

**Molekularbiologische und physiologische
Untersuchung von Connexin-Halbkanälen in
Atemwegsepithelzellen nach
Adenosinrezeptorstimulierung**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Anne Dierks, geb. Klett, M. Sc.

2023

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Anaclet Ngezahayo

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Claus

Tag der Promotion: 10.08.2023

Zusammenfassung

Sowohl die Freisetzung von Adenosin als auch die Aktivität von Connexin-Halbkanälen werden mit pathologischen Ereignissen in der Lunge, wie Entzündungen, in Verbindung gebracht. Die humane Calu-3-Zelllinie wurde als Modell für das Epithel der Atemwege verwendet, um das Zusammenspiel zwischen Connexin-Halbkanälen und Adenosinrezeptorsignalwegen in Epithelzellen der Atemwege zu untersuchen. Die Genexpression von Connexin-Isoformen auf mRNA- und Proteinebene wurde mittels quantitativer real time PCR, Western Blotting und Immunfärbetechniken analysiert. Der Beitrag spezifischer Connexin-Isoformen zur Bildung von Halbkanälen wurde durch short interfering RNA-vermittelte Connexin-spezifische Knockdowns und anschließende Farbstoffaufnahmeexperimente bestimmt. 5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin (NECA) ein Adenosinrezeptor-Agonist, sowie pharmakologische Inhibitoren spezifischer Adenosinrezeptor-Subtypen und intrazellulärer Adenosinrezeptor-Signalmoleküle, wurden verwendet, um die Rolle des Adenosinrezeptorsignalweges zur Regulierung der Connexin-Halbkanalaktivität zu klären. NECA steigerte die Connexin 26-Halbkanalaktivität in Calu-3-Zellen über die Stimulierung des A_{2B} Adenosinrezeptor. Diese Hochregulierung erfolgte durch die Aktivierung der Proteinkinase A und des Transkriptionsfaktors spezifisches Protein 1, was zu einer erhöhten Proteinproduktion von Connexin 26 führte. Zudem wurden zwei neue polyphenolische Verbindungen, CVB2-61 und CVB4-57, als Connexin-Halbkanalblocker getestet. Beide Verbindungen blockierten die Farbstoffaufnahme in Neuro2a-Zellen, die humanes Connexin 26 oder Connexin 46 exprimierten. Dass CVB2-61 und CVB4-57 die Farbstoffaufnahme in Connexin 26-exprimierenden Zellen bei einer Konzentration von 5 µM hemmten, während bei Zellen, die Connexin 46 exprimieren, 20 µM hemmten, ließ auf eine Spezifität für Connexin 26-Halbkanäle schließen. CVB2-61 oder CVB4-57 in einer Konzentration von 5 µM unterdrückten die Farbstoffaufnahme in NECA-behandelten Calu-3-Zellen. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Farbstoffaufnahme und ihre Verstärkung durch den Adenosinrezeptorsignalweg in Calu-3-Zellen auf Connexin 26 zurückzuführen ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der A_{2B} Adenosinrezeptor die Connexin 26-Halbkanalaktivität verstärkt und dass die neuen polyphenolischen Connexin-Halbkanalblocker CVB2-61 und CVB4-57 diesen Effekt unterdrücken können, was auf einen möglichen therapeutischen Nutzen der Verbindungen für Connexin 26-Halbkanalabhängige Pathologien hindeutet.

Schlagwörter: Connexin-Halbkanal, Adenosinrezeptor, Farbstoffaufnahme, Atemwegsepithel, Connexin Halbkanal Blocker

Abstract

Both adenosine release and connexin hemichannel activity are associated with pathological events in the lung like inflammation. We used the human Calu-3 cell line as model for the airway epithelium to study the interplay between connexin hemichannels and adenosine receptor signalling in airway epithelial cells. mRNA and protein expression of connexin isoforms were analysed using quantitative real time PCR and Western blotting as well as immunostaining techniques. The contribution of specific connexin isoforms to hemichannel formation was determined by small interfering RNA-mediated connexin-specific knockdown and subsequent dye uptake experiments. 5'-*N*-Ethylcarboxamidoadenosine (NECA) as adenosine receptor agonist as well as pharmacological inhibitors of specific adenosine receptor subtypes and adenosine receptor intracellular signalling molecules were used to elucidate the role of adenosine receptor signalling for the regulation of connexin hemichannel activity. NECA increased connexin 26 hemichannel activity in Calu-3 cells via adenosine receptor subtype A_{2B}. The response was due to activation of protein kinase A and transcription factor specific protein 1, resulting in an increased protein production of connexin 26. Further, two new phenolic compounds, CVB2-61 and CVB4-57, were tested as connexin hemichannel blocker. Both compounds blocked dye uptake in Neuro2a cells expressing human connexin 26 or connexin 46. The finding that CVB2-61 and CVB4-57 inhibited the dye uptake in connexin 26 expressing cells at concentrations as low as 5 μ M, while 20 μ M was needed for cells expressing connexin 46 suggest a specificity for connexin 26 hemichannels. CVB2-61 or CVB4-57 at 5 μ M suppressed the dye uptake in NECA-treated Calu-3 cells. The results seem to confirm that the dye uptake and its enhancement by the adenosine receptor signalling in Calu-3 cells were due to connexin 26. This work demonstrated that the adenosine receptor A_{2B} enhances connexin 26 hemichannel activity and that the new polyphenolic connexin hemichannel blockers CVB2-61 and CVB4-57 can prevent this effect, suggesting a possible therapeutic benefit of the compounds for connexin 26 hemichannel dependent pathologies.

Keywords: Connexin hemichannel, adenosine receptor, dye uptake, airway epithelium, connexin hemichannel blocker

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Einleitung	7
1.1 Connexin-Halbkanäle und Gap Junctions.....	7
1.1.1 Connexine im Atemwegsepithel	9
1.1.2 Mechanismen zur Regulierung der Connexinexpression.....	11
1.2 Adenosinrezeptorsignalwege in der Lunge.....	13
1.3 Connexin-Halbkanalinhibitoren als potentielle Therapeutika	15
1.4 Zielsetzung.....	17
2 Adenosinrezeptorstimulation erhöht die Aktivität von Connexin-Halbkanälen in Epithelzellen der Atemwege	19
3 Die bioaktiven phenolischen Wirkstoffe Diarylether CVB2-61 und Diarylheptanoid CVB4-57 als Connexin-Halbkanalblocker.....	37
4 Diskussion und Ausblick.....	55
4.1 Durch welche Mechanismen können Adenosinrezeptorsignalwege die Aktivität der Connexin 26-Halbkanäle erhöhen?.....	55
4.2 Die (patho)physiologische Bedeutung der A _{2B} Adenosinrezeptor-induzierten Steigerung der Connexin 26-Halbkanalaktivität.....	58
4.3 Inhibierung von Connexin-Halbkanälen.....	64
4.4 Fazit	70
Literaturverzeichnis	73
Danksagung	86
Curriculum Vitae	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von Connexin (Cx), Connexon und Gap Junction.9

Abbildung 2: Schema der Zelltypen entlang des Lungenbaumes. 11

Abbildung 3: Adenosinstoffwechsel und -signalweg. 14

Abbildung 4: Postulierte Adenosin-Signalkaskade in Calu3-Zellen. 63

Abbildung 5: Farbstoffaufnahmeexperimente in transfizierten Neuro2a-Zellen, mit der humanen Cx46N188T-Mutante (Schadzek et al. 2016). 69

Abbildung 6: Schema eines Kreislaufs der sterilen Entzündung mit den Akteuren Adenosintriphosphat (ATP), Adenosin, A_{2B} Adenosinrezeptor und den ATP-freisetzenden Connexin26 (Cx)-Halbkanälen. 71

Abkürzungsverzeichnis

2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
AC	Adenylylcyase
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Calciumionen
Calu-3	humane Lungenkrebszelllinie
CD	<i>clusters of differentiation</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
COPD	chronisch obstruktiven Lungenerkrankung
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
Cx	Connexin
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GA	18 β -Glycyrrhetinsäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein
<i>GJ</i>	Gap Junction-Gen
G-protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
N2a	Neuro2a, murine Neuroblastom-Zelllinie
NECA	5'- <i>N</i> -Ethylcarboxamidoadenosin
NF- κ B	nuklearer Faktor <i>kappa-light-chain-enhancer</i> aktivierter B-Zellen
PAMPs	pathogen assoziierte molekulare Muster
PCLS	humanen Lungenschnitte, <i>precision cut lung slices</i>
PKA	Proteinkinase A
qPCR	quantitative <i>real time</i> Polymerasekettenreaktion
siRNA	<i>short interfering</i> Ribonukleinsäure
Sp1	spezifisches Protein 1
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
ZO-1	<i>Zonula occludens</i> 1

1 Einleitung

1.1 Connexin-Halbkanäle und Gap Junctions

Connexin (Cx)-Halbkanäle, auch Connexon genannt, sind Membrankanäle, die in verschiedenen Zellen vorkommen. Sie bilden eine gröÙenselektive Pore, die Metaboliten und Ionen, die kleiner als 1,5 kDa sind, passieren können (Nielsen et al. 2012). Cx-Halbkanäle in der Zellmembran bieten so eine Möglichkeit des Stoffaustausches zwischen dem intrazellulären und dem extrazellulären Raum (Esseltine und Laird 2016). Cx-Halbkanäle können miteinander verbunden werden, um Gap Junctions zwischen zwei benachbarten Zellen zu bilden (Abbildung 1), was die interzelluläre Kommunikation ermöglicht (Goodenough und Paul 2009; Maeda und Tsukihara 2011; Sáez et al. 2005). Dies lässt eine Synchronisation des Gewebes zu, wie zum Beispiel bei der synchronen Kontraktion von Herzmuskelzellen (Oviedo-Orta und Howard Evans 2004; Orellana et al. 2012b). Cx-Kanäle können geöffnet oder geschlossen vorliegen, die Gatingmechanismen der Cx-Kanäle sind unter anderem von der extrazellulären und intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig (Contreras et al. 2003; Sáez et al. 2005). Die Öffnung von Cx-Halbkanälen in der Membran erfolgt meist vorübergehend für einen Austausch zwischen dem Zytosol und dem extrazellulären Raum (Goodenough und Paul 2003), was z. B. durch die Freisetzung von intrazellulärem Adenosintriphosphat (ATP) als Reaktion auf eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erfasst wurde (Anselmi et al. 2008; Kreda et al. 2007; Contreras et al. 2003; Lopez et al. 2016; Sáez et al. 2005). Wie wichtig die Cx-Kanäle für die Zellphysiologie sind, zeigen verschiedenen Krankheiten, die bei Cx-Mutanten mit veränderter Cx-Kanalfunktion auftreten (Rabionet et al. 2002; Pfenniger et al. 2011).

Cx-Halbkanäle und Gap-Junctions werden von Cx-Proteinen gebildet. Es sind 21 verschiedene humane Cx-Isoformen bekannt (Söhl und Willecke 2004). Die verschiedenen Cx-Proteine werden mit der Abkürzung Cx bezeichnet, gefolgt von einem Suffix, das die Molekularmasse des Polypeptids in kDa angibt (Beyer et al. 1987). Die empfohlene Nomenklatur für die Cx-Gene beginnt mit *GJ* (*gap junction*), gefolgt von einem Buchstaben der Untergruppe *A*, *B*, *C*, *D* und einer Zahl, die die Reihenfolge der Entdeckung angibt. Zum Beispiel war das Gen für Cx43 das erste identifizierte Cx-Gen der *A*-Gruppe und wird daher als *GJA1* bezeichnet. Die Untergruppenzugehörigkeit (*A-D*) basiert auf den allgemeinen Sequenzhomologien und

der Länge der zytoplasmatischen Schleife des Membranproteins (Beyer und Bertoud 2009). Cx-Proteine werden in fast allen Zelltypen mit Ausnahme von differenzierten Skelettmuskelzellen, Erythrozyten und reifen Spermatozoiden exprimiert (Nielsen et al. 2012). Einige Cx-Isoformen, wie Cx36 in den Neuronen, werden nur von wenigen spezialisierten Zelltypen exprimiert, während andere, wie Cx43, ubiquitär in fast allen Geweben vorkommen (Willecke et al. 2002; Laird 2006). Cx sind membranständige Proteine mit zwei konservierten extrazellulären Schleifen, einer intrazellulären Schleife und zytoplasmatischen N-Terminus und C-Terminus (Nielsen et al. 2012; Maeda und Tsukihara 2011; Maeda et al. 2009) (Abbildung 1). Wie andere klassische integrale Membranproteine werden Cx im endoplasmatischen Retikulum (ER) kotranslational synthetisiert (Laird 2006), mit einer möglichen Ausnahme für Cx26. Zhang et al. (1996) zeigten, dass Cx26 sowohl post- als auch kotranslational in die ER-Mikrosomenmembranen importiert werden kann, und Ahmad und Evans (2002) zeigten in *in vitro*-Experimenten einen möglichen direkten Import in die Plasmamembran. Diese Ergebnisse konnten jedoch an keiner Membran *in vivo* bestätigt werden. Die Oligomerisierung von Cx findet entweder im ER statt (Laird 2006) oder im *trans*-Golgi-Netzwerk, abhängig von der Isoform (Musil und Goodenough 1993; Koval et al. 1997). Es gilt die Annahme, dass der Transport von Cx zur Zelloberfläche nach dem ER-Austritt durch das ER-Golgi-Intermediate-Kompartiment zum *cis*-Golgi-Netzwerk erfolgt (Laird 2006), mit Ausnahme von Cx26 (Evans et al. 1999). Zur direkten Untersuchung und zum Vergleich der naszierenden und stationären Freisetzung von Cx43 und Cx26 zur Plasmamembran und Biogenese von Cx-Kanälen nutzten Thomas et al. (2005) Cx43 und Cx26 markiert mit fluoreszierenden Proteinen die in Brustkrebs- und Rattennierenzellen exprimiert wurden. Es zeigte sich, dass sowohl Cx26 als auch Cx43 vor dem Transport zur Zelloberfläche durch den Golgi-Apparat geleitet werden. Interessanterweise war Cx26 innerhalb der Plasmamembran mobiler als Cx43, was auf Unterschiede bei der Bindung an Proteingerüste zurückzuführen sein könnte (Thomas et al. 2005). Die Gerüstproteine binden meist an Motive im C-Terminus der Cx. Es ist möglich, dass der extrem kurze C-Terminus von Cx26 den Gerüstproteinen nicht genügend Bindungsmotive bietet. Mehrere assoziierte Gerüstproteine verankern die Cx in Plaques in der Zellmembran, meist über zytoskelettale Filamente (Lauf et al. 2002). Das Tight Junction-assoziierte Protein *Zonula Occludens* (ZO) 1 beispielsweise verankert Cx43 an Aktinfilamente und ist an der Bildung von Gap Junctions und dem Abbau von Cx beteiligt (Rhett et al. 2011). Die Halbwertszeiten von Cx scheinen von der Isoform und dem zugrundeliegendem Gewebe abzuhängen, werden aber meist für Cx26, Cx32, Cx43 und Cx45 zwischen 1-5 h beschrieben (Laird 2005; Hervé et al. 2007). Der Abbau erfolgt so-

wohl durch das Proteasom als auch durch das Lysosom und wird durch Ubiquitinierung und Phosphorylierung reguliert (Laird 2006). Es wird weiterhin beschrieben, dass Gap Junctions als komplette Gap Junction aus benachbarten Zellen in sogenannten Annular Junctions internalisiert werden (Falk et al. 2016).

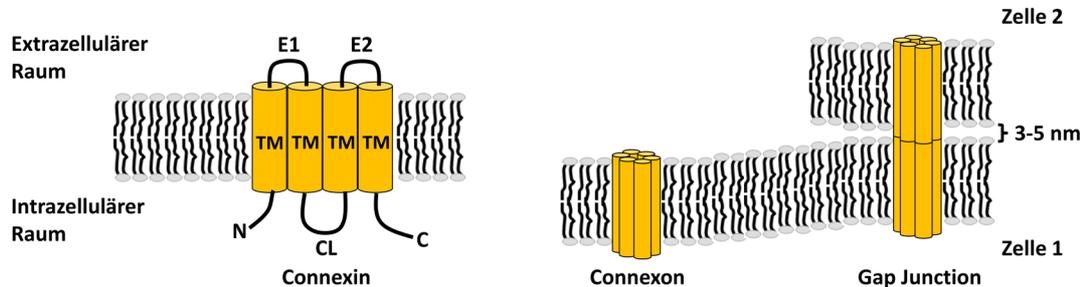


Abbildung 1: Schematische Darstellung von Connexin (Cx), Connexon und Gap Junction. Cx-Proteine bestehen aus vier Transmembrandomänen (TM), zwei extrazellulären Schleifen (E), einer zyttoplasmatischen Schleife (CL) sowie N-Terminus und C-Terminus im intrazellulären Raum. Sechs Cx bilden ein Connexon, zwei Connexone benachbarter Zellen bilden eine Gap Junction.

1.1.1 Connexine im Atemwegsepithel

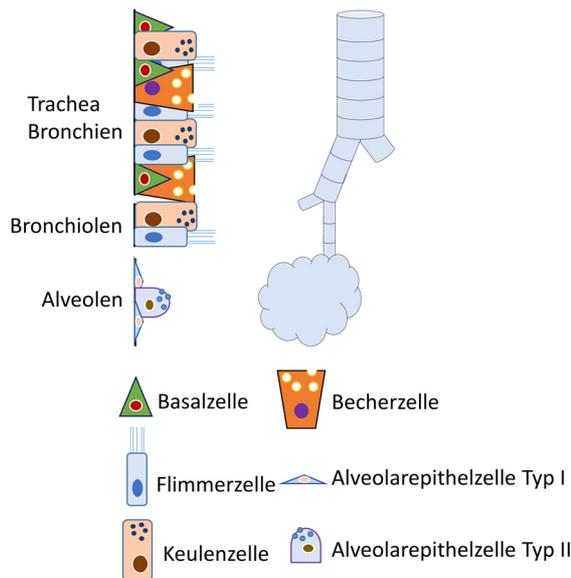
Das Epithel der Atemwege bildet die erste Abwehrlinie, die die Lunge vor Umwelteinflüssen schützt und damit die Aufrechterhaltung der Lungenhomöostase ermöglicht. Zu diesem Zweck exprimieren die Epithelzellen der Atemwege Tight Junction-Proteine wie Claudine und Adapterproteine wie ZO, um eine starke Zellbarriere, die Tight Junctions, zu bilden (Foster et al. 2000; Stanke et al. 2021). Die Barrierefunktion kontrolliert den parazellulären Fluss und ermöglicht einen geregelten Durchgang von Substanzen zwischen dem luminalen und dem abluminalen Lungenraum. Claudine sind Membranproteine, die über Adapterproteine wie ZO mit dem Zytoskelett verbunden sind (Umeda et al. 2006). Es gibt 26 menschliche Claudin-Isoformen, die zell- und gewebespezifisch exprimiert werden, was zu einer gewebespezifischen Barrierefunktion führt (Krause et al. 2015). Im Lungenepithel werden Claudin-3, Claudin-4 und Claudin-7 exprimiert (Schlingmann et al. 2015).

Was die Expression von Cx-Isoformen im Atemwegsepithel betrifft, so wurden Cx26, Cx30, Cx31 und Cx43 in Primärkulturen und Gewebe nachgewiesen (Losa et al. 2011). Bisherige Untersuchungen konnten verschiedene Cx-Isoformen den spezifischen Lungenzelltypen zuordnen (Losa und Chanson 2015) (Abbildung 2). Die Lunge kann in Luftröhre, Bronchien, Bronchiolen und Alveolen unterteilt werden. Die assoziierten Zellen, die das Epithel bilden, sind für jeden Abschnitt spezifisch.

Die Expression von Cx32 wurde im bronchiolären Epithel nachgewiesen (Losa et al. 2011). Die Luftröhre und weitestgehend die Bronchien sind mit differenzierten Becher- und Keulenzellen als sekretorische Zellen ausgekleidet, sowie mit Basalzellen, die durch Teilung und Differenzierung dem Ersatz von alten oder beschädigten Zellen dienen (Abbildung 2). Die Sekretion von Muzin durch Becher- und Keulenzellen ist eine der wichtigsten Schutzfunktionen des Lungenepithels, da es Mikroben und Partikel einfängt (Ridley und Thornton 2018). In der Luftröhre, den Bronchien und den Bronchiolen befinden sich Flimmerzellen (Abbildung 2). Entlang der Atemwege gewährleisten diese den Transport von Sekret durch koordinierte metachronale Ziliartätigkeit (Wang et al. 2010). Es wurde gezeigt, dass die Basalzellen Cx30 und Cx31 exprimieren und Gap Junctions mit Flimmerzellen ausbilden, die aus Cx30 bestehen (Losa und Chanson 2015). Die Becherzellen exprimieren Cx26, Cx30, Cx32 und Cx43 (Losa und Chanson 2015). Alveolen sind mit zwei Arten von Epithelzellen ausgekleidet, Typ I und Typ II, wobei Typ I die Blut-Luft-Schranke bildet und Typ II sowohl oberflächenaktive Substanzen sezerniert als auch als Zellersatz durch Differenzierung für den Typ I fungiert (Abbildung 2). Die Alveolarepithelzellen vom Typ I exprimieren Cx43 und Cx46, während die Alveolarepithelzellen vom Typ II Cx43 und Cx32 exprimieren (Losa und Chanson 2015).

Neben ihrer Barrierefunktion entsprechen die Epithelzellen der Atemwege, insbesondere die Becherzellen, den submukösen Drüsen der Lunge und sind eine wichtige Quelle der oberflächenaktiven Substanzen der Atemwege, die sich aus Muzinen und immunologischen Bestandteilen zusammensetzen (Losa und Chanson 2015). Diese Eigenschaften ermöglichen eine chemische Abwehr gegen Eindringlinge und die Rekrutierung von Immunzellen. Eine akute Entzündungsreaktion entwickelt sich bei Lungenverletzungen durch Infektionen, Lungenentzündungen, Traumata und Hyperoxie (Ware und Matthay 2000), die durch eine massive Infiltration von Immunzellen in die Lunge gekennzeichnet sind. Die Lunge ist ein mechanisch aktives System, das der äußeren Umgebung ausgesetzt ist und besonders empfindlich auf Verletzungen und Entzündungen reagiert. In Studien wurden intra- und extrazelluläre Kommunikationswege identifiziert, die eine ordnungsgemäße Lungenfunktion als Reaktion auf Verletzungen und Krankheiten fördern (Losa et al. 2011). Cx-Kanäle, übernehmen hier mehrere zentrale Rollen bei der Förderung einer regulierten Entzündungsreaktion und der Erleichterung der Lungenreparatur (Losa et al. 2011). Verschiedene Pathologien können die normalen Kommunikationswege, die für eine ordnungsgemäße Lungenfunktion erforderlich sind, stören, darunter akute Lungenverletzungen, Asthma, zystische Fibrose, Lungenfibrose und Krebs (Losa et al. 2011). Die Rolle der Cx bei der Ausbreitung infektiöser Signale scheint von Bedeutung zu sein, da die

Herunterregulierung von Cx43 und damit der Gap Junction-Kommunikation gewebeschtützend ist, während die Hochregulierung von Cx40 entzündungshemmende Signale vermittelt (Losa et al. 2011). Die Cx übernehmen weiter eine wichtige Rolle in der Barrierefunktion des Atemwegsepithels, da gezeigt wurde, dass eine Überexpression von Cx26 die Barrierefunktion durch Tight Junctions in Lungenepithelzellen beständiger gegen den Na^+/K^+ -ATPase-Inhibitor Ouabain machen kann (Go et al. 2006).



Zelltyp	Cx-Isoform
Basalzelle	30, 31
Flimmerzelle	30
Becherzelle	26, 30, 32, 43
Alveolarepithelzelle Typ I	43, 46
Alveolarepithelzelle Typ II	32, 43

Abbildung 2: Schema der Zelltypen entlang des Lungenbaumes. In der Trachea und den Bronchien werden Basalzellen, Flimmerzellen, Keulenzellen und Becherzellen gebildet. Die Bronchiolen weisen Keulenzellen und Flimmerzellen auf, die Alveolen zwei Arten von Epithelzellen. Tabelle: Connexin (Cx)-Isoformen, die in den Zelltypen der Lunge exprimiert werden (Losa und Chanson 2015).

1.1.2 Mechanismen zur Regulierung der Connexinexpression

Die Zellkommunikation über Cx-Kanäle hängt von dem spezifischen Muster der Cx-Genexpression ab (Bedner et al. 2012). Dieses verändert sich während der Entwicklung und bei pathologischen Ereignissen, was zu einer Veränderung der Gap Junction-Kopplung und der Cx-Halbkanalaktivität führt (Willebrords et al. 2016). Wie andere Gene kann auch die Cx-Expression durch die Transkriptionskontrolle reguliert werden, die neben den Regulationsfaktoren für Abbau und Verwendung der Cx-messenger Ribonukleinsäuren (mRNA) der wichtigste Faktor ist (Oyamada et al. 2005).

Cx-Gene sind nach dem folgenden Schema aufgebaut, eine 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) auf Exon 1, getrennt von der vollständigen Cx-Kodierungsregion und der anschließenden 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) auf Exon 2 (Fishman et al. 1991). Mit Ausnahme von *GJB2*, konnten mittlerweile für mehreren Cx-mRNAs verschiedene Spleißisoformen entdeckt werden (Oyamada et al. 2005; Oyamada et al. 2013). Oyamada et al. (2013) führten zelltypunabhängige, ubiquitäre Transkriptionsfaktoren auf, die die Cx-Expression regulieren. Sie beschrieben die Bindungsstelle für das spezifische Protein 1 (Sp1) als gemeinsames Element in der transkriptionellen Aktivität von *GJB2*, *GJB6*, *GJAI* und *GJA5*. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Sp1 in Abhängigkeit von anderen mit-exprimierten Transkriptionsfaktoren, z. B. Kernrezeptor-Subfamilie 1 Gruppe D Mitglied 2, die *GJAI*-Expression hoch- oder herunterregulieren kann (Negoro et al. 2013). Der Transkriptionsfaktor Sp1 besitzt eine Zinkfinger-Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Bindungsdomäne, die GC-reiche Motive benötigt, um in der Promotorregion zu binden (Kadonaga et al. 1987). Für den basalen *GJAI*-Promotor wirkt Sp1 in Synergie mit der Histon-Acetyltransferase p300/zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) *response element-binding protein* (CREB-p300) (Hernandez et al. 2006; Mukherjee und Sengupta Bandyopadhyay 2018). Ein Beispiel für die Aktivierung von CREB-p300 ist der Signalweg durch Guanin-Nukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) als Reaktion auf aktivierte purinerge Membranrezeptoren. Die stimulierten alpha Untereinheiten, *Gas*, einiger G-Proteine stimulieren die Adenylylcyclase, was zu einem Anstieg von cAMP führt, einem aus intrazellulärem ATP erzeugten sekundären Botenstoff (Ross und Gilman 1980). cAMP als sekundärer Botenstoff kann in der Zelle unter anderem die Protein-kinase A (PKA) stimulieren. Der cAMP/PKA-Komplex kann im Zellkern CREB phosphorylieren und die Interaktion von der cAMP Response Element-Sequenz (CRE) und CREB-p300 fördern, was zu einer verstärkten Transkription von CREB-regulierten Genen führt. Außerdem können cAMP-Signalwege die Expression von Sp1 und anderen Transkriptionsfaktoren stimulieren (Rohlf et al. 1997; Li et al. 2014).

All dies deutet stark darauf hin, dass der cAMP-Signalweg ein Instrument zur Regulierung der Cx-Expression und damit zur Regulierung der Cx-Halbkanalaktivität ist. Eine verstärkte cAMP-Synthese kann durch einen G-Protein-gekoppelten Adenosinrezeptor induziert werden, der im folgenden Kapitel beschrieben wird.

1.2 Adenosinrezeptorsignalwege in der Lunge

Damit das Epithelgewebe in der Lage ist auf Krankheitserreger oder schädigende Ereignisse zu reagieren, werden in der Membran der Epithelzellen verschiedene Rezeptoren zur Erkennung von Erreger- und Verletzungssignalen exprimiert. Nukleotide wie Adenosin, ein Derivat von ATP, und auch ATP selber gehören zu diesen Verletzungssignalen (Riteau et al. 2010; Blackburn 2003). Der extrazelluläre Purinanstieg erfolgt als Reaktion auf zellulären Stress oder Zellschäden, von zum einen den Eindringling wie Bakterien oder zum anderen den Gewebezellen (Riteau et al. 2010). Unter diesen Umständen wird intrazelluläres ATP oder Adenosin durch mehrere mögliche Mechanismen freigesetzt. Aktivierte Membrankanäle, deren Lumen groß genug ist, Nukleotide oder Nukleoside passieren zu lassen (Anselmi et al. 2008; D'hondt et al. 2011) oder Ko-Stimulation, wie z. B. Degranulation (Eltzschig et al. 2006) können zu einem extrazellulären Anstieg von Adenosin und ATP führen.

ATP selbst ist ein Signalmolekül, das durch die Bindung an purinerge P2 Rezeptoren wirkt (Riteau et al. 2010). Weiter kann nach der Freisetzung von ATP dieses von extrazelluläre Nukleotidasen, die Differenzierungscluster (clusters of differentiation, CD) CD39 und CD73 (Zimmermann 2000) zu extrazellulärem Adenosin dephosphoryliert werden (Abbildung 3) (Yegutkin 2008), das wiederum die Zellen durch Bindung der purinergen P1 Rezeptoren stimulieren kann. Hohe Konzentrationen von extrazellulärem Adenosin stehen im Zusammenhang mit entzündlichen Ereignissen, die häufig mit Verletzungen und Krankheiten einhergehen (Eckle et al. 2009). Beim Menschen sind vier P1 Rezeptor-Subtypen bekannt: A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃. Die verschiedenen Rezeptorsubtypen induzieren unterschiedliche Signalwege in der Zelle. Die P1 Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die durch die Regulierung der Aktivität der Adenylylcyclase, die Konzentration von intrazellulärem cAMP steuern, während die Subtypen A₁ und A₃ in einem verminderten cAMP-Spiegel resultieren, werden die Subtypen A_{2A} und A_{2B} mit einem erhöhten cAMP-Spiegel in Verbindung gebracht (Collis und Hourani 1993).

