 43). Allerdings war der Effekt in WB-F344 stärker als in HFFF2 (Abb. 43): eine fast komplette Inhibierung der ZZK wurde in WB-F344 bei 10 µM, in HFFF2 dagegen erst bei 100 µM beobachtet. Dicumarol hemmte die ZZK in beiden Zelltypen dosisabhängig: je höher die Dosis, desto höher die Hemmung der ZZK durch Dicumarol. Signifikant inhibitorische Effekte wurden in WB-F344 bereits ab einer Konzentration von 1,25 µM festgestellt. Für eine 50 %ige Inhibierung der ZZK in WB-F344 war eine Konzentration (IC₅₀) von ca. 3 µM Dicumarol bei einer 60-minütigen

Inkubationszeit erforderlich. In HFFF2 lag die IC_{50} bei weniger als $10 \mu\text{M}$ (Abb. 43, Tab. 19).

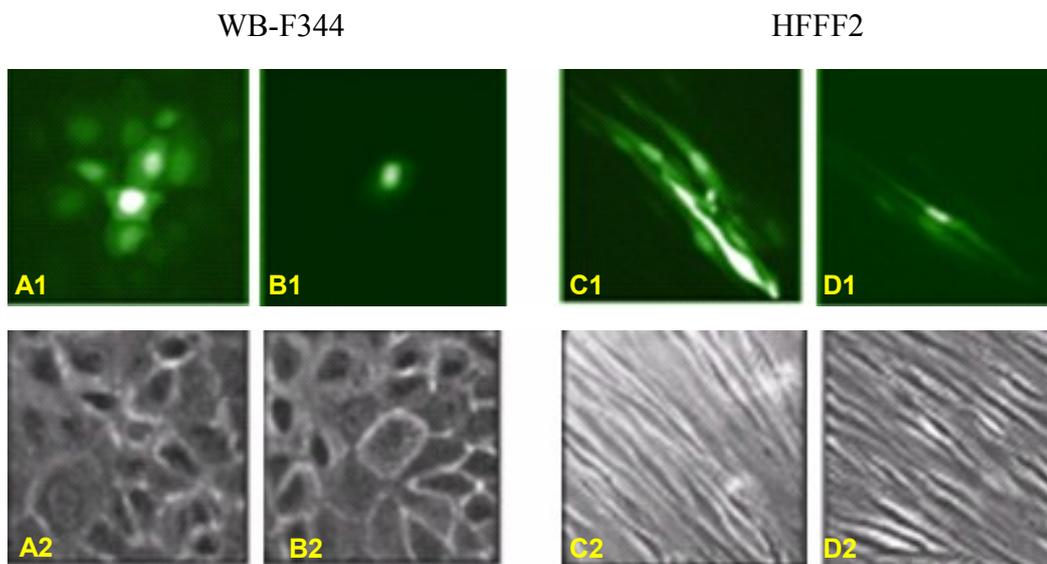


Abb. 42: Messung der ZKK in WB-F344 und HFFF2 nach 60-minütiger Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ Dicumarol. Fluoreszenz (1) - und Phasenkontrast (2) - Aufnahmen von WB-F344 (A, B) und HFFF2 (C, D). Dicumarol $10 \mu\text{M}$ (B, D), DMSO als Kontrolle (A, C).

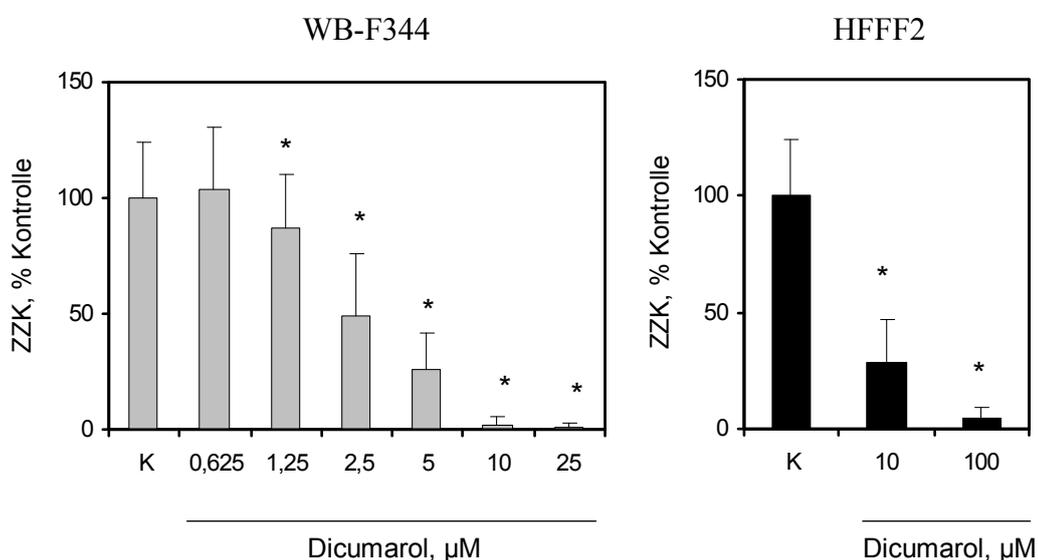


Abb. 43: Dosisabhängigkeit des inhibitorischen Effekts von Dicumarol auf die ZKK von WB-F344 und HFFF2. 60 min Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Dicumarol.

K Lösungsmittel-Kontrolle (0,25 % DMSO). Absolute ZKK der Kontrolle beträgt durchschnittlich $16,0 \pm 3,9$ (WB-F344) bzw. $9,3 \pm 2,4$ (HFFF2) kommunizierende Zellen. $n = 3$ (WB-F344), $n = 2$ (HFFF2). * $p < 0,05$, im Vergleich zur Kontrolle.

Konzentration ^{Dicumarol} , μM	WB-F344	HFFF2
Kontrolle	100,0 ± 24,5	100,0 ± 24,4
0,625	103,6 ± 26,7	---
1,25	86,7 ± 23,5	---
2,5	49,1 ± 26,9	---
5	25,8 ± 15,7	---
10	1,9 ± 3,6	28,9 ± 18,4
25	0,6 ± 2,3	---
100	---	4,3 ± 5,4

*Tab. 19: Dosisabhängigkeit des inhibitorischen Effekts von Dicumarol auf die ZZK. ZZK angegeben als Mittelwert % ± SD %. Absolute ZZK der Kontrolle beträgt durchschnittlich 16,0 ± 3,9 (WB-F344) bzw. 9,3 ± 2,4 (HFFF2) kommunizierende Zellen. n = 3 (WB-F344), n = 2 (HFFF2). * p < 0,05, im Vergleich zur Kontrolle.*

Die Inhibierung der ZZK war nicht nur dosis-, sondern auch zeitabhängig (Abb. 44, Tab. 20). Die Wirkung in WB-F344 war stärker bzw. schneller als in HFFF2. 100 μM Dicumarol führten in WB-F344 bereits nach 15 min, in HFFF2 erst nach 30 min zu einer kompletten Inhibierung. In WB-F344 reichte ein Viertel der Konzentration (25 μM), um nach 30 min, analog zu 100 μM in HFFF2, eine komplette Hemmung der ZZK zu erreichen. Der Verlauf der Zeitabhängigkeit ist jedoch in beiden Zelltypen und unabhängig von der Konzentration identisch. Die Abnahme der ZZK ist innerhalb der ersten 10 min am stärksten (ca. 70 - 80 %) und flacht dann langsam zur kompletten Hemmung hin ab.

Die eingesetzten Dicumarol-Konzentrationen waren in keinem der getesteten Zellsysteme toxisch (Daten nicht dargestellt). Dies spiegeln auch die Phasenkontrastaufnahmen in Abb. 42 wieder.

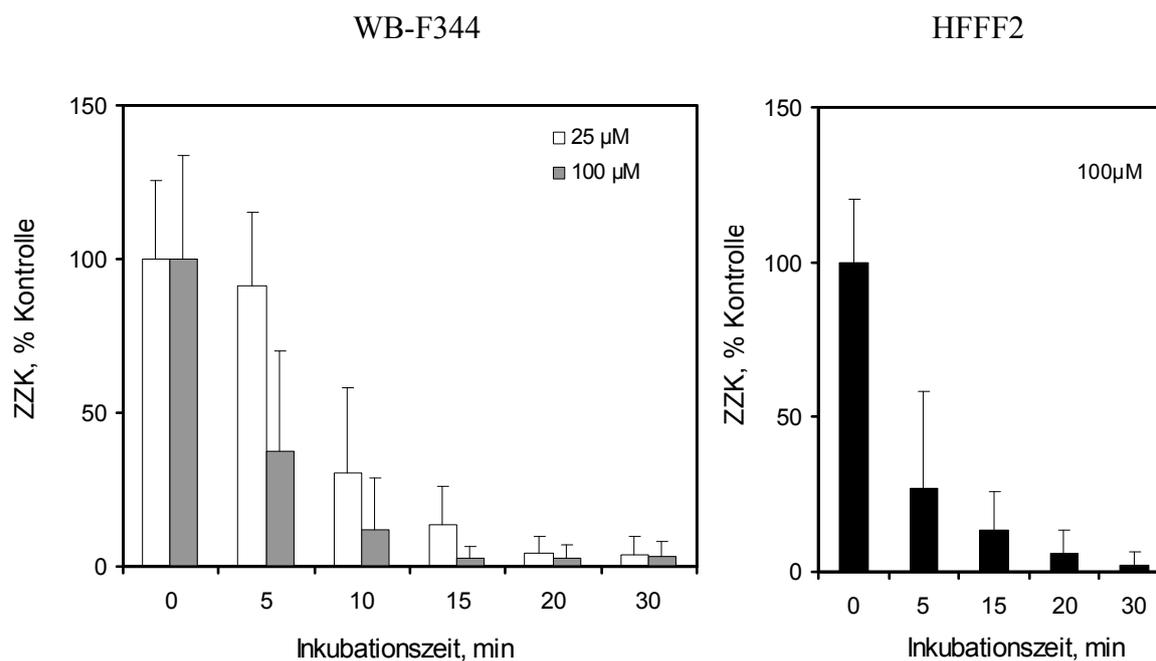


Abb. 44: Zeitabhängigkeit des inhibitorischen Effekts von Dicumarol auf die ZK von HFFF2 und WB-F344. 0, 5, 15, 20 min Inkubation. Absolute ZK der Kontrolle beträgt durchschnittlich $12,5 \pm 3,2$ (WB-F344) bzw. $10,7 \pm 2,2$ (HFFF2) kommunizierende Zellen. $n = 3$ (WB-F344, 25 μM), $n = 4$ (WB-F344, 100 μM), $n = 2$ (HFFF2, 100 μM).

Tab. 20: Zeitabhängigkeit des inhibitorischen Effekts von Dicumarol auf die ZK von HFFF2 und WB-F344. 100 μM Dicumarol. 0, 5, 15, 20 min Inkubation. Absolute ZK der Kontrolle beträgt durchschnittlich $12,5 \pm 3,2$ (WB-F344) bzw. $10,7 \pm 2,2$ (HFFF2) kommunizierende Zellen. $n = 2$.

Inkubationszeit, min	ZK, Mittelwert % \pm SD %		
	WB-F344		HFFF2
	25 μM	100 μM	100 μM
0*	100,0 \pm 25,4	100,0 \pm 33,7	100,0 \pm 20,5
5	91,6 \pm 23,8	37,3 \pm 32,8	27,1 \pm 31,3
10	30,5 \pm 27,5	12,1 \pm 16,9	---
15	13,8 \pm 12,1	2,7 \pm 3,8	13,6 \pm 12,4
20	4,1 \pm 5,7	2,5 \pm 4,8	6,1 \pm 7,4
30	3,9 \pm 5,7	3,1 \pm 5,0	2,3 \pm 4,0

* 0 min Inkubation = Kontrollwert.

Weiterhin zeigte sich in Reversibilitäts-Experimenten, daß der starke, inhibitorische Effekt von Dicumarol reversibel ist (Abb. 45). WB-F344 wurden 60 min mit 25 μ M Dicumarol inkubiert und anschließend wurde das Dicumarol-Medium entfernt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in serumfreiem Medium weiter kultiviert. Anschließend wurde die ZZK zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Mediumwechsel (= Regenerationszeit) gemessen. Nach einer Regenerationszeit von 60 min hatte sich die ZZK in WB-F344 bis auf ca. 80 % des Kontrollwertes erholt.

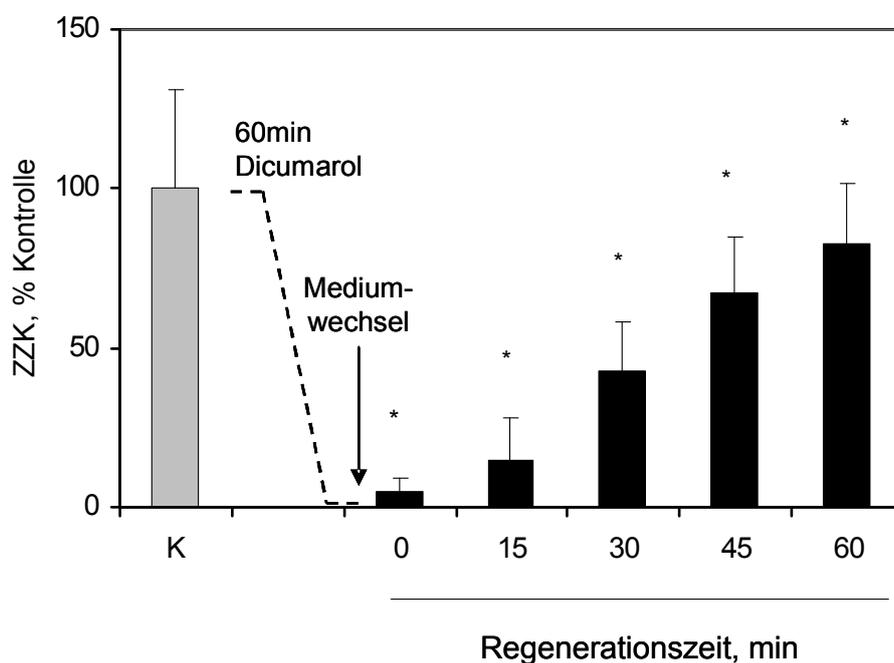


Abb. 45: Reversibilität des inhibitorischen Effekts von Dicumarol auf die ZZK von WB-F344. 60 min Inkubation mit 25 μ M Dicumarol, anschließend Messung der ZZK nach 0, 15, 30, 45 und 60 min nach Entfernen des Dicumarols. K Kontrolle. Absolute ZZK der Kontrolle beträgt durchschnittlich $15,7 \pm 4,9$ kommunizierende Zellen. $n = 4$. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

Regenerationszeit nach Mediumwechsel*, min	ZZK, Mittelwert % \pm SD %
Kontrolle	100,0 \pm 31,3
0	4,6 \pm 4,6
15	14,8 \pm 13,3
30	43,1 \pm 15,1
45	67,6 \pm 17,4
60	82,6 \pm 18,8

*Tab. 21: Reversibilität des inhibitorischen Effekts von Dicumarol auf die ZZK von WB-F344. 60 min Inkubation mit 25 μ M Dicumarol. Absolute ZZK der Kontrolle beträgt durchschnittlich 15,7 \pm 4,9 kommunizierende Zellen. n = 4. * p < 0,05, im Vergleich zur Kontrolle.*

* Entfernen des dicumarolhaltigen Mediums und Inkubation in serumfreiem Medium.

3.2.2 Mechanismus des inhibitorischen Effekts von Dicumarol auf die Zell-Zell-Kommunikation

Wie mehrfach erwähnt, kann die ZZK durch Phosphorylierung des Kanalproteins Cx43 reguliert werden (s. 1.2.1.3). Der inhibitorische Effekt von Dicumarol trat sehr rasch auf – 100 μ M Dicumarol führten zu einem mehr als 60 % igen Verlust der ZZK innerhalb der ersten fünf Inkubationsminuten (Abb. 42). Daher kann auch hier eine Cx43-Phosphorylierung der Grund für die ZZK-Abnahme sein, da Phosphorylierungen sehr schnell ablaufende Ereignisse in der Zelle sind. Es zeigte sich, daß Dicumarol weder EGFR noch ERK aktiviert (s. [Abdelmohsen 2005]). Folglich läßt sich die Abnahme der ZZK in Anwesenheit von Dicumarol nicht durch eine Aktivierung der ERK1/ ERK2- Signalkaskade erklären wie es beispielsweise für Chinone bekannt ist [Klotz 2002, Abdelmohsen 2005].

Western Blot Untersuchungen von Cx43 nach einer Behandlung von WB-F344 und HFFF2 mit Dicumarol ergaben, daß parallel zur Abnahme der ZZK eine Änderung des Phosphorylierungsstatus von Cx43 auftrat (Abb. 46). In 3.2.1 ist beschrieben, daß durch eine ca. 30-minütige Inkubation mit 25 μ M Dicumarol die ZZK in WB-F344 fast komplett inhibiert wird. In den dazugehörigen Western-Blot-Experimenten (Abb. 46 B) konnte eine Abnahme bis hin zum Verschwinden der P2-Bande von Cx43 nach 30 min beobachtet werden. Auch in HFFF2 war keine P2-Bande mehr zu detektieren, nachdem die Zellen mit 10 bzw. 100 μ M Dicumarol behandelt worden waren. Der Verlust der P2-Bande war wie die Inhibierung der ZZK reversibel: nach dem Auswaschen des Dicumarols und einer Regenerationszeit von 60 min in serumfreiem Medium konnte die P2-Bande wieder im Western Blot detektiert werden (Abb. 46 A).