Im Epithel der Atemwege sind die Adenosinrezeptoren A_{2A} und A_{2B} die am häufigsten vorkommenden Subtypen (Eckle et al. 2009). Ihre Rolle in der Physiologie des Atemwegepithels ist jedoch komplex, da gezeigt wurde, dass Adenosin sowohl gewebesetzend als auch gewebesetzend wirken kann (Zhou et al. 2011; Zhou et al. 2009b). Agonisten des A_{2A} Adenosinrezeptors verhinderten bei Asthmapatienten die Infiltration von entzündungsfördernden Immunzellen in die Lunge, was auf eine schützende Rolle des A_{2A} Adenosinrezeptors hinweist (Haskó et al. 2009).

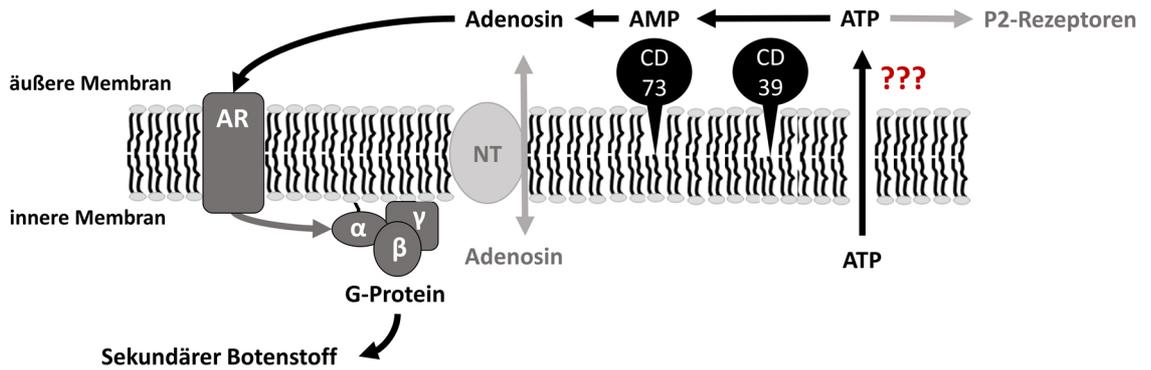


Abbildung 3: Adenosinstoffwechsel und -signalweg. Extrazelluläres Adenosin kann mit G-Protein gekoppelten Adenosinrezeptoren (AR) interagieren, die die Produktion des sekundären Botenstoffes zyklisches Adenosinmonophosphat regulieren. Adenosintriphosphat (ATP) kann durch mehrere Mechanismen freigesetzt werden (in Grafik: ???). ATP wird durch membrangebundene extrazelluläre Nucleotidasen wie CD39 zu Adenosinmonophosphat (AMP) und durch CD73 zu Adenosin dephosphoryliert. Extrazelluläres Adenosin kann auch über fakultative Nucleosidtransporter (NT) transportiert werden. Extrazelluläres ATP kann purinerge P2 Rezeptoren stimulieren.

Im Gegensatz dazu wurde festgestellt, dass eine gewebeschützende oder eine gewebeschädigende Rolle des A_{2B} Adenosinrezeptors von den akuten oder chronischen Stadien einer Lungenverletzung abhängt (Zhou et al. 2011; Zhou et al. 2009b). Studien von Eckle et al. (2008b) untersuchten den Beitrag der Adenosinrezeptorsignalwege zur Abschwächung Beatmungsgerät-induzierter Lungenschädigung in Mäusen. Die genetische Deletion des A_{2B} Adenosinrezeptors in diesen Mäusen zeigte eine verkürzte Überlebenszeit und eine erhöhte pulmonalen Albuminausschüttung während einer akuten Lungenverletzung nach 24 Stunden. Dagegen wurde in einem chronischen Entzündungsprozess gezeigt, dass Antagonisten des A_{2B} Adenosinrezeptors die Mastzelldegranulation und die Überproduktion von pro-inflammatorischen Mediatoren in der Lunge bei Mäusen in einem asthmatischen Zustand verhinderten, was in diesem Zusammenhang auf eine destruktive Rolle des A_{2B} Adenosinrezeptors schließen lässt (Mustafa et al. 2007; Haskó et al. 2008). Mäuse, die ein induziertes genetisches Defizit des purinkatabolischen Enzyms Adenosin-Desaminase haben, entwickeln, durch die anhaltend erhöhte extrazelluläre Adenosinkonzentration Merkmale einer chronischen Lungenerkrankung wie Fibrose, neutrophilenreiche Entzündung und Zerstörung des alveolären Luftraums (Blackburn et al. 2000). Die Behandlung mit einem A_{2B} Adenosinrezeptor-Antagonisten bei diesen Adenosin-Desaminase-defizienten Mäusen während der chronischen Krankheitsphase führte zu einem Rückgang der Lungenentzündung und Fibrose (Sun et al. 2006). Diese Befunde

legten für die Autoren die Vermutung nahe, dass der A_{2B} Adenosinrezeptor in chronischen Krankheitsstadien pro-fibrotisch wirkt.

Dieser widersprüchliche, entzündungsfördernde (Anvari et al. 2010) und entzündungshemmende (Schingnitz et al. 2010; Eckle et al. 2008a; Eckle et al. 2008b) Charakter des A_{2B} Adenosinrezeptors in der Lunge könnte mit einer Bifunktionalität des Rezeptors erklärt werden, die in der Arbeit von Sun et al. (2012) vorgestellt wurde. Die Aktivierung des A_{2B} Adenosinrezeptors durch Adenosin führt zu pro-inflammatorischen Effekten, während der A_{2B} Adenosinrezeptor eine Adenosin-unabhängige Runterregulation der pro-inflammatorischen Reaktion induziert. Dies wäre auf eine mögliche Liganden-unabhängige Bindung des Transkriptionsfaktors nuklearer Faktor *kappa-light-chain-enhancer* aktivierter B-Zellen (NF-κB) an den C-Terminus des A_{2B} Adenosinrezeptors zurückzuführen. NF-κB ist Teil der Entzündungsprozesse (Hatada et al. 2000), pro-inflammatorische Reaktionen könnten somit durch die Assoziation des Transkriptionsfaktors NFκB1 an den A_{2B} Adenosinrezeptor herunterreguliert werden. Dies soll die gegensätzlichen Wirkungen des A_{2B} Adenosinrezeptors, durch Gegenwart und Abwesenheit seines Liganden, Adenosin erklären.

Hohe Konzentrationen von Adenosin in der Lunge kennzeichnen pathophysiologische Situationen (Driver et al. 1993; Huszár et al. 2002). Eine hohe Konzentration von extrazellulärem ATP, als Vorgängermolekül für Adenosin (Zimmermann 2000), ist in pathologischen Situationen nachweislich durch die vermehrte Öffnung von Cx-Halbkanälen in der Lunge hervorgerufen (Arzola-Martínez et al. 2021; Eltzschig et al. 2006; Riteau et al. 2010). Ein mögliches Zusammenspiel von Cx-Halbkanälen und Adenosinrezeptoren in der Lunge ist bisher ungeklärt. Die Cx-Halbkanäle könnten in ihrer Funktion als Membrankanäle eine Quelle für extrazelluläres Adenosin in der Lunge unter pathophysiologische Bedingungen darstellen (Abbildung 3).

1.3 Connexin-Halbkanalinhibitoren als potentielle Therapeutika

Die Öffnungswahrscheinlichkeit der Cx-Halbkanäle in der Membran ist normalerweise gering. Einerseits trägt das Andocken von Cx-Halbkanälen zwischen benachbarten Zellen zu Gap Junctions zu einer verringerten Anzahl von Cx-Halbkanälen in der Zellmembran bei. Andererseits reduziert die hohe Konzentration von externem Ca²⁺ die Öffnungswahrscheinlichkeit von Cx-Halbkanälen stark. Pathologische Zustände wie Membrandepolarisation, Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, Verringerung der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration, mechanische Stimulation und oxidativer Stress können die Aktivität der Cx-Halbkanäle erhöhen (Contreras et

al. 2003; Lopez et al. 2016; Sáez et al. 2005). Entzündungen gehören zu den pathologischen Zustände, die zu einer erhöhten Cx-Halbkanalaktivität führen (Calder et al. 2015; Willebrords et al. 2016). Das Initiieren einer akuten Entzündungsreaktion ist der erste Mechanismus der angeborenen Immunantwort, um das Gewebe vor Krankheitserregern und deren schädlichen Auswirkungen zu schützen. Dabei soll die ursprüngliche Ursache der Infektion oder Verletzung beseitigt und die Gewebereparatur eingeleitet werden (Waisman et al. 2015). Mikrobiologisch induzierte Entzündungen und sterile Entzündungen des Epithels, gekennzeichnet durch sterile Akteure wie ATP und Adenosin, beinhalten die Rekrutierung von Immunzellen, wie Makrophagen, Neutrophile, dendritische Zellen und B-Zellen, durch die Freisetzung von molekularen Mediatoren, den Zytokinen (Chen und Nuñez 2010).

Cx sind als Akteure bakterieller Infektionen beschrieben worden. So, erhöhten pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) wie Lipopolysaccharide (LPS) von gramnegativen Bakterien die Organisation und Menge der Cx-Halbkanäle in der Membran von Epithelzellen des Darms (Clair et al. 2008). Peptidoglykan als bakterielles Endotoxin erhöhte die Cx26-Halbkanalaktivität und setzte dadurch ATP als Botenstoff in epithelialen Hautzellen frei (Donnelly et al. 2012). Neben einer bakteriellen Infektion zeigten auch virusinfizierte Astrozyten eine erhöhte Cx-Halbkanalaktivität (Orellana et al. 2014). Die erhöhte Cx-Halbkanalaktivität kann zu einer Freisetzung von intrazellulärem Adenosin und ATP führen, dass die Adenosinrezeptorsignalwege aktiviert (Abbildung 3) und dadurch eine Entzündung fördern kann (Anvari et al. 2010; Sun et al. 2006; Zhou et al. 2009a). Cx26-Halbkanäle und Cx43-Halbkanäle stehen im Zusammenhang mit der Entzündungsreaktion und der Entzündungssignalgebung des Epithels (García-Vega et al. 2019; Retamal et al. 2015; Mugisho et al. 2018). Daher ist die Entwicklung von Cx-Halbkanalinhibitoren, die für die Behandlung von Entzündungsreaktionen in verschiedenen Krankheiten eingesetzt werden könnten, Gegenstand aktueller Forschung (Losa et al. 2011; Willebrords et al. 2017).

Neben nicht-selektiven Cx-Kanalinhibitoren wie 18 β -Glycyrrhetinsäure (GA) und ihren Derivaten, die allesamt nicht Cx-Halbkanal-spezifisch sind, gibt es sogenannte mimetische Peptide, die eine spezifische Aminosäuresequenz in der extrazellulären Schleife des Cx nachahmen (Bock et al. 2011; Wang et al. 2013). ⁴³Gap27 ist ein Beispiel für ein mimetisches Peptid, das Cx43-Halbkanäle hemmte und nachweislich die Wundheilung von diabetischem Hautgewebe verbesserte (Pollok et al. 2011). Darüber hinaus hemmte ⁴³Gap27 die durch Cx-Halbkanäle vermittelte ATP-Freiset-

zung *in vitro* in humanen Leukozyten (Eltzschig et al. 2006). Zusätzlich aber unterdrückte $^{43}\text{Gap27}$ auch die Zell-Kopplung über Gap Junctions (Decrock et al. 2009), ein Befund, der die Verwendung des mimetischen Peptids für therapeutische Maßnahmen einschränken kann. Das mimetische Peptid Gap19, das auf Grundlage der intrazellulären Cx43-Schleifensequenz entwickelt wurde, scheint spezifisch für Cx43-Halbkanäle zu sein, ohne die Gap Junction-Kommunikation zu verändern (Abudara et al. 2014). Die Tatsache, dass Gap19 in die Zellen eindringen muss (Abudara et al. 2014), erschwert allerdings seine klinische Verwendung. Das Molekül Boldin, ein Alkaloid, das als Inhibitor an Cx43-Halbkanälen getestet wurde, funktioniert, ohne in die Zellen eindringen zu müssen, und wurde als Behandlung zur Verringerung neuronaler Schäden bei neurodegenerativen Erkrankungen vorgeschlagen (Yi et al. 2017). Ein anti-Cx26-Antikörper, der die Cx26-Halbkanäle blockieren kann, ohne die Gap Junctions zu beeinträchtigen, wurde von Xu et al. (2017) entwickelt mit dem Ziel Krankheiten zu behandeln, die mit hyperaktiven Cx26-Halbkanälen in Verbindung gebracht werden. All diese Moleküle sind Beispiele für die laufende Entwicklung und Anwendung spezifischer Inhibitoren für Cx-Halbkanäle.

1.4 Zielsetzung

Sowohl Cx-Kanäle (Losa et al. 2011) als auch die Adenosinsignalgebung (Blackburn 2003; Zhou et al. 2011; Feoktistov et al. 1998; Haskó et al. 2009) sind an verschiedenen chronischen Lungenerkrankungen beteiligt. Wie genau die Adenosinsignalgebung und Cx-Kanäle von Epithelzellen interagieren, war ein Schwerpunkt dieser Arbeit. Wie bereits beschrieben, ist die Barrierefunktion eine wichtige Eigenschaft des Lungenepithelgewebes. Daher wurde die humane Bronchialepithelzelllinie Calu-3 verwendet, die eine Barriere ausbildet und submuköse Becherzelleigenschaften aufweist (Foster et al. 2000; Go et al. 2006; Kreda et al. 2007). Die Aktivität der Halbkanäle in der Membran der Calu-3-Zellen wurden durch Messung der intrazellulären Fluoreszenzintensität eines Farbstoffes mittels Farbstoffaufnahmeexperimenten (Schadzek et al. 2018), sowie die Gap Junction-Kopplung mittels der Goldnanopartikel-vermittelten Laserperforation /Farbstofftransfer-Methode ermittelt (Begandt et al. 2015). Dabei sollte festgestellt werden, welchen Einfluss die Stimulation durch Adenosinrezeptor-Agonisten auf die Aktivität der Cx-Halbkanäle und die Gap Junction-Kopplung hat. Die in Calu-3-Zellen exprimierten Cx-Isoformen sollten durch mRNA- und Proteinquantifizierung ermittelt werden. Ein siRNA-vermittelter Knock-down spezifischer Cx-Isoformen sollte eine oder mehrere der ermittelten Cx-Isoformen der Cx-Halbkanalaktivität zuordnen können. Darüber hinaus sollte die Auswirkungen der Adenosinrezeptorsignalwege auf die Cx-Halbkanäle in Calu-3-

Zellen genauer untersucht werden. Knock-down Versuche und pharmakologische Inhibierung und Stimulierung von Adenosinrezeptor-Subtypen sollte eine Zuordnung des zu Grunde liegenden Adenosinrezeptor-Subtyps in dem Signalweg zur Änderung einer Cx-Halbkanalaktivität ermöglichen. Die Aufklärung des Mechanismus, der zu einer Änderung der Aktivität von Cx-Halbkanälen durch die Adenosinrezeptorstimulation führte, sollte mittels Inhibitoren der Zielproteine im Adenosinrezeptorsignalweg in Farbstoffaufnahmeexperimenten ermöglicht werden.

Im zweiten Schwerpunkt der Arbeit wurden zwei polyphenolische potenzielle Cx-Halbkanalblocker getestet: der Diarylether CVB2-61 und das Diarylheptanoid und Curcuminoid-Analogon CVB4-57. CVB2-61 wurde bereits als wirksames Therapeutikum bei Atherosklerose publiziert (Vanucci-Bacqué et al. 2016). CVB4-57 wurde bisher noch nicht beschrieben, aber der Polyphenol- und Cucuminoid-Ursprung ist vielversprechend und könnte eine zukünftige therapeutische Leitstruktur sein (Kumar und Goel 2019; Vanucci-Bacqué et al. 2016). Durch Farbstoffaufnahmeexperimente in Zellen sollte die Kapazität zur Blockierung der Cx-Halbkanäle untersucht werden. Durch die gezielte Transfektion von humanem Cx26 oder humanem Cx46 in zuvor nicht Cx-exprimierende Zellen sollten die entsprechenden Cx-Halbkanäle ausgebildet werden. Diese würden zur Analyse einer möglichen Cx-Isoform-Spezifität bezüglich einer Blockierung durch CVB2-61 und CVB4-57 unter den beiden Cx-Isoformen dienen. CVB2-61 und CVB4-57 sollten außerdem in endogen Cx-exprimierenden Zellen mit Cx-Halbkanälen und Gap Junction-Kopplung getestet werden. Die erfolgreiche Entwicklung eines Cx-Isoform-spezifischen Cx-Halbkanal-Blockers, der sich von einer zusätzlichen Inhibierung der Gap Junction-Kopplung abgrenzen würde, würde neben einem möglichen therapeutischen Ansatz ein wertvolles Instrument für die Untersuchung der Rolle von Cx-Halbkanälen in Zellen und Gewebe ermöglichen.

2 Adenosinrezeptorstimulation erhöht die Aktivität von Connexin-Halbkanälen in Epithelzellen der Atemwege

Reprinted by permission from Cellular Physiology and Biochemistry Press

The Journal of Cellular Physiology and Biochemistry, Volume 53, Issue 4, pp. 606-622, 2019, DOI: 10.33594/000000160,

Stimulation of the A_{2B} Adenosine Receptor Subtype Enhances Connexin26 Hemichannel Activity in Small Airway Epithelial Cells

Anne Dierks, Almke Bader, Tina Lehrich and Anaclet Ngezahayo

Licence number: CC BY-NC-ND

The final publication is available at <https://www.cellphysiolbiochem.com/>

Contribution: I designed the experiments together with A. N., performed most of the experiments, analysed the data, prepared all the figures and wrote the manuscript together with A. B. and A. N.

This article is licensed under the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives 4.0 International License (CC BY-NC-ND). Usage and distribution for commercial purposes as well as any distribution of modified material requires written permission.

Original Paper

Stimulation of the A_{2B} Adenosine Receptor Subtype Enhances Connexin26 Hemichannel Activity in Small Airway Epithelial Cells

Anne Dierks^a Almke Bader^a Tina Lehrich^a Anaclet Ngezahayo^{a,b}

^aDepartment of Cell Physiology and Biophysics, Institute of Cell Biology and Biophysics, Leibniz University Hannover, Hannover, Germany, ^bCenter for Systems Neuroscience (ZNS), University of Veterinary Medicine Hannover Foundation, Hannover, Germany

Key Words

Connexin hemichannels • Adenosine receptors • Airway epithelium • Metabolite uptake • Calu-3 cells

Abstract

Background/Aims: Adenosine release and connexin (Cx) hemichannel activity are enhanced in the respiratory epithelium during pathophysiological events such as inflammation. We analysed the interplay between Cx channels and adenosine signalling in human respiratory airway epithelium using the Calu-3 cell line as a model. **Methods:** The Cx hemichannel activity in Calu-3 cells was evaluated by dye uptake assays. The expressed Cx isoforms and adenosine receptor subtypes were identified by PCR and western blot analysis. Pharmacological and molecular biological experiments were performed to analyse the involvement of the different adenosine receptor subtypes, the induced signalling pathways and the contribution of specific Cx isoforms to the hemichannel activity. **Results:** The adenosine receptor agonist 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (NECA) increased the dye uptake rate in Calu-3 cells. The pannexon and Cx hemichannel inhibitor carbenoxolone (CBX) did not suppress the dye uptake at pannexin-specific concentrations (100 μM). High CBX concentrations or the inhibitor La³⁺, both effective on Cx hemichannels, were needed to inhibit the dye uptake. The NECA-related increase of dye uptake depended on enhanced cAMP synthesis and subsequent activation of the protein kinase A (PKA) as shown by quantification of cAMP levels and pharmacological inhibition of the adenylyl cyclase and the PKA. Further pharmacological inhibition as well as knockdown experiments with specific siRNA showed that the A_{2B} adenosine receptor was the subtype mainly responsible for the increased dye uptake. The NECA-related increase of the dye uptake rate correlated with a decrease of Cx43 mRNA and an increase of Cx26 mRNA content in the cells as well as Cx26 protein synthesis and was inhibited by Cx26 knockdown using Cx26 siRNA. Of note, a siRNA-induced knockdown of Cx43 increased the content of Cx26 mRNA

Anaclet Ngezahayo

Department of Cell Physiology and Biophysics, Institute of Cell Biology and Biophysics, Leibniz University Hannover, Herrenhäuser Straße 2, Hannover, 30419 (Germany)
Tel. +49 511 762 4568, Fax +49 511 762 2606, E-Mail ngezahayo@cell.uni-hannover.de

Adenosinrezeptorstimulation erhöht die Aktivität von Connexin-Halbkanälen in Epithelzellen der Atemwege

Cellular Physiology and Biochemistry

Cell Physiol Biochem 2019;53:606-622

DOI: 10.33594/000000160

Published online: 25 September 2019

© 2019 The Author(s). Published by

Cell Physiol Biochem Press GmbH&Co. KG

Dierks et al.: A_{2B} Adenosine Receptors and Cx26 Hemichannels in Airway Epithelium

607

and correspondingly the dye uptake rate. **Conclusion:** The Calu-3 cell model shows that stimulation of the A_{2B} adenosine receptor subtype activates synthesis of cAMP. cAMP activates PKA and induces thereby an increase in Cx26 and a decrease in Cx43 mRNA levels. As a result, the synthesis of Cx26 is reinforced, leading to an enhanced Cx hemichannel activity. The report identifies a mechanism that integrates adenosine release and Cx hemichannel activity and shows how adenosine signalling and Cx channels may act together to promote persistent inflammation, which is observed in several chronic diseases of the respiratory airway.

© 2019 The Author(s). Published by
Cell Physiol Biochem Press GmbH&Co. KG

Introduction

Connexins (Cx) are membrane proteins that form gap junction channels and Cx hemichannels in the membrane of cells [1, 2]. They are the protein product of a gene family composed of 21 members in humans [2, 3]. As membrane proteins Cxs are synthesized and inserted into the membrane in the rough endoplasmic reticulum (ER). Along the trafficking pathway through the ER and Golgi apparatus, Cxs oligomerize to hexamers called connexons. These are transported to the plasma membrane where they form Cx hemichannels. Under normal conditions, the open probability of Cx hemichannels is very low due to the relatively high external Ca²⁺ concentration [4, 5]. Cx hemichannels of adjacent cells might dock to each other by interactions of specific motifs of their extracellular loops [6, 7] and form gap junction channels. Gap junction channels allow the intercellular exchange of ions and metabolites such as glucose and second messengers, e. g. cyclic nucleotides and IP₃ as well as oligonucleotides such as siRNAs or microRNAs. They thereby allow cells in tissues to form synchronized functional units as nicely illustrated in cardiac tissue [8]. When opened, Cx hemichannels are large enough to allow the exchange of metabolites with a size of 1-2 kDa between the external and the intracellular spaces. The Cx hemichannels might also participate in the release of mediators such as ATP, ADP or adenosine [9]. Before degradation or reuptake in the cells, the mediators can in a paracrine and autocrine manner bind to their receptors on cells in direct proximity of the site of release. The subsequently produced second messengers in the stimulated cells can then diffuse through gap junction channels, leading to a reaction in a large portion of the tissue. Thus, Cx channels as hemichannels and gap junction channels may participate in different signalling pathways such as adenosine signalling in tissues.

Adenosine is a metabolite ubiquitously present in tissue [10, 11]. As extracellular mediator, adenosine is either released or produced by rapid conversion of released ATP or ADP through a series of ectonucleotidases such as CD73 and CD39 [11, 12]. As in other tissue, the systemic basal adenosine concentration in respiratory tissue is in the range of 100 nM. However, local increases of external adenosine by transient adenosine and nucleotide release have been observed [13, 14]. The basal and transient adenosine level is part of the innate immune response and is involved in the general pulmonary physiology such as air surface liquid homeostasis [15–18]. Adenosine signalling is related to the adenosine receptor subtypes A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃, which are all linked to the adenylyl cyclase (AC) via G proteins [12]. While A_{2A} and A_{2B} adenosine receptors are linked to G_s proteins and activate cAMP synthesis, A₁ and A₃ adenosine receptors activate G_i proteins and inhibit cAMP synthesis [11, 12].

As locally released and produced mediator with a high degradation and reuptake rate, adenosine activates cells in close vicinity of its site of release. However, adenosine affects large tissue areas, suggesting a propagation of adenosine-dependent signalling through integrative mechanisms such as Cx channels [19]. Correspondingly, it was observed that pathological events, e. g. inflammatory reactions, the hallmark of various pathologies of the respiratory airway epithelium such as acute lung injury (ALI), chronic obstructive pulmonary disease (COPD), or asthma, correlated with an exacerbated adenosine release and changes in the activity of Cx channels in the whole organ [20–23]. The second messenger affected by adenosine signalling, cAMP, regulates various cellular processes by activating its targets,

the protein kinase A (PKA), the exchange protein directly activated by cAMP (Epac) [24] or cyclic nucleotide-gated (CNG) channels [25]. With respect to Cx channels, the cAMP/PKA cascade is a well-studied signalling pathway that predominantly increases the gap junction-dependent cell-to-cell communication [26, 27]. At molecular level, the cAMP/PKA cascade affects gap junction channels by phosphorylation of either Cxs [27, 28] or Cx-regulating proteins [29], leading to an increased insertion of connexons into the cell membrane, an elevated opening probability or an increased electrical conductance of single gap junction channels, as well as a reduced removal of gap junction channels from gap junction plaques. Additionally, activation of the cAMP/PKA cascade can upregulate Cx expression [29–32]. Finally, Bader et al. (2017) showed that in endothelial cells of the blood-brain barrier cAMP enhanced the gap junction coupling by activating a Ca²⁺ influx through CNG channels [25].

In order to analyse the interplay between adenosine signalling and Cx channels in epithelial cells of the respiratory airway system we used the Calu-3 cell line as model. These cells form a tight monolayer of polarized cells with a high transepithelial electrical resistance when cultured in transwell systems [33]. Calu-3 cells also express characteristic molecules of bronchial epithelial cells, such as cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), show a cAMP-dependent Cl⁻ secretion and are able to secrete pulmonary fluids with mucins and other immunologically active mediators [34, 35].

We found that the adenosine receptor agonist NECA reduced the mRNA level of Cx43 while increasing the mRNA amount of Cx26. The increased expression of Cx26 correlated with an enhanced Cx26 hemichannel activity. The effect of NECA was related to stimulation of the A_{2B} adenosine receptor subtype and depended on activation of a cAMP/PKA-dependent pathway.

Materials and Methods

Material

NECA and withaferin A were purchased from Biomol (Hamburg, Germany). MRS1754, SCH58261, BAY60-6583 and Lucifer Yellow (LY) were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). CGS21680 was from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). SQ22536 was from Enzo Life Sciences (Lörrach, Germany). Adenosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate (Rp-cAMPS) was from Biolog Life Science Institute (Bremen, Germany). NECA, withaferin A, MRS1754, SCH58261, CGS21680, and BAY60-6583 were dissolved in DMSO while Rp-cAMPS and SQ22536 were dissolved in water. All inhibitors were preincubated for 30 min prior to addition of NECA. The vehicles DMSO or water were added to control cells in all experiments at maximal concentrations of 0.1% or 0.3%, respectively.

Cell Culture

The human lung adenocarcinoma epithelial Calu-3 cells (AddexBio, San Diego, CA, USA) were cultured in Dulbecco's MEM/Ham's F-12 medium (Biochrom, Berlin, Germany) supplemented with 10% foetal calf serum (Biochrom, Berlin, Germany), 1 mg/ml penicillin, and 0.1 mg/ml streptomycin (Biochrom, Berlin, Germany). The cells were maintained in a cell culture incubator in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. The cell culture medium was renewed every three days. Cells up to passage 35 were used for experiments.

Transepithelial electrical resistance (TEER) measurement

The TEER was monitored every 24 h by impedance spectroscopy using the cellZscope (nanoAnalytics, Muenster, Germany). For the measurements 10⁵ Calu-3 cells/cm² were seeded in transwell inserts with a transparent PET membrane (pore size 0.4 µm, BD Falcon, Corning) and cultivated in cell culture medium for 3 days before being transferred into the cellZscope and placed in the cell culture incubator. TEER data were automatically recorded by the cellZscope software.

Adenosinrezeptorstimulation erhöht die Aktivität von Connexin-Halbkanälen in Epithelzellen der Atemwege

Cellular Physiology and Biochemistry

Cell Physiol Biochem 2019;53:606-622

DOI: 10.33594/00000160

© 2019 The Author(s). Published by

Published online: 25 September 2019

Cell Physiol Biochem Press GmbH&Co. KG

Dierks et al.: A_{2b} Adenosine Receptors and Cx26 Hemichannels in Airway Epithelium

609

Western blot

Protein isolation was performed as described previously in Bader et al. (2017) [25]. For isolation of total proteins cells were grown in 60 mm diameter cell culture plates or 6 well plates. The cells were removed from the surface with a cell scraper, transferred in 1 ml PBS and centrifuged for 4 min at 900 × g at 4°C. The cell pellet was resuspended in 20 µl RIPA buffer (25 mM Tris HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% nonidet P-40, 1% sodium desoxycholate, 0.1% SDS, freshly added 0.5% protease inhibitor cocktail (Roche, Waiblingen, Germany), 10 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 1.5 mM PMSF) and kept for 15 min on ice before centrifugation for 15 min at 14,000 × g at 4°C. Protein concentration was determined with a Bradford assay (Sigma-Aldrich) using bovine serum albumin (BSA) as standard. 20 µg total protein was mixed with 5 × Laemmli buffer (13 mM Tris HCl, 2% glycerol, 0.4% SDS, 0.002% bromophenol blue, 10 mM DTT, pH 6.8), heated at 70°C for 10 min and separated in 5% SDS-polyacrylamide stacking gels and 12% or 15% separation gels. Proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane using a semi-dry blotting system (transfer buffer: 25 mM Tris HCl, pH 8.3, 192 mM glycine, 0.1% SDS, 20% methanol). The membranes were blocked in 5% non-fat dry milk powder in PBS containing 0.5% Tween 20 (PBS-T) for 2-3 h at room temperature. Anti-β-tubulin antibody as loading control (1:4,000, Sigma-Aldrich, T4026), anti-Cx26 antibody (0.5 µg/ml, Merck, MABT198), anti-Cx43 antibody (0.19 µg/ml, Sigma-Aldrich, C6219), anti-Cx45 antibody (1 µg/ml, Thermo Fisher Scientific, 41-5800), anti-claudin1 antibody (0.54 µg/ml, Thermo Fisher Scientific, 51-9,000), anti-claudin3 antibody (0.5 µg/ml, Thermo Fisher Scientific, 34-1700), anti-claudin4 antibody (1 µg/ml, Thermo Fisher Scientific, 32-9400), anti-claudin7 antibody (1.3 µg/ml, Sigma-Aldrich, SAB4500436), anti-A_{2b} adenosine receptor antibody (4 µg/ml, Alomone Labs, AAR-007), and anti-A_{2b} adenosine receptor antibody (3.75 µg/ml, Alomone Labs, AAR-003) were diluted in PBS-T and applied to the membranes at 4°C overnight. The secondary horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit and anti-mouse antibodies (1:40,000 Sigma-Aldrich, A9169 and A9044) were each applied for 1 h at room temperature. The detection was carried out with a substrate containing coumarin and linoleic acid (100 mM Tris pH 8.5, 1.25 mM linoleic acid, 0.225 mM coumarin acid, freshly added 0.01% H₂O₂) and imaged with a CCD camera imaging system (Intas Science Imaging, Göttingen, Germany).

Immunofluorescence staining

For immunostaining 10 × 10⁵ cells were seeded on collagen I-coated coverslips (diameter 5 mm) and grown for 48 h to a confluence of 70%. The cells were fixed with an acetone/methanol mix (1:1) for 5 min at -20°C and blocked with 1% BSA in PBS for 30 min at 37°C. The primary antibodies anti-Cx26 (2 µg/ml, Merck, MABT198), anti-Cx43 (0.75 µg/ml, Sigma-Aldrich, C6219), anti-Cx45 (10 µg/ml, Thermo Invitrogen, 41-5800), anti-claudin1 (5 µg/ml, Thermo Fisher Scientific, 51-9,000), and anti-claudin3 (60 µg/ml, Thermo Fisher Scientific, 34-1700) were diluted in PBS and added to the cells overnight at 4°C. The secondary iFluor488™-conjugated anti-rabbit and anti-mouse antibodies (AAT Bioquest, 16608, 16528) were diluted 1:1,000 in PBS with 2 µM DAPI (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37°C. The cells were washed with PBS and stored at 4°C. Immunostaining was imaged with an Eclipse TE2000-E inverse confocal laser scanning microscope (Nikon GmbH) with a 60 x water immersion objective and the software EZ-C1 (Nikon GmbH).

Gold nanoparticle mediated laser perforation/dye transfer (GNOME-LP/DT)

GNOME-LP/DT experiments were performed as described previously in Begandt et al. (2015) [36]. The cells were seeded at a density of 1.5 × 10⁵ cells/well in 96 multiwell plates and cultivated for 72 h until confluence. Gold nanoparticles (AuNPs, diameter 200 nm, 0.5 µg/cm²) were added 3 h before an experiment started. Cells were washed with a bath solution containing 121 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 6 mM NaHCO₃, 5.5 mM glucose, 0.8 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, and 25 mM HEPES (pH 7.4, 295 mOsmol/l). The laser permeabilisation was performed in presence of 0.25% LY dissolved in bath solution. The laser system set-up and laser treatment parameters were according to Heinemann et al. (2013) [37]. The set-up included a 532 nm Nd:YAG microchip laser (Horus Laser, Limoges, France), enabling 850 ps laser pulses with a repetition rate of 20 kHz, a telescope for the adjustment of the laser diameter and a halfwave plate combined with a polarizing beam-splitter (Thorlabs, Newton, USA) for adjustment of the laser power. A motorised stage (Carl Zeiss, Jena, Germany) with controller unit (Prior Scientific, Cambridge, UK) and a scanner (Müller Elektronik, Spaichingen, Germany) enabled the positioning and scanning of the multiwell plates. The laser power and the scanning velocity as well as the selection of wells were controlled by a custom-made LabView-based software [37]. To perform GNOME LP/DT, in each well of a 96 multiwell plate, a line of cells

Adenosinrezeptorstimulation erhöht die Aktivität von Connexin-Halbkanälen in Epithelzellen der Atemwege

Cellular Physiology and Biochemistry

Cell Physiol Biochem 2019;53:606-622

DOI: 10.33594/000000160

Published online: 25 September 2019

© 2019 The Author(s). Published by

Cell Physiol Biochem Press GmbH&Co. KG

Dierks et al.: A_{2b} Adenosine Receptors and Cx26 Hemichannels in Airway Epithelium

610

was optoperforated by a 20 mW laser beam with a diameter of 60 µm and a scanning velocity of 60 mm/s. After 10 min dye diffusion time, the cells were washed with Ca²⁺-containing bath solution as previously described. The cells were fixed with 4% formaldehyde. In CBX experiments, 400 µM CBX was present during optoperforation and all washing steps. To automatically document the GNOME LP/DT experiments, images were obtained with an Orca Flash 4.0 camera (Hamamatsu Photonics, Herrsching am Ammersee, Germany) mounted onto an Eclipse Ti microscope (Nikon) with a 10 x objective using the NIS elements AR 4.21 software (Nikon). The tool Multipoint ND acquisition was used to generate three images with 2044 × 2048 pixels (1348.4 × 1351.04 µm) per well along the perforated fluorescent cell band plus one image aside for background subtraction. To analyse the diffusion distance in the fluorescence plot profiles, a Java-based ImageJ plugin was used which included a background subtraction. The results were passed to Octave 4.0-based software for calculation of the dye diffusion distances. The results are given as mean ± SEM from at least three biological replicates, the significance of the mean difference was evaluated by a student's *t* test.

Dye uptake assays

The activity of Cx hemichannels was analysed by measuring the ethidium bromide (Etd) uptake slightly modified from Schadzek et al. (2019) [38]. Calu-3 cells and HeLa cells were cultivated to 40% confluence on collagen I-coated coverslips. The cells were placed in a perfusion chamber with a chamber volume of approximately 400 µl and mounted on an Eclipse Ti microscope (Nikon). Regions of interest (ROIs) were selected in a transmission micrograph of the cells acquired with an Orca flash 4.0 CCD camera (Hamamatsu Photonics Germany). During the experiment, fluorescent images were taken every 15 s with an exposure time of 900 ms to assess fluorescence intensity changes within the ROIs using the NIS-Elements AR 4.4 software (Nikon GmbH). The ISMATEC REGIO ICC peristaltic pump (Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Germany) controlled by the software ISMATEC® Pump Control (Cole-Parmer GmbH) was used to maintain a constant 1 ml/min medium flow rate. During the first 5 min of a 20 min long dye uptake experiment, the cells in the chamber were perfused with a prewarmed (37°C) bath solution containing 121 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 6 mM NaHCO₃, 5.5 mM glucose, 0.8 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, and 25 mM HEPES (pH 7.4, 295 mOsmol/l), and 5 µM ethidium bromide. For the next 10 min, the medium was changed to a Ca²⁺/Mg²⁺-free solution. In some experiments, cells were additionally perfused for 5 min with 100 µM, 400 µM CBX or 1 mM La³⁺ added to the Ca²⁺-free solution. The dye uptake rate (Etd uptake in AU/min) was calculated from minute 1.5-2.5, 5.5-7.5, and 15.5-17.5. The significance of the differences of different perfusion solutions was evaluated by student's *t* test.

RT-PCR

For RT-PCR the PeqGOLD Total RNA kit (Peqlab, Erlangen, Germany) was used for total RNA isolation of cells grown on tissue culture plates according to the manufacturer's protocols. The RNA was eluted twice from the spin columns with 20 µl prewarmed (56°C) RNase-free water. The RNA concentration was measured with a Nanodrop2000c™ spectrophotometer (Peqlab). The Maxima First Strand cDNA synthesis kit for

Table 1. List of all primer pairs used for PCR and quantitative real time PCR

Target gene	Primer sequence 5'-3'	Amplicon size (bp)
adora1	TGGTGACCTTGGGTGCTTGCC AGGGGTCCAGTCCCACACGGA	495
adora2A	ATCGCAGTGGGTGCTGCGC GCCGCCAGGAAGATCCGCAAA	455
adora2B	GTGCCACCAACAATGCACAGAAC CTGCACATCCCACTCTTGACATC	515
adora3	GTGCTTCAGCTCTGCTCCCA GCCAGTGGGCTAGCTCTCG	518
gapdh	TTGAGGTCAATGAAGGGGTC GAAGGTGAAGTCCGAGTCA	117
actB	CCTTGACATGCCGGAG GCACAGAGCTCCGCTT	112
cx26	CTCCCGACGCAGAGCAAA ACGGTGAGCCAGATCTTTCC	114
cx30	AAAGCAACCGATAGCTCC ATCTCTGGGTCCAAGTGGTC	108
cx32	GGCTCCCAAGGTGTGAA TGGCAGTGAATGCCGGTTC	86
cx36	CTGCCAGTCTTTGTCTGCT CAACAGGATCTCCGATCAT	119
cx37	CAGGCAGGCAGCGAG TGCGGAAGATGAAGACACC	127
cx40	GCAGCCAGAGTGTGAAGAAG CGGTGAGTGTGTGTA	150
cx43	TTTAAGCAAAAGACTGTGCC CTTCCCTCCAGCTTGA	98
cx45	CTGGACAACAGGGGATACCA ACAGCTGAAGGACGATCCG	144
cx46	CACCGCAGGTGTGAAGG TTCAGATTCTAACCCTGCT	103
cx47	TCTGGCTGGAGAAGGACC CACGAAGTGGAGTGTGTTGT	103
adora2A	CATCGTCTCTCCACACCAA GTGGCTGCGAATGATCTTGC	100
adora2B	TTCTGGCCGTGGCAGTC AGGACAGCAATGACCCCT	100

RT-qPCR with dsDNase (Thermo Fisher Scientific) was used for cDNA synthesis. Up to 5 µg total RNA were incubated with 1 µl dsDNase and 1 × dsDNase buffer for 30 min at 37°C. 1 × reaction buffer and 2 µl enzyme mix were added in a final volume of 20 µl. The reaction was carried out for 10 min at 25°C, 30 min at 65°C and 5 min at 85°C. Complete removal of genomic DNA was confirmed before reverse transcription by PCR analysis. The primer pairs for gene expression analysis of Cx isoforms and adenosine receptor subtypes are given in Table 1. PCR analyses for qualitative gene expression assessment were performed with the OneTaq® Quick-load mastermix (New England Biolabs). Quantitative real time PCR was used to quantify gene expression changes after NECA treatment and to analyse RNA knockdown after siRNA transfection. The glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gapdh) and β-actin (actB) genes were used as housekeeping genes for normalization. The ΔΔCt method was used for quantification of the relative mRNA amounts. The real time PCR was performed with the KAPA SYBR™ FAST Universal mastermix (Kapa Biosystems) in the peqSTAR 96Q real time PCR cycler (Peqlab) and was carried out with an initial denaturation at 95°C for 3 min, 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing of primers and elongation at 60°C for 30 s, followed by melt curve generation.

Measurement of intracellular cAMP levels

For ELISA experiments 0.5 × 10⁶ cells per well were seeded in a 24 multiwell plate and grown for 5 days until confluent. Cells were treated for 20 min with 10 µM NECA or vehicle control (0.1% DMSO). Measurements of cAMP levels were performed using the cAMP ELISA Kit (Cayman Chemical, 581001) according to the manufacturer's protocol. For cell lysis 100 µl of 0.1 M HCl were added per well for 20 min at room temperature before the lysate was centrifuged at 1,000 × g for 10 min. The supernatant was used as samples for the assay. The luminometric measurement was performed with a multiplate reader (Mithras, Berthold) with a measurement time of 1 s per well. Defined cAMP concentrations served as standard. Chemiluminescence values of treated cell samples were normalised to control cell samples. The results are given as mean ± SEM from at least two different cell passages. The significance of the difference was evaluated by student's *t* test.

Knock-down of connexin isoforms and the A_{2B} adenosine receptor subtype

For siRNA-mediated knockdown of Cx isoforms and the A_{2B} adenosine receptor subtype, 30 × 10⁵ cells/cm² were seeded on collagen I-coated coverslips and grown for 24 h to a confluence of about 30%. Cell culture media was changed to Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific). Cx26-siRNA (Qiagen, Hilden, Germany, SI03047856), Cx43-siRNA (SI02780491), A_{2B} adenosine receptor-siRNA (SI02662982), and Silencer Select Negative Control No. 2 siRNA (Thermo Fisher Scientific) were diluted in JetPrime dilution buffer (Polyplus transfection, Illkirch, France) to a final siRNA concentration of 9.6 nM per 48-well and 26.4 nM per 24-well. Per 48-well 1 µl, per 24-well 1.5 µl JetPrime transfection reagent (Polyplus transfection) were added. The transfection mix was incubated for 15 min at room temperature before addition to the cells. After 6 h the transfection medium was replaced by standard cell culture medium and cells were cultivated for 48 h before dye uptake experiments or quantification of mRNA amount was performed.

Results

Cx channels in Calu-3 Cells

Calu-3 cells form a barrier characterised by a TEER of 500–2,000 Ω cm² [39] and are therefore considered as an adequate model for the respiratory epithelium. We used this cell model to analyse the interaction between Cx channels and adenosine signalling in the airway respiratory epithelium. Plated at a density of 10⁵ cells/cm², Calu-3 cells formed a monolayer with a TEER of about 700 Ω cm² within about 11 days (Fig. 1A). This TEER value correlated with the expression of claudins, as shown by western blotting for Cld1, Cld3, Cld4 and Cld7 (Fig. 1B). Moreover, immunocytochemistry showed the presence of claudins distinctively located at cell-cell contact regions (Fig. 1C).

Concerning Cx channels, GNOME-LP/DT experiments showed that Calu-3 cells were coupled by gap junction channels. In Calu-3 cell monolayers, a LY-positive cell band (Fig. 2A) of about 170 µm (Fig. 2B) was found after GNOME-LP treatment. Applied in presence

Adenosinrezeptorstimulation erhöht die Aktivität von Connexin-Halbkanälen in Epithelzellen der Atemwege

Cellular Physiology and Biochemistry

Cell Physiol Biochem 2019;53:606-622

DOI: 10.33594/000000160

Published online: 25 September 2019

© 2019 The Author(s). Published by

Cell Physiol Biochem Press GmbH&Co. KG

Dierks et al.: A_{2b} Adenosine Receptors and Cx26 Hemichannels in Airway Epithelium

612

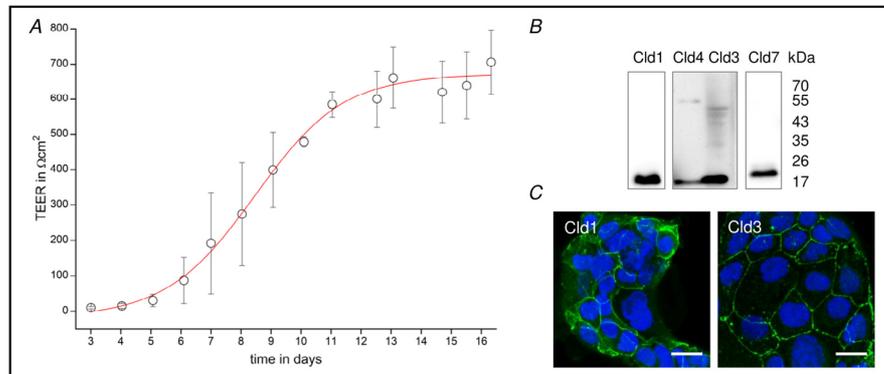
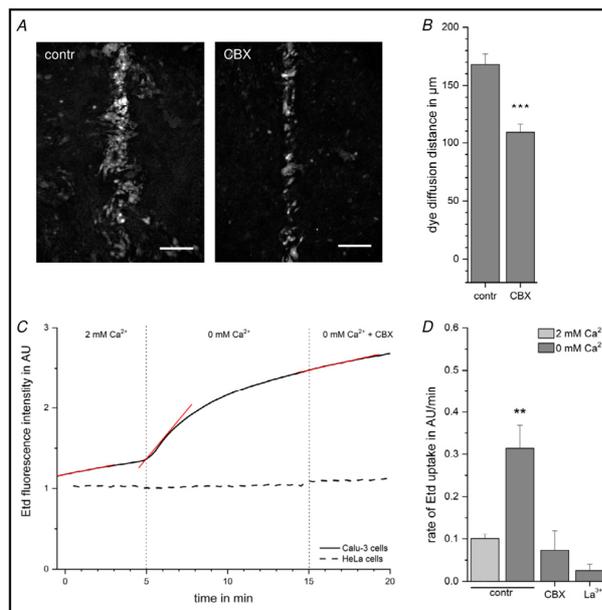


Fig. 1. Calu-3 cells cultivated in transwell inserts formed a tight barrier. (A) Time course of TEER development recorded with the cellZscope for cells cultivated in transwell inserts. The data points represent the average \pm SEM from three independent experiments. The red line represents a fitting of the data points to the Boltzmann equation. (B) Expression of the claudin (Cld) isoforms Cld1, Cld3, Cld4, and Cld7 in Calu-3 cells shown by western blotting. (C) Immunofluorescence staining shows intercellular membrane localisation of Cld1 and Cld3. The scale bar represents 20 μ m.

Fig. 2. Gap junction coupling and Cx hemichannel activity in Calu-3 cells. (A) Representative micrographs of Calu-3 cells after GNOME-LP/DT experiments performed in absence or presence of the gap junction channel inhibitor carbenoxolone (CBX). The scale bar represents 200 μ m. (B) The quantification of the experiments showed that CBX reduced the dye diffusion distance of LY from about 170 μ m to about 110 μ m. The results are shown as average \pm SEM from twenty experiments with five cell culture passages. The data were statistically compared using student's t test ($P < 0.001$ ***). (C) Time course of a dye uptake experiment showed that reduction of the external Ca^{2+} concentration accelerated the dye uptake as shown by the slope of the tangent to the dye uptake curve (red line). (D) Quantification of dye uptake experiments showing that various inhibitors of Cx hemichannels inhibited the dye uptake. The results are shown as average \pm SEM of five experiments with three cell culture passages. The data were statistically compared using student's t test ($P < 0.01$ **).



of the gap junction inhibitor CBX (Fig. 2A) GNOME-LP generated a LY-positive cell band of only 110 μ m (Fig. 2B), indicating that the wider band of LY-positive cells observed in absence of CBX was due to lateral diffusion of LY through gap junction channels between the cells.

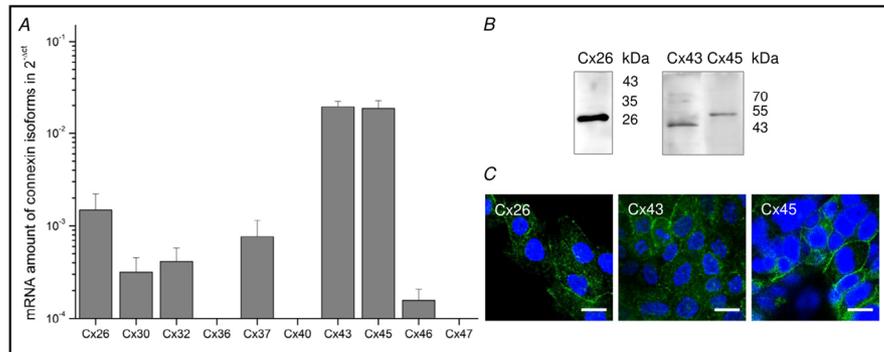


Fig. 3. Expression of connexin isoforms in Calu-3 cells. (A) RT-qPCR experiments showed expression of different Cx isoforms. Cx43 and Cx45 were remarkably high expressed, followed by Cx26. The results represent the average \pm SEM from three experiments with three cell culture passages. (B) Western blots confirmed protein synthesis of Cx26, Cx43 and Cx45. (C) In immunostainings Cx26, Cx43, and Cx45 were also found at cell-cell contact regions. The scale bar represents 20 μ m.

In addition to gap junction channels, Cxs also form hemichannels that, when open, allow the exchange of metabolites between the intracellular and extracellular spaces [9]. The hemichannels can be analysed by following the uptake of membrane impermeable dyes such as ethidium bromide (Etd) [5, 38]. In comparison to HeLa cells which are almost Cx-free and thus did not show dye uptake (Fig. 2C), Calu-3 cells cultivated under control conditions were able to absorb Etd 3 times as effective when the Ca²⁺ concentration in the external solution was strongly reduced (Fig. 2C, D). The uptake of Etd was inhibited by gap junction inhibitors such as 400 μ M CBX and 1 mM La³⁺ below the control level with an Etd uptake rate of 0.1 Au/min (Fig. 2C, D), but was not affected by low concentration (100 μ M) of CBX (Supplementary Fig. S1 – for all supplementary material see www.cellphysiolbiochem.com). With respect to the expressed Cx isoforms, RT-qPCR revealed the expression of Cx26, Cx30, Cx32, Cx37 as well as Cx46 and, more pronounced, Cx43 and Cx45 (Fig. 3A). At protein level, western blot experiments confirmed protein expression of Cx26, Cx43 and Cx45 (Fig. 3B). Similarly, the presence of Cx26, Cx43 and Cx45 localised at cell borders between adjacent cells was observed in immunocytochemical experiments (Fig. 3C).

Interplay between adenosine receptors and Cx channels

To analyse whether adenosine signalling affected the Cx channels in Calu-3 cells, the cells were cultivated in presence of the adenosine receptor agonist NECA. The analysis of gap junction coupling and Cx hemichannels with GNOME-LP/DT and dye uptake experiments, respectively, showed that NECA affected both the cell-cell coupling through gap junction channels and the dye uptake through Cx hemichannels. While incubation of Calu-3 cells with 10 μ M NECA for 24 h significantly reduced the gap junction-dependent dye transfer by half (Supplementary Fig. S2), the Cx hemichannel-dependent dye uptake rate was significantly enhanced by nearly 50% (Fig. 4A). The influence of adenosine signalling on gap junction channels will not be followed in detail in this study. The present report aims to analyse how stimulation of adenosine receptors might affect the activity of Cx hemichannels in respiratory epithelial cells. Therefore, we first analysed the expression of adenosine receptor subtypes. RT-PCR experiments showed the expression of the adenosine receptor subtypes A_{2A} and A_{2B} (Fig. 4B) while the subtypes A₁ and A₃ could not be detected. Western blot experiments confirmed the presence of A_{2A} and A_{2B} adenosine receptors on protein level (Fig. 4B). The qRT-PCR analysis revealed a more than 10-fold higher mRNA level of the A_{2B} adenosine receptor subtype in comparison to the A_{2A} adenosine receptor subtype (Fig. 4B). A_{2A} and A_{2B} adenosine receptors are both coupled to G_s proteins [12]. Accordingly, the Calu-3 cells responded to

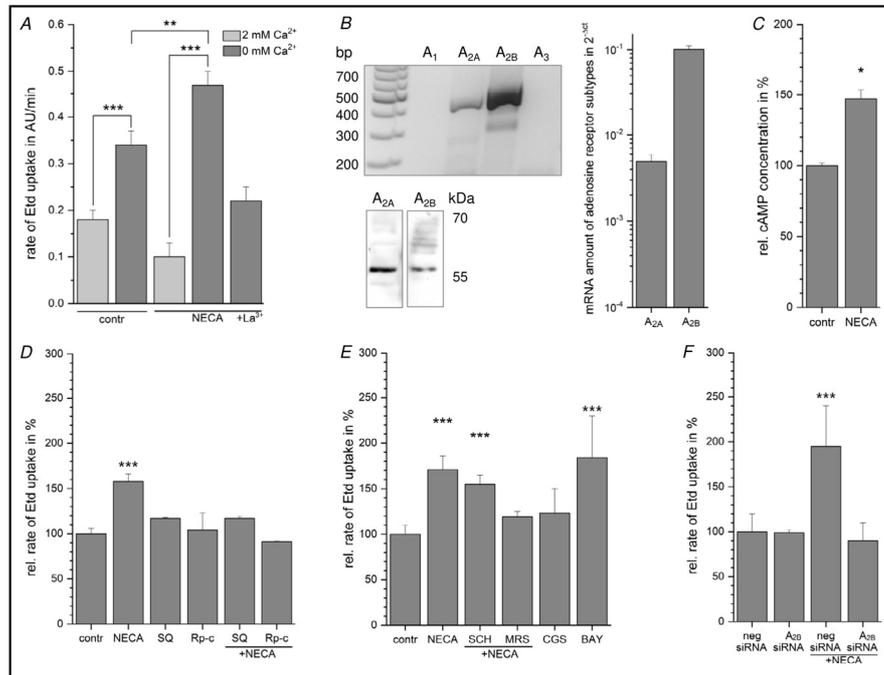


Fig. 4. Expression of adenosine receptor subtypes in Calu-3 cells. (A) Increase in the dye uptake rate induced by NECA (10 μ M, 24 h) as quantified from dye uptake experiments. (B) RT-PCR analysis and western blot experiments showed expression of the adenosine receptor subtypes A_{2A} and A_{2B}. qRT-PCR analysis showed a remarkably higher expression of the A_{2B} adenosine receptor subtype. The results are given as average \pm SEM from three cell culture passages. (C) NECA increased the intracellular cAMP concentration. The results are given as average \pm SEM from three cell culture passages. (D) The increase in the dye uptake rate was attenuated by the AC inhibitor SQ22536 (SQ, 400 μ M) and the PKA inhibitor Rp-cAMPs (Rp-c, 200 μ M). (E) The NECA-induced increased dye uptake rate was not significantly affected by the A_{2A} adenosine receptor antagonist SCH58261 (SCH, 0.5 μ M). The A_{2B} adenosine receptor antagonist MRS1754 (MRS, 0.5 μ M) blocked the NECA-induced increase in the dye uptake rate. The A_{2A} adenosine receptor-specific agonist CGS21680 (CGS, 50 nM) did not change the dye uptake rate, while the A_{2B} adenosine receptor-specific agonist BAY60-6583 (BAY, 100 nM) significantly increased the dye uptake rate. (F) siRNA-knockdown of the A_{2B} adenosine receptor subtype blocked the NECA-induced increase in the dye uptake rate. The dye uptake rates are given as average \pm SEM from respectively six experiments with three cell culture passages. The data were statistically compared to the control using student's t test ($P < 0.05$ *, $P < 0.01$ **, $P < 0.001$ ***).

NECA by increasing the intracellular cAMP concentration by about 50% compared to control conditions (Fig. 4C). This increase in cAMP was also responsible for the NECA-dependent enhanced dye uptake since application of SQ22536, a general inhibitor of AC, suppressed the NECA-induced increase in dye uptake to an only 17% higher relative Etd uptake compared to the control (Fig. 4D). Further pharmacological inhibition of A_{2A} and A_{2B} adenosine receptors using SCH58261 (0.5 μ M) and MRS1754 (0.5 μ M), respectively, had different effects on the NECA-related enhancement of the dye uptake. While SCH58261 did not affect the NECA-induced enhancement of dye uptake with a 55% higher relative Etd uptake, MRS1754 as inhibitor of the A_{2B} adenosine receptor subtype antagonized the NECA-dependent increase in dye uptake to an with only 18% negligibly higher relative Etd uptake compared to control conditions (Fig. 4E). Inversely, CGS21680 (50 nM), a specific agonist of A_{2A} adenosine

receptors, was not able to significantly increase the dye uptake with a 23% higher relative Etd uptake, while BAY60-6583 (0.1 μ M), a specific agonist of the A_{2B} adenosine receptor subtype, was similarly efficient in increasing the dye uptake rate as NECA with a 80% higher relative Etd uptake compared to the control (Fig. 4E) [40]. Additionally, the NECA-related increase in the dye uptake was suppressed by knockdown of the A_{2B} adenosine receptor subtype with specific siRNA with 90% relative Etd uptake compared to the control (neg siRNA) (Fig. 4F). Taken together, the results suggest that NECA increased the dye uptake in Calu-3 cells by activating the A_{2B} adenosine receptor subtype which subsequently activated cAMP synthesis (Fig. 4C). cAMP is a second messenger which mostly acts via activation of the PKA. We therefore analysed a possible involvement of the PKA. As shown in Fig. 4D the PKA inhibitor Rp-cAMPs (200 μ M) antagonized the NECA-induced increase in dye uptake to control level (90% rel. Etd uptake compared to control conditions), suggesting a central role for the PKA in the regulation of Cx hemichannels.

Contribution of specific Cx isoforms to the hemichannel activity

At Cx level, qRT-PCR revealed that NECA increased the mRNA levels of Cx26 and Cx30 by about 50% and decreased the content of Cx43 mRNA (0.79 rel. mRNA amount compared to the control) but did not significantly affect the Cx45 mRNA level (1.20 rel. mRNA amount compared to the control) (Fig. 5A). Accordingly, Cx26 was increased at protein level by approximately 2.6-fold (Fig. 5B). Moreover, western blot experiments also showed that NECA decreased the expression of Cx43 at protein level to 62% of control levels (Fig. 5B). It can therefore be assumed that the NECA-related increase of the dye uptake rate was mostly related to an increase of the cellular Cx26 mRNA content and upregulation of protein synthesis of Cx26 (Fig. 6). This assumption agrees very well with the observation that the PKA inhibitor Rp-cAMPs, which was able to suppress the NECA-related enhancement of dye uptake, also suppressed the NECA-related upregulation of the Cx26 mRNA level to control level (0.94 rel. mRNA amount compared to the control) (Fig. 5A). Furthermore, inhibition of the specificity protein 1 (Sp1), a transcription factor for Cx26, with withaferin A concomitantly with the application of NECA completely suppressed an increase of Cx26 transcript levels (1.02 rel. mRNA amount compared to the control) (Fig. 5A). This suggests a prominent role of the Sp1 transcription factor in the NECA-induced cAMP/PKA cascade (Fig. 6).