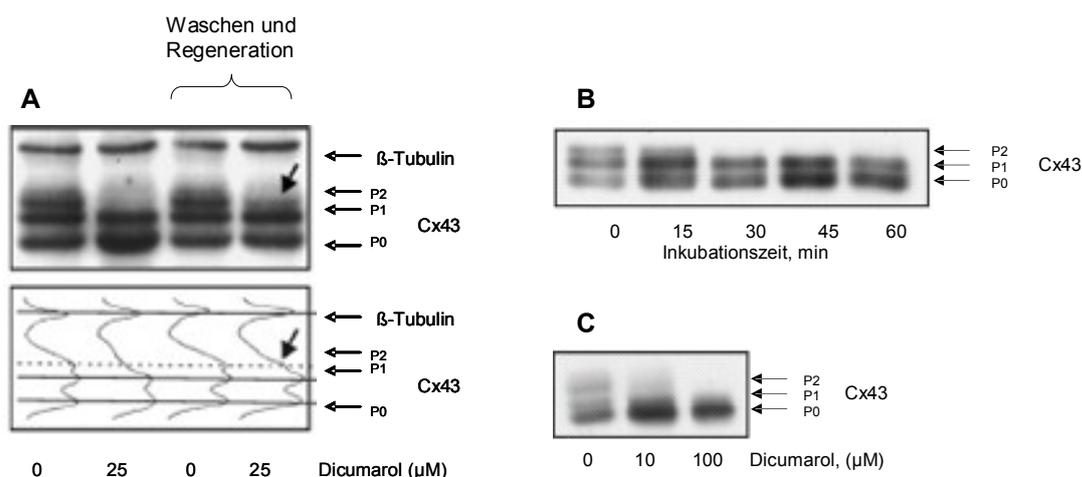


Abb. 46: Western-Blot-Analyse von Cx43 nach Inkubation mit Dicumarol.

- A Cx43-Phosphorylierung in WB-F344 nach 60-minütiger Inkubation mit 25 µM Dicumarol (Bande 1 und 2) bzw. nach anschließendem Auswaschen des Dicumarols und 60-minütiger Regenerationszeit in serumfreiem Medium (Bande 3 und 4). 0 = Kontrolle.
- B Änderung der Cx43-Phosphorylierung in WB-F344 infolge von Inkubation mit 25 µM Dicumarol in Abhängigkeit von der Zeit.
- C Änderung der Cx43-Phosphorylierung in HFFF2 nach 60 min Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Dicumarol (10 µM, 100 µM). 0 = Kontrolle.

3.2.3 Das inhibitorische Potential von Dicumarol

Als ZVK-Inhibitoren sind auch andere Substanzen bekannt, beispielsweise Alkanole, primäre Amide von Fettsäuren (z.B. Oleamid) [Guan 1997, Boger 1998] und Substanzen, die mit Membran-Ionenkanälen interagieren (z.B. flufenamic acid) [Harks 2001, Eskandari 2002]. Allerdings sind die mechanistischen Abläufe der Inhibierung noch nicht geklärt.

Dicumarol wurde in WB-F344 Zellen mit zwei weiteren Inhibitoren (s. Abb 47 und 48, Tab. 14) hinsichtlich seines inhibitorischen Potentials verglichen. WB-F344 wurden mit 25 µM Dicumarol, Flufenaminsäure (flufenamic acid, FFA) oder 1-Octanol für 60 min inkubiert und anschließend die ZVK bestimmt. Dicumarol führte unter diesen Versuchsbedingungen, wie bereits in 3.2.1 (Abb. 43) beschrieben, zu einer fast kompletten Inhibierung der ZVK (Abb. 48, Tab. 22). FFA und 1-Octanol hingegen hemmten die ZVK in diesem Testsystem nur zu ca. 44 % (FFA) bzw. 36 % (1-Octanol) (Abb. 48, Tab. 22).

Daraus läßt sich schließen, daß die IC_{50} von FFA und 1-Octanol über $25\ \mu\text{M}$ liegt, was verglichen mit $3\ \mu\text{M}$ für Dicumarol (s. 3.2.1) relativ hoch ist.

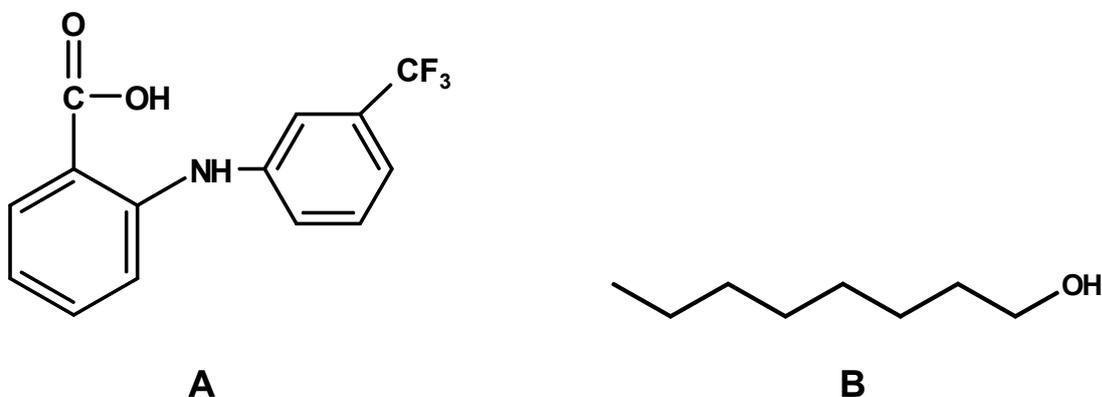


Abb. 47: Strukturformeln von GJ-Inhibitoren. **A** Flufenaminsäure **B** 1-Octanol.

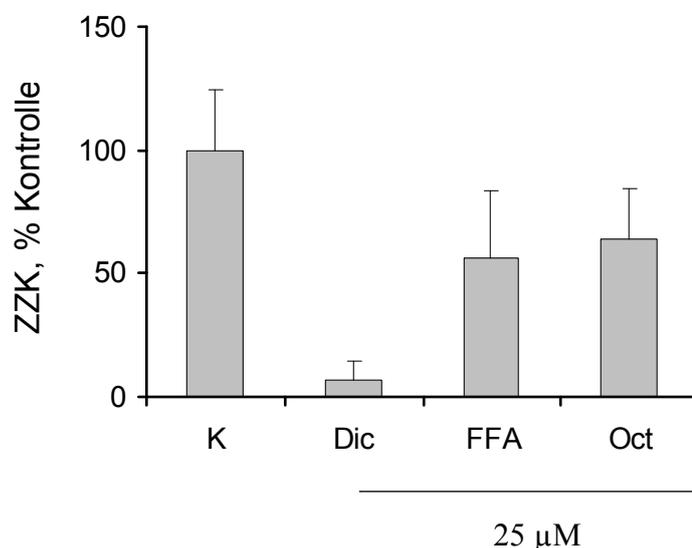


Abb. 48: Vergleich des inhibitorischen Potentials von Dicumarol auf die ZZK mit dem anderer ZZK-Inhibitoren. WB-F344 wurden mit DMSO (Kontrolle) bzw. $25\ \mu\text{M}$ Dicumarol (Dic), Flufenaminsäure (FFA) oder 1-Octanol (Oct) für 60 min inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde die ZZK bestimmt. Absolute ZZK der Kontrolle beträgt durchschnittlich $13,6 \pm 3,3$ kommunizierende Zellen. $n = 4$.

	ZZK, Mittelwert % \pm SD %
Kontrolle*	100,0 \pm 24,5
Dicumarol 25 μ M	6,6 \pm 8,1
Flufenamic Acid 25 μ M	56,1 \pm 27,7
1-Octanol 25 μ M	63,9 \pm 20,1

Tab. 22: Vergleich des inhibitorischen Potentials von Dicumarol auf die ZZK mit dem anderer ZZK-Inhibitoren. Absolute ZZK der Kontrolle beträgt durchschnittlich $13,6 \pm 3,3$ kommunizierende Zellen. $n = 4$.

* 0,25 % DMSO.

3.3 Carotinoide als Mikronährstoffe mit potentiell protektiver Wirkung gegen schädigende Effekte von UVA-Strahlung

Sonneneinstrahlung, v.a. der Bereich der ultravioletten (UV) Strahlung, induziert akute und chronische Reaktionen der menschlichen Haut [Ichihashi 2003]. Wiederholte chronische UV-Expositionen sind die Hauptursachen für benigne und maligne Hauttumoren, einschließlich des malignen Melanoms. Der Mensch ist 75 % der gesamten Dosis an UV-Strahlung, die ihn während seines Lebens erreicht, im Erwachsenenalter ausgesetzt. Meist schützt er sich nur während bestimmter Freizeitaktivitäten vor der UV-Strahlung durch Applikation von lokalen Sonnenschutzmitteln, während die Haut den Rest der Zeit ungeschützt der UV-Einstrahlung ausgesetzt ist. Daher ist eine Photoprotektion mit endogenen Sonnenschutzmitteln, die in der Haut einen permanenten Schutz vor der UV-Strahlung gewährleisten können, erstrebenswert. Die Krebsentstehung wird im Allgemeinen mit einem Verlust der ZZK assoziiert und *in vitro* Studien zeigten, daß UVA-Strahlung (320 – 400 nm) die ZZK in humanen Keratinozyten hemmt [Provost 2003]. Es wird angenommen, daß der procarcinogene Effekt von UV-Strahlung u.a. über eine Hemmung der ZZK vermittelt wird. In Humanstudien konnte die UV-protective Wirkung von Carotinoiden nachgewiesen werden, die natürlicherweise als Mikronährstoffe in der menschlichen Nahrung vorkommen und in der Haut akkumuliert werden (s. 1.1.1.2). In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob UVA-Strahlung auch die ZZK in humanen Hautfibroblasten hemmt und ob Carotinoide die inhibitorische Wirkung der UVA-Strahlung auf die ZZK in humanen Hautfibroblasten verhindern können.

3.3.1 Dosis-Zeit-Abhängigkeit des Effekts von UVA-Strahlung auf die Zell-Zell-Kommunikation in humanen Hautfibroblasten

Vor den eigentlichen Experimenten zur protektiven Wirkung von Carotinoiden gegen UVA-Strahlung wurde untersucht, wie es sich mit der Dosis- bzw. Zeit-Wirkungsabhängigkeit der ZZK in humanen Hautfibroblasten bzgl. UVA-Strahlung verhält (Abb. 49). Zellen wurden hierfür mit UVA-Licht in unterschiedlicher Dosis (5, 10, 15 J/cm²) bestrahlt. Nach 3 h, 6 h bzw. 24 h wurde die ZZK gemessen. Der getestete Dosisbereich orientierte sich an anderen, in Zellsystemen durchgeführten UV-Experimenten aus der Literatur (z.B. [Provost 2003]).

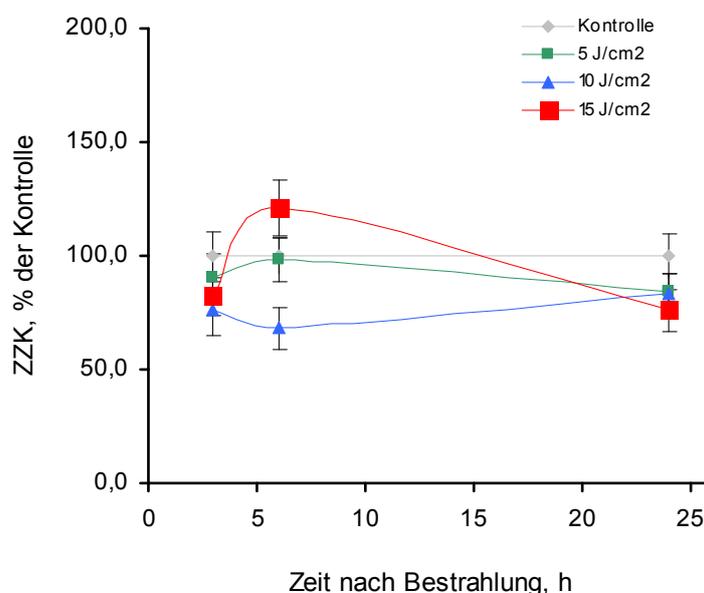


Abb. 49: Zeit-Dosis-Abhängigkeit des Effekts von UVA auf die ZZK in humanen Hautfibroblasten. Messung der ZZK im Fluoreszenzfarbstoff-Transfer-Assay nach 3 h, 6 h bzw. 24 h nach Bestrahlung mit 5, 10 und 15 J/cm². Als Kontrolle wurde die ZZK von unbestrahlten, aber identisch behandelten Zellen bestimmt. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert aus $n = 2$.

Nach einer UVA-Dosis von 10 J/cm² war die ZZK 6 h nach der Bestrahlung signifikant erniedrigt (Abb. 49). Bei niedrigerer (5 J/cm²) sowie höherer (15 J/cm²) Dosis konnte keine signifikante Änderung der ZZK in HdF beobachtet werden. Daher wurden die folgenden Experimente mit 10 J/cm² durchgeführt.

3.3.2 UVA-protective Wirkung von Carotinoiden auf die Zell-Zell-Kommunikation in humanen Hautfibroblasten

HdF wurden mit 10 μM Carotinoid (Astaxanthin, Canthaxanthin oder β -Carotin) 24 h bzw. 72 h vorinkubiert. Dann wurde wie in 2.2.8. beschrieben mit UVA bestrahlt und 6 h bzw. 24 h nach der UVA-Bestrahlung die ZZK gemessen (Tab. 23, Abb. 50).

Tab. 23: *Einfluß von Carotinoiden auf die ZZK in HdF unter UVA-Einwirkung. Absolute ZZK der unbestrahlten Kontrollzellen (0,1 % THF) beträgt $9,7 \pm 3,4$ kommunizierende Zellen. $n = 4$. * $p < 0,05$ im Vergleich zu Kontrolle bzw. unbestrahlten Probe.*

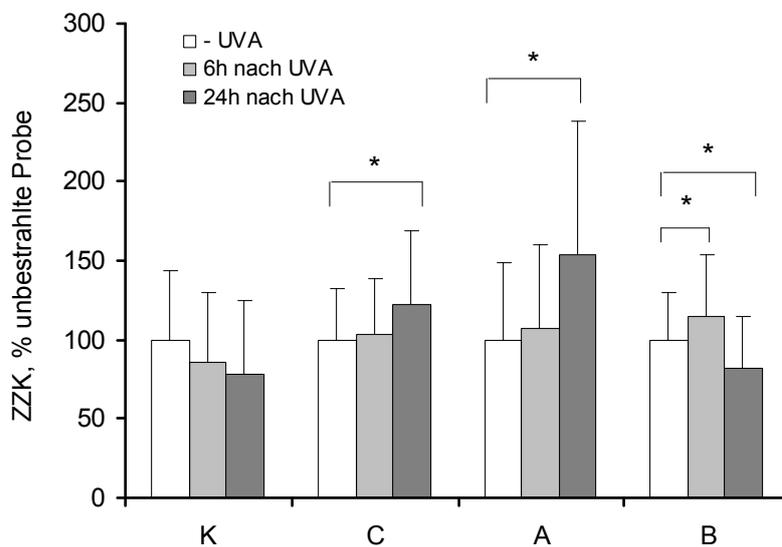
24 h Vorinkubation	UVA (10 J/ cm ²)	% von unbestrahlter THF-Kontrolle		% von unbestrahlter Probe	
		6h nach UVA	24 h nach UVA	6h nach UVA	24 h nach UVA
Kontrolle (0,1 % THF)	-	100,0 \pm 44,1	100,0 \pm 47,5	100,0 \pm 44,1	100,0 \pm 47,5
	+	85,4 \pm 44,5	78,8 \pm 46,6	85,4 \pm 44,5	78,8 \pm 46,6
Canthaxanthin 10 μM	-	125,4 \pm 39,9 *	110,0 \pm 50,2	100,0 \pm 31,8	100,0 \pm 45,6
	+	129,3 \pm 44,7 *	135,1 \pm 50,2 *	103,1 \pm 135,6	122,8 \pm 45,6 *
Astaxanthin 10 μM	-	67,8 \pm 32,9 *	64,1 \pm 53,1 *	100,0 \pm 48,5	100,0 \pm 82,8
	+	72,7 \pm 36,1 *	98,8 \pm 53,9	107,3 \pm 53,3	154,2 \pm 84,1 *
β -Carotin 10 μM	-	106,6 \pm 32,4	145,9 \pm 33,5 *	100,0 \pm 30,4	100,0 \pm 23,0
	+	122,8 \pm 40,9 *	120,1 \pm 47,2	115,2 \pm 38,4 *	82,3 \pm 32,3 *

72 h Vorinkubation	UVA (10 J/ cm ²)	% von unbestrahlter THF-Kontrolle		% von unbestrahlter Probe	
		6h nach UVA	24 h nach UVA	6h nach UVA	24 h nach UVA
Kontrolle (0,1 % THF)	-	100,0 \pm 33,5	100,0 \pm 29,8	100,0 \pm 33,5	100,0 \pm 29,8
	+	95,6 \pm 42,0	69,1 \pm 33,2 *	95,6 \pm 42,0	69,1 \pm 33,2 *
Canthaxanthin 10 μM	-	140,6 \pm 34,0 *	102,0 \pm 25,9	100,0 \pm 24,2	100,0 \pm 25,4
	+	165,1 \pm 52,2 *	115,7 \pm 39,6	117,5 \pm 37,1 *	113,5 \pm 38,8
Astaxanthin 10 μM	-	77,3 \pm 33,3 *	73,8 \pm 49,8 *	100,0 \pm 43,1	100,0 \pm 67,5
	+	104,7 \pm 53,8	88,2 \pm 36,1	135,5 \pm 69,7 *	119,6 \pm 49,0
β -Carotin 10 μM	-	132,8 \pm 43,9 *	88,0 \pm 27,6	100,0 \pm 33,1	100,0 \pm 31,4
	+	137,0 \pm 64,8 *	106,4 \pm 34,1	103,1 \pm 48,8	120,9 \pm 38,7 *

Unter den gewählten Bedingungen war die Wirkung von UVA-Strahlen auf die ZZK in humanen Hautfibroblasten nicht sehr ausgeprägt (Tab. 23, Abb. 50). Nach einer 72-stündigen Vorinkubation war die ZZK in den Kontrollzellen 24 h nach der UVA-Bestrahlung im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollzellen signifikant um ca. 30 % erniedrigt (Abb 50 B). Bei allen Versuchsandordnungen war eine Abnahme der ZZK in den

Kontrollzellen zu beobachten. Eine signifikante Veränderung der ZZK in den Kontrollzellen wurde aber nur nach einer 72-stündigen Vorinkubation 24 h nach der Bestrahlung gemessen.