The prominent role of Cx26 in dye uptake was further confirmed by knockdown of Cx26 using Cx26-siRNA (Fig. 5C, Supplementary Fig. S3). The specific siRNA decreased the dye uptake rate by about 55% (Fig. 5D). In comparison, a Cx43-siRNA did not reduce the dye uptake but rather showed a tendency to increase the dye uptake rate to 154% compared to the control siRNA (neg siRNA) (Fig. 5D). Moreover, in cells treated with Cx26-specific siRNA, NECA was not able to enhance the dye uptake rate anymore (40% rel. Etd uptake compared to the neg siRNA) (Fig. 5D). This effect was due to a specific targeting of Cx26 since a control siRNA not targeting Cxs (Fig. 5C) was not able to affect the NECA-related enhancement of dye uptake with an 80% higher relative Etd uptake compared to the control (neg siRNA) (Fig. 5D). When using the Cx43-siRNA, the Cx26 mRNA level was increased by 1.4-fold (Fig. 5C). The results suggest that NECA, by activating A_{2B} adenosine receptors, induced a cAMP/PKA cascade that upregulated the expression of the Cx26 isoform via the Sp1 transcription factor, which in turn upregulated the formation of Cx hemichannels responsible for the enhanced dye uptake rate in Calu-3 cells (Fig. 6).

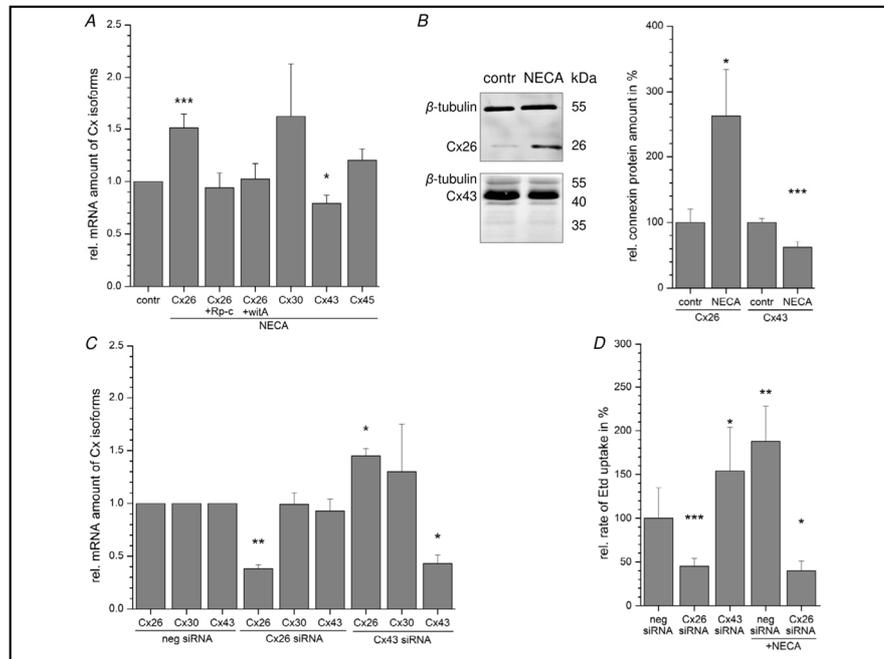


Fig. 5. Activation of adenosine receptors regulates connexin expression in Calu-3 cells. (A) qRT-PCR analysis showed an increase in the mRNA level of Cx26, Cx30 and a decrease in the mRNA level of Cx43 induced by NECA (10 μ M, 24 h). The PKA inhibitor Rp-cAMPS (Rp-c, 200 μ M) as well as the Sp1 inhibitor withaferin A (witA, 1 μ M) blocked the NECA-induced increase in Cx26 mRNA. (B) Western blot experiments showed an increase in Cx26 protein level and a decrease in Cx43 protein level induced by NECA. The results are given as average \pm SEM from three cell culture passages. (C) The mRNA levels of Cx26 and Cx43 were significantly reduced after 48 h treatment with specific siRNAs. The Cx26 mRNA level was increased after Cx43-siRNA treatment, the Cx30 mRNA level was not significantly affected by both Cx26- and Cx43-siRNAs. The results are given as average \pm SEM from at least three experiments. (D) The dye uptake rate of Calu-3 cells was significantly reduced after knockdown of Cx26 with specific siRNA, and NECA was not able to affect it. The results are given as average \pm SEM from at least six experiments with three cell culture passages. The data were statistically compared to the control (contr, neg siRNA) using student's t test ($P < 0.05$ *, $P < 0.01$ **, $P < 0.001$ ***).

Discussion

Pulmonary epithelial cells maintain a barrier that separates the atmospheric space (luminal) from the body circulatory system (abluminal) [41]. The physiological function of this barrier is modulated by different mediators such as adenosine which is released by different cells in the tissue [22, 42]. The systemic concentration of adenosine is maintained at very low levels by mechanisms of cellular uptake and degradation [43]. However, transient and local adenosine increases can be observed in response to various stimuli within the tissue and it was observed that locally released adenosine can affect the function of a whole organ [14], suggesting an involvement of integrative systems such as Cx channels [19]. In the present report Calu-3 cells were used as model to analyse the interplay between adenosine signalling and Cx channels in human respiratory airway epithelial cells. As shown above, Calu-3 cells formed an excellent barrier characterized by a high TEER (Fig. 1A). This barrier,

Adenosinrezeptorstimulation erhöht die Aktivität von Connexin-Halbkanälen in Epithelzellen der Atemwege

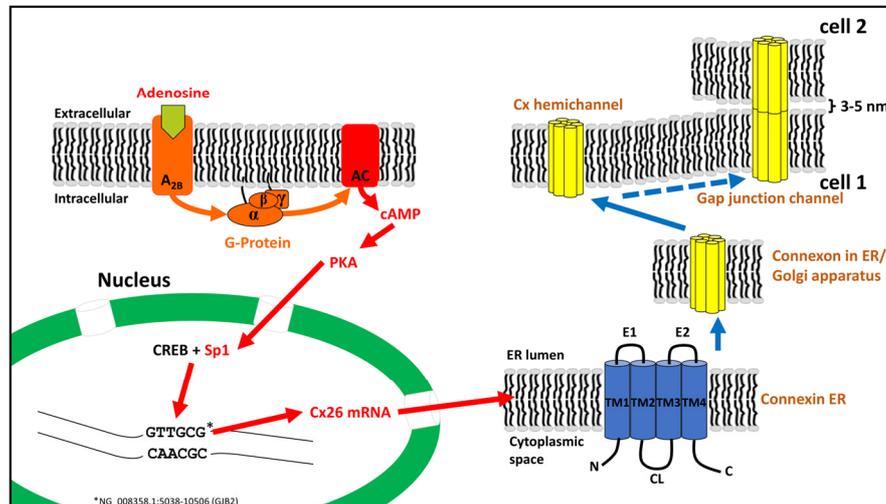


Fig. 6. Proposed mechanism of interplay between adenosine signalling and Cx26 hemichannels. The stimulation of A_{2B} adenosine receptors induces the synthesis of cAMP which activates the protein kinase A (PKA). The PKA in turn phosphorylates CREB and/or the specificity protein 1 (Sp1) resulting in an upregulation of Cx26 expression and synthesis. A proposed enhanced insertion of Cx hemichannels into the membrane leads to an increase in Cx hemichannel activity. Red labels indicate experimental confirmations.

which is one of the convincing evidences that Calu-3 cells are a suitable model for epithelial cells of the respiratory airway [33], correlated with an expression of the claudins Cld1, Cld3, Cld4, and Cld7 (Fig. 1B). These were detected in western blot experiments (Fig. 1B) as well as in immunocytochemical experiments with a prominent localisation at cell-cell borders (Fig. 1C) where they probably participated in tight junction formation [44].

Adenosine receptors are part of the purinergic signalling system, which is linked to a regulation of diverse functions in the respiratory epithelium [9, 13–16]. In our experiments we found that a 24 h treatment of Calu-3 cells with NECA, an agonist that stimulates both A_{2A} and A_{2B} adenosine receptor subtypes [40], reduced the gap junction coupling-related dye transfer (Supplementary Fig. S2) but increased the dye uptake (Fig. 4A). In the following we concentrated on the dye uptake results. Dye uptake can be achieved by activation of various channels such as pannexons formed by pannexins, P2X7 channels or Cx hemichannels called connexons [45]. At pharmacological level, connexons and pannexons are inhibited by agents such as CBX or La³⁺, but differ with respect to their sensitivity to these agents. Pannexons are already closed at low micromolar CBX concentrations while higher concentration of CBX or La³⁺ are needed for a proper inhibition of connexons [5, 46]. In our experiments we found that the dye uptake was only affected by 400 μM CBX and 1 mM La³⁺ (Fig. 2C, D and Fig. 4A). CBX concentrations of 100 μM did not affect the dye uptake rate (Supplementary Fig. S1). Taken together, these findings show that the dye uptake was related to Cx hemichannels.

NECA is an agonist of adenosine receptors that regulate cAMP synthesis by activation or inhibition of the AC. In our experiments, the NECA-related enhancement of dye uptake was accompanied by an increase of cAMP synthesis (Fig. 4C) and was suppressed by inhibition of the AC with SQ22536 (Fig. 4D), indicating that NECA affected the dye uptake by activating A_{2A} and A_{2B} adenosine receptors that stimulate the AC to synthesize cAMP. This is supported by the expression analysis that revealed that Calu-3 cells only expressed the A_{2A} and A_{2B} adenosine receptor subtypes (Fig. 4B). At mRNA level, adenosine receptor stimulation increased the cellular content of Cx26 and Cx30 mRNA (Fig. 5A) and we could also observe that Cx26 was upregulated at protein level as shown by western blotting

(Fig. 5B). Moreover, the dye uptake and its adenosine receptor-related enhancement were completely inhibited when Cx26 was knocked down using Cx26-specific siRNA (Fig. 5D). The data stress the prominent role of Cx26 in the formation of Cx hemichannels and in the Cx hemichannel-related dye uptake of the cells as response to stimulation of adenosine receptors. The finding that NECA treatment also induced an increase in mRNA and protein levels of Cx26 is further evidence that the dye uptake was due to Cx26 hemichannels. It is of interest to note the following two observations: The stimulation of adenosine receptors downregulated Cx43 expression while upregulating Cx26 expression (Fig. 5A, B). The siRNA-dependent knockdown of Cx43 increased the expression of Cx26 and was followed by an increased activity of Cx hemichannels as documented by dye uptake experiments (Fig. 5C, D). The downregulation of Cx43 as result of NECA application could probably explain the reduction of gap junction coupling observed in the NECA-treated cells (Supplementary Fig. S2), indicating that while Cx26 was predominantly involved in hemichannel activity, Cx43 was mainly responsible for intercellular gap junction coupling. Future studies should clarify this point and the link between adenosine signalling and the downregulation of Cx43 and its consequence in respiratory airway epithelial cells. The upregulation of Cx26 expression in response to Cx43 knockdown suggests an antagonistic regulation of Cx26 and Cx43 expression that should be analysed more detailed in future studies.

Through activation of the A_{2A} and A_{2B} adenosine receptors expressed in Calu-3 cells, NECA upregulated the expression and synthesis of Cx26 (Fig. 5A), which correlated with an increase of Cx26 hemichannel activity (Fig. 4A). The increase of the hemichannel activity was suppressed when the adenosine receptor stimulation took place in the presence of MRS1754, an inhibitor of the A_{2B} adenosine receptor subtype, while the A_{2A} adenosine receptor subtype inhibitor SCH58261 did not affect the NECA-related enhancement of Cx hemichannel activity (Fig. 4E). Additionally, the A_{2A} adenosine receptor agonist CGS21680 was not able to significantly increase the dye uptake, while the specific A_{2B} adenosine receptor agonist BAY60-6583 was even slightly more efficient in increasing the dye uptake rate than NECA (Fig. 4E) [40]. Moreover, an analysis of the adenosine receptor expression showed that the A_{2B} adenosine receptor was more expressed than the A_{2A} adenosine receptor on mRNA level (Fig 4B). Similar results concerning adenosine receptor expression levels were found by other authors in bronchial epithelial cells [47]. Considering the results obtained through pharmacological modulation of adenosine receptors (Fig. 4E) and the expression data (Fig. 4B) we assume that the NECA-induced enhancement of Cx26 hemichannel activity was related to the stimulation of the A_{2B} adenosine receptor subtype. This assumption was confirmed by the finding that the NECA-related enhancement of Cx hemichannel activity was suppressed when the A_{2B} adenosine receptor subtype was knocked down using specific siRNA (Fig. 4F). From this it can be assumed that adenosine signalling affects Cx26 hemichannels only via the A_{2B} adenosine receptor subtype, the adenosine receptor subtype with the highest expression level, which agreed very well with other studies revealing that the A_{2B} adenosine receptor subtype was the most abundant adenosine receptor subtype in bronchial epithelial cells [48]. However, it is also possible that the different adenosine receptor subtypes may be linked to variable cascades, thereby regulating different functions [49]. In functional analyses the A_{2B} adenosine receptor was found in the whole cell membrane in an unpolarised manner [50–52]. For the A_{2A} adenosine receptor Sun et al. (2008) proposed an apical restriction of the localisation [50], while other authors argued for a strictly basolateral localisation [51, 52]. Regardless of these contradictions, these studies assume a polarization of the A_{2A} adenosine receptor subtype. The finding suggests that the A_{2A} and A_{2B} adenosine receptors might differ in their trafficking and probably in their scaffold systems to which they are anchored and thereby can be involved in different signalling cascades. Taken together the results show for the first time that stimulation of the A_{2B} adenosine receptor may specifically enhance Cx26 hemichannel activity in epithelial cells of the respiratory airway.

Concerning the pathway by which the activation of the A_{2B} adenosine receptor increased the Cx26 hemichannel activity (Fig. 6), we showed that the enhancement of Cx26 hemichannel activity was related to the activation of the cAMP/PKA cascade (Fig. 4C, D).

This signalling pathway can affect Cx channels by phosphorylation of Cxs [27, 28]. Cx26 was previously described as a non-phosphorylated Cx [28, 53], but new data show that Cx26 can be phosphorylated [54]. However, changes in phosphorylation take place within a short time in the range of minutes while the observed enhancement of Cx26 hemichannel activity was observable after stimulation period of many hours, suggesting that dependency to Cx26 phosphorylation for the observed effects was unlikely. Activation of the cAMP/PKA cascade can also regulate Cx expression [53]. Our results showed a significant increase of Cx26 and Cx30 mRNA levels as a result of the stimulation of adenosine receptors using NECA (Fig. 5A), that was suppressed by inhibition of the PKA (Fig. 5A). An increase in the amount of specific mRNAs can be achieved by a transcriptional upregulation of the Cx26 and Cx30 genes or by a reduced mRNA degradation. We observed that the NECA-related increase of the cellular Cx26 mRNA content was antagonized by inhibition of the transcription factor Sp-1 (Fig. 5A). This result suggests that the increase of Cx26 and Cx30 mRNA content may be related to an upregulation of the respective gene transcription. Cx26 and Cx30 are encoded by the genes *GJB2* and *GJB6* in the deafness locus DFNB1 on 13q12 [55]. These genes are contiguous and co-regulation was observed in different cell types [56–58]. Interestingly, the upregulation of Cx26 correlated with a downregulation of Cx43 in Calu-3 cells (Fig. 5A). The mechanism of this finding is yet a matter of speculation. Expression of different Cxs is regulated by variable transcription factors [59]. The promoter regions of both the *GJB2* and *GJB6* gene contains binding sites of Sp1 [32, 60–63], a transcription factor which was shown to form a transcription complex with the PKA-activated cAMP response element-binding protein (CREB) [64]. Moreover, it was shown that depending on other co-expressed transcription factors, e.g. REV-ERB β , Sp1 can upregulate or downregulate Cx43 expression [65]. Since the cAMP pathway participates in the expression of transcription factors [32, 66], it is tempting to speculate this was induced by activating cAMP synthesis through stimulation of A_{2B} adenosine receptors in epithelial cells of the respiratory airway, in turn upregulating the expression and synthesis of Cx26. The increasing amount of Cx26 proteins forming Cx26 hemichannels in the cell membrane thereby leads to an increase in Cx hemichannel activity (Fig. 6).

Persistent inflammation and alteration of lung structure are symptoms of chronic respiratory diseases, which encompass various pathological conditions such as cystic fibrosis (CF), idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), COPD and asthma [67]. Adenosine is one of the mediators whose release is upregulated during inflammatory conditions of the respiratory airway epithelia [11, 21, 48]. Since we observed a possible adenosine-induced enhancement of Cx26 hemichannel activity through which intracellular molecules such as adenosine or purine nucleotides can be released, it is possible that adenosine signalling and Cx26 hemichannels interact in a vicious circle that fires and maintains the inflammation leading to detrimental effects in the tissue [19]. In this model (Fig. 6) a specific targeting of Cx26 could be a possible treatment of inflammation related diseases of the airway epithelium [23, 68].

Acknowledgements

Experiments were performed in the laboratory of A.N.. A.D, A.B. and A.N. contributed to the conception and design of the work as well as writing and revising the manuscript. A.D., T.L. and A.N. contributed to the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work. A.B. provided technical support with gold nanoparticle-mediated laser perforation/dye transfer experiments and revised the work critically. All authors have approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

The research was partly supported by the DFG project NG 4/10-1 and the BMBF project TRANS-LARA. The publication of this article was funded by the Open Access Fund of the Leibniz Universität Hannover.

Adenosinrezeptorstimulation erhöht die Aktivität von Connexin-Halbkanälen in Epithelzellen der Atemwege

Cellular Physiology and Biochemistry

Cell Physiol Biochem 2019;53:606-622

DOI: 10.33594/000000160

Published online: 25 September 2019

© 2019 The Author(s). Published by

Cell Physiol Biochem Press GmbH&Co. KG

Dierks et al.: A_{2b} Adenosine Receptors and Cx26 Hemichannels in Airway Epithelium

620

The authors thank Nadine Dilger for technical support with the Cx-specific qRT-PCR primers and Patrik Schadzek for technical support with the dye uptake experiments. The authors also thank Klaudia Grieger for assistance with the experiments.

Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- 1 Goodenough DA, Paul DL: Gap junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a002576.
- 2 Söhl G, Willecke K: Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 2004;62:228-232.
- 3 Berthoud VM, Beyer EC: Oxidative stress, lens gap junctions, and cataracts. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:339-353.
- 4 Johnson RG, Le HC, Evenson K, Loberg SW, Myslajek TM, Prabhu A, Manley AM, O'Shea C, Grunenwald H, Haddican M, Fitzgerald PM, Robinson T, Cisterna BA, Sáez JC, Liu TF, Laird DW, Sheridan JD: Connexin Hemichannels: Methods for Dye Uptake and Leakage. *J Membr Biol* 2016;249:713-741.
- 5 Sáez JC, Retamal MA, Basilio D, Bukauskas FF, Bennett MVL: Connexin-based gap junction hemichannels: Gating mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2005;1711:215-224.
- 6 Maeda S, Tsukihara T: Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:1115-1129.
- 7 Schadzek P, Schlingmann B, Schaarschmidt F, Lindner J, Koval M, Heisterkamp A, Ngezahayo A, Preller M: Data of the molecular dynamics simulations of mutations in the human connexin46 docking interface. *Data Brief* 2016;7:93-99.
- 8 Orellana JA, Sánchez HA, Schalper KA, Figueroa V, Sáez JC: Regulation of intercellular calcium signaling through calcium interactions with connexin-based channels. *Adv Exp Med Biol* 2012;740:777-794.
- 9 Droguett K, Rios M, Carreño DV, Navarrete C, Fuentes C, Villalón M, Barrera NP: An autocrine ATP release mechanism regulates basal ciliary activity in airway epithelium. *J Physiol* 2017;595:4755-4767.
- 10 Blackburn MR, Vance CO, Morschl E, Wilson CN: Adenosine receptors and inflammation, in: Wilson CN, Mustafa SJ (eds): *Adenosine receptors in health and disease; Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009, vol. 193, pp 215-269.
- 11 Fredholm BB: Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ* 2007;14:1315-1323.
- 12 Eltzschig HK: Adenosine: An old drug newly discovered. *Anesthesiology* 2009;111:904-915.
- 13 Lazarowski ER, Tarran R, Grubb BR, van Heusden CA, Okada S, Boucher RC: Nucleotide release provides a mechanism for airway surface liquid homeostasis. *J Biol Chem* 2004;279:36855-6864.
- 14 Okada SF, Nicholas RA, Kreda SM, Lazarowski ER, Boucher RC: Physiological regulation of ATP release at the apical surface of human airway epithelia. *J Biol Chem* 2006;281:22992-23002.
- 15 Allen-Gipson DS, Wong J, Spurzem JR, Sisson JH, Wyatt TA: Adenosine A_{2A} receptors promote adenosine-stimulated wound healing in bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L849-855.
- 16 Lazarowski ER, Mason SJ, Clarke L, Harden TK, Boucher RC: Adenosine receptors on human airway epithelia and their relationship to chloride secretion. *Br J Pharmacol* 1992;106:774-782.
- 17 Alam MS, Costales MG, Cavanaugh C, Williams K: Extracellular adenosine generation in the regulation of pro-inflammatory responses and pathogen colonization. *Biomolecules* 2015;5:775-792.
- 18 Zuo P, Picher M, Okada SF, Lazarowski ER, Button B, Boucher RC, Elston TC: Mathematical model of nucleotide regulation on airway epithelia. Implications for airway homeostasis. *J Biol Chem* 2008;283:26805-26819.
- 19 Freund-Michel V, Muller B, Marthan R, Savineau JP, Guibert C: Expression and role of connexin-based gap junctions in pulmonary inflammatory diseases. *Pharmacol Ther* 2016;164:105-119.
- 20 Burnstock G: Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Front Pharmacol* 2017;8:661.
- 21 Pelleg A, Schulman ES, Barnes PJ: Extracellular Adenosine 5'-Triphosphate in Obstructive Airway Diseases. *Chest* 2016;150:908-915.

Adenosinrezeptorstimulation erhöht die Aktivität von Connexin-Halbkanälen in Epithelzellen der Atemwege

Cellular Physiology and Biochemistry

Cell Physiol Biochem 2019;53:606-622

DOI: 10.33594/00000160

Published online: 25 September 2019

© 2019 The Author(s). Published by

Cell Physiol Biochem Press GmbH&Co. KG

Dierks et al.: A_{2b} Adenosine Receptors and Cx26 Hemichannels in Airway Epithelium

621

- 22 Della Latta V, Cabiati M, Rocchiccioli S, Del Ry S, Morales MA: The role of the adenosinergic system in lung fibrosis. *Pharmacol Res* 2013;76:182–189.
- 23 Caruso M, Alamo A, Crisafulli E, Raciti C, Fischella A, Polosa R: Adenosine signaling pathways as potential therapeutic targets in respiratory disease. *Expert Opin Ther Targets* 2013;17:761–772.
- 24 Cheng X, Ji Z, Tsalkova T, Mei F: Epac and PKA: A tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008;40:651–662.
- 25 Bader A, Bintig W, Begandt D, Klett A, Siller IG, Gregor C, Schaarschmidt F, Weksler B, Romero I, Couraud PO, Hell SW, Ngezahayo A: Adenosine receptors regulate gap junction coupling of the human cerebral microvascular endothelial cells hCMEC/D3 by Ca²⁺ influx through cyclic nucleotide-gated channels. *J Physiol* 2017;595:2497–2517.
- 26 Begandt D, Bintig W, Oberheide K, Schlie S, Ngezahayo A: Dipyridamole increases gap junction coupling in bovine GM-7373 aortic endothelial cells by a cAMP-protein kinase A dependent pathway. *J Bioenerg Biomembr* 2010;42:79–84.
- 27 Lampe PD, Lau AF: The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1171–1186.
- 28 Laird DW: Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochim Biophys Acta* 2005;1711:172–182.
- 29 Dukic AR, Haugen LH, Pidoux G, Leithe E, Bakke O, Taskén K: A protein kinase A-ezrin complex regulates connexin 43 gap junction communication in liver epithelial cells. *Cell Signal* 2017;32:1–11.
- 30 Ampey BC, Morschauser TJ, Lampe PD, Magness RR: Gap junction regulation of vascular tone: Implications of modulatory intercellular communication during gestation. *Adv Exp Med Biol* 2014;814:117–132.
- 31 Zhang F, Cheng J, Lam G, Jin DK, Vincent L, Hackett NR, Wang S, Young LM, Hempstead B, Crystal RG, Rafii S: Adenovirus vector E4 gene regulates connexin 40 and 43 expression in endothelial cells via PKA and PI3K signal pathways. *Circ Res* 2005;96:950–957.
- 32 Rohlff C, Ahmad S, Borellini F, Lei J, Glazer RI: Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1997;272:21137–21141.
- 33 Foster KA, Avery ML, Yazdani M, Audus KL: Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery. *Int J Pharm* 2000;208:1–11.
- 34 Zhang Y, Reenstra WW, Chidekel A: Antibacterial activity of apical surface fluid from the human airway cell line Calu-3: Pharmacologic alteration by corticosteroids and beta(2)-agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:196–202.
- 35 Shen BQ, Finkbeiner WE, Wine JJ, Mrsny RJ, Widdicombe JH: Calu-3: A human airway epithelial cell line that shows cAMP-dependent Cl⁻ secretion. *Am J Physiol* 1994;266:L493-501.
- 36 Begandt D, Bader A, Antonopoulos GC, Schomaker M, Kalies S, Meyer H, Ripken T, Ngezahayo A: Gold nanoparticle-mediated (GNOME) laser perforation: A new method for a high-throughput analysis of gap junction intercellular coupling. *J Bioenerg Biomembr* 2015;47:441–449.
- 37 Heinemann D, Schomaker M, Kalies S, Schieck M, Carlson R, Murua Escobar H, Ripken T, Meyer H, Heisterkamp A: Gold nanoparticle mediated laser transfection for efficient siRNA mediated gene knock down. *PLoS one* 2013;8:e58604.
- 38 Schadzek P, Stahl Y, Preller M, Ngezahayo A: Analysis of the dominant mutation N188T of human connexin46 (hCx46) using concatenation and molecular dynamics simulation. *FEBS Open Bio* 2019;9:840–850.
- 39 Grainger CI, Greenwell LL, Lockley DJ, Martin GP, Forbes B: Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier. *Pharm Res* 2006;23:1482–1490.
- 40 Klotz KN: Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;362:382–391.
- 41 Koval M: Claudin heterogeneity and control of lung tight junctions. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2013;75:551–567.
- 42 Eckle T, Koeppen M, Eltzschig HK: Role of extracellular adenosine in acute lung injury. *Physiology (Bethesda)* 2009;24:298–306.
- 43 Chunn JL, Young HW, Banerjee SK, Colasurdo GN, Blackburn MR: Adenosine-dependent airway inflammation and hyperresponsiveness in partially adenosine deaminase-deficient mice. *J Immunol* 2001;167:4676–4685.
- 44 Frank JA: Claudins and alveolar epithelial barrier function in the lung. *Ann NY Acad Sci* 2012;1257:175–183.

Adenosinrezeptorstimulation erhöht die Aktivität von Connexin-Halbkanälen in Epithelzellen der Atemwege

Cellular Physiology and Biochemistry

Cell Physiol Biochem 2019;53:606-622

DOI: 10.33594/000000160

© 2019 The Author(s). Published by

Published online: 25 September 2019

Cell Physiol Biochem Press GmbH&Co. KG

Dierks et al.: A_{2B} Adenosine Receptors and Cx26 Hemichannels in Airway Epithelium

622

- 45 Patel D, Zhang X, Veenstra RD: Connexin hemichannel and pannexin channel electrophysiology: How do they differ? *FEBS Lett* 2014;588:1372–1378.
- 46 Pan F, Mills SL, Massey SC: Screening of gap junction antagonists on dye coupling in the rabbit retina. *Vis Neurosci* 2007;24:609–618.
- 47 Davis CW, Lazarowski E: Coupling of airway ciliary activity and mucin secretion to mechanical stresses by purinergic signaling. *Respir Physiol Neurobiol* 2008;163:208–213.
- 48 Sun C-X, Zhong H, Mohsenin A, Morschl E, Chunn JL, Molina JG, Belardinelli L, Zeng D, Blackburn MR: Role of A_{2B} adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury. *J Clin Invest* 2006;116:2173–2182.
- 49 Gao ZG, Inoue A, Jacobson KA: On the G protein-coupling selectivity of the native A_{2B} adenosine receptor. *Biochem Pharmacol* 2018;151:201–213.
- 50 Sun Y, Wu F, Sun F, Huang P: Adenosine promotes IL-6 release in airway epithelia. *J Immunol* 2008;180:4173–4181.
- 51 Szkotak AJ, Ng AML, Man SFP, Baldwin SA, Cass CE, Young JD, Duszyk M: Coupling of CFTR-mediated anion secretion to nucleoside transporters and adenosine homeostasis in Calu-3 cells. *J Membr Biol* 2003;192:169–179.
- 52 Wang D, Sun Y, Zhang W, Huang P: Apical adenosine regulates basolateral Ca²⁺-activated potassium channels in human airway Calu-3 epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;294:C1443–1453.
- 53 Traub O, Look J, Dermietzel R, Brümmer F, Hülser D, Willecke K: Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes. *J Cell Biol* 1989;108:1039–1051.
- 54 Locke D, Bian S, Li H, Harris AL: Post-translational modifications of connexin26 revealed by mass spectrometry. *Biochem J* 2009;424:385–398.
- 55 Guilford P, Ben Arab S, Blanchard S, Leveilliers J, Weissenbach J, Belkahlia A, Petit C: A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat Genet* 1994;6:24–28.
- 56 Ortolano S, Di Pasquale G, Crispino G, Anselmi F, Mammano F, Chiorini JA: Coordinated control of connexin 26 and connexin 30 at the regulatory and functional level in the inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:18776–18781.
- 57 Boulay AC, del Castillo FJ, Giraudet F, Hamard G, Giaume C, Petit C, Avan P, Cohen-Salmon M: Hearing is normal without connexin30. *J Neurosci* 2013;33:430–434.
- 58 Kelly JJ, Abitbol JM, Hulme S, Press ER, Laird DW, Allman BL: The connexin 30 A88V mutant reduces cochlear gap junction expression and confers long-term protection against hearing loss. *J Cell Sci* 2019;132:pii:jcs224097.
- 59 Oyamada M, Takebe K, Oyamada Y: Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2013;1828:118–133.
- 60 del Castillo FJ, Del Castillo I: DFNB1 Non-syndromic Hearing Impairment: Diversity of Mutations and Associated Phenotypes. *Front Mol Neurosci* 2017;10:428.
- 61 Kiang DT, Jin N, Tu ZJ, Lin HH: Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. *Gene* 1997;199:165–171.
- 62 Tu ZJ, Kollander R, Kiang DT: Differential up-regulation of gap junction connexin 26 gene in mammary and uterine tissues: The role of Sp transcription factors. *Mol Endocrinol* 1998;12:1931–1938.
- 63 Tu ZJ, Kiang DT: Mapping and characterization of the basal promoter of the human connexin26 gene. *Biochim Biophys Acta* 1998;1443:169–181.
- 64 Mukherjee S, Sengupta Bandyopadhyay S: Mechanism of prostaglandin E₂-induced transcriptional up-regulation of Oncostatin-M by CREB and Sp1. *Biochem J* 2018;475:477–494.
- 65 Negoro H, Okinami T, Kanematsu A, Imamura M, Tabata Y, Ogawa O: Role of Rev-erba domains for transactivation of the connexin43 promoter with Sp1. *FEBS Lett* 2013;587:98–103.
- 66 Li L, Zhang Z, Peng J, Wang Y, Zhu Q: Cooperation of luteinizing hormone signaling pathways in preovulatory avian follicles regulates circadian clock expression in granulosa cell. *Mol Cell Biochem* 2014;394:31–41.
- 67 Stolzenburg LR, Harris A: The role of microRNAs in chronic respiratory disease: Recent insights. *Biol Chem* 2018;399:219–234.
- 68 Willebrords J, Maes M, Crespo Yanguas S, Vinken M: Inhibitors of connexin and pannexin channels as potential therapeutics. *Pharmacol Ther* 2017;180:144–160.