A



B

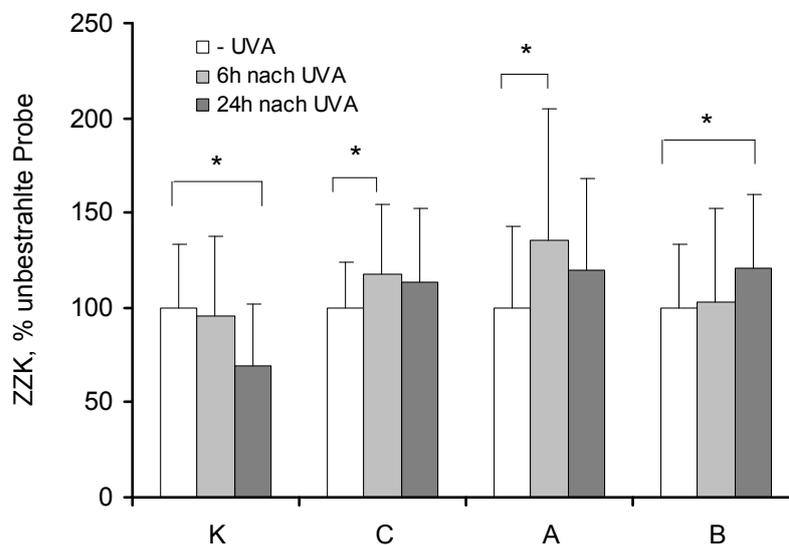


Abb. 50: Einfluß von Carotinoiden auf die ZZK in humanen Hautfibroblasten bei UVA-Streß. K Kontrolle (0,1 % THF), C Canthaxanthin, A Astaxanthin, B β -Carotin, jeweils 10 μ M. UVA: 10 J/cm². n = 4. * p < 0,05, im Vergleich zur unbestrahlten Probe.

A 24 h Vorinkubation mit Carotinoiden.

B 72 h Vorinkubation mit Carotinoiden.

Alle getesteten Carotinoide hoben die durch UVA-induzierte ca. 30 % ige Abnahme der ZZK auf, die nach einer 72-stündigen Vorinkubation 24 h nach der Bestrahlung in den Kontrollzellen gemessen worden war.

β -Carotin allerdings zeigte keine einheitliche Wirkung auf die ZZK. Nach einer 24-stündigen Vorinkubation wurde 6 h nach Bestrahlung verglichen mit den unbestrahlten β -Carotin-behandelten Zellen eine signifikante Erhöhung der ZZK beobachtet, wohingegen 24 h nach Bestrahlung die ZZK signifikant erniedrigt war. Allerdings verhielt es sich anders nach einer 72-stündigen Vorinkubation: bei dieser Versuchsdurchführung war die ZZK 6 h nach Bestrahlung unverändert und 24 h nach Bestrahlung sogar um 20 % erhöht verglichen mit den unbestrahlten β -Carotin-behandelten Zellen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde zum erstenmal gezeigt, daß das Carotinoid Astaxanthin die Zell-Zell-Kommunikation über GJs hemmt. Die Hemmung geht einher mit einer Änderung des Phosphorylierungsmusters von Connexin 43. Alle anderen bisher untersuchten Carotinoide erwiesen sich in der Regel in Zellkulturstudien als Stimulatoren der ZZK, was in dieser Arbeit bestätigt und im Detail auch mechanistisch an Canthaxanthin untersucht wurde. Neben den antioxidativen Wirkungen der Carotinoide wurde immer wieder die Stimulation der ZZK als ein möglicher Mechanismus der krebspräventiven Eigenschaften von Carotinoiden postuliert. Studien an Zellkulturen zeigten, daß die Stimulation der ZZK über GJs (induziert durch Carotinoide) assoziiert ist mit der Hemmung des Wachstums präneoplastischer Zellen. Tumorpromotoren wie TPA hingegen hemmen die ZZK über GJs. In Tierversuchen zeigte Astaxanthin anticarcinogene Wirkungen. Die vorliegenden Ergebnisse werfen im Kontext mit der Literatur mehrere Fragen auf, die in der nachfolgenden detaillierten Diskussion angesprochen werden. Zur Klärung bedarf es aber noch weiterer Untersuchungen zum Einfluss von Carotinoiden auf die ZZK.

4.1 Einfluß von Carotinoiden auf die Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions in Zellkultur

4.1.1 Einfluß von Carotinoiden auf die Zell-Zell-Kommunikation in Rattenleberepithelzellen (WB-F344)

Die für die ZZK-Studien ausgewählten Carotinoide sind bislang nur teilweise in Zellkulturstudien (meist in Mausfibroblasten, C3H/10T1/2 Zellen) hinsichtlich ihres Einflusses auf die ZZK untersucht worden. Mit den ausgewählten Substanzen wurden sowohl Carotine (Phytoen, Lycopin, β -Carotin) als auch Xanthophylle (Lutein, Astaxanthin, Canthaxanthin, Zeaxanthin) in die Experimente mit einbezogen. Zeaxanthin und Phytoen wurden zum ersten Mal auf diese Eigenschaft hin in einem Zellsystem analysiert.

In Übereinstimmung mit der Literatur wurde für β -Carotin, Canthaxanthin und Lycopin ein stimulatorischer Effekt auf die ZZK in WB-F344 im Fluoreszenzfarbstoff-Transfer-Assay gefunden (s. Tab. 11, Abb. 21). Allerdings war die gemessene Stimulation geringer als in

der Literatur beschrieben. Für 10 μM β -Carotin wurde nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen eine 1,7fache, für 10 μM Canthaxanthin eine 1,4fache und für 10 μM Lycopin eine 1,5fache Stimulation der ZZK gemessen. Stahl et al. [Stahl 1997] fanden für 10 μM β -Carotin eine ca. fünffach, für 10 μM Canthaxanthin eine ca. vierfach erhöhte ZZK im Vergleich zum Kontrollwert. Auch in den ZZK-Studien von Zhang et al. [Zhang 1991] führte eine Behandlung mit 10 μM β -Carotin bzw. Canthaxanthin zu einer jeweils fünffach höheren ZZK, mit 10 μM Lycopin zu einer dreifach höheren ZZK im Vergleich zum Kontrollwert. Die Studien unterscheiden sich in den Versuchsbedingungen: die Hauptunterschiede liegen in der Inkubationszeit und den Zellsystemen. Stahl et al. und Zhang et al. verwendeten längere Inkubationszeiten (Stahl et al. 5 Tage [Stahl 1997], Zhang et al. 14 Tage [Zhang 1991]) und ein anderes Zellsystem (embryonale Mausfibroblasten: C3H/10T1/2). In der vorliegenden Arbeit wurden Rattenleberepithelzellen (WB-F344) 1 bzw. 3 Tage mit den jeweiligen Carotinoiden inkubiert. Zhang et al. [Zhang 1995] zeigten, daß die Wirkung von Carotinoiden auf die ZZK und die Expression des Kanalproteins Cx43 je nach Zelltyp unterschiedlich sein kann. Außerdem variieren Expressionsmuster und -menge der Connexine je nach Zelltyp (s.a. Einleitung 1.2.1.1). Generell unterscheiden sich die verschiedenen Zelltypen in ihrer Basalkommunikation (s. eigene Meßwerte in Mittelwert \pm SD: $15,5 \pm 6,7$ in WB-F344 bzw. $8,6 \pm 3,0$ in humanen Hautfibroblasten). Dazu tragen Parameter wie die exprimierte Connexinmenge oder die Anzahl an gebildeten funktionsfähigen Kanälen in der Zellmembran bei.

Auch *in vivo* konnte von Krutovskikh et al. [Krutovskikh 1997] eine Stimulation der ZZK durch die Behandlung von fünf Wochen alten männlichen F344-Ratten mit Carotinoiden gezeigt werden. Eine tägliche Carotinoiddosis von 5 mg/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von fünf Tagen stimulierte im Falle von Lycopin und β -Carotin die ZZK in der Rattenleber um den Faktor 2.

Es ist noch nicht geklärt, ob die Muttersubstanzen oder biologisch aktive Metabolite für die Aktivierung verantwortlich sind. Im Falle von Canthaxanthin konnte in C3H/10T1/2 Zellen für einen Konzentrationsbereich von 1-10 μM gezeigt werden, daß die stimulatorische Wirkung auf die ZZK zumindest teilweise durch aktive Metaboliten des Canthaxanthin, wie z.B. die 4-oxo-Retinsäure, verursacht wird [Hanusch 1995]. Auch für Lycopin konnte in WB-F344 ein stimulatorischer Effekt nachgewiesen werden, für den möglicherweise ein Abbauprodukt, das Oxidationsprodukt 2,7,11-Trimethyl-Tetradecahexaen-1,14-Dial, verantwortlich ist [Aust 2003].

Für Lutein wurde in der hier vorgestellten Studie nur eine geringe Wirkung auf die ZZK in WB-F344 gemessen. Eine 72-stündige Behandlung von WB-F344 mit 10 μM Lutein führte zu einer ca. 30 %igen Inhibierung der ZZK. Im Gegensatz dazu fanden Zhang et al. [Zhang 1991] für 10 μM Lutein nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen eine vierfache Erhöhung der ZZK in C3H/10T1/2 Zellen. Es bleibt zu klären, ob die Wirkung von Lutein auf die ZZK vom Zelltyp und/ oder von der Inkubationszeit abhängig ist.

Phytoen, das zum ersten Mal hinsichtlich seiner Wirkung auf die ZZK untersucht wurde, zeigte geringfügige Effekte auf die ZZK in WB-F344. Es wurden Wirkungsunterschiede zwischen den cis/trans-Isomeren von Phytoen festgestellt. Der Effekt von trans-Phytoen auf die ZZK war nicht signifikant, cis-Phytoen hingegen hemmte je nach Konzentration und Inkubationszeit signifikant die ZZK: nach einer 24 h-Inkubation mit 1 μM cis-Phytoen wurde eine ca. 20 %ige, nach einer 72 h-Inkubation mit 10 μM cis-Phytoen eine ca. 10 %ige Hemmung auf die ZZK gemessen.

Für das ebenfalls erstmals in einer ZZK-Studie untersuchte Zeaxanthin wurde eine 1,5fache Erhöhung der ZZK in WB-F344 nach einer 72 h-Inkubation gemessen. Die übrigen Werte von Zeaxanthin wichen nicht signifikant von den Kontrollwerten ab. Zeaxanthin zählt wie β -Carotin, Lycopin und Canthaxanthin zu den stimulatorisch wirkenden Carotinoiden.

Im Gegensatz zu allen anderen Carotinoiden, die hier getestet wurden, zeigte Astaxanthin eine äußerst starke inhibitorische Wirkung (s. Tab. 11, Abb. 21; [Daubrawa 2005]). Die höhere Konzentration (10 μM) führte im Vergleich zur Kontrolle bei beiden Inkubationszeiten (24 h, 72 h) zu einer über 80 %igen Hemmung der ZZK. Bei 1 μM Astaxanthin war die Inhibierung zwar etwas schwächer, aber betrug immer noch 25 % (24 h) bzw. 69 % (72 h). Der Effekt von Astaxanthin auf die ZZK ist gemäß der Literatur bis *dato* kaum untersucht worden. Hix et al. [Hix 2005] untersuchten den Effekt von Astaxanthin und einem Tetranatriumdiphosphat-Derivat des Astaxanthins auf die ZZK in einem Konzentrationsbereich von 10^{-10} M bis 10^{-6} M in embryonalen Mausfibroblasten (C3H/10T1/2). Sie fanden innerhalb des getesteten Konzentrationsbereichs keine inhibitorischen Effekte, sondern bei niedrigeren Konzentrationen sogar stimulatorische Effekte von Astaxanthin auf die ZZK. Nach einer 7-tägigen Behandlung von C3H/10T1/2 Zellen mit 10^{-8} M bzw. 10^{-7} M Astaxanthin war die ZZK signifikant erhöht verglichen mit den Kontrollwerten. Die Stimulation der ZZK durch Astaxanthin war nicht dosisabhängig, da bei niedrigeren (10^{-10} M, 10^{-9} M) sowie höheren (10^{-6} M) Dosen an Astaxanthin keine Effekte auf die ZZK beobachtet wurden. 10 μM Astaxanthin (10^{-5} M), für die in der hier

vorliegenden Arbeit eine stark inhibitorische Wirkung auf die ZZK in WB-F344 gemessen wurde, ist von Hix et al. nicht getestet worden, und kann daher nicht verglichen werden. Bei 10^{-6} M Astaxanthin beobachteten Hix et al. in ihrer Studie keinen Effekt von Astaxanthin auf die ZZK. Im Gegensatz dazu führte in Experimenten der hier vorliegenden Arbeit eine Inkubation mit 10^{-6} M Astaxanthin zu einer signifikanten, ausgeprägten Hemmung der ZZK. Eine inhibitorische Wirkung von höheren Konzentrationen Astaxanthin auf die ZZK wie sie in der vorliegenden Arbeit beschrieben ist, widerlegt die Studie von Hix et al nicht. Die Diskrepanz zwischen diesen beiden Studien hinsichtlich der Ergebnisse des Funktionsassays (ZZK-Messung) sind vermutlich auf unterschiedliche experimentelle Konditionen und Zelltypen zurückzuführen. Wie bereits erwähnt, zeigten Zhang et al. [Zhang 1995], daß die Wirkung von Carotinoiden auf die ZZK und die Expression des Kanalproteins Cx43 je nach Zelltyp unterschiedlich sein kann. Außerdem inkubierten Hix et al. die Zellen wesentlich länger (7 Tage) mit Astaxanthin [Hix 2005]. Zudem führten Hix et al. die Messungen der ZZK nicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff-Transfer-Assay nach der Methode der Mikroinjektionstechnik, sondern nach der Methode des Scrape-Loading-Assays durch, der im Vergleich zur Mikroinjektionstechnik ungenauere Daten liefert.

Der inhibitorische Effekt des Astaxanthins kann nicht mit einer toxischen Wirkung des Astaxanthins begründet werden. Im Zellvitalitäts-Assay (MTT-Assay) war nach Astaxanthin-Behandlung unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine signifikante Abnahme der Zellvitalität, sondern sogar eine Zunahme der Zellvitalität der WB-F344 beobachtet worden, obwohl die ZZK unter den gleichen Bedingungen stark gehemmt wurde. Die hier eingesetzten Astaxanthin-Konzentrationen werden gemäß den Resultaten des MTT-Tests als nicht toxisch beurteilt. Hix et al. [Hix 2005] postulierten für 10^{-5} M Astaxanthin eine kumulative zytotoxische Wirkung auf Mausfibroblasten (10T1/2) nach einer 4-wöchigen Inkubationszeit. Im Unterschied dazu wurden die Zellen in der hier vorgestellten Arbeit nicht über Wochen, sondern maximal drei Tage mit Astaxanthin inkubiert. Für eine umfassende toxikologische Bewertung von Astaxanthin ist eine nähere Untersuchung des toxikologischen Potentials in weiteren toxikologischen Tests erforderlich.

Erstaunlich ist, daß Canthaxanthin, ein Stimulator der ZZK, die Zellvitalität unter den gegebenen Versuchsbedingungen um 50-60 % erniedrigte. Über die Toxizität von Canthaxanthin sind nur wenige Daten in der Literatur verfügbar. Rock et al. [Rock 1995] beobachteten, daß eine Canthaxanthin-Behandlung Auswirkungen auf die Proliferationsfähigkeit und Differenzierung von humanen, primären epithelialen Brustzellen

hat, die aus Brustamputationen stammten. Neben α - und β -Carotin erniedrigte auch Canthaxanthin die Zellvitalität (MTT-Test) in Darmkrebszellen [Onogi 1998]. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete toxische Wirkung (MTT-Test) von Canthaxanthin in WB-F344 hatte unter den gegebenen Bedingungen keinerlei negative Auswirkungen auf den Parameter der ZZK. Im Falle von Krebszellen ist die Hemmung der Proliferation bzw. Reduktion der Zellvitalität sowie die Induktion der zellulären Differenzierung positiv zu sehen. Die toxikologische Wirkung von Canthaxanthin auf nicht entartete Zellen und deren Bedeutung für die Zellen bleibt zu klären.

Untersuchungen von Astaxanthin zweier verschiedenener Hersteller (BASF, SIGMA) zeigte, daß der inhibitorische Effekt von Astaxanthin auf die ZZK nicht auf Nebenprodukte der industriellen Synthese von Astaxanthin zurückzuführen ist. Sowohl Astaxanthin von SIGMA als auch das von BASF hemmte die ZZK konzentrationsabhängig. Der Zelltyp hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die Wirkung des Astaxanthins auf die ZZK: sowohl in WB-F344 als auch in humanen Hautfibroblasten wurde die ZZK dosisabhängig gehemmt. Unterschiede in der Stärke der Hemmung zwischen den beiden Astaxanthin-Substanzen bei einer Konzentration von 1 μ M ist in dem auftretenden Maße mit der semi-quantitativen Natur des Funktions-Assays (Fluoreszenzfarbstoff-Transfer-Assay) bzw. durch zellspezifische Faktoren zu erklären. Der verwendete Assay eignet sich für semi-quantitative, aber nicht für präzise quantitative Aussagen. Darüberhinaus wird in Zellsystemen gearbeitet, die aufgrund ihrer komplexen und sensitiven Funktionsweise trotz Berücksichtigung der Kontrollzellen einen weiteren Anteil an Schwankungen von Meßergebnissen der ZZK haben.

4.1.2 Einfluß von Carotinoiden auf Expression und subzelluläre Lokalisation des Kanalproteins Connexin43 in Rattenleber-epithelzellen (WB-F344)

Es ist bekannt, daß die ZZK durch unterschiedliche Mechanismen beeinflusst werden kann (s. 1.2.1.3.). In der Literatur wurde gezeigt, daß Carotinoide (β -Carotin, α -Carotin, Lycopin, Canthaxanthin, Lutein und β -Cryptoxanthin) die ZZK stimulieren und zugleich die Connexin-Expression erhöhen [Bertram 1995, Bertram 1993, Zhang 1992, Hanusch 1995]. Die Erhöhung der Cx43-Expression wurde auch in den hier dargestellten immunohistochemischen Experimenten nach Behandlung von WB-F344 mit den ZZK-Stimulatoren β -Carotin, Canthaxanthin, Lycopin beobachtet (s. Abb. 23 - 26). Durch die Erhöhung der Cx43-Expression wird mehr Protein (Cx43) bereitgestellt. Es können daher

mehr Gap-Junction-Kanäle in der Plasmamembran gebildet werden. Als Konsequenz wird eine erhöhte ZZK gemessen. Der molekulare Mechanismus der Expressionserhöhung ist bislang noch nicht bekannt. Clairmont et al. [Clairmont 1997] zeigten, daß Retinsäure die Cx43-Expression beeinflusst, indem sie die mRNA von Cx43 über Elemente, die in der 3'-UTR lokalisiert sind, stabilisiert. Weiter vermuteten sie, daß es sich um eine indirekte Stabilisierung der mRNA durch Retinsäure handelt. Retinsäure wirkt durch Binden an die Kernrezeptoren RAR bzw. RXR auf die Expression bestimmter Zielgene, die RAREs (**R**etinoic **A**cid **R**esponsive **E**lements) als Erkennungssequenz im Promotor für den heterodimeren Rezeptorkomplex enthalten. Diese Zielgene könnten für Proteine codieren, die an der posttranskriptionellen Regulation von Cx43 beteiligt sind, indem sie beispielsweise an die 3'-UTR binden und dadurch die mRNA stabilisieren. Ein ähnlicher Mechanismus ist für das Provitamin A-Carotinoid β -Carotin denkbar. In weiteren Studien ist zu klären, ob die Induktion der Cx43-Expression durch Carotinoide ohne Provitamin A-Charakter (Canthaxanthin, Lycopin) auch auf posttranskriptionalen Effekten basiert.

Bei anderen hier getesteten Carotinoiden, d.h. bei Lutein, Zeaxanthin und Phytoen, wurden in den immunohistochemischen Untersuchungen keine Änderungen in der Cx43-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt. Dies korreliert mit ihrem geringen bzw. fehlenden Einfluß auf die ZZK.

Keines der hier getesteten Carotinoide (Phytoen, Lycopin, β -Carotin, Lutein, Zeaxanthin, Canthaxanthin, Astaxanthin) beeinflusste unter den gewählten Versuchsbedingungen die subzelluläre Lokalisation von Cx43.

Auffällig ist, daß trotz des starken inhibitorischen Effekts von Astaxanthin auf die ZZK in den Astaxanthin behandelten Zellen die Proteinmenge von Cx43 im Vergleich zu den Kontrollzellen in den immunohistochemischen Untersuchungen nicht verändert war (s. Abb. 23-26). Demzufolge gilt zwar für einige Carotinoide (z.B. Canthaxanthin, β -Carotin, Lycopin), daß sie die ZZK stimulieren und zugleich die Cx-Expression erhöhen. Eine Hemmung der ZZK ist jedoch nicht zwangsläufig mit der Erniedrigung der Cx-Expression assoziiert - wie das Beispiel Astaxanthin zeigt (s. Abb. 23-26, 33, 34, 36). Astaxanthin führte auch nicht zu einer Delokalisation des Kanalproteins Cx43 von der Plasmamembran in das Zytoplasma wie es für den Tumorpromotor TPA bekannt ist, der ein starker Inhibitor der ZZK ist (s. Abb. 8; [Matesic 1994, Ale-Agha 2002]). Folglich muß Astaxanthin die ZZK über einen anderen Mechanismus beeinflussen als es für den Tumorpromotor TPA postuliert wird.

Die Effekte der Expressionserhöhung und der Stimulation der ZZK sind unabhängig von der Provitamin A-Aktivität der Carotinoide und korrelieren in Übereinstimmung mit der Literatur nicht mit ihren antioxidativen Eigenschaften [Bertram 1993, Stahl 1997, Zhang 1991 und 1992]. Denn sowohl das Provitamin A-Carotinoid β -Carotin als auch Canthaxanthin, das keinen Provitamin A-Charakter besitzt, stimulieren die ZZK und die Cx43-Expression (s. vorliegende Arbeit und Zhang 1991, Bertram 2004). Stahl et al. [Stahl 1997] zeigten, daß die Fähigkeit von Carotinoiden, Singulett-Sauerstoff abzufangen, unabhängig ist von ihrer Wirkung auf die ZZK. In verschiedenen Untersuchungen [Miki 1991, Yousry 2000, Beutner 2001] erwies sich Astaxanthin als starkes Antioxidans, das sowohl ein stärkerer Singulett-Sauerstoff-Quencher als auch ein stärkerer Peroxylradikalfänger ist als Canthaxanthin bzw. β -Carotin. Trotz seiner starken antioxidativen Eigenschaften inhibierte es in höheren Konzentrationen die ZZK, während die im Vergleich zu Astaxanthin schwächeren Antioxidantien Canthaxanthin und β -Carotin die ZZK stimulierten (s. Abb. 21, Tab. 11).

Aufgrund der inhibitorischen Wirkung von Astaxanthin auf die ZZK stellt sich die Frage, ob die beobachteten krebspräventiven Effekte von Carotinoiden und ihre Effekte auf die ZZK mechanistisch in einem Zusammenhang stehen. Die Stimulation der ZZK durch Carotinoide war bislang neben ihrer antioxidativen Eigenschaften als ein möglicher Mechanismus in der krebspräventiven Wirkung der Carotinoide postuliert worden. In der Literatur sind auch für Astaxanthin krebspräventive Wirkungen beschrieben [Kurihara 2002, Chew 1999, Tanaka 1994]. Umso mehr bleibt zu klären, was die inhibitorische Wirkung von Astaxanthin auf die ZZK bedeutet, ob sie ein Risiko für Zellen darstellt und ob sich mit Astaxanthin behandelte präcarcinogene Zellen der Wachstumskontrolle entziehen. Da die Inhibierung der ZZK bisher mit einer procarcinogenen Wirkung assoziiert wurde (z.B. Behandlung mit dem Tumorsuppressor TPA, s. 1.2.1.3), muß somit in weiteren Arbeiten unbedingt geklärt werden, ob Astaxanthin neben seiner beobachteten krebspräventiven Wirkung auch eine procarcinogene besitzt. Bis *dato* gibt es dafür keine Anzeichen.

4.1.3 Vergleich der Effekte der Xanthophylle Astaxanthin und Canthaxanthin auf die Zell-Zell-Kommunikation in humanen Hautfibroblasten und mechanistische Erklärungsansätze

Die vergleichende Untersuchung der Effekte der strukturell eng verwandten Xanthophylle Astaxanthin und Canthaxanthin auf die ZZK in humanen Hautfibroblasten (HdF) zeigte, daß Astaxanthin dosisabhängig die ZZK inhibiert (s. Abb. 32), während Canthaxanthin über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich (10^{-9} – 10^{-5} M) die ZZK stimuliert (s. Abb. 31). Für die inhibitorische Wirkung von Astaxanthin auf die ZZK ist in der Zellkultur HdF eine Konzentration von mindestens $0,1 \mu\text{M}$ erforderlich. In einer Humanstudie mit 32 männlichen Testpersonen wurden nach einer einmaligen Astaxanthingabe von 40 mg je nach Bioverfügbarkeit der getesteten Astaxanthin-Lipidformulierung maximale Plasmaspiegel von $0,09$ bis $0,21 \mu\text{M}$ Astaxanthin gemessen [Odeberg 2003]. Die Halbwertszeit von Astaxanthin betrug im Blut zwischen 12 und 16 h. Daher kann es zu einer Akkumulation bei mehrfacher Astaxanthingabe und daraus resultierende höhere Plasmaspiegel kommen. Eine physiologische Relevanz des in Zellkultur beobachteten stark inhibitorischen Effekts der höheren Astaxanthinkonzentration ist deshalb *in vivo* denkbar. Um hohe Astaxanthinspiegel zu erhalten, muß die Substanz supplementiert werden, da bei einer normalen Ernährung nur wenig Astaxanthin in der Nahrung enthalten ist und somit auch nur wenig Astaxanthin dem Organismus zugeführt wird. Nennenswerte Mengen an Astaxanthin finden sich in Lebensmitteln wie z. B. Lachs und Forelle (1-10 mg Astaxanthin pro kg). Üblicherweise konsumiert der Mensch diese astaxanthinreichen Lebensmittel in einer Menge und Häufigkeit, die gemäß den Ergebnissen der oben erwähnten Studie [Odeberg 2003] nicht zu den für die Inhibierung der ZZK relevanten Astaxanthinkonzentrationen im Blut führen. Effekte auf die ZZK *in vivo* sind jedoch infolge von Akkumulation von Astaxanthin in Geweben denkbar. Es bleibt außerdem zu klären, ob der *in vitro* beobachtete inhibitorische Effekt von Astaxanthin und seine Dosisabhängigkeit auch *in vivo* relevant ist.

Andere biologische Effekte von Astaxanthin wurden auch schon bei niedrigerer Astaxanthindosierung beobachtet: *in vivo* wurde bereits bei einer niedrigeren Astaxanthindosis - und demzufolge einem niedrigeren Plasmaspiegel - die LDL¹¹-Oxidation inhibiert. Bereits eine tägliche Dosis von 1,8 mg Astaxanthin über einen Zeitraum von 14

¹¹ LDL: low density lipoprotein.

Tagen führte zu einer signifikant erhöhten lag-Phase bis zur Oxidation von LDLs [Iwamoto 2000].

Die verminderte ZZK nach Behandlung mit höheren Konzentrationen an Astaxanthin (1 und 10 μM) korrelierte mit dem Verlust der P2-Bande des Kanalproteins Cx43 im Western Blot. Möglicherweise ist daher eine Hypophosphorylierung von Cx43 verantwortlich für den Verlust der ZZK. Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung funktionsfähiger Connexine (Kanalproteine), die sich in der Membran befinden, können den Schließ-Öffnungsmechanismus des Kanals und damit die Kanalfunktion beeinflussen [Lampe 2004] (s.a. 1.2.1.3). Das Phosphorylierungsmuster von Cx43 wurde durch die Behandlung mit Canthaxanthin nicht beeinflusst. Das weist daraufhin, daß keine posttranslationalen Modifikationen in den Wirkmechanismus von Canthaxanthin auf die ZZK involviert sind. Neben Astaxanthin gibt es auch andere Inhibitoren, die eine Veränderung im Phosphorylierungsmuster der Connexine bewirken (s. Abb. 51).

Tumorpromotoren wie der Phorbolster TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat; 17 nM) oder wie Dieldrin (26 μM) und Heptachlorepoxid (26 μM) hemmten in WB-F344 innerhalb von 5 min 80-90 % der ZZK und mehr als 90 % nach 1 h [Matesic 1994]. Bei TPA trat zeitgleich mit dem Verlust der ZZK eine Hyperphosphorylierung von Cx43 auf, d.h. im Western Blot war eine zusätzliche Phosphorylierungsbande (P3) erkennbar. Außerdem nahm die Intensität der P0-Bande ab. Der Verlust der ZZK bei gleichzeitiger Hyperphosphorylierung des Kanalproteins nach Behandlung mit Tumorpromotoren aus der Klasse der Phorbolster (z.B. TPA) ist mehrfach in der Literatur beschrieben [Kang 2000, Ale-Agha 2002, Rivedal 2005].

Die Behandlung mit Dieldrin und Heptachlorepoxid führte zwar nach 1 h zu einem Verlust der P2-Bande und gleichzeitiger Zunahme der Intensität der P0-Bande. Dieser Effekt war aber nicht nach einer kürzeren Behandlungszeit zu beobachten. Daher kann die rasche Hemmung der ZZK durch Dieldrin und Heptachlorepoxid nicht primär auf eine Hypophosphorylierung von Cx43 zurückgeführt werden. Der Verlust der P2-Bande von Cx43 ist auch für Zellen beschrieben, die mit anderen ZZK-Inhibitoren, z. B. Heptanol [Musil 1990] oder Oleamid [Guan 1997], behandelt wurden. Die erläuterten unterschiedlichen Zusammenhänge zwischen Hemmung der ZZK und Veränderungen im Phosphorylierungsmuster von Cx43 zeigen, daß sowohl eine Hyper- (TPA) als auch eine Hypophosphorylierung (Oleamid, Heptanol) von Cx43 für eine Hemmung der ZZK verantwortlich sein kann.

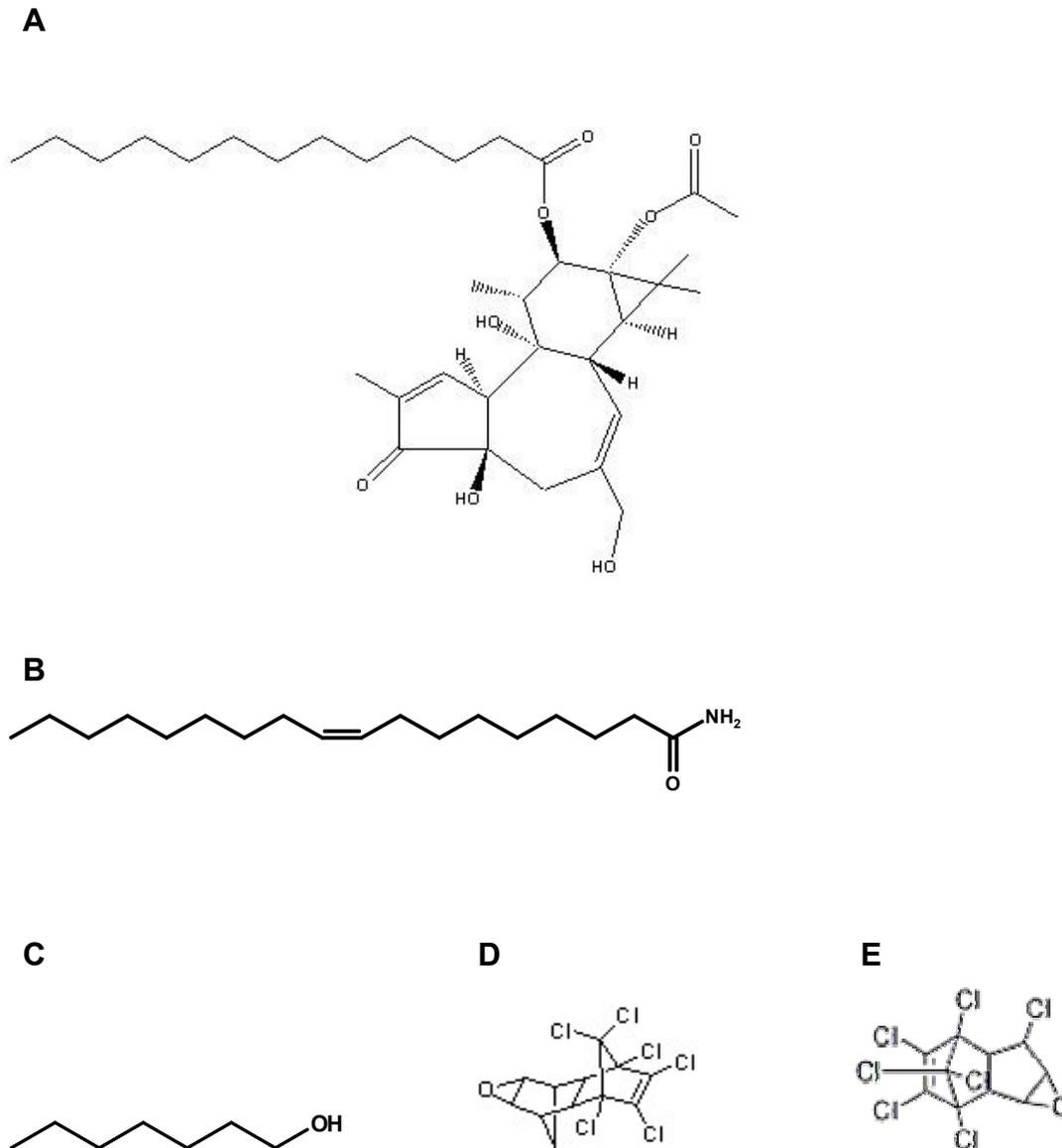


Abb. 51: Beispiele für Inhibitoren der ZZK.

A TPA [<http://www.prn2.usm.my/mainsite/plant/croton.html>]

B Oleamid

C Heptanol

D Dieldrin [<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/ALDRICH/291218>]

E Heptachlorepoxyd [<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SUPELCO/49042>]

Es ist von entscheidender Bedeutung, die jeweils betroffenen Phosphorylierungsstellen zu kennen und ihrer (De)Phosphorylierung die jeweiligen Effekte auf die ZZK zuordnen zu können. Im C-Terminus von Cx43 sind 14 Serin- und 6 Tyrosinreste als mögliche

Phosphorylierungsstellen lokalisiert (s.a. 1.2.1.3, Abb. 10). Daraus ergeben sich viele Möglichkeiten bzw. Kombinationsmöglichkeiten für Phosphorylierungen. Der Phosphorylierungszustand P1 repräsentiert nicht die Phosphorylierung einer bestimmten Phosphorylierungsstelle im Cx43-Molekül, sondern den Grad der Phosphorylierung von Cx43. Die Phosphorylierung an einer Phosphorylierungsstelle A hat nicht automatisch die gleiche Wirkung auf die ZZK wie eine Phosphorylierung an einer Phosphorylierungsstelle B. Daher ist es entscheidend, die Phosphorylierungsstellen zu kennen, deren Phosphorylierung zu einem P1- oder P2-Phosphorylierungszustand führt. Eine Phosphorylierung an Ser279 muß nicht zwangsläufig den gleichen Effekt bedingen wie eine Phosphorylierung an Ser373.

Generell muß geklärt werden, wie eine Veränderung des Phosphorylierungsmusters von Cx43 die ZZK beeinflusst und welche Aminosäuren im Cx43-Molekül davon betroffen sind.