3 Die bioaktiven phenolischen Wirkstoffe Diarylether CVB2-61 und Diarylheptanoid CVB4-57 als Connexin- Halbkanalblocker

Reprinted by permission from the Multidisciplinary Digital Publishing Institute

Pharmaceuticals, Volume 15, Issue 10, 1173, 2022, DOI: 10.3390/ph15101173

The Bioactive Phenolic Agents Diaryl Ether CVB2-61 and Diarylheptanoid CVB4-57 as Connexin Hemichannel Blockers

Anne Dierks, Corinne Vanucci-Bacqué, Anne-Marie Schäfer, Tina Lehrich, Frederike Ruhe, Patrik Schadzek, Florence Bedos-Belval and Anaclet Ngezahayo

Licence number: CC BY 4.0

The final publication is available at <https://www.mdpi.com/journal/pharmaceuticals>

Contribution: I designed the experiments together with A. N., performed most of the experiments with C. V.-B., analysed the data, prepared the figures together with T. L. and wrote the manuscript together with A. N. in cooperation with F. B-B.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Article

The Bioactive Phenolic Agents Diaryl Ether CVB2-61 and Diarylheptanoid CVB4-57 as Connexin Hemichannel Blockers

Anne Dierks ¹, Corinne Vanucci-Bacqué ^{2,3}, Anne-Marie Schäfer ¹, Tina Lechrich ¹, Frederike Ruhe ¹, Patrik Schadzek ¹, Florence Bedos-Belval ^{2,3} and Anaclet Ngezahayo ^{1,4,*}

¹ Department of Cell Physiology and Biophysics, Institute of Cell Biology and Biophysics, Leibniz University Hannover, 30419 Hannover, Germany

² Laboratoire de Synthèse et Physicochimie des Molécules d'Intérêt Biologique, Université Paul Sabatier, CEDEX 9, 31062 Toulouse, France

³ CNRS, UMR 5068, Laboratoire de Synthèse et Physicochimie des Molécules d'Intérêt Biologique, CEDEX 9, 31062 Toulouse, France

⁴ Center for Systems Neuroscience (ZSN), University of Veterinary Medicine Hannover, 30559 Hannover, Germany

* Correspondence: ngezahayo@cell.uni-hannover.de; Tel.: +49-511-762-4568

Abstract: Inflammation mediators enhance the activity of connexin (Cx) hemichannels, especially in the epithelial and endothelial tissues. As potential release routes for injury signals, such as (oligo)nucleotides, Cx hemichannels may contribute to long-lasting inflammation. Specific inhibition of Cx hemichannels may therefore be a mode of prevention and treatment of long-lasting, chronic sterile inflammation. The activity of Cx hemichannels was analysed in N2A and HeLa cells transfected with human Cx26 and Cx46 as well as in Calu-3 cells, using dye uptake as functional assay. Moreover, the possible impacts of the bioactive phenolic agents CVB2-61 and CVB4-57 on the barrier function of epithelial cells was analysed using Calu-3 cells. Both agents inhibited the dye uptake in N2A cells expressing Cx26 (>5 µM) and Cx46 (>20 µM). In Calu-3 cells, CVB2-61 and CVB4-57 reversibly inhibited the dye uptake at concentrations as low as 5 µM, without affecting the gap junction communication and barrier function, even at concentrations of 20 µM. While CVB2-61 or CVB4-57 maintained a reduced dye uptake in Calu-3 cells, an enhancement of the dye uptake in response to the stimulation of adenosine signalling was still observed after removal of the agents. The report shows that CVB2-61 and CVB4-57 reversibly block Cx hemichannels. Deciphering the mechanisms of the interactions of these agents with Cx hemichannels could allow further development of phenolic compounds to target Cx hemichannels for better and safer treatment of pathologies that involve Cx hemichannels.

Keywords: connexin channels; inflammation signals; dye uptake; transepithelial electrical resistance (TEER); polyphenols; curcuminoids; Calu-3 cells



Citation: Dierks, A.; Vanucci-Bacqué, C.; Schäfer, A.-M.; Lechrich, T.; Ruhe, F.; Schadzek, P.; Bedos-Belval, F.; Ngezahayo, A. The Bioactive Phenolic Agents Diaryl Ether CVB2-61 and Diarylheptanoid CVB4-57 as Connexin Hemichannel Blockers. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1173. <https://doi.org/10.3390/ph15101173>

Academic Editor: Nuno Manuel Xavier

Received: 2 August 2022

Accepted: 15 September 2022

Published: 21 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Connexins (Cx) are membrane proteins whose most recognised function is the formation of gap junction channels that directly connect the cytoplasmic spaces of adjacent cells in tissue [1,2]. The Cx gap junction channels are large enough to allow the exchange of ions and metabolites, such as (oligo)nucleotides and peptides, up to 1.5 kDa [1,3]. Cxs also form unopposed hemichannels in the membranes of individual cells [2]. In most tissues, the activity of the Cx hemichannels is maintained at a very low level by the docking between adjacent cells that reduces the density of unopposed Cx hemichannels. Moreover, the interstitial Ca²⁺ concentration of about 2 mM strongly reduces the open probability of Cx hemichannels [4]. Due to their large pores, Cx hemichannels allow the influx of solutes from the extracellular milieu as well as the release of intracellular molecules, which may act as injury signals in the tissue [2].

Die bioaktiven phenolischen Wirkstoffe Diarylether CVB2-61 und Diarylheptanoid CVB4-57 als Connexin-Halbkanalblocker

Increased activity of Cx hemichannels has been involved in inflammation, the hallmark of various pathologies, such as atherosclerosis, neurodegenerative diseases, respiratory stress, and genetic-related disorders in different organs, as well as the age-related disabilities commonly referred to as inflamm-aging [5–9]. Cx hemichannels have also been reported as being involved in tumour development [10]. The mechanisms that lead to the increased activity of Cx hemichannels under the mentioned pathological conditions are still a matter of ongoing research. Due to experimental convenience, an increased expression of mainly Cx43 has been extensively reported [11–13]. Likewise, the link between the activity of Cx hemichannels and the pathological status is still poorly understood. For tumours, a role of Cx hemichannels as release routes for anti-oxidant [14] and survival mediators, such as bisphosphates [15], has been proposed. In the case of inflammation, the enhancement of Cx hemichannels and a resulting increase in the release of injury signals, such as (oligo)nucleotides, which may continue to trigger inflammation even after infection decay or injury repair, is one of the hypotheses that are often proposed [16,17]. In addition to the clarification of the mechanisms leading to the increased activity of Cx hemichannels, there is considerable research targeting the development of agents that block Cx hemichannels to prevent or treat various diseases [18]. An ideal blocker would be expected to: (i) selectively target the Cx hemichannels and not the gap junction channels, (ii) be isoform-specific, and (iii) not alter the tissue physiology.

Inflammation is a response to invader microbes and the substances released from them commonly known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Inflammation is also triggered when tissue is injured. In this latter case, injured cells release into tissue intracellular molecules, such as nucleotides, known as tissue injury signals, commonly called damage-associated molecular patterns (DAMPs) [19]. After binding to so-called toll-like receptors (TLR), mainly in the cell membranes of epithelial cells, the invading microorganisms and their released PAMPs may induce injury-like responses in the epithelial cells, resulting in the release of DAMPs and the activation of cytokine synthesis and secretion [20]. The released DAMPs and cytokines can act as chemoattractants and chemostimulants for immune cells, which trigger inflammation as a starting point for the removal of the invader or for injury healing [20,21].

Enhancement of the activity of Cx hemichannels in epithelial cells in response to PAMPs and DAMPs, as recently shown [12,22], may correlate with an increased release of injury signals during inflammatory events. An increased and possibly persistent enhancement of Cx hemichannels may therefore represent a detrimental response of epithelial cells to invaders and PAMPs that would continue to release DAMPs even after the decay of infection.

Polyphenols and curcuminoids are known for their anti-inflammatory activity [23]. These natural products, found in food and beverages as well as in nutrient supplements, present low toxicity and are currently tested in clinical usage mostly as complements for other anti-inflammation pharmaceuticals [24,25]. In animal models, polyphenols and curcuminoids inhibit the reactive oxygen species production or the expression and release of inflammatory cytokines by innate immune system cells [26–28]. Although these natural products exhibit poor pharmacokinetic properties, they represent a good starting point for the design of biological active agents. In the present article, we report the study of CVB2-61, a phenolic diarylether, which is a dimer of a vanillin derivate with antiatherogenic properties [6] and CVB4-57, a diarylheptanoid and a curcuminoid analogue, as specific agents to target Cx hemichannels.

2. Results

2.1. Synthesis of the Bioactive Phenolic Agents CVB2-61 and CVB4-57

CVB2-61 (Figure 1a) was synthesised as previously described [29]. CVB4-57 was obtained in three synthesis steps, starting from piperazine, involving two successive N-alkylations with (4-(2-bromoethyl)phenoxy)(tert-butyl)dimethylsilane and 2-bromo-

Die bioaktiven phenolischen Wirkstoffe Diarylether CVB2-61 und Diarylheptanoid CVB4-57 als Connexin-Halbkanalblocker

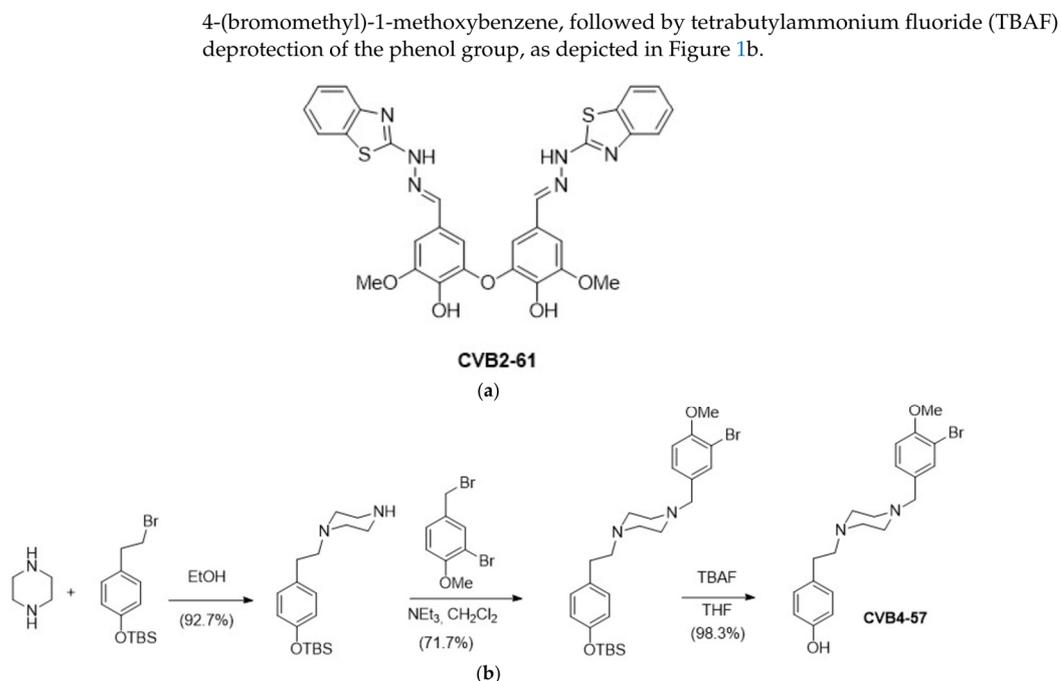


Figure 1. Chemical structure of the studied bioactive phenolic agents. (a) CVB2-61 was synthesised as previously described [29], and (b) CVB4-57 was synthesised in three steps, as depicted.

2.2. Connexin Expression in N2A and HeLa Cells

Molecular cloning was used to generate IRES vectors containing the DNA sequence of the Cx isoform Cx26 or Cx46 and GFP. We used these two Cx isoforms for their known function/ability to form Cx hemichannels *in vivo* in tissues such as the ocular lens, the skin, and the inner ear [30,31]. Additionally, a crystal structure model of Cx26 [32] is available and gives valuable information for further analysis and simulation processes [33] in common studies of the interaction mechanisms of the compounds with Cx hemichannels. To analyse their capacity to form Cx channels, the constructs were expressed in N2A and HeLa cells (Figure S1) that did not express endogenous Cxs. The IRES vector allowed a concomitant expression of GFP and Cxs. However, these two proteins were not linked together. The presence of GFP in the cytoplasmic space was used as control for a successful transfection and expression of the Cxs but did not interfere with the Cx channels' functionality. Confocal laser scanning microscopy showed a reliable expression of the proteins in the cells, with a transfection efficiency of about 35%. A similar transfection efficiency was also observed in cells transfected with a vector containing only the GFP gene (Figure S1). These latter were used as control in further analysis of the functionality of the Cx hemichannels. The expression of the Cxs was further verified by immunofluorescence staining (Figure S1). As shown in Figure S1, the Cxs were expressed and exported to the cell membrane. In some cells, Cx associations were found at the cell-to-cell contact and the cell border (Figure S1; red arrows), where they presumably formed cell-to-cell gap junction channels or Cx hemichannels. In other cells, a cytoplasmic localisation, probably in the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus of the Cxs, was observed (Figure S1; white arrows).

Die bioaktiven phenolischen Wirkstoffe Diarylether CVB2-61 und Diarylheptanoid CVB4-57 als Connexin-Halbkanalblocker

2.3. Functionality of Expressed Cx Hemichannels

In order to analyse the functionality of the Cx hemichannels formed in the membranes of transfected cells, we performed dye-uptake experiments [11,34–36]. The functionality of the Cx hemichannels was recognised as an accelerated increase in fluorescence intensity of the dye ethidium bromide (Etd) in the cells in response to the removal of external Ca^{2+} , as compared to control conditions with 2 mM external Ca^{2+} (Figure 2a). The rate of dye uptake was quantified to compare cells expressing the Cx variants with cells expressing GFP alone. The fluorescence intensity of Etd was measured in the cells and plotted vs the amount of time for which the cells were incubated with or without external Ca^{2+} . A linear regression was applied on the measured curve. The rate of dye uptake in the presence or absence of external Ca^{2+} was estimated as the slope of the linear regression in Ca^{2+} -containing and Ca^{2+} -free sectors of the experiment (Figure 2a). The rate of dye uptake in cells expressing the Cx variants and those expressing GFP alone was low when external Ca^{2+} (2 mM) was present. The removal of external Ca^{2+} showed an increased rate of dye uptake in cells expressing the Cx variants compared to cells expressing GFP alone (Figures 2b and S2b). It is worth noting that the dye-uptake rate in cells expressing GFP without Cx variants was similar to that measured in non-transfected cells (Figure S2a). As shown in Figure 2b, the rate of Etd uptake in cells expressing Cx variants together with GFP was significantly higher compared to that estimated in cells expressing GFP alone, with 3.1 ± 0.4 -fold hCx26 ($p < 0.001$) and 4.1 ± 0.5 -fold hCx46 ($p < 0.001$) in N2A cells (Figure 2b; for HeLa cells: Figure S2b). This observation constitutes evidence that even if the open probability of the hemichannels were reduced by external Ca^{2+} , the presence of Cx hemichannels in the membrane allowed an uptake of Etd in the N2A cells that was significantly higher in cells expressing Cxs compared to cells expressing GFP alone (Figure 2b). The N2A cells expressing the respective Cx provide a good basis for testing the capacity of different compounds to inhibit Cx hemichannel activity.

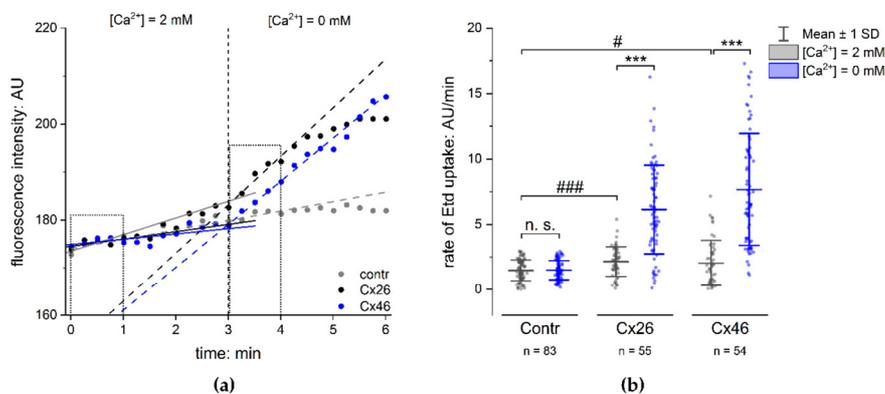


Figure 2. Dye uptake in N2A cells expressing connexins. (a) The time course of the fluorescence intensity of Etd in N2A cells transfected with GFP vector (Contr), hCx26IRES-GFP (Cx26) vector, or Cx46IRES-GFP vector (Cx46). The dots show the fluorescence intensity measured in single cells expressing only GFP (grey), Cx26 (black), and Cx46 (blue) in the presence and absence of external Ca^{2+} . Removal of external Ca^{2+} led to a rapid increase in the measured fluorescence intensity in the cells expressing Cxs, but not in the control cells, indicating an opening of the Cx hemichannels. The lines show a linear regression along the fluorescence intensity in the presence and absence of external Ca^{2+} ; the slope was used to estimate the rate of Etd uptake. (b) Rate of Etd uptake in N2A cells transfected with the Cx isoforms compared to cells expressing GFP alone (Contr). The results are given as mean \pm SD of at least three respective transfections. The number of analysed cells is given as n. One-way ANOVA was applied to estimate the statistical significance (p : # < 0.05; ***, ### < 0.001).

Die bioaktiven phenolischen Wirkstoffe Diarylether CVB2-61 und Diarylheptanoid CVB4-57 als Connexin-Halbkanalblocker

2.4. Inhibition of Cx Hemichannels

CVB2-61 and CVB4-57 were tested on cells expressing hCx26 and hCx46 (Figures 3 and S3). In presence of 5 μM CVB2-61, the dye uptake in cells expressing hCx26 decreased to $60 \pm 6\%$. An increase in the CVB2-61 concentration to 20 μM did not result in a significant increase in the effect. However, the statistical significance of the reduction in the dye-uptake rate ($p < 0.05$ for 5 μM ; $p < 0.01$ for 10 μM ; $p < 0.001$ for 20 μM) was strengthened in comparison to the control experiment without CVB2-61 (Figure 3a). For CVB4-57, a significant reduction in the dye-uptake rate ($79 \pm 17\%$) was observed even at 1 μM ($p < 0.05$) in cells expressing hCx26 (Figure 3b). Increasing the concentration to 5 μM reinforced the reduction to $50 \pm 12\%$ ($p < 0.01$). A further increase in the CVB4-57 to 20 μM induced a further reduction in the dye-uptake rate ($34 \pm 2\%$, $p < 0.001$) (Figure 3b). In N2A cells expressing Cx46, a reduction in the dye uptake of about $72 \pm 3\%$ ($p < 0.001$) was only observed at the high concentration of 20 μM for both CVB2-61 and CVB4-57 (Figure 3c,d).

In addition to N2A cells, we studied the effects of CVB2-61 and CVB4-57 on Cx channels in Calu-3 cells. In contrast to N2A cells, Calu-3 cells endogenously expressed Cxs. Calu-3 cells are epithelial cells of the human respiratory airways forming a good barrier in vitro [37], and are therefore considered an adequate model for investigating the physiological functions of the lung epithelium [11,38], as well as for the development of therapeutics for various lung diseases [39]. The ability of CVB2-61 and CVB4-57 to inhibit Cx hemichannels in Calu-3 cells was studied (Figures 4 and S4) in reference to previously published results, which showed that inflammatory signals, such as adenosine, enhanced the activity of Cx26 hemichannels in Calu-3 cells [11]. CVB2-61 or CVB4-57 (5 μM) was added to the cells at the same time as the removal of external Ca^{2+} . An inhibition of the dye uptake was then noticed (Figures 4 and S4). This effect was observed in cells that were cultivated for 24 h in presence of the adenosine analogue 5-N-Ethylcarboxamidoadenosine (NECA) as well as in cells cultivated under control conditions (Figures 4 and S4). The repression of the dye uptake was due to the presence of CVB2-61 and CVB4-57, since the removal of the agents during the dye-uptake experiments correlated with an immediate acceleration of the dye-uptake rate. In addition, the enhanced rate of dye uptake related to cultivation of the cells under stimulation of adenosine receptors using NECA was still observable after removal of the compounds CVB2-61 and CVB4-57 (Figures 4 and S4).

The above-presented results show that when applied for the short period of the dye-uptake experiment, the response of the Calu-3 cells did not differ between the compounds CVB2-61 and CVB4-57. When the compounds were applied for a long application period (24 h), the response induced by CVB2-61 differed slightly from that induced by CVB4-57. In cells cultivated in the presence of CVB2-61, the increase in the dye-uptake rate observed after the suppression of both external Ca^{2+} and CVB2-61 was reinforced compared to cells cultivated under control conditions (Figures 4a and S4). An additional enhancement was further observed in cells cultivated in the presence of CVB2-61 and NECA (Figures 4a and S4). In contrast, for cells cultivated in the presence of CVB4-57, the increase was similar to that found in cells cultivated under control conditions (Figure 4b). Correspondingly, the enhancement of the dye-uptake rate due to NECA was not affected by the presence of the CVB4-57 during the cultivation compared to cells cultivated without CVB4-57 and in the presence of NECA (Figure 4b). These different effects of CVB2-61 and CVB4-57 should be exploited to further study how they block Cx hemichannels and their overall effects in the cell.

Die bioaktiven phenolischen Wirkstoffe Diarylether CVB2-61 und Diarylheptanoid CVB4-57 als Connexin-Halbkanalblocker

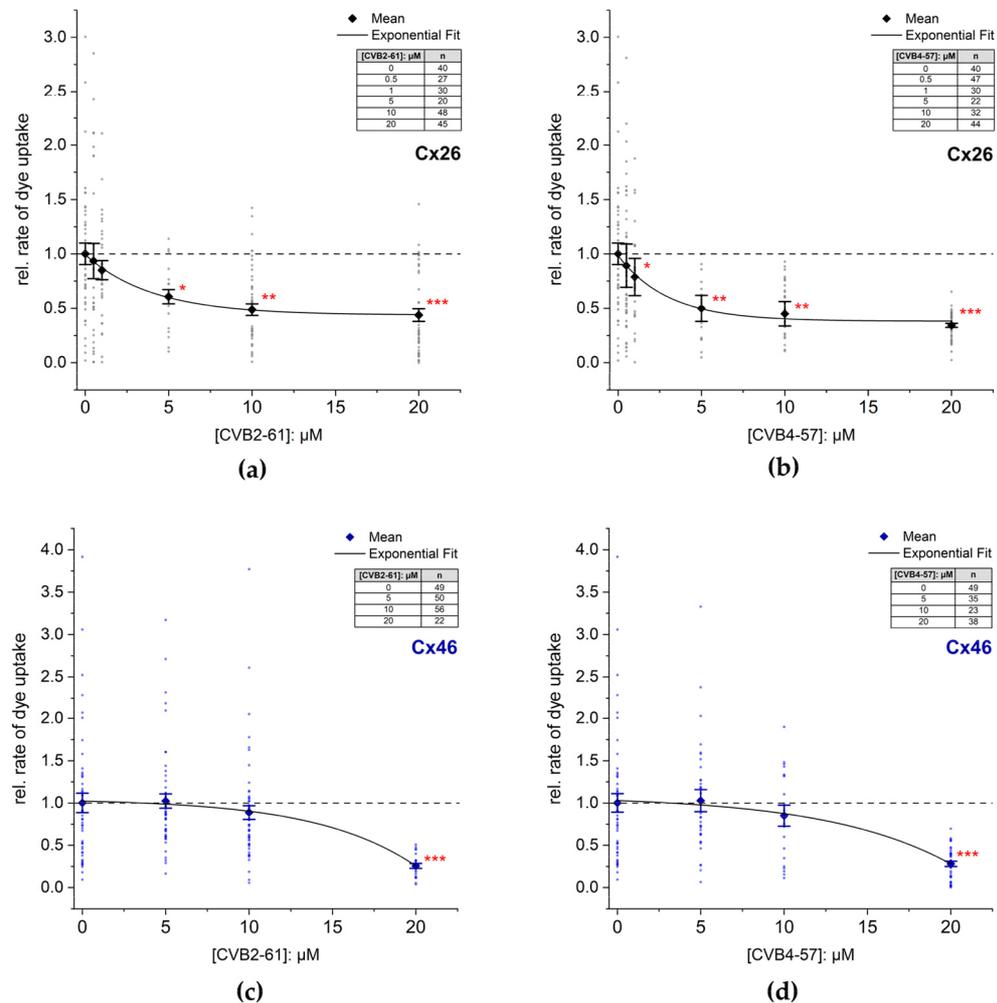


Figure 3. Inhibition of dye uptake by the agents CVB2-61 or CVB4-57. The rate of dye uptake in Cx26 (a,b) or Cx46 (c,d) expressing N2A cells was measured in Ca^{2+} free external solution in the presence or absence of the indicated concentrations of CVB2-61 (a,c) and CVB4-57 (b,d). Representative experiments indicating the time course of the dye uptake in the presence of the compounds are given in Figure S3. The data were normalised to the mean rate of dye uptake found in N2A cells expressing Cxs after removal of external Ca^{2+} and in the absence of the agents. The data are given as mean \pm SEM for at least three respective transfections. The number of cells used for each experiment is given as n. The lines were obtained by fitting the means to a single exponential function. One-way ANOVA was applied to estimate the statistical significance to the 0 μM treated cells (p : * < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001).

Die bioaktiven phenolischen Wirkstoffe Diarylether CVB2-61 und Diarylheptanoid CVB4-57 als Connexin-Halbkanalblocker

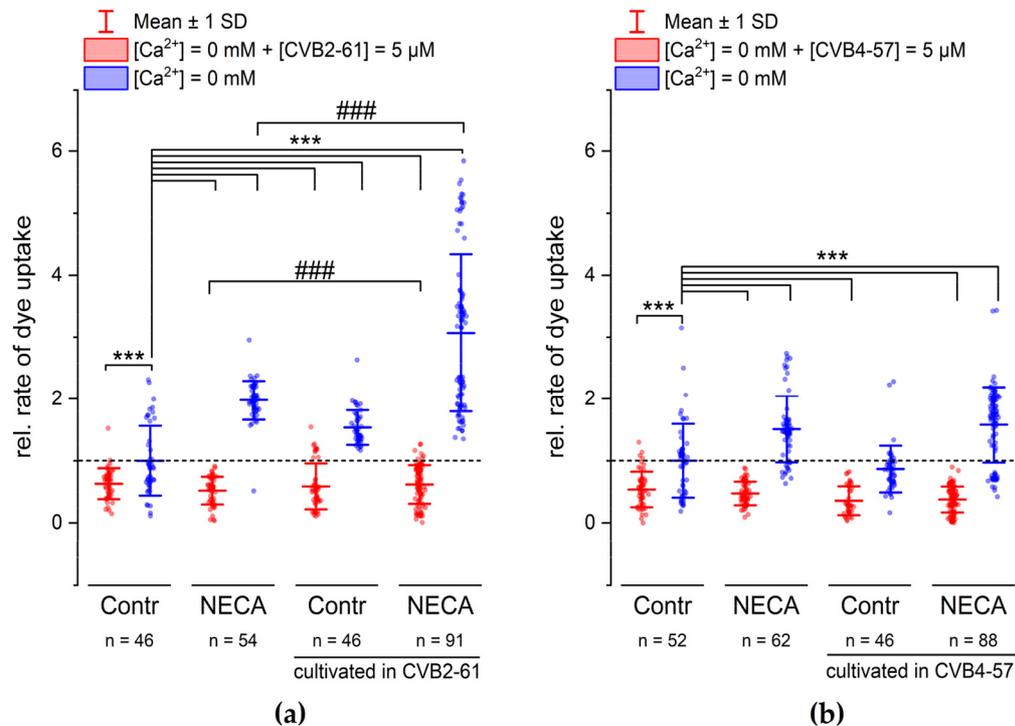


Figure 4. CVB2-61 and CVB4-57 inhibited the dye uptake in Calu-3 cells. The effect of the compounds (5 μM) (a) CVB2-61 or (b) CVB4-57 on the rate of dye uptake after removing of external Ca²⁺. When applied for the short period of the dye-uptake assay, both CVB2-61 and CVB4-57 maintained the reduced dye-uptake rate in cells cultivated under control conditions and those cultivated in the presence of NECA (24 h, 10 μM). The removing of CVB2-61 or CVB4-57 was followed by an increased dye-uptake rate. Note the enhanced dye-uptake rate observed in cells cultivated in the presence of NECA was similar to recently published results [11,40]. For cells cultivated with the compounds for 24 h, modifications of the dye-uptake rate were only observed for CVB2-61. Cells cultivated with CVB2-61 showed a significantly enhanced dye-uptake rate compared to cells cultivated under control conditions (Contr). Correspondingly, cells cultivated with CVB2-61 and NECA showed a more enhanced dye-uptake rate compared to cells cultivated with NECA alone. The data were normalised to the mean of the rate of dye uptake observed in cells cultivated under control conditions (Contr, blue box plot). The data are given as mean ± SD of at least three biological replicates; n indicates the number of analysed cell patches. A cell patch contained 5–40 cells. One-way ANOVA was applied to estimate the statistical significance (p: ***, ### < 0.001).