Im Unterschied zur Wirkung von TPA auf die ZZK war die Hemmung der ZZK durch Astaxanthin nicht mit einer Delokalisation von Cx43 von der Plasmamembran ins Zytosol assoziiert [Daubrawa 2005]. Dies wurde unabhängig vom Zelltyp beobachtet (s. Abb. 23 - 26, 33, 34). In Übereinstimmung mit Literaturdaten war der stimulatorische Effekt von Canthaxanthin auf die ZZK von einer Erhöhung der Cx43-Expression, d.h. der Cx43-Menge, begleitet (s. Abb. 36). Daraus kann geschlußfolgert werden, daß Canthaxanthin die ZZK über einen anderen Wirkmechanismus als Astaxanthin beeinflusst. Der bereits bekannte Effekt von Canthaxanthin auf die Expression von Cx43 bleibt im Detail zu klären. Der Einfluß von Canthaxanthin auf die Expression von Cx43 ist auf transkriptioneller oder auf posttranskriptioneller Ebene wie es für Retinsäure beschrieben ist (s. 4.1.2 und [Clairmont 1997]) denkbar. Astaxanthin beeinflusst die ZZK vorrangig über den posttranslationalen Weg der Phosphorylierung von Cx43 (s.a. Abb. 52).

Offensichtlich ist ein komplexes Regelwerk für die Feinregulation der interzellulären Kommunikation über GJs verantwortlich. Hierfür werden im Falle der posttranslationalen Modifikation vermutlich je nach Signalweg, den eine Substanz auslöst, unterschiedliche Phosphorylierungsstellen im Connexinprotein verändert. Für TPA ist bekannt, daß es über die Aktivierung von Phosphokinase-C (PKC) Cx43 phosphoryliert und dadurch die Zusammenlagerung von GJs in die Membran sowie die Kanalpermeabilität beeinflusst [Ale-Agha 2002, Leithe 2003]. Es bleibt zu klären, über welche Signalkaskaden Astaxanthin die Veränderung des Phosphorylierungszustands von Cx43 bewirkt und welche Phosphorylierungsstellen betroffen sind, d.h. welche Aminosäuren im Cx43-Protein

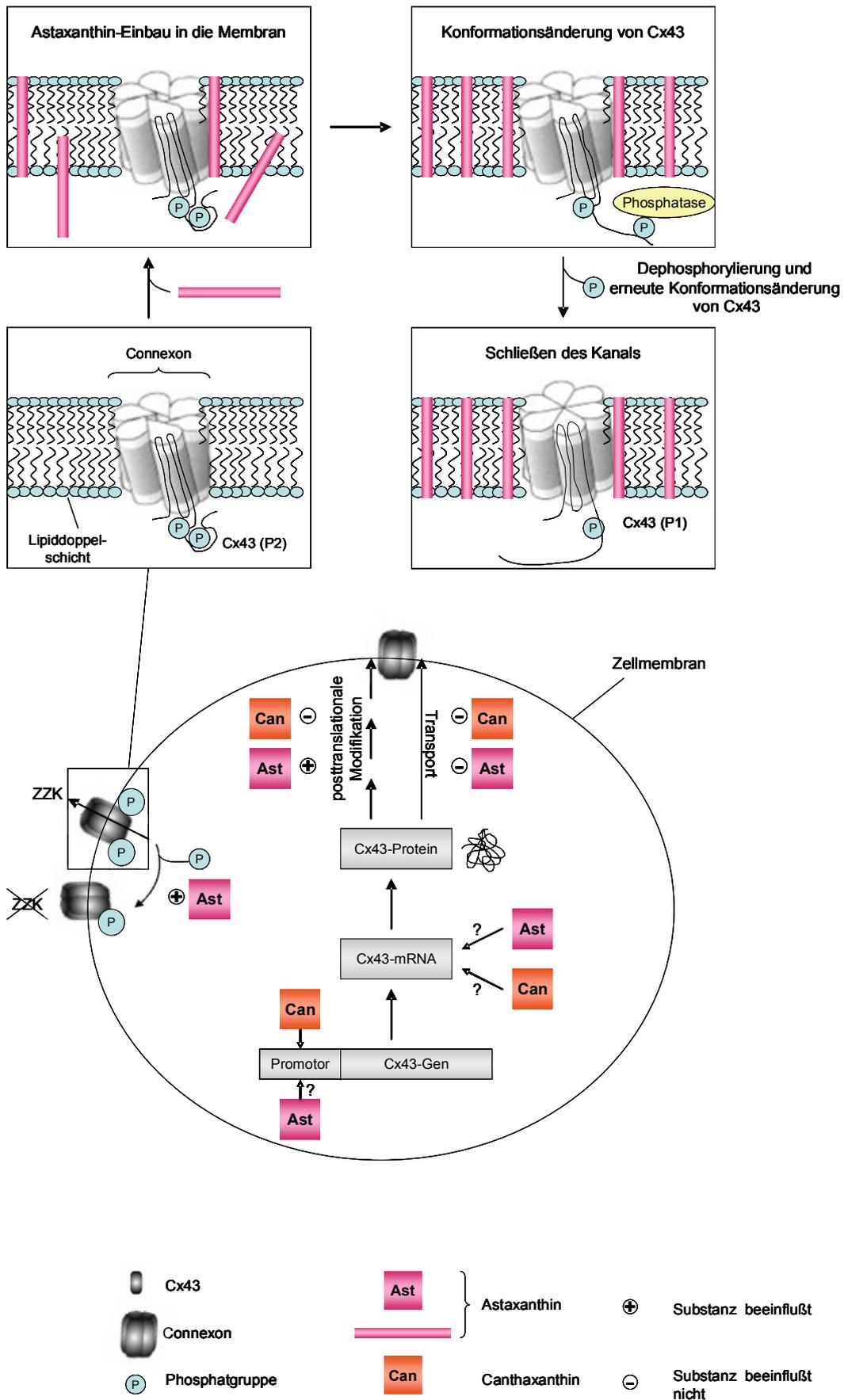


Abb. 52: Möglicher Wirkmechanismus von Canthaxanthin und Astaxanthin auf die ZZK.

phosphoryliert werden. Für die Identifizierung der Phosphorylierungsstelle muß Cx43 mittels Immunpräzipitation in hoher Reinheit aus den Zellen gewonnen und anschließend mittels Massenspektrometrie untersucht werden. Bislang konnte dies noch nicht erfolgreich durchgeführt werden. Insbesondere die Immunpräzipitation stellte einen kritischen Schritt dar: Cx43 konnte nicht in der für die Massenspektrometrie ausreichenden Menge und Reinheit isoliert werden.

Ursache für die inhibitorische Wirkung von Astaxanthin auf die ZZK kann auch ein Membraneffekt von Astaxanthin sein (s. Abb. 52). Charakteristisch für Carotinoide und damit für Astaxanthin ist ihre Lipophilie. Aufgrund ihres lipophilen Charakters können sie die Zellmembran passieren bzw. sich in die Zellmembran einlagern. Je nach strukturellen Voraussetzungen orientieren sich die einzelnen Carotinoide unterschiedlich in der Lipiddoppelschicht. Wie in Abb. 52 schematisch dargestellt, ist es denkbar, daß durch die Einlagerung von Astaxanthin in die Zellmembran, Eigenschaften der Lipiddoppelschicht bzw. Komponenten der Lipiddoppelschicht (wie z.B. GJs) beeinflusst werden. Die Einlagerung von Astaxanthin in die Zellmembran könnte eine Konformationsänderung des am Aufbau der GJs beteiligten Cx43-Moleküls bewirken. Durch diese Konformationsänderung könnten phosphorylierte Aminosäure-Reste im C-Terminus von Cx43 besser zugänglich für zytosolische Phosphatasen sein. Die Dephosphorylierung von Cx43 wiederum könnte eine erneute Konformationsänderung von Cx43 zur Folge haben und dadurch zum Schließen des Gap-Junction-Kanals führen.

Darüberhinaus muß auch die Möglichkeit berücksichtigt werden, daß Astaxanthin eine Signalkaskade induziert, die eine Dephosphorylierung eingebauter Cx43-Moleküle auslöst und dadurch das Schließen des Kanals bewirkt. Außerdem könnte der Verlust der P2-Bande im Phosphorylierungsmuster von Cx43 nach einer Behandlung mit höheren Dosen Astaxanthin auch von einer Astaxanthin induzierten Inhibierung einer Kinase ausgelöst werden.

Die inhibitorische Wirkung von Astaxanthin war reversibel. Das Entfernen von Astaxanthin aus dem Kulturmedium führte zu einer Wiederherstellung der ZZK (s. Abb. 40). Außerdem konnte auch die P2-Bande wieder detektiert werden (s. Abb. 41), was auf einen mechanistischen Zusammenhang zwischen der Veränderung des Phosphorylierungsmusters von Cx43 und der Hemmung der ZZK hindeutet. Die reversible inhibierende Wirkung auf die ZZK ist auch für andere Inhibitoren der ZZK, z.B. Oleamid [Guan 1997] und Ölsäure [Lavado 1997] beschrieben. Der Verlust der P2-Bande von Cx43 in Oleamid behandelten

Zellen ist ebenfalls reversibel [Guan 1997]. Allerdings erholten sich die mit Oleamid bzw. Ölsäure behandelten Zellen schneller von der inhibierenden Wirkung: in Rattengliazellen war eine Regeneration der ZZK innerhalb von 1 h nach Entfernen des Oleamids zu beobachten. Die ZZK in Astrozyten war nach dem Entfernen der Ölsäure innerhalb von etwa 12 h regeneriert. Die ZZK in Astaxanthin behandelten humanen Hautfibroblasten war dagegen nach 24 h nur auf etwa 70 % des Kontrollwertes regeneriert, d.h. die Astaxanthin-Behandlung bedingte in diesem Zelltyp einen langanhaltenderen Effekt. Im Vergleich zum ZZK-Inhibitor TPA waren höhere Konzentrationen und längere Inkubationszeiten nötig, um eine komplette Inhibierung der ZZK zu erreichen [Matesic 1994, Ale-Agha 2003]. Astaxanthin wirkte jedoch schneller als Canthaxanthin (10 μM), dessen stimulatorischer Effekt auf die ZZK in humanen Hautfibroblasten erst nach ca. 6 h zu beobachten war. 10 μM Astaxanthin führten bereits nach einer 3-stündigen Behandlung zu einer signifikanten Hemmung der ZZK. Der stimulatorische Effekt von Canthaxanthin war ebenfalls reversibel (s. Abb. 40 und 41).

Je höher die Carotinoidkonzentration im Inkubationsmedium war, desto höher war die im Zelllysate detektierte Carotinoidmenge. Die extremen Unterschiede zwischen den jeweiligen Einzelmeßwerten durch das zelluläre System und das Lösungsverhalten der Carotinoide erklärbar. Bei Carotinoiden handelt es sich um stark lipophile Substanzen. Diese mußten für die Experimente in einem wässrigen Medium solubilisiert werden, um die Zellen damit inkubieren zu können. Die Carotinoide wurden in Tetrathydrofuran (THF) vorgelöst, das gemäß der Literatur und eigenen Erfahrungen ein geeignetes Lösungsmittel für die Untersuchung von Carotinoiden in Zellkulturstudien ist [Bertram 1991]. Die Carotinoide wurden dann als Carotinoid-THF-Stammlösung in das wässrige Medium verdünnt. Allerdings kann es dabei zu einer ungleichmäßigen Carotinoidverteilung im Medium und im Folgenden zu Abweichungen des auf die Zellen pipettierten Carotinoidgehalts kommen.

Auch nach der Probennahme (Zelllysate und abpipettierte Medienüberstände) können Pipettierfehler zu Fehlern in den Meßergebnissen führen. Für die Carotinoid-Analyse per HPLC wurden bestimmte Volumina der Proben (Zelllysate und abpipettierte Medienüberstände) abpipettiert. Hier ist es ebenfalls von großer Wichtigkeit für die Meßergebnisse, daß die Carotinoide homogen verteilt in den Proben vor dem Abpipettieren der Analyseprobe vorliegen. Während der experimentellen Durchführung wurde zwar versucht, durch kräftiges maschinelles Schütteln der Zelllysate und Medien diese Fehlerquelle zu eliminieren. Aber es ist dennoch nicht auszuschließen, daß ungleiche

Mengen an Carotinoid für die Bestimmung des Carotinoidgehalts in Zelllysat bzw. Medium pipettiert wurden.

Für exaktere Aussagen hinsichtlich des Bioverfügbarkeit der beiden Xanthophylle in Zellen sollte ein anderes Solubilisationssystem verwendet werden (z.B. Liposomen) und eventuell die Probennahme und/ oder die Probenaufarbeitung optimiert werden. Detailliertere Daten über die Aufnahme von Carotinoiden in Zellen können außerdem gewonnen werden, indem die Carotinoidkonzentration nach einer subzellulären Fraktionierung in den einzelnen Kompartimenten (z.B. Nucleus, Mitochondrien) bestimmt wird.

4.2 Einfluß von Dicumarol auf die Zell-Zell-Kommunikation in Rattenleberepithelzellen (WB-F344) und humanen Hautfibroblasten (HFFF2)

Dicumarol inhibiert bekannterweise die ERK-Aktivierung einiger Chinone und die damit verbundene Hemmung der ZZK [Klotz 2002]. Im Widerspruch dazu führte die Behandlung von WB-F344 (Rattenleberepithelzellen) bzw. von HFFF2 mit Dicumarol zu einer starken Erniedrigung der ZZK.

Abdelmohsen et al. [Abdelmohsen 2005] konnten zeigen, daß die Inhibierung der ZZK durch Dicumarol unabhängig vom ERK-Signalweg ist. Demzufolge inhibiert Dicumarol die ZZK nicht über eine Aktivierung des ERK-Signalweges mit anschließender Phosphorylierung des Kanalproteins Cx43 (s. Abb. 11). Vielmehr konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß die dicumarolinduzierte Inhibierung der ZZK ähnlich wie bei anderen Inhibitoren (z.B. Astaxanthin, Oleamid, Heptanol, s. Abb. 36 und 41, s. 4.1.3) mit einer Hypophosphorylierung einhergeht (s. Abb. 46, s 4.1.3). Die Inhibierung der ZZK war begleitet von dem Verlust der P2-Bande von Cx43 und die Regeneration der ZZK nach Auswaschen des Dicumarols von der Regeneration der P2-Bande im Western Blot. Daher kann vermutet werden, daß Dicumarol die ZZK hemmt, indem es eine Veränderung des Cx43-Phosphorylierungsmusters verursacht. Es bleibt zu untersuchen, über welche Signalwege diese Effekte von Dicumarol vermittelt werden.

Ebenso wie für Astaxanthin bleibt auch für Dicumarol zu klären, ob die Inhibierung der ZZK und der gleichzeitige Verlust der P2-Bande kausal miteinander verknüpft sind oder ob es sich bei beiden Effekten um einem unbekanntem Primäreffekt nachgelagerte parallele

Phänomene handelt. Dicumarol beeinflusste ebenso wie Astaxanthin die Lokalisation von Cx43 nicht (immunohistochemische Daten nicht abgebildet). Dicumarol inhibierte die ZZK reversibel (s. Abb 45). Die ZZK in WB-F344 erreichte nach Entfernen des Dicumarols aus dem Medium im Vergleich zu Astaxanthin (s. Abb. 40) sehr schnell wieder das Niveau der Kontrollzellen. Nach einer einstündigen Behandlung von WB-F344 mit 25 μM Dicumarol war die ZZK bereits 1 h nach Entfernen des Dicumarols auf 80 % des Kontrollwertes regeneriert. Nach einer Inhibierung der ZZK mit 10 μM Astaxanthin (24 h-Inkubation) wurde eine Regeneration der ZZK in humanen Hautfibroblasten auf 80 % des Kontrollwertes erst nach 48 h beobachtet. Möglicherweise spielen hier zelltypabhängige Effekte eine Rolle, da die Reversibilität der beiden Substanzen in unterschiedlichen Zellsystemen (WB-F344, humanen Hautfibroblasten) getestet wurden. Weiter kann dies auch ein Indiz für einen unterschiedlichen Wirkmechanismus der beiden Inhibitoren auf die ZZK sein.

Bislang sind unterschiedliche Substanzen als Inhibitoren der ZZK bekannt, z.B. Alkanole oder primäre Amide von Fettsäuren [Guan 1997, Boger 1998]. Außerdem ist für verschiedene Substanzen, die mit Membran-Ionenkanälen interagieren, wie z.B. Flufenaminsäure (FFA), gezeigt worden, daß sie die ZZK inhibieren. Die Aktionsweise dieser Inhibitoren ist bis jetzt nicht geklärt. Und üblicherweise werden eher generelle Effekte auf die Membrandurchlässigkeit und auf die Konformation der GJ-Halbkanäle bzw. der Connexinmoleküle in der Membran als Ursachenerklärung für die Inhibierung der ZZK vorgeschlagen [Lerner 1997]. Im Vergleich zu Dicumarol waren sowohl 1-Octanol als auch FFA in WB-F344 weniger effektiv als ZZK-Inhibitoren (s. Abb. 48). Die IC_{50}^{12} -Werte beider Substanzen lagen bei ca. 25 μM (im Vergleich dazu: 3 μM bei Dicumarol), was mit Literaturdaten über die reversible Inhibierung der ZZK in Rattennierenfibroblasten (NRK Fibroblasten) durch FFA mit einer IC_{50} von 40 μM übereinstimmt [Harks 2001].

4.3 Carotinoide als Mikronährstoffe mit potentiell protektiver Wirkung gegen schädigende Effekte von UVA-Strahlung

UVA-Bestrahlung führte zur Hemmung der ZZK in humanen Hautfibroblasten. Bisher existiert kaum Literatur über den Effekt von UVA-Strahlung auf die ZZK. Der inhibitorische Effekt von UVA-Strahlung auf die ZZK ist *in vitro* in humanen

¹² IC_{50} : Konzentration, bei der 50 % der ZZK inhibiert werden.