Many Cx channel inhibitors, such as glycyrrhetic acid (GA) and its derivate carboxolone (CBX), affect both the Cx hemichannels and the gap junction channels [40]. In addition, it was shown that GA affected the barrier function of epithelial cells [41]. Our data also show that CBX altered the barrier function at concentrations commonly used to block Cx channels (Figure 5a). In contrast, we found that neither CVB2-61 nor CVB4-57 altered the barrier function of Calu-3 monolayers cultivated in transwell inserts, as shown by measuring the transepithelial electrical resistance (TEER) by impedance spectroscopy (Figure 5a). Moreover, the agents inhibited the dye uptake, meaning they blocked the Cx hemichannels without altering the gap junction related dye transfer. Using the gold-nanoparticle-mediated laser perforation/dye transfer (GNOME-LP/DT) method as

Die bioaktiven phenolischen Wirkstoffe Diarylether CVB2-61 und Diarylheptanoid CVB4-57 als Connexin-Halbkanalblocker

described previously [11,42], we found that neither agent affected the degree of gap junction coupling, either when applied spontaneously or when applied during cultivation for 24 h (Figure 5b). Taken together, the above reported results suggest that CVB2-61 and CVB4-57 could block Cx hemichannels with minimal impact on the epithelial physiology.

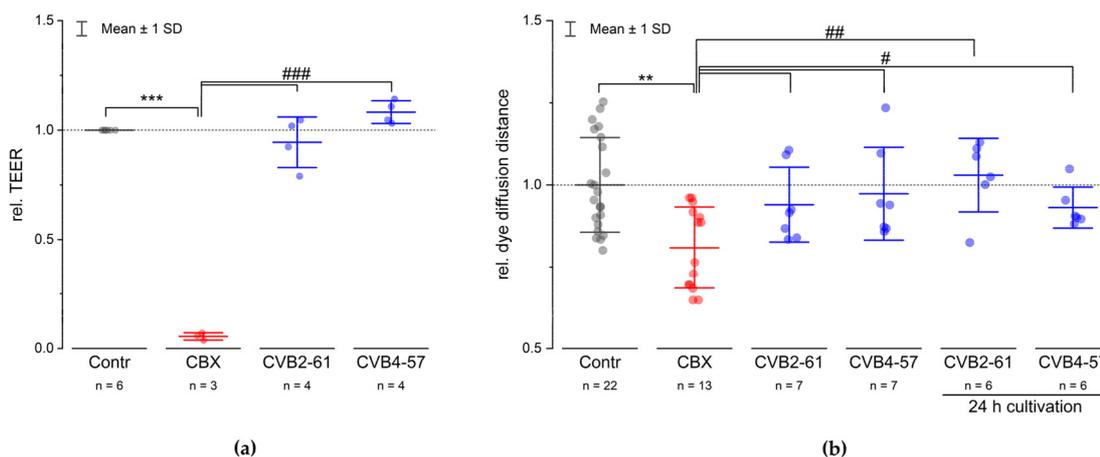


Figure 5. CVB2-61 and CVB4-57 did not affect the barrier function or gap junction communication. (a) The effect of CVB2-61 (20 μ M) and CVB4-57 (20 μ M) on the TEER of Calu-3 cells cultivated in transwell inserts with a TEER value of at least 1000 Ω cm² is shown. (b) The dye diffusion distance in the Calu-3 cells monolayer as estimated by the gold-nanoparticle-mediated laser perforation/dye transfer method (GNOMELP/ DT; [42]) in presence or absence of CVB2-61 (20 μ M) and CVB4-57 (20 μ M). Compared to the control cells, the compounds CVB2-61 and CVB4-57 did not change either the TEER value or the dye diffusion distance. Notably, even if the compounds were already present in the cells over a cultivation time of 24 h, the dye diffusion distance was not affected. In contrast, CBX (100 μ M), a commonly used inhibitor of Cx channels, strongly reduced the TEER (a), and as expected, the dye diffusion distance (b). The data were normalised to the mean of the results found in the corresponding control cells and are given as mean \pm SD of at least three respective experiments; n indicates the number technical replicates. One-way ANOVA was applied to estimate the statistical significance (*p*: ***, ### < 0.001; **, ## < 0.01; # < 0.05).

In summary, the present study shows that the agents CVB2-61 and CVB4-57 are able to reversibly block Cx hemichannels in a Cx expression system as well as in native cells without affecting the activity of the gap junction channels. In comparison, Cx26 hemichannels are more sensitive to both agents compared to Cx46.

3. Discussion

Evidence has accumulated showing that inflammation inducers such as the lipopolysaccharide (LPS) of gram negative bacteria, and injury signals such as adenosine enhance the activity of Cx hemichannels in different tissues, especially epithelial layer [11–13]. Since hemichannels are permeable to molecules that act as injury signals, the enhancement of the activity of Cx hemichannels may represent a detrimental response of cells to inflammation inducers. They may start and sustain a long-lasting inflammation that persists after the infection decays, with the risk of becoming a chronic sterile inflammation [6,13], the hallmark of various but unrelated pathological situations, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma in the respiratory system [43], or neurological degenerative diseases [6]. It was therefore proposed that compounds able to block the hemichannels could be used for the prevention and treatment of these different pathologies [18]. As Cx hemichannels are also involved in cancer development [10], inhibitors of Cx hemichannels

Die bioaktiven phenolischen Wirkstoffe Diarylether CVB2-61 und Diarylheptanoid CVB4-57 als Connexin-Halbkanalblocker

could be of interest for cancer therapy [44]. Finally, for a low general toxicity, the ideal compound should target the Cx hemichannels specifically without affecting the gap junction channels or altering the tissue physiology.

So far, various small molecules have been tested as blockers of Cx hemichannels, including the antimalarial agents quinine and mefloquine; non-steroidal anti-inflammatory drugs such as fenamates; the anaesthetic drugs propofol and ketamine; glycyrrhetic acid (GA) and its derivatives, such as carbenoxolone (CBX); alcohols such as heptanol and octanol; 2-aminoethoxydiphenyl borate; and mimetic peptides of Cx extracellular loop sequences, anti-Cx antibodies, and aminoglycoside antibiotics and their derivatives without antibiotic effects. Many small molecules and mimetic peptides mentioned above, as well as anti-Cx antibodies, only poorly distinguished between the gap junction channels and the Cx hemichannels [45,46]. However, the small molecule boldine [47] and the mimetic peptide Gap19 [48], as well as the aminoglycoside antibiotics [49,50], were shown to block Cx43 hemichannels. The mimetic peptide Gap19, designed on the basis of the Cx43 intracellular loop sequence, needs to enter the cells to function. Boldine is an alkaloid tested on Cx43 that may function without entering into the cells. Among the antibodies, a potent anti-Cx26 antibody capable of blocking Cx26 hemichannels without affecting the gap junction channels was generated [51]. With respect to antibiotics, the compound 12i, a derivative of kanamycin A, showed a selectivity toward Cx43 hemichannels compared to Cx26 hemichannels [49,52]. The previously mentioned anti-Cx26 antibody, the Gap19 mimetic peptide, and the small molecule boldine, as well as the antibiotics derivatives, show the ongoing development of compounds capable of specifically inhibiting Cx hemichannels. In the present report, we studied two agents, CVB2-61 and CVB4-57, which were able to reversibly block human Cx hemichannels in an expression system as well as in native cells (Figures 3 and 4). In Calu-3 cells (human lung epithelial cells), which are naturally expressing Cx [11], the two agents were found to not affect the gap junction coupling (Figure 5b), suggesting that they may specifically target Cx hemichannels. Moreover, Cx26 hemichannels were inhibited by the agents even at concentrations as low as 5 μ M, while a higher concentration (20 μ M) was needed to inhibit Cx46 hemichannels (Figure 3). Finally, the two agents did not appear to alter the barrier function of the epithelial cells, an important physiological aspect of the epithelium (Figure 5a).

CVB2-61 [29] is a dimer constituted by two benzothiazole-vanillin units linked together by an ether oxide bridge (Figure 1a). Due to its antioxidant, antiradical, and antiangiogenic properties, CVB2-61 is a good drug-candidate for preventing atherosclerosis [29]. CVB4-57 is an original analogue of the curcuminoids, which are known for their anti-inflammatory properties [53,54]. CVB4-57 exhibits a phenolic moiety, which may confer its radical quenching properties [55]. A piperazine core was inserted between the two aromatic moieties to replace the heptanoid chain in CVB4-57, ensuring the agent's rigidity, and finally, two nitrogen atoms were added for potential H-bond interactions with Cx amino acids (Figure 1b). Since piperazine has a well-known pharmacophore [37], a low cytotoxicity for CVB4-57 was expected.

The data presented here show that both CVB2-61 and CVB4-57, at the concentrations used, may selectively affect the Cx hemichannels without disturbing the Cx gap junction channels, either in the opened or in the closed formation (Figure 5b). Moreover, Cx26 was found to be more sensitive to the agents than Cx46 (Figure 3), suggesting that a Cx isoform specificity may be achieved. Furthermore, in Calu-3 cells treated simultaneously with the respective agent and the adenosine receptor agonist NECA for 24 hours, both agents maintained a reduced dye-uptake rate. After their removal from the cells during the experiments, the activity of the hemichannels was released and the NECA-induced enhancement of the rate of dye uptake [11] was still observed, compared to cells cultivated under control conditions (Figure 4). The NECA-related enhancement of the dye-uptake rate was shown to be linked to an increased expression of Cx26 [11]. We therefore assume that CVB2-61 and CVB4-57 did not negatively interfere with gene expression e.g., the expression of Cx26.

The action mechanisms of the agents CVB2-61 and CVB4-57 affecting the Cx hemichannels are not yet elucidated. For small molecules, such as long-chain alcohols and anaesthetics that inhibit Cx channels, an indirect effect due to induced changes in membrane fluidity has been proposed [56–58]. This may explain why these small molecules and anaesthetics do not distinguish between the gap junction channels and the Cx hemichannels. Likewise, these small molecules and anaesthetics are not expected to achieve any isoform specificity. Since the gap junction channels were not affected by neither CVB2-61 nor CVB4-57 (Figure 5b), a similar model of action to that proposed for alcohols or anaesthetics seems unlikely. Finally, some small molecules may have detrimental effects on the physiology of tissue, as revealed by the observation that GA [42] and CBX affected the barrier function (Figure 5a). The mimetic peptides, such as Gap26 and Gap27 [59], and many anti-Cx antibodies bind the extracellular domains of the Cx, and thus probably interfere with Cx hemichannel opening. Many small molecules, as well as mimetic peptides and antibodies, affect more than just the Cx hemichannels. Depending on the duration of the application, they have negative impacts on the gap junction channels. These effects on gap junction channels are spontaneous and reversible for the small molecules [45]. For mimetic peptides as well as antibodies, the effects are slow and may be related to the competition of mimetic peptides or antibodies with the docking mechanism of Cx hemichannels. With regard to the Cx isoform specificity, many anti-Cx antibodies used to close the hemichannels are mainly directed against the extracellular domains of the Cxs [45]. Similarly, many mimetic peptides were designed according to the extracellular domains of the Cxs [59]. The extracellular loops of Cxs are short and largely conserved between the Cx isoforms. In this context, the development of Cx isoform specific antibodies as well as mimetic peptides may be challenging. However, as shown by Xu et al. 2017, it is possible to develop an anti-Cx26 antibody capable of inhibiting only Cx26 [51]. Furthermore, as shown for Gap19 [48], other more specific regions of the Cx protein distinct from the extracellular domains could be considered for the design of mimetic peptides, thus allowing a better Cx-isoform specificity. The agents CVB2-61 and CVB4-57 reversibly inhibited the Cx hemichannel opening and did not affect the gap junction channels when applied for a duration of 24 h (Figure 5b). These results suggest that both CVB2-61 and CVB4-7 blocked the Cx hemichannels without competing with the docking of Cx hemichannels between the adjacent cells. Current understanding of the mode of interaction between both CVB2-61 or CVB4-57 and the Cx hemichannels still needs clarification, involving experiments far above the scope of the present report, such as crystallisation of Cx hemichannels in the presence of either agent. Finally, neither CVB2-61 nor CVB4-57 were observed to affect the barrier function of Calu-3 cells (Figure 5a), suggesting that the two compounds are non-cytotoxic. Moreover, these two small molecules may be less recognised by the immunological system. These last two aspects offer an obvious advantage in the use of these agents as tools to study the role of Cx hemichannels in the function of the epithelial barrier with the aim of developing drugs to treat diseases involving Cx hemichannels.

4. Materials and Methods

4.1. Chemical Synthesis of the Bioactive Agent CVB4-57

4.1.1. General

If not otherwise stated, the different chemicals for the synthesis of CVB4-57 were obtained from Sigma Aldrich (Sigma Aldrich S.a.r.l; Saint-Quentin-Fallavier, France). Furthermore, unless otherwise noted, all experiments were carried out under a nitrogen atmosphere. Solvents (CH_2Cl_2 and THF) were dried via a purification solvent system MB-SP-800 (MBRAUN, Garching, Germany). Melting points (mp) were obtained on a Mettler-Toledo MP50 apparatus (Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA) and are uncorrected. IR spectra were recorded on a Thermo Nicolet Nexus spectrometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). NMR spectra were recorded on Bruker Avance 300 MHz spectrometers (Bruker, Wissembourg, France). The NMR spectra were acquired in CDCl_3 , and the chemical shifts were reported in parts per million referring to CHCl_3 (δ_{H} 7.26 for proton and

Die bioaktiven phenolischen Wirkstoffe Diarylether CVB2-61 und Diarylheptanoid CVB4-57 als Connexin-Halbkanalblocker

δ_C 77.16 for carbon). Signals are described as follows: s, singlet; brs, broad signal; d, doublet; t, triplet; m, multiplet. HRMS data were recorded on a Xevo G2 QTOF instrument (Waters, Milford, MA, USA). Reactions were monitored by TLC on silica gel Alugram@Xtra SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel, Duren, Germany). Column chromatography was performed on Macherey-Nagel silica gel 0.063-0.2 mm.

4.1.2. 1-(4-((Tert-butyl dimethylsilyl)oxy)phenethyl)piperazine

To a mixture of piperazine (1.36 g, 15.86 mmol) in EtOH (5 mL) at 70 °C was added dropwise a solution of (4-(2-bromoethyl)phenoxy)(tert-butyl)dimethylsilane (500 mg, 1.58 mmol) in EtOH (5 mL). The reaction mixture was stirred at 70 °C for 4 h. After cooling to room temperature, saturated aqueous NaCl solution was added. The aqueous layer was extracted with CHCl₃ and the combined organic layers were washed with brine (4x), dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure, yielding to the expected compound (469 mg, 92.7%) as a light yellow oil, which was pure enough to be used in the next step. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.07–7.00 (m, 2H), 6.74 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 3.04–2.86 (m, 4H), 2.78–2.70 (m, 2H), 2.60–2.45 (m, 6H), 0.97 (s, 9H), 0.17 (s, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 153.7, 132.8, 129.4, 119.8, 61.2, 54.2, 45.8, 32.4, 25.6, 18.0, –4.5.

4.1.3. 1-(3-Bromo-4-methoxybenzyl)-4-(4-((tert-butyl dimethylsilyl)oxy)phenethyl)piperazine

To a solution of piperazine derivative 1 (469 mg, 1.46 mmol) in CH₂Cl₂ (15 mL) were added NEt₃ (0.3 mL, 2.2 mmol) and 2-bromo-4-(bromomethyl)-1-methoxybenzene (430 mg, 3.54 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Then, water was added, and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂/MeOH = 98:2) to provide compound 2 as a colourless oil (545 mg, 71.7%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.52 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.21 (dd, J = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 7.08–7.00 (m, 2H), 6.84 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.78–6.71 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.43 (s, 2H), 2.80–2.37 (m, 12H), 0.97 (s, 9H), 0.17 (s, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 154.8, 153.7, 133.8, 129.5, 129.1, 119.8, 111.5, 111.4, 77.2, 61.7, 60.6, 56.2, 53.1, 52.9, 32.8, 25.7, 18.1, –4.5. HRMS (DCI-CH₄) m/z for C₂₆H₄₀N₂O₂SiBr [M+H]⁺ Calcd: 519.2042, Found: 519.2016.

4.1.4. 4-(2-(4-(3-Bromo-4-methoxybenzyl)piperazin-1-yl)ethyl)phenol: CVB4-57

To an ice-cooled solution of compound 2 (545 mg, 1.05 mmol) in anhydrous THF (15 mL) was added dropwise *n*-Bu₄NF solution (1M in THF, 2.1 mL, 2.1 mmol). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 4 h. Saturated aqueous NaHCO₃ solution was added, and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO₃, water, and brine, dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography (CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂/MeOH = 95:5) to provide the expected compound as a white solid (418 mg, 98.3%). mp = 151–152 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.51 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.20 (dd, J = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.83 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.44 (s, 2H), 2.87–2.31 (m, 12H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 155.1, 154.8, 134.2, 131.3, 131.2, 129.8, 129.5, 115.8, 111.7, 111.5, 61.8, 60.7, 56.4, 52.9, 52.6, 32.3. HRMS (DCI-CH₄) m/z for C₂₀H₂₆N₂O₂Br [M]⁺ Calcd: 405.1178, Found: 405.1162. IR (KBr): ν = 3522 cm^{−1}.

4.2. Materials

Both CVB2-61 and CVB4-57 were stored at −20 °C and were solved in DMSO and stored at −20 °C used for max. 6 months. Lucifer yellow and carbenoxolone (CBX) were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) and dissolved in sodium NaCl-bath solution without Ca²⁺, composed as follows (in mM) 145 NaCl, 5.4 KCl, 1 MgCl₂, 5 glucose, 10 Hepes (295 mOsmol; pH: 7.4). The vehicle (for the compound CVB2-61 and CVB4-57) DMSO was added to control cells in all experiments at maximal

Die bioaktiven phenolischen Wirkstoffe Diarylether CVB2-61 und Diarylheptanoid CVB4-57 als Connexin-Halbkanalblocker

concentrations of 0.1%. Transfection reagent FuGENE®HD was purchased from Promega (Promega, Walldorf, Germany) and used according to the transfection protocol.

4.3. Molecular Cloning and Transfection

For this work, the expression vectors pEF1a B1-hCx26-B2-IRES-GFP and pEF1a B1-hCx46-B2-IRES-GFP [34,60] were used and constructed by gateway cloning. The genes for human connexin (hCx) isoforms hCx26 or hCx46 were cloned in the vector pEF1a, which has an IRES element between the gateway cassette and the reporter GFP. pEF1a-GFP GX [61] was a gift from John Brigande (Addgene plasmid # 45443). The Cx gene sequence insert was placed with attB sides, shown in Table 1, into a pDONR™ 221 by Gateway BP cloning. By Gateway LR cloning, the Cx gene sequence was integrated into the pEF1a-GFP. The constructs (pEF1a B1-hCx26-B2-IRES-GFP and pEF1a B1-hCx46-B2-IRES-GFP) were transformed in competent *Escherichia coli* Mach 1 cells and selected on ampicillin-containing LB, and the plasmids were extracted with the QIAprep Spin Miniprep Kit (QUIAGEN, Hilden, Germany) after protocol and controlled by sequencing. As control, the pEGFP-N1 vector was used with a CMV promoter and a gfp gene sequence.

Table 1. Primers used for the BP cloning to generate the various entry clones [34].

Primer	5'-3' Sequence
GW_BP-cloning hCx26 attB1 F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGATTGGGGCACGCT
GW_BP-cl. hCx26 stop attB2 R	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAAACTGGCTTTTTTGTACTCCAGAAC
GW_BP-cloning hCx46 attB1 F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCGACTGGAGCTTCTGG
GW_BP-cl. hCx46 stop attB2 R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGATGGCCAAGTCTCCGGT

For transfection of Neuro-2A (N2A) cells (DSMZ, Braunschweig, Germany; DSMZ no.: ACC 148) and HeLa cells (DSMZ; DSMZ no.: ACC 57) with the hCx26-IRES, hCx46-IRES, or the GFP plasmids, the cells were seeded on 5 mm diameter coverslips coated with rat collagen I and cultivated until 40% confluence. The cells were transfected with 0.9 µL FuGene HD (Promega) and 0.3 µg Plasmid DNA for 24 h in 300 µL cultivating media Dulbecco's MEM/Ham's F-12 medium (Biochrom, Berlin, Germany), and supplemented with 10% foetal calf serum (Biochrom), 1 mg/ml penicillin, and 0.1 mg/ml streptomycin (Biochrom). After 24 h, the cells were ready for the experiments.

4.4. Immunofluorescence Staining

The transfected N2A cells or HeLa cells were fixed with an acetone/methanol mix (1:2) for 5 min at −20 °C and blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in phosphate-buffered solution (PBS) for 30 min at 37 °C. The primary anti-Cx46 antibody SantaCruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Germany, sc-365394) and anti-Cx26 antibody; (Alomone labs, Jerusalem, Israel ACC-212) were used. The antibodies were diluted, respectively, 1:100 and 1:200 in PBS and added to the cells overnight at 4 °C. The secondary iFluor488™-conjugated anti-rabbit and anti-mouse antibodies (16,608 and 16,528) (AAT Bioquest, Sunnyvale, CA, USA) were diluted by 1:1000 in PBS with 2 µM 4', 6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich,) for 1 h at 37 °C. The cells were washed with PBS and stored at 4 °C. The cells were imaged with an Eclipse TE2000-E inverse confocal laser scanning microscope (Nikon, Düsseldorf, Germany) with a 60× water immersion objective and the software EZ-C1 (Version 3.80, Nikon, Düsseldorf, Germany).

4.5. Dye-Uptake Assay

The activity of Cx hemichannels was analysed by measuring the Etd uptake. The transfected N2A cells or HeLa cells as well as the Calu-3 cells (AddexBio no.: C00116001) were cultivated on coverslips coated in rat collagen I in Dulbecco's MEM/Ham's F-12 medium (Biochrom, Berlin, Germany) supplemented with 10% foetal calf serum (Biochrom, Berlin, Germany), 1 mg/ml penicillin, and 0.1 mg/ml streptomycin (Biochrom, Berlin, Germany) until 40% confluence. At this stage, Calu-3 cells had grown in patches composed

Die bioaktiven phenolischen Wirkstoffe Diarylether CVB2-61 und Diarylheptanoid CVB4-57 als Connexin-Halbkanalblocker

of 500–4000 μm^2 , with a single cell covering approximately 100 μm^2 . The coverslips were placed in a perfusion chamber containing about 400 μL NaCl bath solution (NaCl-BS) containing 121 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 6 mM NaHCO_3 , 5.5 mM glucose, 0.8 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , and 25 mM HEPES (pH 7.4, 295 mOsmol/l), and mounted on an Eclipse Ti microscope (Nikon GmbH) equipped with an Orca flash 4.0 CCD camera (Hamamatsu Photonics Germany). Regions of interest (ROIs), corresponding mostly to single cells for N2A or HeLa cells and to cell patches for Calu-3 cells, were selected. Thereafter, the cells were perfused with Etd containing NaCl-BS, as described above, and the recording of the fluorescence images was started. Fluorescent images were taken every 15 s with an exposure time of 900 ms, 40 \times or 20 \times objective, dependent on the cell type (N2A, HeLa 40 \times , Calu-3 20 \times). For acquisition analysis and storage of the images, NIS-Elements AR 4.4 software (Nikon GmbH) was used. For the superfusion of the different media onto the cells, the ISMATEC REGIO ICC peristaltic pump (Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Germany) was used to maintain a constant 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ medium flow rate. After a recording time of about 3 minutes, the cells were superfused with Etd containing NaCl-BS without Ca^{2+} . The agents CVB2-61 and CVB4-57 were tested in Ca^{2+} -free Etd containing NaCl-BS. The rate of dye uptake was estimated by considering the dye uptake within the first minute of the respective perfusion steps.

4.6. Transepithelial Electrical Resistance (TEER) Measurement

For the TEER measurements, 10^5 Calu-3 cells were seeded in transwell inserts (0.3 cm^2) with a transparent porous PET membrane with pores of: 0.4 μm in diameter (BD Falcon, Corning, Kaiserslautern, Germany) and cultivated in the same cell culture medium as described above for 3 days. Thereafter, they were transferred into the cellZscope+ (nanoAnalytics, Muenster, Germany) and placed in the cell culture incubator for a continuous monitoring of the TEER by impedance spectroscopy. After formation of a stable barrier of more than 1000 Ωcm^2 (approximately 5 days), the compounds CBX (100 μM), CVB2-61 (20 μM) and CVB4-57 (20 μM) were applied, and the resistance was monitored for further 24 h.

4.7. Gold-Nanoparticle-Mediated Laser Perforation/Dye Transfer (GNOME-LP/DT)

GNOME-LP/DT experiments were performed as previously described [11,42]. The cells were seeded at a density of 10^5 cells/well in 96-multiwell plates and cultivated for 72 h until confluence. Gold nanoparticles (AuNPs, diameter 200 nm, 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) were added 3 h before an experiment started. Cells were washed with a Ca^{2+} -free NaCl-BS, as described above. The laser permeabilisation was performed in the presence of 0.25% Lucifer yellow (LY) dissolved in Ca^{2+} -free NaCl-BS, using the laser set-up and parameters previously published [62]. In each well of a 96-multiwell plate, a line of cells was optoperforated by a 20 mW laser beam with a diameter of 60 μm and a scanning velocity of 50 mm/s. After 10 min dye diffusion time, the cells were washed with Ca^{2+} -containing bath solution and then fixed with 4% formaldehyde. In some experiments, CBX (100 μM), CVB2-61 (20 μM) or CVB4-57 (20 μM) was present during optoperforation in the dye. To automatically document the GNOME LP/DT experiments, images were obtained with an Orca Flash 4.0 camera mounted onto an Eclipse Ti microscope (Nikon, Düsseldorf, Germany) with a 10 \times objective using the NIS elements AR 4.21 software (Nikon, Düsseldorf, Germany). The tool Multipoint ND acquisition was used to generate three images with 2044 \times 2048 pixels (1348.4 \times 1351.04 μm) per well along the perforated fluorescent cell band. To analyse the diffusion distance in fluorescence plot profiles, a lab-based ImageJ plugin was used, which generated a one pic of the three images, including a background subtraction and Gaussian fitting; results with a R^2 value < 0.96 were not used.

4.8. Statistical Analyses

Experiments were repeated 3–9 times independently. All statistical analysis was performed using Microsoft Excel software (Microsoft Office 2016) and Origin software

Die bioaktiven phenolischen Wirkstoffe Diarylether CVB2-61 und Diarylheptanoid CVB4-57 als Connexin-Halbkanalblocker

(OriginLab 7.0). One-way ANOVA were performed for all studies, with $p < 0.05$ as the minimal cutoff for statistical significance. The data are given as mean with the error bars to indicate the standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM).

5. Conclusions

The present paper identifies Cx and specifically Cx26 hemichannels as targets for the bioactive phenolic agents CVB2-61 and CVB4-57. The blocking of Cx hemichannels in epithelial cells could be a way to reduce the release of DAMPs, such as nucleotides, by the epithelial cells during inflammatory events, and may represent, at least partly, the mode of the anti-inflammatory effect of phenolic agents. The results show that CVB2-61 and CVB4-57 reversibly blocked the Cx26 hemichannels without affecting the gap junction communication or the barrier function of the epithelial cells. The results suggest a role of epithelial cells and Cx hemichannels in the discussed positive effects of phenolic agents in the treatment of inflammation. In this context, CVB2-61 and CVB4-57 could be a starting point for further investigation of Cx hemichannel-based therapies for different pathologies that involve Cx hemichannels.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ph15101173/s1>. Figure S1: Expression of the connexin variants in the N2A and HeLa cells. Figure S2a: Dye uptake in N2A and HeLa cells expressing only GFP and in non-transfected cells. Figure S2b: Dye uptake in HeLa cells expressing connexins. Figure S3: Representative experiments showing inhibition of the dye uptake by CVB2-61 or CVB4-57 in N2A cells expressing Cx26 and Cx46. Figure S4: Representative experiments showing dye uptake and its inhibition by CVB2-61 or CVB4-57 in Calu-3 cells.

Author Contributions: A.N., F.B.-B., C.V.-B. and A.D. participated in research design. C.V.-B., A.D., A.-M.S. and T.L. conducted experiments. A.D., A.-M.S. and T.L. performed data analysis. A.N., F.B.-B., C.V.-B., A.D. and P.S. wrote the manuscript. The CVB2-61 and CVB4-57 for the experiments were synthesised by C.V.-B. and F.B.-B. Design and generation of the vectors for the transfection experiments were performed by P.S., F.R. and A.-M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the PhD Completion Grant programme of Hochschulbüro für ChancenVielfalt, Leibniz Universität Hannover.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article and supplementary materials.