Keratinocyten [Provost 2003] und in Hamsterfibroblasten [Banrud 1994] in der Literatur beschrieben. Provost et al. [Provost 2003] stellten eine Dosisabhängigkeit des inhibitorischen Effekts von UVA-Strahlung auf die ZZK in humanen Keratinocyten fest: je höher die Dosis der UVA-Strahlung ($0-20 \text{ J/cm}^2$) war, desto stärker war die Hemmung der ZZK. Eine Dosisabhängigkeit konnte für die Wirkung von UVA-Strahlung auf die ZZK in humanen Hautfibroblasten (HdF) in den hier vorgestellten Untersuchungen nicht bestätigt werden (s. Abb. 49). Eine UVA-Dosis von 10 J/cm^2 führte zu einer signifikanten Hemmung der ZZK, höhere bzw. niedrigere Dosen (5 bzw. 15 J/cm^2) nicht. Bei den hier vorgestellten Versuchsergebnissen handelt es sich allerdings um vorläufige Ergebnisse. Möglich ist aber, daß der Effekt der UVA-Strahlung auf die ZZK vom Zelltyp abhängt. Dies bleibt zu klären.

Der inhibitorische Effekt von UVA-Strahlung auf die ZZK war abhängig vom Meßzeitpunkt. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen wurde bei einer Dosis von 10 J/cm^2 nur für den Meßpunkt von 6 h nach der Bestrahlung ein signifikanter inhibitorischer Effekt auf die ZZK festgestellt. Für höhere (24 h) bzw. niedrigere (3 h) Zeitspannen zwischen Bestrahlung und Messung der ZZK wurden keine signifikanten Effekte auf die ZZK beobachtet. Auch Banrud et al. [Banrud 1994] zeigten, daß der beobachtete Effekt der UVA-Strahlung abhängig ist von der Zeitspanne zwischen Bestrahlung und Messung der ZZK. Ihre Untersuchungen ergaben eine maximale Hemmung der ZZK in Hamsterfibroblasten 4 h nach Bestrahlung mit UVA. Daraus kann man schließen, daß die Wirkung der UVA-Strahlung auf die ZZK zeitversetzt zur eigentlichen Bestrahlung einsetzt. Es bleibt zu klären, welche molekularen Prozesse in der Zelle durch die UVA-Strahlung initiiert werden, die dann letztlich zur Hemmung der ZZK führen.

Gemäß derzeitigem Wissensstand spielt die Hemmung der ZZK eine Rolle in der Kanzerogenese: Krebszellen weisen in der Regel eine verminderte bzw. keine ZZK auf [Bertram 2004, Trosko 2001]. Es wird vermutet, daß es während der Tumorentstehung für die Tumorzelle äußerst wichtig ist, sich von den Signalen (z.B. Wachstumskontrollsignale) der sie umgebenden Zellen zu isolieren und damit der Wachstumskontrolle normaler Zellen zu entziehen [Vine 2002]. Hautkrebs zählt zu den häufigsten Tumorerkrankungen des Menschen und seine Inzidenz nahm in den letzten Jahren stetig zu. Es besteht ein klarer Zusammenhang zwischen der Entstehung von Hautkrebs und der Einwirkung ultravioletter Strahlung, unabhängig davon, ob sie von der Sonne oder aus dem Solarium kommt [Lyons 2002, <http://www.krebsinformation.de/Krebsarten/hautkrebs.html>]. UVA-Strahlen dringen tiefer in die Haut - d.h. bis zur Dermis - ein als UVB-Strahlen, die nur bis in die Epidermis

gelangen. UVA-Strahlung wird daher neben genetischer Disposition als eine Ursache für den bösartigsten Hautkrebstyp, das maligne Melanom, angesehen. Der Mechanismus der procarcinogene Wirkung von UVA-Strahlung ist noch nicht in vollem Umfang aufgeklärt. U.a. wird angenommen, daß UVA-Strahlung biologisch relevante Moleküle (z.B. DNA) indirekt über die Bildung von ROS schädigt [Ichihashi 2003, Lyons 2002, Sies 2004] und somit zur Krebsentstehung beiträgt. Es wird angenommen, daß die in dieser Arbeit beschriebene inhibitorische Wirkung von UVA-Strahlung auf die ZZK in humanen Hautfibroblasten ein weiterer möglicher Mechanismus der procarcinogenen Wirkung von UVA-Strahlung ist.

Wertz et al. [Wertz 2005] konnten zeigen, daß die UVA-Strahlung die Expression von vielen hundert Genen in Keratinozyten, z.T. ROS vermittelt, beeinflusst. Daher kann die beobachtete Hemmung der ZZK in humanen Hautfibroblasten aus einer veränderten Expression von Cx43 infolge von UVA-Strahlung resultieren. Die Carotinoide β -Carotin, Astaxanthin und Canthaxanthin kompensierten die inhibitorische Wirkung von UVA-Strahlung auf die ZZK in humanen Hautfibroblasten (s. Abb. 50) und führten in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen sogar zu einer Stimulation der ZZK unter UVA-Einwirkung. Insbesondere für Astaxanthin wirft dies Fragen auf, da es sich in den bisherigen ZZK-Studien als Inhibitor der ZZK erwiesen hat. Die Ursache können Effekte von Astaxanthin-Metaboliten sein, die unter UVA-Einfluß gebildet wurden und im Gegensatz zu ihrer Muttersubstanz Astaxanthin stimulatorisch auf die ZZK wirken. β -Carotin hingegen verhielt sich ambivalent: einerseits stimulierte es nach UVA-Exposition ebenso wie Canthaxanthin die ZZK; andererseits war die ZZK in humanen Hautfibroblasten nach einer 24-stündigen Vorinkubation mit β -Carotin 24 h nach der Bestrahlung mit UVA signifikant erniedrigt. Auch hier können Metaboliten eine Rolle spielen, die die inhibitorische Wirkung der UVA-Strahlung auf die ZZK im Gegensatz zu β -Carotin nicht kompensieren können oder selbst inhibitorisch wirken.

Die photoprotektive Wirkung von Carotinoiden ist in der Literatur mehrmals beschrieben. O'Connor et al. [O'Connor 1998] zeigten, daß β -Carotin (1 μ M), Astaxanthin (10 nM) und Lutein (1 μ M) Rattennierenfibroblasten vor UVA-induziertem oxidativen Streß schützen, wobei Astaxanthin die größte antioxidative Wirkung entfaltete. Es bleibt zu klären, ob bei der protektiven Wirkung der Carotinoide gegen UVA-induzierte Hemmung der ZZK auch antioxidative Mechanismen eine Rolle spielen. Dies würde bedeuten, daß die ZZK durch ROS-abhängige Signalwege beeinflusst wird. Für UVB-Strahlung ist bekannt, daß sie ERK-abhängige Signalwege aktiviert [Ichihashi 2003]. Die Aktivierung des ERK-Signalwegs

wiederum kann zu einer Phosphorylierung von Cx43 und im Folgenden zu einer Inhibierung der ZZK führen [Warn-Cramer 1996, Lampe 2000] (s.a. Abb. 11). Auch *in vivo* wurde die photoprotektive Wirkung von natürlich vorkommenden Carotinoiden nachgewiesen. Eine Supplementierung mit täglich 24 mg β -Carotin, Lycopin oder einer Carotinoidmischung (jeweils 8 mg: β -Carotin, Lycopin, Lutein) über einen Zeitraum von 12 Wochen verminderte die Erythemintensität nach UV-Exposition [Heinrich 2003]. Diese Supplementierung erfolgte mit Carotinoiden in Gelkapsel-Formulierung. Auch eine 10-wöchige Supplementierung mit Lycopin (16 mg/ d) in einer der Nahrung entsprechenden Matrix (Tomatenpaste mit Olivenöl) führte zu einer 40 % geringeren Erythembildung nach UV-Exposition [Stahl 2001]. Diese Studien und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, daß die natürlich vorkommende Mikronährstoffklasse der Carotinoide als endogene Sonnenschutzmittel für eine systemische Photoprotektion des menschlichen Organismus geeignet ist. Ihre Schutzwirkung ist zwar geringer als die synthetisch hergestellter, topisch applizierter Sonnenschutzmittel (z.B. UVA- bzw. UVB- Filter in herkömmlicher Sonnenmilch). Aber sie können einen permanenten Schutz gegen UV-Strahlung gewährleisten und zum permanenten Verteidigungssystem des Organismus gegen UV-Strahlung beitragen.

5 Zusammenfassung

Die interzelluläre Zell-Zell-Kommunikation (ZZK) über Zell-Zell-Kanäle (Gap Junctions) ermöglicht komplexen Organismen den Austausch von niedermolekularen Verbindungen (<1 kDa) zum Zwecke der Signaltransduktion (von molekularen und elektrischen Signalen) und Austausch von Nährstoffen. Die GJs sind aus Membranproteinen aus der Connexin-Familie aufgebaut. Die Regulation der ZZK erfolgt auf transkriptioneller, posttranskriptioneller und posttranslationaler Ebene. Die ZZK über GJs ist für viele verschiedene zelluläre Funktionen wie z.B. die Regulation von Wachstum, Differenzierung und Entwicklung der Zelle von Bedeutung. Der Verlust der ZZK ist ein Charakteristikum der meisten Krebszellen. Für Carotinoide, natürlich vorkommende Mikronährstoffe, wurden in vielen Studien krebspräventive Eigenschaften beobachtet. Frühere Untersuchungen zeigten, daß einige Carotinoide die ZZK stimulieren. Es wird diskutiert, daß ihre krebspräventiven Eigenschaften wenigstens z.T. auf ihrer stimulatorischen Wirkung auf die ZZK basieren.

In der hier vorliegenden Arbeit konnten stimulatorische Effekte einiger Carotinoide (β -Carotin, Lycopin, Canthaxanthin) auf die ZZK in Rattenleberepithelzellen (WB-F344) durch Messungen der ZZK im Fluoreszenzfarbstoff-Transfer-Assay bestätigt werden. Für andere Carotinoide (Phytoen, Zeaxanthin, Lutein) wurden keine oder nur geringfügige Effekte auf die ZZK beobachtet. Astaxanthin, das bislang kaum hinsichtlich seiner Wirkung auf die ZZK untersucht worden war, führte unerwarteterweise zu einer drastischen Hemmung der ZZK in WB-F344. Interessanterweise ist das strukturell eng verwandte Canthaxanthin ein starker Stimulator der ZZK.

Detailliertere Studien zur Wirkung von Astaxanthin und Canthaxanthin auf die ZZK wurden vergleichenderweise in einem humanen Zellsystem (humane Hautfibroblasten, HdF) durchgeführt. Diese Studien zeigten, daß Astaxanthin die ZZK dosisabhängig (10^{-9} – 10^{-5} M) signifikant hemmt, während Canthaxanthin innerhalb des gleichen Konzentrationsbereichs sowie gleicher Inkubationszeiten (24 - 72 h) die ZZK signifikant stimuliert. Die Inkubation mit 10^{-5} M Astaxanthin führt sowohl nach 24 h als auch nach 72 h zu einer fast kompletten Inhibierung (< 95 %) der ZZK in HdF. Die Hemmung der ZZK durch Astaxanthin ist reversibel.

Untersuchungen zum Mechanismus der starken inhibitorischen Wirkung von Astaxanthin auf die ZVK zeigten, daß diese mit einer Veränderung im Phosphorylierungsmuster des Kanalproteins Connexin43 (Cx43) assoziiert ist. Die stimulatorische Wirkung von Canthaxanthin auf die ZVK geht nicht mit einer Veränderung des Phosphorylierungsmusters, sondern mit einer Erhöhung der Expression von Cx43 einher. Dies weist auf unterschiedliche Wirkmechanismen von Astaxanthin und Canthaxanthin auf die ZVK hin: Canthaxanthin wirkt auf posttranskriptioneller oder transkriptioneller Ebene. Astaxanthin beeinflusst die ZVK auf posttranslationaler Ebene. Im Gegensatz zu anderen Inhibitoren der ZVK (z.B. dem Tumorpromotor TPA) war die inhibitorische Wirkung von Astaxanthin nicht mit einer Delokalisation von Cx43 von der Zellmembran assoziiert.

UVA-Strahlung ist als zellulärer Stressor bekannt. Es konnte im Verlauf dieser Arbeit gezeigt werden, daß UVA-Strahlung die ZVK in humanen Hautfibroblasten zu ca. 30 % hemmt. Die Behandlung mit Carotinoiden (β -Carotin, Astaxanthin, Canthaxanthin) schützte die Zellen vor der von UVA-Strahlung induzierten Inhibierung der ZVK. Dies unterstützt die These, daß Carotinoide als endogene Sonnenschutzmittel beim Menschen angewendet werden können.

Neben Carotinoiden wurde auch das Cumarin Dicumarol hinsichtlich seiner Wirkung auf die ZVK in WB-F344 sowie humanen Vorhautfibroblasten (HFFF2) untersucht. Wie Astaxanthin inhibiert es dosisabhängig die ZVK. Möglicherweise hemmen Astaxanthin und Dicumarol die ZVK über den gleichen Mechanismus, da auch die inhibitorische Wirkung von Dicumarol mit einer Veränderung des Phosphorylierungszustands von Cx43 assoziiert ist.

6 Literatur

Artikel und Bücher

- ABDELMOHSEN K, Gerber PA, von Montfort C, Sies H, Klotz LO (2003): Epidermal growth factor receptor is a common mediator of quinone-induced signaling leading to phosphorylation of connexin-43: role of glutathione and tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* 278: 38360-7.
- ABDELMOHSEN K, Stuhlmann D, Daubrawa F, Klotz LO (2005): Dicumarol is a potent reversible inhibitor of gap junctional intercellular communication. *Arch Biochem Biophys* 434: 241-7.
- ALE-AGHA N, Stahl W, Sies H (2002): (-)-Epicatechin effects in rat liver epithelial cells: stimulation of gap junctional communication and counteraction of its loss due to the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Biochem Pharmacol* 63: 2145-9.
- ALE-AGHA N (2003): Untersuchungen zum Einfluß von Retinoiden, Flavonoiden und Menadion auf die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- AMTSBLATT der Europäischen Gemeinschaften L 22/28 (25.1.2003), Richtlinie 2003/7/EG der Kommission vom 24. Januar 2003.
- ANDREWES AG, Phaff HJ, Starr MP (1976): Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry* 15: 1003-7.
- ASTORG P, Gradelet S, Leclerc J, Canivenc MC, Siess MH (1994): Effects of beta-carotene and canthaxanthin on liver xenobiotic-metabolizing enzymes in the rat. *Food Chem Toxicol* 32: 735-42.
- AUST O, Ale-Agha N, Zhang L, Wollersen H, Sies H, Stahl W (2003): Lycopene oxidation product enhances gap junctional communication. *Food Chem Toxicol* 41: 1399-407.
- BANRUD H, Mikalsen SO, Berg K, Moan J (1994): Effects of ultraviolet radiation on intercellular communication in V79 Chinese hamster fibroblasts. *Carcinogenesis* 15: 233-9.

- BARR L, Dewey MM, Berger W (1965): Propagation of action potentials and the structure of the nexus in cardiac muscle. *J Gen Physiol* 48: 797-823.
- BARRIO LC, Suchyna T, Bargiello T, Xu LX, Roginski RS, Bennett MVL, Nicholson BJ (1991): Gap junctions formed by connexins 26 and 32 alone and in combination are differently affected by applied voltage. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8410-4.
- BEARDSLEE MA; Laing JG, Beyer EC, Saffitz JE (1998): Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ Res* 83: 629-35.
- BELITZ HD, Grosch W (1992): *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 4. überarbeitete Auflage, korrigierter Nachdruck, Springer-Verlag, Berlin/ Heidelberg/ New York.
- BEN-DOR A, Nahum A, Danilenko M, Giat Y, Stahl W, Martin HD, Emmerich T, Noy N, Levy J, Sharoni Y (2001): Effects of acyclo-retinoic acid and lycopene on activation of the retinoic acid receptor and proliferation of mammary cancer cells. *Arch Biochem Biophys* 391: 295-302.
- BERTHOUD VM, Beyer EC, Kurata WE, Lau AF, Lampe PD (1997): The gap-junction protein connexin 56 is phosphorylated in the intracellular loop and the carboxy-terminal region. *Eur J Biochem* 244 (1): 89-97.
- BERTHOUD VM, Minogue PJ, Laing JG, Beyer EC (2004): Pathways for degradation of connexins and gap junctions. *Cardiovasc Res* 62: 256-67.
- BERTRAM JS, Pung A, Churley M, Kappock TJ 4th, Wilkins LR, Cooney RV (1991): Diverse carotenoids protect against chemically induced neoplastic transformation. *Carcinogenesis* 12: 671-8.
- BERTRAM JS (1993): Cancer prevention by carotenoids. Mechanistic studies in cultured cells. *Ann N Y Acad Sci* 691: 177-91.
- BERTRAM JS, Bortkiewicz H (1995): Dietary carotenoids inhibit neoplastic transformation and modulate gene expression in mouse and human cells. *Am J Clin Nutr* 62 (6 Suppl): 1327S-1336S.
- BERTRAM JS (2004): Induction of connexin 43 by carotenoids: functional consequences. *Arch Biochem Biophys* 430: 120-6.
- BEUTNER S, Bloedorn B, Frixel S, Blanco IH, Hoffmann T, Martin HD, Mayer B, Noack P, Ruck C, Schmidt M, Schülke I, Sell S, Ernst H, Haremza S, Seybold G, Sies H, Sstahl W, Walsh R (2001): Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of β -carotene in antioxidant functions. *J Sci Food Agric* 81: 559-68.

- BEX V, Mercier T, Chaumontet C, Gaillard-Sanchez I, Flechon B, Mazet F, Traub O, Martel P (1995): Retinoic acid enhances connexin43 expression at the post-transcriptional level in rat liver epithelial cells. *Cell Biochem Funct* 13: 69-77.
- BOGER DL, Patterson JE, Guan X, Cravatt BF, Lerner RA, Gilula NB (1998): Chemical requirements for inhibition of gap junction communication by the biologically active lipid oleamide. *Proc Natl Acad Sci* 95: 4810-5.
- BONE RA, Landrum JT, Dixon Z, Chen Y, Llerena CM (2000): Lutein and zeaxanthin in the eyes, sebum and diet of human subjects. *Exp Eye Res* 71 (3): 239-45.
- BOUSSIBA S, Vonshak A (1991): Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant & Cell Physiol* 32:1077-82.
- BREINHOLT V, Lauridsen ST, Daneshvar B, Jakobson J (2000): Dose-response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. *Cancer Lett* 154: 201-10.
- BRITTON G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (1995 a): Carotenoids, Vol. 1A: Isolation and Analysis, Birkhäuser Verlag, Basel/ Boston/ Berlin.
- BRITTON G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (1995 b): Carotenoids, Vol. 1B: Spectroscopy, Birkhäuser Verlag, Basel/ Boston/ Berlin.
- BUNDESGESETZBLATT Jahrgang 1998 Teil I Nr.8, S. 230ff.
- CAMERON SJ, Malik S, Akaike M, Lerner-Marmarosh N, Yan C, Lee JD, Abe J, Yang J (2003): Regulation of epidermal growth factor-induced connexin 43 gap junction communication by big mitogen-activated protein kinase1/ERK5 but not ERK1/2 kinase activation. *J Biol Chem* 278: 18682-8.
- CARRUBA G, Stefano R, Cocciadiferro L, Saladino, F, di Christina A, Tokar E, Quader STA, Webber MM, Castagnetta L (2002): Intercellular communication and human prostate carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 963: 156-68.
- CARYSTINOS GD, Alaoui-Jamali MA, Phipps J, Yen L, Batist G (2001): Upregulation of gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression by cyclic-AMP and all-trans-retinoic acid is associated with glutathione depletion and chemosensitivity in neuroblastoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 47: 126-32.
- CASCIO M (2005): Connexins and their environment: effects of lipids composition on ion channels. *Biochim Biophys Acta* 1711: 142-53.
- CHANSON M, Derouette J-P, Roth I, Foglia B, Scerri I, Dudez T, Kwak BR (2005): Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. *Biochim Biophys Acta* 1711: 197-207.

- CHEW BP, Park JS, Wong MW, Wong TS (1999): A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo. *Anticancer Res* 19: 1849-53.
- CHEW BP, Park JS (2004): Carotenoid action on the immune response. *J Nutr* 134:257S-261S.
- CHYLACK LT JR, Brown NP, Bron A, Hurst M, Kopcke W, Thien U, Schalch W (2002): The Roche European American Cataract Trial (REACT): a randomized clinical trial to investigate the efficacy of an oral antioxidant micronutrient mixture to slow progression of age-related cataract. *Ophthalmic Epidemiol* 9: 49-80.
- CLAIRMONT A, Sies H (1997): Evidence for a posttranscriptional effect of retinoic acid on connexin43 gene expression via the 3'-untranslated region. *FEBS Lett* 419: 268-70.
- COTTRELL GT, Burt JM (2005): Functional consequences of heterogenous gap junction channel formation and its influence in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1711: 126-41.
- CROW DS, Beyer EC, Paul DL, Kobe SS, Lau AF (1990): Phosphorylation of connexin43 gap junction protein in uninfected and rous sarcoma virus-transformed mammalian fibroblasts. *Mol Cell Biol* 10: 1754-63.
- CRUCIANI V, Mikalsen SO, Vasseu P, Sanner T (1997): Effects of peroxisome proliferators and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate on intercellular communication and connexin43 in two hamster fibroblast systems. *Int J Cancer* 73: 240-8.
- DAHL G, Werner R, Levine E, Rabadan-Diehl C (1992): Mutational analysis of gap junctional formation. *Biophys J* 62: 172-80.
- DAUBRAWA F, Sies H, Stahl W (2005): Astaxanthin diminishes gap junctional intercellular communication in primary human fibroblasts. *J Nutr* 135: 2507-11.
- DE MAIO A, Vega VL, Contreras JE (2002): Gap junctions, homeostasis, and injury. *J Cell Physiol* 191 (3): 269-82.
- DENISON MS, Nagy SR (2003): Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 309-34.
- DONALDSON MS (2004): Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutr J* 3:19.
- EL-AGAMEY A, Lowe GM, McGarvey DJ, Mortensen A, Phillip DM, Truscott TG, Young AJ (2004): Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch Biochem Biophys* 430: 37-48.

- ELFGANG C, Eckert R, Lichtenberg-Fraté H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hülser DF, Willecke K (1995): Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 129: 805-17.
- ESKANDARI S, Zampighi GA, Leung DW, Wright EM, Loo DD (2002): Inhibition of gap junction hemichannels by chloride channel blockers. *J Membr Biol* 185: 93-102.
- FALLER A, Schünke M (2004): *Der Körper des Menschen – Einführung in Bau und Funktion*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart/ New York.
- FALLON RF, Goodenough DA (1981): Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. *J Cell Biol* 127: 343-55.
- FRASER PD, Yutaka M, Norihiko M (1997): *In vitro* characterization of Astaxanthin biosynthetic enzymes. *J Biol Chem* 272: 6128-35.
- GANN PH, Ma J, Giovannucci E, Willett E, Sacks FM, Hennekens CH, Stampfer MJ (1999): Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis. *Cancer Res* 59: 1225-30.
- GERIDO DA, White TW (2004): Connexin disorders of the ear, skin, and lens. *Biochim Biophys Acta* 1662: 159-70.
- GIEPMANS BNG (2004): Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res* 62: 233-45.
- GOLDBERG GS, Moreno AP, Lampe PD (2002): Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP. *J Biol Chem* 277 (39): 36725-30.
- GOODENOUGH DA, Goliger JA, Paul DL (1996): Connexins, connexons and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 65: 475-502.
- GOTO S, Kogure K, Abe K, Kimata Y, Kitahama K, Yamashita E, Terada H (2001): Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochim Biophys Acta* 1512: 251-8.
- GRADELET S, Astorg P, Leclerc J, Chevalier J, Vernevaux MF, Siess MH (1996 a): Effects of canthaxanthin, astaxanthin, lycopene and lutein on liver xenobiotic-metabolizing enzymes in the rat. *Xenobiotica* 26: 49-63.
- GRADELET S, Leclerc J, Siess MH, Astorg PO (1996 b): beta-Apo-8'-carotenal, but not beta-carotene, is a strong inducer of liver cytochromes P4501A1 and 1A2 in rat. *Xenobiotica* 26: 909-19.
- GRADELET S, Astorg P, Pineau T, Canivenc MC, Siess MH, Leclerc J, Lesca P (1997): Ah receptor-dependent CYP1A induction by two carotenoids, canthaxanthin and beta-

- apo-8'-carotenal, with no affinity for the TCDD binding site. *Biochem Pharmacol* 54: 307-15.
- GUAN X, Cravatt BF, Ehring GR, Hall JE, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB (1997): The sleep-inducing lipid oleamide deconvolutes gap junction communication and calcium wave transmission in glial cells. *J Cell Biol* 139: 1785-92.
- GUERIN M, Huntley ME, Olaizola M (2003): Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol* 21: 210-6.
- HALSTED CH (2003): Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin? *Am J Clin Nutr* 77 (Suppl): 1001S-1007S.
- HANUSCH M, Stahl W, Schulz WA, Sies H (1995): Induction of gap junctional communication by 4-oxoretinoic acid generated from its precursor canthaxanthin. *Arch Biochem Biophys* 317 (2): 1-6.
- HARKS EGA, De Roos ADG, Peters PHJ, De Haan LH, Brouwer A, Ypey DL, Van Zoelen EJJ, Theuvenet APR (2001): Fenamates: a novel class of reversible gap junction blockers. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 1033-41.
- HARRIS AL (2001): Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q Rev Biophys* 34: 325-472.
- HEINRICH U, Gärtner C, Wiebusch M, Eichler O, Sies H, Tronnier H, Stahl W (2003): Supplement with β -carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. *J Nutr*. 133: 98-101.
- HENNEMANN H, Suchyna T, Lichtenberg-Fraté H, Jungbluth S, Dahl E, Schwarz J, Nicholson BJ, Willecke K (1992): Molecular cloning and functional expression of mouse connexin40, a second gap junction gene preferentially expressed in lung. *J Cell Biol* 117 (6): 1299-1310.
- HERVÉ JC (2004): The connexins – Introduction. *Biochim Biophys Acta* 1662: 1-2.
- HIEBER AD, King TJ, Morioka S, Fukushima LH, Franke AA, Bertram JS (2000): Comparative effects of all-trans β -carotene vs. 9-cis β -carotene on carcinogen-induced neoplastic transformation and connexin 43 expression in murine 10T1/2 cells and on the differentiation of human keratinocytes. *Nutr Cancer* 37: 234-44.
- HIX LM, Frey DA, McLaws MD, Østerlie ;, Lockwood AF, Bertram JS (2005): Inhibition of chemically-induced neoplastic transformation by a novel tetrasodium diphosphate astaxanthin derivative. *Carcinogenesis* 26: 1634-41.
- HOFFMANN-LA ROCHE AG (Hrsg.), Urban & Fischer (Hrsg.) (2003): Roche Lexikon Medizin, 5., neu bearbeitete und erweiterte Auflage, Urban & Fischer Verlag, München/ Jena.

- HOSSAIN MZ, Wilkens LR, Mehta PP, Loewenstein W, Bertram JS (1989): Enhancement of gap junctional communication by retinoids correlates with their ability to inhibit neoplastic transformation. *Carcinogenesis* 10: 1743-8.
- HOSSAIN MZ, Zhang L-X, Bertram JS (1993): Retinoids and carotenoids upregulate gap-junctional communication: correlation with enhanced growth control and cancer prevention. *Progress Cell Res* 3: 301-9.
- HOSSAIN MZ, Ao P, Boynton AL (1998): Rapid disruption of gap junctional communication and phosphorylation of connexin43 by platelet-derived growth factor in T51B rat liver epithelial cells expressing platelet-derived growth factor receptor. *J Cell Physiology* 174: 66-77.
- HOSSAIN MZ, Boynton AL (2000): Regulation of Cx43 gap junctions: the gatekeeper and the password. *Sci STKE* 54: 1-5.
- HOTZ-WAGENBLATT A, Shalloway D (1993): Gap junctional communication and neoplastic transformation. *Crit Rev Oncog* 4: 541-58.
- HULSER DF, Rutz ML, Eckert R, Traub O (2001): Functional rescue of defective mutant connexons by pairing with wild-type connexons. *Pflugers Arch* 441: 521-8.
- ICHIHASHI M, Ueda M, Budiyo A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru T, Horikawa T (2003): UV-induced skin damage. *Toxicology* 189: 21-39.
- ITO Y, Kurata M, Hoiki R, Suzuki K, Ochiai J, Aoki K (2005): Cancer mortality and serum levels of carotenoids, retinol, and tocopherol: a population-based follow-up study of inhabitants of a rural area of Japan. *Asian Pac J Cancer Prev* 6: 10-5.
- IWAMOTO T, Hosoda K, Hirano R, Kurata H, Matsumoto A, Miki W, Kamiyama M, Itakura H, Yamamoto S, Kondo K (2000): Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by astaxanthin. *J Atheroscler Thromb* 7: 216-22.
- JIANG JX, Goodenough DA (1996): Heteromeric connexons in lens gap junction channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1287-91.
- JYONOUCHI H, Sun S, Tomita Y, Gross MD (1995): Astaxanthin, a carotenoid without vitamin activity, augments antibody responses in cultures including T-helper cell clones and suboptimal doses of antigen. *J Nutr* 125: 2483-92.
- KANEMITSU MY, Lau AF (1993): Epidermal growth factor stimulated the disruption of gap junctional communication and connexin43 phosphorylation independent of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-sensitive protein kinase C: The possible involvement of mitogen-activated protein kinase. *Mol Biol Cell* 4: 837-48.
- KANG KS, Yun JW, Yoon B, Lim YK, Lee YS (2000): Preventive effect of germanium dioxide on the inhibition of gap junctional intercellular communication by TPA. *Cancer Lett* 166: 147-53

- KARAS M, Amir H, Fishman D, Danilenko M, Segal S, Nahum A, Koifmann A, Glat Y, Levy J, Sharoni Y (2000): Lycopene interferes with cell cycle progression and insulin-like growth factor I signaling in mammary cancer cells. *Nutr Cancer* 36: 101-11.
- KELSELL DP, Dunlop J, Hodgins MB (2001): Human diseases: clues to cracking the connexin code? *Trends Cell Biol* 11: 2-6.
- KHACHIK F, Carvalho L, Bernstein PS, Muir GJ, Zhao DY, Katz NB (2002): Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. *Exp Biol Med (Maywood)* 227: 845-51.
- KLOTZ L-O, Patak P, Ale-Agha N, Buchczyk DP, Abdelmohsen K, Gerber PA, von Montfort C, Sies H (2002): 2-Methyl-1,4-naphthoquinone, Vitamin K3 decreases gap-junctional intercellular communication via activation of the epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase cascade. *Canc Res* 62: 4922-8.
- KRINSKY NI, Landrum JT, Bone RA (2003): Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annu Rev Nutr* 23: 171-201.
- KRINSKY N, Mayne ST, Sies H (2004): Carotenoids in health and disease. Marcel Dekker, New York.
- KRUTOVSKIKH V, Asamoto M, Takasuka N, Murakoshi M, Nishino H, Tsuda H (1997): Differential dose-dependent effects of alpha-, beta-carotenes and lycopene on gap-junctional intercellular communication in rat liver *in vivo*. *Jpn J Canc Res* 88: 1121-24.
- KURIHARA H, Koda H, Asami S, Kiso Y, Tanaka T (2002): Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress. *Life Sci* 70: 2509-20.
- LAIRD DW, PURANAM KI, Revel JP (1991): Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem J* 273: 67-72.
- LAIRD DW (1996): The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation. *J Bioenerg Biomembr* 28: 311-8.
- LAIRD DW (2005): Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochim Biophys Acta* 1711: 172-82.
- LAMPE PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG, Lau AF (2000): Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulated gap junctional communication. *J Cell Biol* 149: 1503-12.
- LAMPE PD, Lau AF (2004): The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1171-86.

- LANDRUM JT, Bone RA, Joa H, Kilburn MD, Moore LL, Sprague KE (1997): A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. *Exp Eye Res* 65: 57-62
- LAU AF, Kurata WE, Kanetmitsu MY, Loo LWM, Warn-Cramer BJ, Eckhart W, Lampe PD (1996): Regulation of connexin43 function by activated tyrosine protein kinases. *J Bioenerg Biomembr* 28: 359-68.
- LAVADO E, Sánchez-Abarca LI, Tabernero A, Bolanos JP, Medina JM (1997): Oleic acid inhibits gap junction permeability and increases glucose uptake in cultures rat astrocytes. *J Neurochem* 69: 721-8.
- LEITHE E, Cruciani V, Sanner T, Mikalsen SO, Rivedal E (2003): Recovery of gap junctional intercellular communication after phorbol ester treatment requires proteasomal degradation of protein kinase C. *Carcinogenesis* 24: 1239-45.
- LERNER RA (1997): A hypothesis about the endogenous analgue of general anesthesia. *Proc Natl Acad Sci* 94: 13375-7.
- LIVNY O, Kaplan I, Reifen R, Polak-Charcon S, Madar Z, Schwartz B (2002): Lycopene inhibits proliferation and enhances gap-junction communication of KB-1 human oral tumor cells. *J Nutr* 132: 3754-9.
- LÖFFLER G, Petrides PE (Hrsg.) (2003): *Biochemie und Pathobiochemie*, 7. völlig neu bearbeitete Auflage, Springer-Verlag, Berlin/ Heidelberg/ New York.
- LYONS NM, O'Brien NM (2002): Modulatory effects of an algal extract containing astaxanthin on UVA-irradiated cells in culture. *J Dermatol Sci* 30: 73-84.
- MARES-PERLMAN JA, Millen AE, Ficek TL, Hankinson SE (2002): The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview. *J Nutr* 132: 518S-524S.
- MATESIC DF, Rupp HL, Bonney WJ, Ruch RJ, Trosko JE (1994): Changes in gap-junction permeability, phosphorylation, and number mediated by phorbol ester and non-phorbol-ester tumor promoters in rat liver epithelial cells. *Mol Carcinog* 10: 226-36.
- MAYNE ST (1996): β -carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB J* 10: 690-701.
- MAYNE ST (2003): Antioxidant nutrients and chronic disease: Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr* 133: 933S-940S.
- MEHTA PP, Perez-Stable C, Nadji M, Mian M, Asotra K, Roos B (1999): Suppression of human prostate cancer cell growth by forced expression of connexin genes. *Dev Genet* 24: 91-110.

- NERA PHARMACEUTICAL, INC. (1999): Haematococcus pluvialis and astaxanthin consumption. Technical Report TR.3005.001.
- MIKI W (1991): Biological functions and activities of animal carotenoids. Pure & Appl Chem 63: 141-6.
- MILLER EC, Giovannucci E, Erdman JW Jr, Bahnson R, Schwartz SJ, Clinton SK (2002): Tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. Urol Clin North Am 29: 83-93.
- MILLS SL, Massey SC (1995): Differential properties of two gap junctional pathways made by AII amacrine cells. Nature 377 (6551): 676-7.
- MORENO AP (2005): Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to channel gating. Biochimica et Biophysica Acta 1711: 164-71.
- MORTENSEN A, Skibsted LH, Sampson J, Rice-Evans C, Everett SA (1997): Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. FEBS Lett 24; 418: 91-7.
- MORTENSEN A (2004): Carotenoids: an overview. Agro Food industry hi-tech 15: 32-33.
- MOZAFFARIEH M, Sacu S, Wedrich A (2003): The role of the carotenoids, lutein and zeaxanthin, in protecting against age-related macular degeneration: A review based on controversial evidence. Nutr J 2: 20.
- MUSIL LS, Cunninham BA, Edelman GM, Goodenough DA (1990): Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. J Cell Biol 111: 2077-88.
- MUSIL LS, Goodenough DA (1993): Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. Cell 74 (6): 1065-77.
- NAHUM A, Hirsch K, Danilenko M, Watts CK, Prall OW, Levy J, Sharoni Y (2001): Lycopene inhibition of cell cycle progression in breast and endometrial cancer cells is associated with reduction in cyclin D levels and retention of p27 (Kip1) in the cyclin E-cdk2 complexes. Oncogene 20: 3428-36.
- NAUS CC, Hearn S, Zhu D, Nicholson BJ, Shivers RR (1993): Ultrastructural analysis of gap junctions in C6 glioma transfected with connexin43 cDNA. Exp Cell Res 206 (1): 72-84.
- NKONDJOCK A, Ghadirian P, Johnson KC, Krewski D; Candian Cancer Registries Epidemiology Research Group (2005): Dietary intake of lycopene is associated with reduced pancreatic cancer risk. J Nutr 135 (3): 592-7.