Acknowledgments: We thank Vicky Kawalek for the GNOME-LP/ DT macro and Frank Koepke and Helma Feierabend for technical support. The publication of this article was funded by the Open Access Fund of the Leibniz Universität Hannover.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Goodenough, D.A.; Paul, D.L. Gap junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2009**, *1*, a002576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Esseltine, J.L.; Laird, D.W. Next-Generation Connexin and Pannexin Cell Biology. *Trends Cell Biol.* **2016**, *26*, 944–955. [[CrossRef](#)]
3. Maeda, S.; Tsukihara, T. Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 1115–1129. [[CrossRef](#)]
4. Sáez, J.C.; Retamal, M.A.; Basilio, D.; Bukauskas, F.F.; Bennett, M.V.L. Connexin-based gap junction hemichannels: Gating mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1711*, 215–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Huang, X.; Su, Y.; Wang, N.; Li, H.; Li, Z.; Yin, G.; Chen, H.; Niu, J.; Yi, C. Astroglial Connexins in Neurodegenerative Diseases. *Front. Mol. Neurosci.* **2021**, *14*, 657514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Orellana, J.A.; von Bernhardi, R.; Giaume, C.; Sáez, J.C. Glial hemichannels and their involvement in aging and neurodegenerative diseases. *Rev. Neurosci.* **2012**, *23*, 163–177. [[CrossRef](#)]
7. Ramadan, R.; Vromans, E.; Anang, D.C.; Goetschalckx, I.; Hoorelbeke, D.; Decrock, E.; Baatout, S.; Leybaert, L.; Aerts, A. Connexin43 Hemichannel Targeting With TAT-Gap19 Alleviates Radiation-Induced Endothelial Cell Damage. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Die bioaktiven phenolischen Wirkstoffe Diarylether CVB2-61 und Diarylheptanoid CVB4-57 als Connexin-Halbkanalblocker

8. Pfenniger, A.; Chanson, M.; Kwak, B.R. Connexins in atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 157–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Willebrords, J.; Crespo Yanguas, S.; Maes, M.; Decrock, E.; Wang, N.; Leybaert, L.; Kwak, B.R.; Green, C.R.; Cogliati, B.; Vinken, M. Connexins and their channels in inflammation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2016**, *51*, 413–439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Schalper, K.A.; Carvajal-Hausdorf, D.; Oyarzo, M.P. Possible role of hemichannels in cancer. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Dierks, A.; Bader, A.; Lehrich, T.; Ngezahayo, A. Stimulation of the A2B Adenosine Receptor Subtype Enhances Connexin26 Hemichannel Activity in Small Airway Epithelial Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **2019**, *53*, 606–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. García-Vega, L.; O’Shaughnessy, E.M.; Jan, A.; Bartholomew, C.; Martin, P.E. Connexin 26 and 43 play a role in regulating proinflammatory events in the epidermis. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 15594–15606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Mugisho, O.O.; Green, C.R.; Kho, D.T.; Zhang, J.; Graham, E.S.; Acosta, M.L.; Rupenthal, I.D. The inflammasome pathway is amplified and perpetuated in an autocrine manner through connexin43 hemichannel mediated ATP release. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2018**, *1862*, 385–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Liu, J.; Riquelme, M.A.; Li, Z.; Li, Y.; Tong, Y.; Quan, Y.; Pei, C.; Gu, S.; Jiang, J.X. Mechanosensitive collaboration between integrins and connexins allows nutrient and antioxidant transport into the lens. *J. Cell Biol.* **2020**, *219*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Plotkin, L.I. Connexin 43 hemichannels and intracellular signaling in bone cells. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Vinken, M. Connexin hemichannels: Novel mediators of toxicity. *Arch. Toxicol.* **2015**, *89*, 143–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Wang, N.; de Bock, M.; Decrock, E.; Bol, M.; Gadicherla, A.; Vinken, M.; Rogiers, V.; Bukauskas, F.F.; Bultynck, G.; Leybaert, L. Paracrine signaling through plasma membrane hemichannels. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 35–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Buratto, D.; Donati, V.; Zonta, F.; Mammano, F. Harnessing the therapeutic potential of antibodies targeting connexin hemichannels. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2021**, *1867*, 166047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Tang, D.; Kang, R.; Coyne, C.B.; Zeh, H.J.; Lotze, M.T. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol. Rev.* **2012**, *249*, 158–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Burgoyne, R.A.; Fisher, A.J.; Borthwick, L.A. The Role of Epithelial Damage in the Pulmonary Immune Response. *Cells* **2021**, *10*, 2763. [[CrossRef](#)]
21. Johnston, S.L.; Goldblatt, D.L.; Evans, S.E.; Tuvim, M.J.; Dickey, B.F. Airway Epithelial Innate Immunity. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 749077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. de Vuyst, E.; Decrock, E.; Bock, M.d.; Yamasaki, H.; Naus, C.C.; Evans, W.H.; Leybaert, L. Connexin hemichannels and gap junction channels are differentially influenced by lipopolysaccharide and basic fibroblast growth factor. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 34–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Li, C.; Miao, X.; Li, F.; Adhikari, B.K.; Liu, Y.; Sun, J.; Zhang, R.; Cai, L.; Liu, Q.; Wang, Y. Curcuminoids: Implication for inflammation and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Phytother. Res.* **2019**, *33*, 1302–1317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. He, Y.; Yue, Y.; Zheng, X.; Zhang, K.; Chen, S.; Du, Z. Curcumin, inflammation, and chronic diseases: How are they linked? *Molecules* **2015**, *20*, 9183–9213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Salehi, B.; Stojanović-Radić, Z.; Matejić, J.; Sharifi-Rad, M.; Anil Kumar, N.V.; Martins, N.; Sharifi-Rad, J. The therapeutic potential of curcumin: A review of clinical trials. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *163*, 527–545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Estornut, C.; Milara, J.; Bayarri, M.A.; Belhadj, N.; Cortijo, J. Targeting Oxidative Stress as a Therapeutic Approach for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 794997. [[CrossRef](#)]
27. Liu, Z.; Ying, Y. The Inhibitory Effect of Curcumin on Virus-Induced Cytokine Storm and Its Potential Use in the Associated Severe Pneumonia. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 479. [[CrossRef](#)]
28. Yahfoufi, N.; Alsadi, N.; Jambi, M.; Matar, C. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients* **2018**, *10*, 1618. [[CrossRef](#)]
29. Vanucci-Bacqué, C.; Camare, C.; Carayon, C.; Bernis, C.; Baltas, M.; Nègre-Salvayre, A.; Bedos-Belval, F. Synthesis and evaluation of antioxidant phenolic diaryl hydrazones as potent antiangiogenic agents in atherosclerosis. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 3571–3578. [[CrossRef](#)]
30. Beyer, E.C.; Berthoud, V.M. Connexin hemichannels in the lens. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Sellitto, C.; Li, L.; White, T.W. Connexin hemichannel inhibition ameliorates epidermal pathology in a mouse model of keratitis ichthyosis deafness syndrome. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 24118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Maeda, S.; Nakagawa, S.; Suga, M.; Yamashita, E.; Oshima, A.; Fujiyoshi, Y.; Tsukihara, T. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature* **2009**, *458*, 597–602. [[CrossRef](#)]
33. Schadzek, P.; Schlingmann, B.; Schaarschmidt, F.; Lindner, J.; Koval, M.; Heisterkamp, A.; Ngezahayo, A.; Preller, M. Data of the molecular dynamics simulations of mutations in the human connexin46 docking interface. *Data Brief* **2016**, *7*, 93–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Schadzek, P.; Hermes, D.; Stahl, Y.; Dilger, N.; Ngezahayo, A. Concatenation of Human Connexin26 (hCx26) and Human Connexin46 (hCx46) for the Analysis of Heteromeric Gap Junction Hemichannels and Heterotypic Gap Junction Channels. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2742. [[CrossRef](#)]
35. Schalper, K.A.; Palacios-Prado, N.; Retamal, M.A.; Shoji, K.F.; Martínez, A.D.; Sáez, J.C. Connexin hemichannel composition determines the FGF-1-induced membrane permeability and free Ca²⁺ responses. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 3501–3513. [[CrossRef](#)]

Die bioaktiven phenolischen Wirkstoffe Diarylether CVB2-61 und Diarylheptanoid CVB4-57 als Connexin-Halbkanalblocker

36. Johnson, R.G.; Le, H.C.; Evenson, K.; Loberg, S.W.; Myslajek, T.M.; Prabhu, A.; Manley, A.-M.; O'Shea, C.; Grunenwald, H.; Haddican, M.; et al. Connexin Hemichannels: Methods for Dye Uptake and Leakage. *J. Membr. Biol.* **2016**, *249*, 713–741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Zhu, Y.; Chidekel, A.; Shaffer, T.H. Cultured human airway epithelial cells (calu-3): A model of human respiratory function, structure, and inflammatory responses. *Crit. Care Res. Pract.* **2010**, *2010*, 394578. [[CrossRef](#)]
38. Kreft, M.E.; Jerman, U.D.; Lasič, E.; Hevir-Kene, N.; Rižner, T.L.; Peternel, L.; Kristan, K. The characterization of the human cell line Calu-3 under different culture conditions and its use as an optimized in vitro model to investigate bronchial epithelial function. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *69*, 1–9. [[CrossRef](#)]
39. Foster, K.A.; Avery, M.L.; Yazdani, M.; Audus, K.L. Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2000**, *208*, 1–11. [[CrossRef](#)]
40. Buckley, C.; Zhang, X.; Wilson, C.; McCarron, J.G. Carbenoxolone and 18 β -glycyrrhetic acid inhibit inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated endothelial cell calcium signalling and depolarise mitochondria. *Br. J. Pharmacol.* **2021**, *178*, 896–912. [[CrossRef](#)]
41. Malekinejad, M.; Pashae, M.R.; Malekinejad, H. 18 β -Glycyrrhetic acid altered the intestinal permeability in the human Caco-2 monolayer cell model. *Eur. J. Nutr.* **2022**, *61*, 3437–3447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Begandt, D.; Bader, A.; Antonopoulos, G.C.; Schomaker, M.; Kalies, S.; Meyer, H.; Ripken, T.; Ngezahayo, A. Gold nanoparticle-mediated (GNOME) laser perforation: A new method for a high-throughput analysis of gap junction intercellular coupling. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2015**, *47*, 441–449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Arzola-Martínez, L.; Benavente, R.; Vega, G.; Ríos, M.; Fonseca, W.; Rasky, A.J.; Morris, S.; Lukacs, N.W.; Villalón, M.J. Blocking ATP-releasing channels prevents high extracellular ATP levels and airway hyperreactivity in an asthmatic mouse model. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2021**, *321*, L466–L476. [[CrossRef](#)]
44. Zhang, J.; O'Carroll, S.J.; Henare, K.; Ching, L.-M.; Ormonde, S.; Nicholson, L.F.B.; Danesh-Meyer, H.V.; Green, C.R. Connexin hemichannel induced vascular leak suggests a new paradigm for cancer therapy. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 1365–1371. [[CrossRef](#)]
45. Bodendiek, S.B.; Raman, G. Connexin modulators and their potential targets under the magnifying glass. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 4191–4230. [[CrossRef](#)]
46. Willebrords, J.; Maes, M.; Crespo Yanguas, S.; Vinken, M. Inhibitors of connexin and pannexin channels as potential therapeutics. *Pharmacol. Ther.* **2017**, *180*, 144–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Yi, C.; Ezan, P.; Fernández, P.; Schmitt, J.; Sáez, J.C.; Giaume, C.; Koulakoff, A. Inhibition of glial hemichannels by boldine treatment reduces neuronal suffering in a murine model of Alzheimer's disease. *Glia* **2017**, *65*, 1607–1625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Abudara, V.; Bechberger, J.; Freitas-Andrade, M.; de Bock, M.; Wang, N.; Bultynck, G.; Naus, C.C.; Leybaert, L.; Giaume, C. The connexin43 mimetic peptide Gap19 inhibits hemichannels without altering gap junctional communication in astrocytes. *Front. Cell. Neurosci.* **2014**, *8*, 306. [[CrossRef](#)]
49. Fiori, M.C.; Krishnan, S.; Kjellgren, A.; Cuello, L.G.; Altenberg, G.A. Inhibition by Commercial Aminoglycosides of Human Connexin Hemichannels Expressed in Bacteria. *Molecules* **2017**, *22*, 2063. [[CrossRef](#)]
50. Natha, C.M.; Vemulapalli, V.; Fiori, M.C.; Chang, C.-W.T.; Altenberg, G.A. Connexin hemichannel inhibitors with a focus on aminoglycosides. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2021**, *1867*, 166115. [[CrossRef](#)]
51. Xu, L.; Carrer, A.; Zonta, F.; Qu, Z.; Ma, P.; Li, S.; Ceriani, F.; Buratto, D.; Crispino, G.; Zorzi, V.; et al. Design and Characterization of a Human Monoclonal Antibody that Modulates Mutant Connexin 26 Hemichannels Implicated in Deafness and Skin Disorders. *Front. Mol. Neurosci.* **2017**, *10*, 298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. AlFindee, M.N.; Subedi, Y.P.; Fiori, M.C.; Krishnan, S.; Kjellgren, A.; Altenberg, G.A.; Chang, C.-W.T. Inhibition of Connexin Hemichannels by New Amphiphilic Aminoglycosides without Antibiotic Activity. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 697–701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Costantino, V.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Perinu, C.; Teta, R.; Panza, E.; Ianaro, A. Tedarenes A and B: Structural and stereochemical analysis of two new strained cyclic diarylheptanoids from the marine sponge *Tedania ignis*. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 6377–6383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Maurent, K.; Vanucci-Bacqué, C.; Baltas, M.; Nègre-Salvayre, A.; Augé, N.; Bedos-Belval, F. Synthesis and biological evaluation of diarylheptanoids as potential antioxidant and anti-inflammatory agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *144*, 289–299. [[CrossRef](#)]
55. Kumar, N.; Goel, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol. Rep. (Amst)* **2019**, *24*, e00370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Enders, O.; Ngezahayo, A.; Wiechmann, M.; Leisten, F.; Kolb, H.-A. Structural calorimetry of main transition of supported DMPC bilayers by temperature-controlled AFM. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 2522–2531. [[CrossRef](#)]
57. Takens-Kwak, B.R.; Jongasma, H.J.; Rook, M.B.; van Ginneken, A.C. Mechanism of heptanol-induced uncoupling of cardiac gap junctions: A perforated patch-clamp study. *Am. J. Physiol.* **1992**, *262*, C1531–8. [[CrossRef](#)]
58. Bastiaanse, E.M.; Jongasma, H.J.; van der Laarse, A.; Takens-Kwak, B.R. Heptanol-induced decrease in cardiac gap junctional conductance is mediated by a decrease in the fluidity of membranous cholesterol-rich domains. *J. Membr. Biol.* **1993**, *136*, 135–145. [[CrossRef](#)]
59. Evans, W.H.; Boitano, S. Connexin mimetic peptides: Specific inhibitors of gap-junctional intercellular communication. *Biochem. Soc. Trans.* **2001**, *29*, 606–612. [[CrossRef](#)]
60. Schadzek, P.; Stahl, Y.; Preller, M.; Ngezahayo, A. Analysis of the dominant mutation N188T of human connexin46 (hCx46) using concatenation and molecular dynamics simulation. *FEBS Open Bio* **2019**, *9*, 840–850. [[CrossRef](#)]

Die bioaktiven phenolischen Wirkstoffe Diarylether CVB2-61 und Diarylheptanoid CVB4-57 als Connexin-Halbkanalblocker

61. Gubbels, S.P.; Woessner, D.W.; Mitchell, J.C.; Ricci, A.J.; Brigande, J.V. Functional auditory hair cells produced in the mammalian cochlea by in utero gene transfer. *Nature* **2008**, *455*, 537–541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Heinemann, D.; Schomaker, M.; Kalies, S.; Schieck, M.; Carlson, R.; Murua Escobar, H.; Ripken, T.; Meyer, H.; Heisterkamp, A. Gold nanoparticle mediated laser transfection for efficient siRNA mediated gene knock down. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58604. [[CrossRef](#)]

4 Diskussion und Ausblick

Cx-Halbkanäle und Gap Junctions spielen mehrere zentrale Rollen während der regulierten Entzündungsreaktion und Gewebeerneuerung in der Lunge. Verschiedene Pathologien können die normalen Kommunikationswege, die für eine ordnungsgemäße Lungenfunktion erforderlich sind, stören, darunter akute Lungenverletzungen, Asthma, zystische Fibrose, chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD), Lungenfibrose und Krebs (Losa et al. 2011). Bisherige Studien zeigten, dass chronische Lungenerkrankungen aus einem dauerhaft erhöhten Adenosinpiegel und dadurch anhaltend stimulierten Adenosinrezeptor resultieren können (Blackburn et al. 2000; Sun et al. 2006). Daraus lässt sich ein Zusammenspiel zwischen der Adenosinrezeptorstimulation und einer abnormalen Funktion von Cx-Kanälen in der Lunge ableiten, welches in dieser Arbeit untersucht wurde. Dabei wurde der erste Fokus daraufgelegt, inwieweit ein Adenosinrezeptor-Agonist die Cx-Kanäle in Lungenepithelzellen beeinflusst. Hierbei wurde der Fokus auf die Cx-Halbkanäle gelegt und die Cx-Halbkanal-bildende Isoform bestimmt. Weiter wurde der stimulierte Adenosinrezeptor-Subtyp bestimmt. Nach Ermittlung einer A_{2B} Adenosinrezeptor-abhängigen Erhöhung der Cx26-Halbkanalaktivität wurde ein möglicher, zugrundeliegender Signalweg analysiert (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Der zweite Fokus der Arbeit umfasste die Ermittlung und Anwendbarkeit von zwei potenten polyphenolischen Cx-Halbkanalblockern, CVB2-61 und CVB4-57. Diese dienten als Cx-26 Halbkanalinhibitoren für die durch die A_{2B} Adenosinrezeptorstimulation erhöhte Cx26-Halbkanalaktivität (Kapitel 3, Dierks et al. 2022), welche zukünftig bei den oben genannten Erkrankungen als mögliche Therapeutika eingesetzt werden könnten.

4.1 Durch welche Mechanismen können Adenosinrezeptorsignale die Aktivität der Connexin 26-Halbkanäle erhöhen?

In Calu-3-Zellen führte die Stimulation der Adenosinrezeptoren durch den Adenosinrezeptor-Agonisten 5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin (NECA) zu einer erhöhten Farbstoffaufnahme, was auf eine erhöhte Cx-Halbkanalaktivität schließen lässt (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). In quantitativen *real time* Polymerasekettenreaktion(qPCR)-Experimenten konnte eine erhöhte *GJB2*-Expression und in Western-

Blot-Experimenten eine erhöhte Cx26-Proteinexpression beobachtet werden (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Nach dem Einsatz von Cx26-spezifischer siRNA in Calu-3-Zellen führte die Stimulation des Adenosinrezeptors nicht mehr zu einer erhöhten Halbkanalaktivität (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Daher wurde angenommen, dass die erhöhte Halbkanalaktivität nach Adenosinrezeptorstimulation auf die Cx26-Halbkanäle zurückzuführen ist. Welche Mechanismen zu einer Erhöhung der Cx26-Halbkanalaktivität führen können, soll im Folgenden geklärt werden.

Eine molekular-dynamische Simulationen der Struktur für offene Cx26-Halbkanäle zeigte, dass ko- und posttranslationale Modifikationen von Cx26-Halbkanälen eine wichtige physiologische Rolle spielen, indem sie die Leitfähigkeit und Ionenselektivität von Cx26-Kanälen definieren (Kwon et al. 2011). Mehrere Cx-Isoformen sind Phosphoproteine (Nielsen et al. 2012), Veränderungen in ihrem Phosphorylierungszustand können an der Regulierung der Öffnungswahrscheinlichkeit ihrer Halbkanäle beteiligt sein (Laird 2005; Laird et al. 1991). Cx26 wurde früher als nicht-phosphoryliertes Cx beschrieben (Laird 2005). Jedoch wurde später in der Arbeit von Locke et al. (2009) Cx26 aus transfizierten, nicht endogen Cx-exprimierenden Zellen, mittels Massenspektrometrie analysiert, wobei eine Reihe von posttranslationalen Modifikationen, einschließlich Phosphorylierung, festgestellt wurden. In dieser Arbeit zeigten Ergebnisse, durch die pharmakologische Inhibierung der PKA, dass die erhöhte Cx26-Halbkanalaktivität PKA-abhängig ist (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Die PKA ist in der Lage, Cx zu phosphorylieren (Laird 2005). Es gibt keine Untersuchungen in dieser Arbeit bezüglich des Phosphorylierungszustandes von Cx26 nach Adenosinrezeptorstimulation. Allerdings finden Phosphorylierungsvorgänge innerhalb von Minuten statt, während der von uns beobachtete Mechanismus erst nach Stunden aufgezeigt werden konnte (Kapitel 2, Dierks et al. 2019), was die Phosphorylierung von Cx26 zur Erhöhung der Cx-Halbkanalaktivität unwahrscheinlich macht.

Ein weiterer Parameter für die Cx-Halbkanalaktivität ist die Anzahl und Dichte der verfügbaren Halbkanäle in der Membran. Diese kann durch verschiedene Faktoren erhöht werden. Eine Möglichkeit dafür wäre die Remodellierung von bereits bestehenden Cx-Halbkanälen aus Gap Junction in der Membran in polarisierten Zellen an die apikale (luminale) Seite in sogenannten Plaques. Die Remodellierung könnte zu einer verminderten Gap Junction-Kopplung führen, da aus den bestehenden Gap Junctions Cx-Halbkanäle würden. Ein Remodellierungseffekt in der Membran wurde in dieser Arbeit nicht gezeigt, allerdings zeigten ergänzende Ergebnisse dieser Arbeit eine verminderte Gap Junction-Kopplung in Calu-3-Zellen nach einer Stimulation

mit NECA (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Die Remodellierung ist erwähnenswert, da neue unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe eine erhöhte Cx26-abhängige Halbkanalaktivität innerhalb weniger Stunden in Calu-3-Zellen nach Toll-like-Rezeptorstimulation mit LPS zeigten. In diesem Fall war eine erhöhte *GJB2* mRNA- und/oder Cx26-Proteinmenge bisher nicht nachweisbar. Dies legt die Vermutung nahe, dass die beiden genannten Regulationsmechanismen, wie Phosphorylierung und Remodellierung an der Erhöhung der Cx-Halbkanalaktivität während der Stimulation mit LPS beteiligt sein könnten.

Eine weitere Möglichkeit, die Cx-Halbkanalaktivität zu erhöhen, wäre eine erhöhte Dichte an Cx-Halbkanälen in der Membran, durch Cx-Expression und Bildung von mehr Cx-Halbkanälen. In dieser Arbeit wurde in qPCR-Experimenten eine erhöhte *GJB2*-Expression und in Western-Blot-Experimenten eine erhöhte Cx26-Proteinmenge nach Adenosinrezeptorstimulation durch den Agonisten NECA gezeigt (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Somit wurde ein Regulationsmechanismus vermutet, der über eine erhöhte Cx26-Expression zu einer erhöhten Cx26-Halbkanalaktivität nach Adenosinrezeptorstimulation führte (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Ein cAMP/PKA-abhängiger Anstieg der *GJB2* mRNA-Expression nach Stimulation des Adenosinrezeptors wurde durch mehrere Ergebnisse aufgezeigt (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Zum einen wurde gezeigt, dass sich die intrazelluläre cAMP-Konzentration in Calu-3-Zellen nach Adenosinrezeptorstimulation durch NECA signifikant erhöhte (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Zum anderen zeigten Experimente mit Rp-cAMPS, ein cAMP-Antagonisten und PKA-Inhibitor (Gjertsen et al. 1995) nach der Kultivierung der Calu-3-Zellen mit NECA, dass die *GJB2*-mRNA-Expression auf Kontrollniveau verblieb (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Dies bestätigte die Bedeutung von cAMP/PKA für die *GJB2*-mRNA-Expression. Die Möglichkeit, dass die PKA als Kinase den Transkriptionsfaktor CREB phosphoryliert und somit eine Regulierung der Cx-Genexpression ermöglicht (Zhang et al. 2005), liegt nahe, wurde aber in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Farbstoffaufnahmeexperimente zeigten eine Cx26-abhängige Erhöhung der Cx-Halbkanalaktivität durch NECA (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Daher wurde die Rolle des Transkriptionsfaktors Sp1, der als Transkriptionsfaktor für das *GJB2*-Gen beschrieben wurde, untersucht (Oyamada et al. 2005; Oyamada et al. 2013). In dieser Arbeit wurde Withaferin A als Sp1-Inhibitor (Prasanna Kumar et al. 2009) zusammen mit NECA verwendet. Nach Kultivierung von Calu-3-Zellen mit dem Sp1-Inhibitor und dem Adenosinrezeptor-Agonisten lag die Expression von *GJB2*-mRNA auf Kontrollniveau, was die Relevanz von Sp1 als Transkriptionsfaktor in diesem Signalweg verdeutlichte (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Die Promotorregionen sowohl der *GJB2*- als auch der *GJB6*-Gene enthalten

Bindungsstellen für Sp1 (Del Castillo und Del Castillo 2017; Oyamada et al. 2005; Oyamada et al. 2013). Die Ergebnisse zeigten, dass die Transkription der Gene *GJB2* und *GJB6* nach der Behandlung mit NECA hochreguliert wurden (Kapitel 2, Dierks et al. 2019), was auf eine Kontrolle der Gentranskription in diesem Signalweg hinweist, denn beide Gene befinden sich im Taubheitslocus *DFNB1* auf dem menschlichen Chromosom 13 Arm q Band 12 (Guilford et al. 1994) und es wurde gezeigt, dass sie zusammenhängen und ko-reguliert sind (Ortolano et al. 2008).

Da gezeigt wurde das der cAMP-Signalweg an der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren beteiligt ist (Rohlf et al. 1997), liegt die Vermutung nahe, dass die Transkriptionsfaktoren Sp1 und CREB durch eine cAMP-Synthese nach Stimulation der Adenosinrezeptoren in Calu-3-Zellen aktiviert wurden. Ein cAMP/PKA-Komplex führte folglich über den Transkriptionsfaktor Sp1 und vermutlich CREB zu einer Hochregulierung der *GJB2*-Expression und damit einer vermehrten Synthese von Cx26-Protein. Der Anstieg des Cx26-Proteins führte zur Bildung von Cx26-Halbkanälen in der Zellmembran, was in einer signifikanten Zunahme der Cx26-Halbkanalaktivität in Atemwegsepithelzellen nach Adenosinrezeptorstimulation zu sehen war (Kapitel 2, Dierks et al. 2019).

4.2 Die (patho)physiologische Bedeutung der A_{2B} Adenosinrezeptor-induzierten Steigerung der Connexin 26-Halbkanalaktivität

Zuvor wurde gezeigt, dass der Adenosinrezeptor-Agonist NECA die Cx26-Halbkanalaktivität in Calu-3-Zellen erhöhte (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Weiter wurde untersucht welcher Adenosinrezeptor-Subtyp diesem Signalweg zugrunde liegt. Hierbei wurde die wichtige Rolle des A_{2B} Adenosinrezeptors bei der Steigerung der Cx26-Halbkanalaktivität in Calu-3-Zellen mit mehreren Ansätzen gezeigt. Erstens wurde die mRNA- und Proteinexpression des A_{2B} Adenosinrezeptors in Calu-3-Zellen durch qPCR und Western-Blot-Experimente nachgewiesen (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Auch Eckle et al. (2014) zeigten in Calu-3-Zellen die Expression des A_{2B} Adenosinrezeptors. Die Ergebnisse der qPCR-Experimente zeigten ebenfalls eine erhöhte Adenosinrezeptor *ADORA2B* mRNA-Menge im Vergleich zur *ADORA2A* mRNA-Menge (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Der A_{2B} Adenosinrezeptor wird als der am häufigsten vorkommende Adenosinrezeptor-subtyp in bronchialen Epithelzellen von verschiedenen Autoren bestätigt (Davis und Lazarowski 2008; Sun et al. 2006). Zweitens blockierte der A_{2B} Adenosinrezeptor-spezifische Inhibitor MRS1754 den NECA-induzierten Anstieg der Cx26-Halbkanalaktivität (Kapitel 2, Dierks et al. 2019), während der A_{2A} Adenosinrezeptor-spezifische Inhibitor

SCH58261 den NECA-induzierten Anstieg der Cx26-Halbkanalaktivität nur geringfügig abschwächte (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Drittens wurde beobachtet, dass der A_{2B} Adenosinrezeptor-spezifische Agonist BAY60-6583 eine signifikant erhöhte Farbstoffaufnahme in Farbstoffaufnahmeexperimenten induzierte, während der A_{2A} Adenosinrezeptor-spezifische Agonist CGS21680 geringfügig und nicht signifikant die Farbstoffaufnahme erhöhte (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Viertens führte NECA in A_{2B}-Adenosinrezeptor-siRNA-behandelten Zellen mit einer reduzierten A_{2B} Adenosinrezeptorexpression nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Farbstoffaufnahme (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Diese Ergebnisse führen zu der Aussage, dass NECA die Cx26-Halbkanalaktivität nur über den A_{2B} Adenosinrezeptor beeinflusste, der auch der am stärksten exprimierte Adenosinrezeptor in den Calu-3-Zellen ist.