- O'CONNOR I, O'Brien N (1998): Modulation of UVA light –induced oxidative stress by beta-carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. *J Dermatol Sci* 16:226-30.
- ODEBERG JM, Lignell A, Pettersson A, Höglund P (2003): Oral bioavailability of the antioxidant astaxanthin in humans is enhanced by incorporation of lipid based formulations. *Eur J Pharm Sci* 19: 299-304.
- OLMEDILLA B, Granado F, Southan S, Wright AJ, Blanco I, Gil-Martinez E, Berg H, Corridan B, Roussel AM, Chopra M, Thurnham D (2001): Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E and C in control subjects from five European countries. *British Journal of Nutrition* 85: 227-38.
- ONOGI N, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Fukutomi Y, Moriwaki H, Muto Y, Kojima S (1998): Antiproliferative effect of carotenoids on human colon cancer cells without conversion to retinoic acid. *Nutr Cancer* 32: 20-4.
- ØSTERLIE M, Bjerkeng B, Liaaen-Jensen S (1999a): On bioavailability and deposition of bent Z-isomers of astaxanthin. Proceedings of the First International Congress on Pigments in Food Technology, Sevilla, Spain, 24-26 March 1999, S.157-161.
- ØSTERLIE M, Bjerkeng B, Liaaen-Jensen S (1999b): Blood appearance and distribution of astaxanthin E/Z isomers among plasma lipoproteins in humans administered a single meal with astaxanthin. Abstract 2A-13. Abstracts of the Twelfth International Carotenoid Symposium, Cairns, Australia, 18-23 July 1999, S. 72.
- OVIEDO-ORTA E, Evans WH (2004): Gap junctions and connexon-mediated communication in the immune system. *Biochim Biophys Acta* 1662: 102-12.
- PETERSEN L (2001): Molekulargenetische Diagnostik von Connexin 26 bei genetisch bedingter, nicht-syndromaler, sensorineuraler Schwerhörigkeit. Inaugural-dissertation, Fachbereich Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg.
- PROVOST N, Moreau M, Leturque A, Nizard C (2003): Ultraviolet A radiation transiently disrupts gap junctional communication in human keratinocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C51-C59.
- PUNG A, Franke A, Zhang LX, Ippendorf H, Martin HD, Sies H, Bertram JS (1993): A synthetic C22 carotenoid inhibits carcinogen-induced neoplastic transformation and enhances gap junctional communication. *Carcinogenesis* 14 (5): 1001-5.
- RAHMAN S, Carlile G, Evans WH (1993): Assembly of hepatic gap junctions. Topography and distribution of connexin32 in intracellular and plasma membranes determined using sequence-specific antibodies. *J Biol Chem* 268 (2): 1260-5.
- RIVEDAL E, Opsahl H (2001): Role of PKC and MAP kinase in EGF- and TPA-induced connexin43 phosphorylation and inhibition of gap junction intercellular communication in rat liver epithelial cells. *Carcinogenesis* 22: 1543-50.

- RIVEDAL E, Leithe E (2005): Connexin43 synthesis, phosphorylation, and degradation in regulation of transient inhibition of gap junction intercellular communication by the phorbol ester TPA in rat liver epithelial cells. *Exp Cell Res* 302: 143-52.
- ROCK CL, Kusluski RA, Galvez MM, Ethier SP (1995): Carotenoids induce morphological changes in human mammary epithelial cell cultures. *Nutr Cancer* 23: 319-33.
- RUCH RJ, Trosko JE, Madhukar BV (2001): Inhibition of connexin43 gap junctional intercellular communication by TPA requires ERK activation. *J Cell Biochem* 83: 163-9.
- SAEZ, JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC (2003): Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83: 1359-1400.
- SCHALCH W (1992): Carotenoids in the retina – a review of their possible role in preventing or limiting damage caused by light and oxygen. *EXS* 62:280-98.
- SCHMIDT E (2004): 1.1. Die Medizin der „richtigen Moleküle“, 1.1.5. Studien. In: Leitfaden Mikronährstoffe – Orthomolekulare Prävention und Therapie. Schmidt E, Schmidt N, Elsevier Urban & Fischer Verlag, München, 2004, S.11f.
- SEVERS NJ, Coppon SR, Dupont E, Yeh HI, Ko YS, Matsushita T (2004): Gap junction alterations in human cardiac disease. *Cardiovasc Res* 62: 368-77.
- SIES H, Stahl W (2004 a): Carotenoids and UV-protection. *Photochem Photobiol Sci* 3: 749-752.
- SIES H, Stahl W (2004 b): Nutritional protection against skin damage from sunlight. *Annu Rev Nutr* 24: 173-200.
- SIPE JC, Moore RY (1976): Astrocytic gap junctions in the rat lateral hypothalamic area. *Anat Rec* 185: 247-51.
- SLOPER JJ, Powell TP (1978): Gap junctions between dendrites and somata of neurons in the primate sensori-motor cortex. *Proc R Soc Lond Biol Sci* 203: 39-47.
- SÖHL G, Willecke K (2004): Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62: 228-232.
- SOLAN JL, Lampe PD (2005): Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochim Biophys Acta* 1711: 154-63.
- SOWELL AL, Huff DL, Yeager PR, Caudill SP, Gunter EW (1994): Retinol, alpha-tocopherol, lutein/zeaxanthin, beta-cryptoxanthin, lycopene, alpha-carotene, trans-beta-carotene, and four retinyl esters in serum determined simultaneously by reversed-phase HPLC with multiwavelength detection. *Clin Chem* 40: 411-6.

- SPORN MB, Roberts AB, Goodman DS (1994): The Retinoids – Biology, Chemistry, and Medicine. 2. Auflage, Raven Press, New York.
- STAHL W, Nicolai S, Briviba K, Hanusch M, Broszeit G, Peters M, Martin H-D, Sies H (1997): Biological activities of natural and synthetic carotenoids: induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching. *Carcinogenesis* 18: 89-92.
- STAHL W, Sies H (1998): The role of carotenoids and retinoids in gap junctional communication. *Int J Vitam Nutr Res* 68: 354-9.
- STAHL W, Heinrich U, Jungmann H, Sies H, Tronnier H (2000): Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *Am J Clin Nutr* 71: 795-8.
- STAHL W, Heinrich U, Wiseman S, Eichler O, Sies H, Tronnier H (2001): Dietary tomato paste protects against ultraviolet light-induced erythema in humans. *J Nutr* 131: 1449-51.
- STAHL W, Ale-Agha N, Polidori MC (2002): Non-antioxidant properties of carotenoids. *Biol Chem* 383: 553-8.
- STAHL W, Sies H (2003): Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med* 24: 345-51.
- STAHL W, Sies H (2005): Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta* 1740: 101-7.
- STAUFFER KA (1995): The gap junction proteins beta 1-connexin (connexin-32) and beta 2-connexin (connexin-26) can form heteromeric hemichannels. *J Biol Chem* 270: 6768-72.
- STOUT C, Goodenough DA, Paul DL (2004): Connexins: functions without junctions. *Curr Opin Cell Biol* 16: 507-12.
- STRAUB O, PFANDER H (Hrsg.), Gerspacher M, Rychener M, Schwabe R (1987): Key to Carotenoids, 2. erweiterte und überarbeitete Auflage, Birkhäuser Verlag, Basel/Boston/ Stuttgart.
- STUHLMANN D (2004): Modulation Gap Junction vermittelter Zell-Zell-Kommunikation durch parakrin wirkenden transformierenden Wachstumsfaktor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$): Rolle in der Tumor-Stroma-Interaktion. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- TANAKA T, Morishita Y, Suzui M, Kojima T, Okumura A, Mori H (1994): Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. *Carcinogenesis* 15: 15-9.
- TANMAHASAMUT P, Sidell N (2005): Up-regulation of gap junctional intercellular communication and connexin43 expression by retinoic acid in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 4151-6.

- TEICHER VB, Kucharski N, Martin HD, van der Saag P, Sies H, Stahl W (1999): Biological activities of apo-canthaxanthinoic acids related to gap junctional communication. *Arch Biochem Biophys* 365: 150-5.
- TIBADUIZA EC, Fleet JC, Russell RM, Krinsky NI (2002): Excentric cleavage products of beta-carotene inhibit estrogen receptor positive and negative breast tumor cell growth in vitro and inhibit activator protein-1-mediated transcriptional activation.
- TRAUB O, Look J, Paul D, Willecke K (1987): Cyclic adenosine monophosphate stimulates biosynthesis and phosphorylation of the 26 kDa gap junction protein in cultured mouse hepatocytes. *Eur J Cell Biol* 43: 48-54.
- TRAUB O, Look J, Dermietzel R, Brummer F, Hulser D, Willecke K (1989): Comparative characterization of the 21-kDa and 26-kDa gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes. *J Cell Biol* 108: 1039-52.
- TROSKO JE, Chang CC (2001): Mechanism of up-regulated junctional intercellular communication during chemoprevention and chemotherapy of cancer. *Mutat Res* 480-481: 219-229.
- TROSKO JE, Ruch RJ (2002): Gap junctions as target for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Curr Drug Targets* 3 (6): 465-82.
- TSAO MS, Smith JD, Nelson KG, Grisham JW (1984): A diploid epithelial cell line from normal adult rat liver with phenotypic properties of 'oval' cells. *Exp Cell Res* 154: 38-52.
- VIKHAMAR G, Rivedal E, Mollerup S, Sanner T (1998): Role of Cx43 phosphorylation and MAP kinase activation in EGF induced enhancement of cell communication in human kidney epithelial cells. *Cell Adhes Commun* 5: 451-60.
- VINE AL, Bertram JS (2002): Cancer chemoprevention by connexins. *Cancer Metastasis Rev* 21: 199-216.
- VINE AL, Leung YM, Bertram JS (2005): Transcriptional regulation of connexin 43 expression by retinoids and carotenoids: similarities and differences. *Mol Carcinog* 43: 75-85.
- WANG XD, Liu C, Bronson RT, Smith DE, Krinsky NI, Russell M (1999): Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst* 91: 60-6.
- WARN-CRAMER BJ, Lampe PD, Kurata WE, Kanemitsu MY, Loo LW, Eckhart W, Lau AF (1996): Characterization of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on the connexin-43 gap junction protein. *J Biol Chem* 271: 3779-86.

- WARN-CRAMER BJ, Cottrell GT, Burt JM, Lau AF (1998): Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273: 9188-96.
- WEESIE RJ, Verel R, Jansen FJHM, Britton G, Lugtenburg J, de Groot HJM (1997): The mechanism of the colour shift of astaxanthin in α -crustacyanin as investigated by ^{13}C MAS NMR and specific isotope enrichment. *Pure & Appl Chem* 69: 2085-90.
- WEI CJ, Xu X, Lo CW (2004): Connexins and cell signaling in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 811-38.
- WEIDMANN S (1952): The electrical constants of Purkinje fibres. *J Physiol* 118: 348-60 .
- WERNER R, Levine E, Rabadan-Diehl C, Dahl G (1989): Formation of hybrid cell-cell channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5380-4.
- WERTZ K, Buchwald Hunziker P, Seifert N, Riss G, Neeb M, Steiner G, Hunziker W, Goralczyk R (2005): β -Carotene interferes with ultraviolet light A-induced gene expression by multiple pathways. *J Invest Dermatol* 124: 428-34.
- WHITE TW, Sellitto C, Paul DL, Goodenough DA (2001): Prenatal development in connexin43 and connexin50 double knockout mice. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 42: 2916-23.
- WONG CW, Christen T, Kwak BR (2004): Connexins in leukocytes: shuttling messages? *Cardiovasc Res* 62: 357-67.
- WU K, Erdman (Jr.) JW, Schwartz SJ, Platz EA, Leitzmann M, Clinton S, DeGroot V, Willett WC, Giovannucci E (2004): Plasma and dietary carotenoids, and the risk of prostate cancer: a nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13: 260-9.
- XIE W, Evans RM (2001): Orphan nuclear receptors: the exotics of xenobiotics. *J Biol Chem* 276: 37739-42.
- YEH SL, Hu M-L (2003): Oxidized β -carotene inhibits gap junction intercellular communication in the human lung adenocarcinoma cell line A549. *Food Chem Toxicol* 41: 1677-84.
- YOKOYAMA A, Izumida H, Miki W (1994): Production of astaxanthin and 4-ketozeaxanthin by the marine bacterium, *Agrobacterium aurantiacum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 58: 1842-4.
- YOUSRY NMA (2000): Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J Agric Food Chem* 48: 1150-4.

- ZHANG LX, Cooney RV, Bertram JS (1991): Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis* 12 (11): 2109-14.
- ZHANG LX, Cooney RV, Bertram JS (1992): Carotenoids up-regulate connexin43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Res* 52: 5707-12.
- ZHANG LX, Acevedo P, Guo H, Bertram JS (1995): Upregulation of gap junctional communication and connexin43 gene expression by carotenoids in human dermal fibroblasts but not in human keratinocytes. *Mol Carcinog* 12: 50-8.
- ZHANG M, Thorgeirsson SS (1994): Modulation of connexins during differentiation of oval cells into hepatocytes. *Exp Cell Res* 213: 37-42.
- ZHANG X, Ren Z, Zuo J, Su C, Wang R, Chang Y, Fang F (2002): The effect of all-trans retinoic acid on gap junctional intercellular communication and connexin 43 gene expression in glioma cells. *Chin Med Sci J* 17: 22-6.
- ZHOU L, Kaspersek EM, Nicholson BJ (1999): Dissection of the molecular basis of pp60v-src induced gating of connexin 43 gap junction channels. *J Cell Biol* 144: 1033-45.
- ZHOU Y, Mi MT, Zhu JD, Zhang QY (2003): Effects of lovastatin on proliferation and gap junctional intercellular communication of human breast cancer cell MCF-7. *Ai Zheng* 22: 257-61.

Internet-Adressen:

- http://www.cellsignal.com/category.asp?catalog_name=CellSignal&category_name=MAPK+Signaling
- <http://www.krebsinformation.de/Krebsarten/hautkrebs.html>
- <http://www.prn2.usm.my/mainsite/plant/croton.html>
- <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/ALDRICH/291218>
- <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SUPELCO/49042>
- http://www.kaikracht.de/cmt/text_cr1.htm
- <http://www.crg.es/deafness>
- <http://www.emedicine.com/emerg/topic872.htm>
- <http://www.zusatzstoffe-online.de/html/zusatz.php?nr=161g>
- <http://www.charlestonseafood.com/images/Amazon/Lobster-500.jpg> (15.08.05)
- <http://www.rienow-fisch.de/kundenbilder/frischfisch-lachssammlung2.jpg> (15.08.05)
- http://www.gifte.de/Giftpflanzen/adonis_annua_bild01.htm (15.08.05)

http://www.gifte.de/Giftpflanzen/adonis_annua_bild01.htm (15.08.05)

<http://www.rienow-fisch.de/kundenbilder/frischfisch-lachssammlung2.jpg> (15.08.05)

<http://www.astaxanthin.org/astax-foods.htm>

<http://www.unifr.ch/histologie/elearningfree/allemand/epithel/epithel05.html>

<http://www.pubmed.de/data/nlm.link.html>

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wilhelm Stahl für die Vergabe dieses sehr interessanten Themas, seine Anregungen, sein Vertrauen in mich, seine Geduld und die wissenschaftliche Betreuung während der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. Helmut Sies für Anregungen und die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu dürfen.

Prof. Dr. Hans-Dieter Martin (Institut für Organische und Makromolekulare Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) danke ich sehr für die Übernahme des Koreferates.

PD Dr. Peter Brenneisen und PD Dr. Lars-Oliver Klotz danke ich für die Bereitstellung von Arbeitsmaterialien und fachliche Beratung. Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Dominik Stuhlmann für die Einführung in molekularbiologische Methoden, konstruktive Gespräche und seine ständige Hilfsbereitschaft.

Danken möchte ich außerdem Dr. Niloofar Ale-Agha für die Einführung in die Zellkultur, Immunostaining- und Mikroinjektionstechnik, Heide Krahl für die Einführung in die Carotinoidanalytik und Dr. Emanuela Camera sowie Dr. Kotb Abdelmohsen für die konstruktive Zusammenarbeit.

Darüberhinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern bzw. ehemaligen Mitgliedern des Instituts für ein ausgezeichnetes Arbeitsklima und zahlreiche Hilfestellungen, insbesondere bei PD Dr. M Cristina Polidori, Dr. Alejandro Betancor, Dr. Olivier Aust, Juan-Carlos Carrillo, Silke De Spirt, Dr. Holger Steinbrenner, Peter Graf und Andrea Borchardt bedanken. Ein herzliches Dankeschön geht auch an Marlies Scholtes für ihre herzliche, freundliche und hilfsbereite Art und der kompetenten Unterstützung in administrativen u.ä. Fragen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, bei der Familie meines Freundes und bei meinen Freunden bedanken, die mich immer unterstützt und aufgemuntert haben.

Den größten Dank schulde ich jedoch meinem Freund Michael, der immer für mich da war und auch in schwierigen Phasen der Promotion so manche Laune verständnisvoll ertragen hat.

Eidesstattliche Erklärung

An Eidesstatt erkläre ich, daß

- ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und daß ich diese in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch keiner anderen Fakultät eingereicht habe;
- die Dissertation noch nicht veröffentlicht wurde (Veröffentlichungen nach § 4 (3) der Promotionsordnung bleiben hiervon ausgenommen).

Wuppertal, den 08.12.2005

.....
Felicitas Daubrawa