Adenosin aktiviert den A_{2B} Adenosinrezeptor im mikromolaren Bereich, wobei die anderen drei Adenosinrezeptor-Subtypen im Vergleich im nanomolaren Bereich aktiviert werden (Fredholm et al. 2001; Fredholm 2007). *In vivo* führen pathophysiologische Bedingungen wie Inflammation oder Hypoxie und Zellschädigung zu einem Anstieg der Konzentrationen von extrazellulärem Adenosin (Eckle et al. 2009; Fredholm 2007; Zhou et al. 2010). So zeigte beispielsweise die Adenosinkonzentration in der Epithelschleimhautflüssigkeit von Probanden mit der chronischen Lungenerkrankung Asthma einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu Kontrollprobanden (Driver et al. 1993; Huszár et al. 2002). Zusätzlich zeigten andere Studien eine erhöhte Expression des A_{2B} Adenosinrezeptors als Reaktion auf Entzündungen, Zellstress und Verletzungen (Kolachala et al. 2005; Németh et al. 2003; Sitaraman et al. 2002). Diese Ergebnisse deuten stark auf eine Aktivierung des A_{2B} Adenosinrezeptors unter pathologischen Bedingungen hin. In dieser Arbeit wurde NECA in einer Konzentration von 10 µM verwendet. NECA ist ein Adenosin-Analogon, wobei die 5'-Hydroxymethylgruppe durch eine N-Ethylcarboxamido-Gruppe ersetzt wurde (Camaioni et al. 1997). Es konnte ein signifikanter Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels in Calu-3-Zellen nach 20-minütiger Stimulation mit NECA nachgewiesen werden (Kapitel 2, Dierks et al. 2019), was auf eine Aktivierung durch A₂ Adenosinrezeptor und Gas vermittelte intrazelluläre cAMP-Produktion schließen lässt (Strohmeier et al. 1995).

Betrachtet man die Lunge als gesamtes System, zeigen einige Studien, dass dem A_{2B} Adenosinrezeptor eine gewebesetzende Rolle unter akuten pathophysiologischen Bedingungen zugeschrieben werden kann (Eckle et al. 2008a; Eckle et al. 2008b; Hoegl et al. 2015; Li et al. 2021; Schingnitz et al. 2010; Yang et al. 2006). In ihrer

Arbeit setzten Eckle et al. (2008a) Mäuse einer Hypoxie (4 % Sauerstoff über 4 Stunden) aus, welche zu Lungenödemem und erhöhter Gefäßpermeabilität führt. Untersuchungen zeigten, dass die Behandlung mit BAY 60-6583, einem A_{2B} Adenosinrezeptor-Agonist, die durch die Hypoxie verursachte alveolär-kapillare erhöhte Permeabilität dämpfte. Weitere Studien von Schingnitz et al. (2010) untersuchten den Beitrag der endogenen Adenosinsignalgebung zur Abschwächung der Endotoxin-induzierten Lungenschädigung in Mäusen. Die genetische Deletion des A_{2B} Adenosinrezeptors in diesen Mäusen war im Vergleich zu den anderen Adenosinrezeptor-Subtypen mit einer verkürzten Überlebenszeit und einem erhöhten pulmonalen Albuminpermeabilität während der akuten Lungenverletzung nach 24 Stunden verbunden. Diese Autoren schlagen inhalative A_{2B} Adenosinrezeptor-Agonisten als Behandlung bei akuten Lungenverletzungen vor. Insgesamt zeigen diese Studien, dass hohe extrazelluläre Adenosinkonzentrationen in Verbindung mit dem A_{2B} Adenosinrezeptor einen endogenen Weg darstellen, um die Lunge vor Lungenödemem und übermäßigen Entzündungen bei akuten Lungenverletzungen zu schützen (Eckle et al. 2008a; Eckle et al. 2009; Schingnitz et al. 2010; Li et al. 2021). Der Mechanismus, durch den die hohe Adenosinkonzentration und der A_{2B} Adenosinrezeptor das Gewebe bei akuten Lungenverletzungen schützen, ist bisher nicht geklärt. Einen Ansatz dafür könnte in dieser Arbeit gezeigt worden sein. Die Stimulierung des A_{2B} Adenosinrezeptors führte in Calu-3-Zellen zu einer erhöhten Cx26-Expression (Kapitel 2, Dierks et al. 2019), die wiederum in demselben Zellmodell von Go et al. (2006) als Barriere-schützend beschrieben wurde. Die Autoren stellten fest, dass eine Vorbehandlung mit den Gap Junction-Blockern GA und Oleamid den durch die Cx26-Überexpression bedingten Schutz der Tight Junction-Barriere nicht beeinflusste. Sie schlossen daraus, dass die Barriere nur durch die Expression von Cx26 und nicht durch dessen Kanalfunktion gestärkt wurde. Es ist jedoch noch unklar, wie die Expression von Cx26 die Barrierefunktion der Tight Junctions regulieren könnte. Generell ist zu sagen, dass die Aufrechterhaltung der Tight Junction-Barriere während pathogener Zustände eine gewebeschützende Eigenschaft darstellt.

Weitere Studien beschrieben die chronische A_{2B} Adenosinrezeptorstimulierung während einer Entzündung als gewebeschädigend (Zhou et al. 2011; Zhou et al. 2009a; Sun et al. 2006; Sun et al. 2008). In der Arbeit mit Adenosin-Desaminase-defizienten Mäusen, welche durch ihren Defizit erhöhte endogene Adenosinkonzentration im Lungengewebe aufwiesen, wurden pathologische Merkmale aufgezeigt, wie Defekte in Alveogenese, Lungenentzündungen und Atemwegsverengungen. Bei diesen Adenosin-Desaminase-defizienten Mäusen konnte eine Ausschüttung von entzündungs-

fördernden Mediatoren der Stimulierung des A_{2B} Adenosinrezeptors zugeordnet werden (Blackburn 2003; Blackburn et al. 2000; Zhou et al. 2009a). Dabei wurden die Mediatoren Interleukin-6 und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), einem Zytokin und Effektor für Entzündungsprozesse (Zelová und Hošek 2013), von den Epithelzellen der alveolären und bronchialen Atemwege in Adenosin-Desaminase-defizienten Mäusen ausgeschüttet (Pedroza et al. 2011). In humanen bronchialen Epithelzellen wurde durch den Adenosinrezeptor-Agonist NECA eine erhöhte Freisetzung von Interleukin-19 über die Aktivierung des A_{2B} Adenosinrezeptors gezeigt. Hierbei stimulierte Interleukin-19 wiederum humane Monozyten zur Freisetzung von TNF- α (Zhong et al. 2006). In Calu-3-Zellen wurde gezeigt, dass Adenosin eine Freisetzung von Interleukin-6 auslöst, zusammen mit entzündungsförderndem Interleukin-8 (Sun et al. 2008). Epithelzellen der Lunge zeigen somit einen pro-inflammatorischen Beitrag durch die Freisetzung von Zytokinen bei chronischer A_{2B} Adenosinrezeptorstimulation.

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass eine chronische Stimulierung des A_{2B} Adenosinrezeptors in Calu-3 Zellen zu einer gesteigerten Cx26-Halbkanalaktivität führte. In der Arbeit von García-Vega et al. (2019) wurde beobachtet, dass pathogene Reize eine gesteigerte *GJB2*-Expression induzieren, was zu einer gesteigerten Cx26-Halbkanalaktivität in Epithelzellen führte. Sie beobachteten in Hautepithelzellen eine erhöhte *GJB2*-mRNA Menge nach 6-stündiger Behandlung mit bakteriellem Peptidoglykan als PAMP. Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass pathogene Reize eine gesteigerte *GJB2*-Expression induzieren, was zu einer gesteigerten Cx26-Halbkanalaktivität in Epithelzellen führt. Zudem beobachteten die Autoren, dass die Freisetzung von dem Zytokin Interleukin-6 nach dem pathogenen Reiz durch die Verwendung von Cx-Halbanalinhilatoren verhindert wurde, was die Cx26-Halbkanalaktivität in dem Signalweg zur Freisetzung von Zytokinen involvieren würde (Robertson et al. 2010; García-Vega et al. 2019). Wie genau der Beitrag der Cx26-Halbkanalaktivität zur Zytokin-Freisetzung aussehen könnte, wird im Folgenden diskutiert.

Extrazelluläres ATP ist eine Quelle für extrazelluläres Adenosin, indem das ATP durch CD39 und CD73 gespalten wird (Yegutkin 2008). Adenosin stimuliert den A_{2B} Adenosinrezeptor von Epithelzellen und führt bei chronischer Stimulierung zur Produktion von Zytokinen (Sun et al. 2008; Zhong et al. 2006). García-Vega et al. (2019) zeigten in ihrer Arbeit eine gesteigerte ATP-Freisetzung nach Stimulation mit Peptidoglykan als PAMP in Hautepithelzellen, die durch Cx-Inhibitoren verhindert werden konnte. In weiteren Zellmodellen konnte gezeigt werden, dass Cx-Halbkanäle

ATP unter, purinergen Stimuli freisetzen. Cx26, Cx32 und Cx43, die in Karzinomzellen exprimiert wurden, bildeten Halbkanäle, die als Reaktion auf eine purinerge Stimulation mit Uridintriphosphat, einem sehr potenten Agonisten von purinergen P2Y2- und P2Y4-Rezeptoren, ATP freisetzen (Cotrina et al. 1998). Anhand dieser Daten können Cx-Halbkanäle als Teil der purinergen Signalübertragung in Zellen betrachtet werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Stimulierung des A_{2B} Adenosinrezeptors zu einer erhöhten Cx26-Halbkanalaktivität in Calu3-Zellen führte (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Es wäre anzunehmen, dass eine verstärkte Cx26-Halbkanalaktivität als Reaktion auf eine initiale A_{2B} Adenosinrezeptorstimulation zu einer Freisetzung von ATP führt. ATP wird degradiert zu Adenosin, das wiederum zu einer chronischen Stimulation des A_{2B} Adenosinrezeptors führt der wiederum zur Produktion von Zytokinen beiträgt. Zusammengenommen entsteht so ein Kreislauf (Abbildung 4). Im Lungenepithelgewebe würde dies bedeuten, dass es zu einer chronischen Entzündungen kommt, wie sie bei Asthma oder COPD betrachtet wird (Sun et al. 2006; Zhou et al. 2011).

Um die Annahme zu unterstützen, dass die Cx26-Halbkanalaktivität zu einer ATP-Freisetzung nach A_{2B} Adenosinrezeptorstimulation in Calu-3-Zellen führt, sollte in weiteren Experimenten die Freisetzung von ATP in Calu-3-Zellen nach Stimulierung mit NECA ermittelt werden. Zur weiteren Analyse von Immunreaktionen wie die Zytokinausschüttung nach A_{2B} Adenosinrezeptorstimulation im Gewebe und der Beitrag von Cx26-Halbkanalaktivität bei der Zytokinausschüttung, könnten *ex vivo*-Modellen, wie z. B. die humanen Lungenschnitte (PCLS) verwendet werden, die mit spezifischen Adenosinrezeptoragonisten und Cx-Halbkanalblocker gezielt behandelt und analysiert werden würden. Henjakovic et al. (2008) veröffentlichten PCLS als Modell zur Charakterisierung von Veränderungen in der Zytokinproduktion und der Expression von Zelloberflächenmarkern nach Inkubation mit immunoaktiven Substanzen wie LPS (Sewald und Danov 2022) und Influenzaviren, die Asthmaexazerbationen verursachen.

In dieser Arbeit wurde erstmals eine erhöhte Cx26-abhängige Halbkanalaktivität in Epithelzellen durch die Aktivierung des A_{2B} Adenosinrezeptors identifiziert (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Frühere Veröffentlichungen haben gezeigt, dass eine erhöhte Cx26-Halbkanalaktivität destruktiv sein kann und Entzündungen und Krankheiten fördert (Willebrords et al. 2016; Losa et al. 2011; Kielian 2008; Mazereeuw-Hautier et al. 2007; Pfenniger et al. 2011; García-Vega et al. 2019; Retamal et al. 2015; Schaller et al. 2009). Daher wird die Hemmung einer Cx-Halbkanalaktivität als therapeutischer Ansatz diskutiert (Willebrords et al. 2017; Losa et al. 2011). Den meisten

bekannten Cx-Kanalinhibitoren fehlt es an Cx-Isoformspezifität und Differenzierung in Gap Junctions und Cx-Halbkanälen (Willebrords et al. 2017). Es gibt derzeit nur wenige Moleküle, die Cx-Isoform- und Cx-Halbkanal-selektiv blockieren können (Abudara et al. 2014; Xu et al. 2017; Yi et al. 2017). Diese wenigen Moleküle sind ein Beispiel der laufenden Entwicklung einer spezifischen Hemmung von Cx-Halbkanälen. In dieser Arbeit wurden zwei neue polyphenolischen Verbindungen, CVB2-61 und CVB4-57 entdeckt, die selektiv Cx-Halbkanäle im Vergleich zu Gap Junctions hemmen, mit einer dosisabhängigen Selektivität für Cx26 im Vergleich zu Cx46 (Kapitel 3, Dierks et al. 2022), die im folgenden Kapitel beschrieben werden.

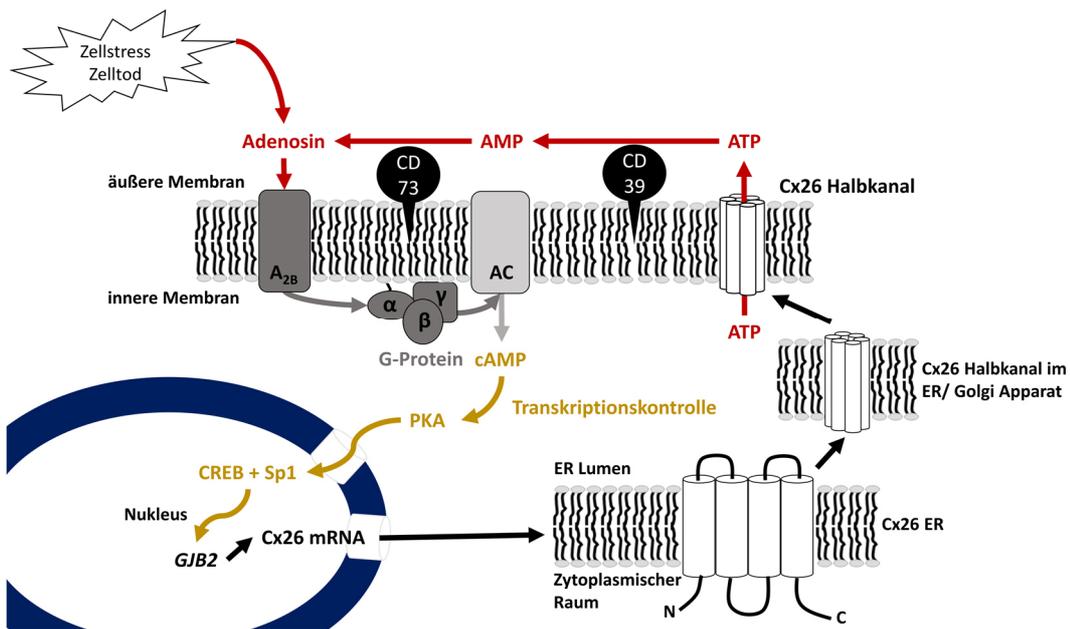


Abbildung 4: Postulierte Adenosin-Signalkaskade in Calu3-Zellen. Extrazelluläres Adenosin aktiviert den G-Protein-gekoppelten A_{2B}-Adenosinrezeptor. Über die Aktivierung der Adenylylcyclase (AC) wird der sekundäre Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) erzeugt und aktiviert die Proteinkinase A (PKA), sowie das spezifische Protein 1 (Sp1) und cAMP-Response-Element-bindende Protein (CREB). Dies führt zur Transkriptionskontrolle des *GJB2*-Genes. Die erhöhte Expression des Cx26-Proteins und eine verstärkte Insertion von Cx26-Halbkanälen in die Membran führt zu einer gesteigerten Aktivität der Cx26-Halbkanäle (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Adenosintriphosphat (ATP) kann durch die Aktivität des Cx-Halbkanals in den extrazellulären Raum freigesetzt werden (Cotrina et al. 1998). ATP wird durch extrazelluläre Nucleotidasen zu extrazellulärem Adenosin dephosphoryliert. Ectonucleosid-Triphosphatdiphosphohydrolase-1 (CD 39) und Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) sind solche membrangebundenen Enzyme, die die lokale Adenosinproduktion für die Rezeptorsignalgebung regulieren (Yegutkin 2008).

4.3 Inhibierung von Connexin-Halbkanälen

Im dritten Kapitel wurde die Etablierung und Analyse von zwei polyphenolischen Verbindungen beschrieben, dem Diarylether CVB2-61 und dem Diarylheptanoid CVB4-57, als Cx-Halbkanalblocker (Kapitel 3, Dierks et al. 2022). Für CVB2-61 wurde bereits nachgewiesen, dass es aufgrund seiner anti-oxidativen, anti-radikalischen und anti-angiogenen Eigenschaften Atherosklerose verhindert (Vanucci-Bacqué et al. 2016). Atherosklerose in Endothelzellen kann durch Thrombin ausgelöst werden, welches die Blutgerinnung und Entzündungsprozesse aktiviert (Okamoto und Suzuki 2017). Seminario-Vidal et al. (2009) zeigten, dass Thrombin die Öffnung von Cx-Halbkanälen und eine anschließende erhöhte ATP-Freisetzung in Lungenepithelzellen fördert, was auf eine Integration von Cx-Halbkanälen in den chronischen Entzündungsprozess Atherosklerose hinweist. CVB4-57, das bisher nicht beschrieben wurde, weist eine phenolische Einheit auf, die anti-radikalische Eigenschaften vermittelt (Kumar und Goel 2019), einen Piperazin-Kern als bekanntes entzündungshemmendes Pharmakophor (Jain et al. 2021) und zwei Stickstoffatome für potenzielle Wasserstoffbrückenbindungen mit Aminosäuren der Cx (Kapitel 3, Dierks et al. 2022). Generell sollten beide Verbindungen eine geringe Gesamttoxizität erreichen und spezifisch auf Cx-Halbkanäle abzielen, ohne Gap-Junctions zu beeinträchtigen oder die Gewebephysiologie zu verändern, um als mögliche Therapeutika in Cx-Halbkanalaktivität-vermittelten Erkrankungen wie in neurodegenerativen Erkrankungen (Orellana et al. 2012a), Asthma (Arzola-Martínez et al. 2021) oder in der Krebstherapie (Zhang et al. 2014) eingesetzt zu werden.

Als Cx-Halbkanalinhibitoren wurden bisher verschiedene Moleküle getestet. Dazu gehören zum einen die Malariamittel Chinin und Mefloquin, nichtsteroidale Entzündungshemmer, entzündungshemmende Medikamente wie Fenamate (Flufenaminsäure), die Narkosemittel Propofol und Ketamin, Cyclodextrin, GA und ihre Derivate, wie Carbenoxolon; Alkohole wie Heptanol und Octanol; 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB); und mimetische Peptide der extrazellulären Cx Schleifensequenzen, anti-Cx-Antikörper und Aminoglykosid-Antibiotika und deren Derivate ohne antibiotische Wirkung. Chinin blockierte in transfizierten *Xenopus laevis*-Oozyten Halbkanäle, die aus Cx35, Cx46 und Cx38 bestanden (Ripps et al. 2002). Mefloquin, ein synthetisches Analogon von Chinin hemmte in transfizierten *Xenopus laevis*-Oozyten die Cx26 und Cx50 Halbkanalaktivität (Levit et al. 2015). Flufenaminsäure hemmte Halbkanäle die aus Cx50, Cx46 und Cx38 in transfizierten *Xenopus laevis*-Oozyten bestanden (Spray et al. 2002). Propofol inhibierte indirekt die Cx43-Halbkanalaktivität in Mikrogliazellen mittels Reduktion der Cx43-Expression (Zhang et

al. 2021). Für Ketamine wurde gezeigt, dass sie Cx43-Halbkanäle in Astrozyten von Mäusen inhibierten (Liu et al. 2016). Cyclodextrin blockierte reversibel die Poren von Cx26- und Cx32-Halbkanälen (Locke et al. 2004). GA inhibierte Cx50- und Cx46-Halbkanäle (Eskandari et al. 2002), während sein wasserlösliches Derivat Carbenoxolon Cx-Halbkanäle bestehend aus Cx26 und Cx38 in *Xenopus laevis*-Oozyten inhibierte (Ripps et al. 2002, 2004). Heptanol bewirkte eine schrittweise Abnahme des Ionenstroms durch Cx43-Halbkanäle in einer planaren Lipiddoppelschicht (Brokamp et al. 2012) und für Octanol wurde gezeigt, dass es Cx50-Halbkanalströme hemmte (Eskandari et al. 2002). 2-APB hemmte reversibel und pH-abhängig aufgereinigte homomere Cx32- und heteromere Cx26/Cx32-Halbkanäle aus nativem Lebergewebe von Nagern, die Diphenyleinheit von 2-APB wurde als das Pharmakophor zur Cx-Kanalinhibition festgestellt (Tao und Harris 2007). All die bisher aufgelisteten Inhibitoren wirkten neben den Cx-Halbkanälen auch auf Gap Junctions und viele weitere zelluläre Ziele, darunter Ionenkanäle, Rezeptoren, Transporter und Enzyme (Willebrords et al. 2017), womit sie neben der Cx-Inhibition die Zellen stark beeinträchtigen. Raffiniertere Inhibitoren, welche gezielt Cx-Kanäle inhibieren, sind die mimetischen Peptide der extrazellulären Cx-Schleifensequenz. *In vitro* hemmten die mimetischen Peptide der Cx43-Schleifensequenz, ⁴³Gap26 und ⁴³Gap27, die Cx43-Halbkanalvermittelte ATP-Freisetzung und Farbstoffaufnahme bei kurzer Exposition (Braet et al. 2003; Eltzschig et al. 2006). Bei längerer Exposition führten sie ebenfalls zur Unterdrückung der entsprechenden Gap Junction-Aktivität (Braet et al. 2003; Decrock et al. 2009). Im Laufe der Zeit wurde festgestellt, dass sie auch die Cx-Kanäle bestehend aus Cx32, Cx40 und Cx37 beeinflussten wodurch die zuvor postulierte Spezifität relativiert wurde (Vuyst et al. 2006; Vuyst et al. 2009; Evans und Boitano 2001). Die Exposition der Zellen mit ⁴³Gap27 könnten Auswirkungen auf die Cx43-Phosphorylierung haben, insbesondere von Serin368, und würden daher die Cx43-Kanalaktivität beeinflussen (Solan und Lampe 2009). Peptid5 ist ein im Vergleich zu Gap27 um 5 Aminosäure in N-terminaler Richtung verschobenes Peptid (Danesh-Meyer et al. 2012). Es hemmte Cx-Halbkanäle bei niedriger Konzentration, während es bei höherer Konzentration auch Gap Junctions hemmt (O'Carroll et al. 2008). Die genannten Cx-Inhibitoren wurden zur Untersuchung einer Vielzahl von zellulären Prozessen verwendet, wie z. B. dynamische Ca²⁺-Signale, Freisetzung von Neurotransmittern, sowie die Ausbreitung des Zelltods (Willebrords et al. 2016; Willebrords et al. 2017), in Studien über das Immunsystem (Oviedo-Orta und Howard Evans 2004), das Gefäßsystem (Matchkov et al. 2004), Herz (Davidson et al. 2012), Lunge (Sarieddine et al. 2009), Gehirn (Bock et al. 2011; Bock et al. 2012), Haut (Pollok et al. 2011) und Leber (Vinken et al. 2010). Eine spezifische Inhibition der Cx-Halbkanäle mit Isoform-Spezifität würde die

Aufklärung von zellulären Prozessen verbessern und spezifischer als therapeutisches Mittel fungieren und somit bisher verwendete nicht-selektive Inhibitoren ersetzen können. (Willebrords et al. 2017).

Bisher wurde gezeigt, dass mimetische Peptide, die die intrazellulären Schleifen von Cx nachahmen, Moleküle wie Boldin (Yi et al. 2017), anti-Cx-Antikörper sowie Aminoglykosid-Antibiotika (AlFindee et al. 2018) nachweislich Cx-Halbkanäle blockierten ohne die Gap Junction-Kopplung zu beeinträchtigen. Mimetische Peptide wie das L2-Peptid, Gap19 oder ³²Gap24, die einer Sequenz in der zytoplasmatischen Schleife von Cx43 oder Cx32 entsprechen, hemmen deren Halbkanalöffnung ohne Beeinträchtigung der Gap Junction-Kopplung, müssen aber in die Zelle eindringen um zu wirken (Wang et al. 2013; Seki et al. 2004). Ein spezifischer anti-Cx26-Antikörper der extrazellulär wirkt wurde von Xu et al. (2017) entwickelt und *in vitro* in menschlichen Keratinozyten getestet. Das Ziel dieser Arbeit war die Blockierung mutierter hyperaktiver Cx26-Halbkanäle, als therapeutische Maßnahme. Der anti-Cx26-Antikörper bindet reversibel an die extrazelluläre Schleife von Cx26 und beeinträchtigt die vom Gap Junction-Kanal abhängige Kommunikation nicht. Im dritten Kapitel wurden zwei polyphenolische Verbindungen, CVB2-61 und CVB4-57, untersucht, die in der Lage waren Cx-Halbkanäle sowohl in einem transgenen Expressionssystem als auch in nativen Zellen reversibel zu blockieren (Kapitel 3, Dierks et al. 2022). In der humanen Lungenepithelzelllinie Calu-3, welche endogen Cx26, Cx43 und Cx45 exprimieren (Kapitel 2, Dierks et al. 2019), wurde festgestellt, dass die beiden Wirkstoffe die Gap Junction-Kopplung bei langer Exposition (24 h) und hoher Konzentration (20 µM) nicht beeinträchtigten (Kapitel 3, Dierks et al. 2022). Dies weist darauf hin, dass sie spezifisch auf Cx-Halbkanäle wirken. Zudem wurde mittels eines Cx-Expressionssystems in Zellen ohne native Cx-Halbkanalfunktion, der Neuro2a (N2a)-Zelllinie (Kapitel 3, Dierks et al. 2022) eine Selektivität der Inhibierung der Cx-Halbkanäle zu CVB2-61 und CVB4-57 bei niedrigen Konzentrationen (≥ 5 µM) für Cx26-Halbkanäle und bei höheren Konzentrationen für Cx46-Halbkanälen (≥ 20 µM) beobachtet (Kapitel 3, Dierks et al. 2022). Dies deutet darauf hin, dass eine Cx-Isoformspezifität erreicht werden kann. In den Calu-3-Zellen wurde aufgezeigt, dass bei 24-stündiger Inkubationen mit CVB2-61 oder CVB4-57 zusammen mit dem Adenosinrezeptor-Agonisten NECA, die Farbstoffaufnahme bei beiden Wirkstoffen reduziert wurde (Kapitel 3, Dierks et al. 2022). Nachdem CVB2-61 oder CVB4-57 während der Farbstoffaufnahme-Experimente von den Zellen ausgewaschen wurden, konnte die Aktivität der Cx26-Halbkanäle wieder gemessen werden, und die NECA-induzierte Erhöhung der Farbstoffaufnahme (Kapitel 2, Dierks et al. 2019) wurde im Vergleich zu Zellen, die unter Kontrollbedingungen

kultiviert wurden, weiterhin beobachtet (Kapitel 3, Dierks et al. 2022). Dies zeigt zum einen eine reversible Blockierung der Cx26-Halbkanäle durch CVB2-61 oder CVB4-57. Zudem wurde im zweiten Kapitel beschrieben, dass die NECA-bedingte Erhöhung der Farbstoffaufnahme mit einer erhöhten Expression von Cx26 zusammenhing (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Daher ist es unwahrscheinlich, dass CVB2-61 und CVB4-57 die Cx26-Expression negativ beeinflussten. Interessanterweise wurde eine unterschiedliche Wirkung auf die Halbkanalaktivität von Calu-3-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit CVB2-61 oder CVB4-57 allein oder zusammen mit dem Adenosinrezeptor-Agonisten NECA beobachtet. Die Farbstoffaufnahme von Zellen, die mit CVB2-61 kultiviert wurden, war im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich erhöht (Kapitel 3, Dierks et al. 2022). In ersten unveröffentlichten qPCR-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die mRNA-Menge der *GJB2*-Isoform nach der Kultivierung zusammen mit dem Adenosinrezeptor-Agonisten NECA und CVB2-61 im Vergleich zur Kultivierung nur mit NECA signifikant erhöht war. Bei CVB4-57 zusammen mit NECA konnte kein Unterschied in der mRNA-Expression von *GJB2* im Vergleich zu NECA festgestellt werden. Es konnten also Auswirkungen in Verbindung mit NECA von CVB2-61 auf die *GJB2*-Genregulation nachgewiesen werden, während für CVB4-57 in Verbindung mit NECA keine Auswirkungen auf die *GJB2*-Genregulation festgestellt wurden. Diese unterschiedlichen Auswirkungen von CVB2-61 und CVB4-57 auf die *GJB2*-Genregulation sollten genutzt werden, um weiter zu untersuchen, wie sie Cx-Halbkanäle blockieren und welche Auswirkungen sie insgesamt in der Zelle haben können.

Die Blockierungsmechanismen der Wirkstoffe CVB2-61 und CVB4-57 auf die Cx-Halbkanäle sind Thema aktueller Forschung. Sowohl ein Mechanismus wie er bei der hemmenden Wirkung von langkettigen Alkoholen Anästhetika und Fenamate beobachtet wird, kann ausgeschlossen werden, sowie der Mechanismus von GA und seinen Derivaten. Der Wirkmechanismus langkettiger Alkohole, Anästhetika und Fenamate kann nicht zwischen Gap Junction-Kanälen und den Cx-Halbkanälen unterscheiden. Da die Gap Junction-Kopplung weder von CVB2-61 noch von CVB4-57 beeinflusst wurde (Kapitel 3, Dierks et al. 2022), ist das Wirkungsmodell einer Änderung der Membranfluidität, wie bei den genannten Molekülen, unwahrscheinlich. Für GA wurde gezeigt, dass sie nachteilige Auswirkungen auf die Barrierefunktion von Epithelzellen hat (Malekinejad et al. 2022). In Messexperimenten zum transepithelialen Widerstand konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Carbenoxolon bei einer Konzentration von 100 μM , einer üblichen Konzentration für die Hemmung von Cx-Kanälen, innerhalb von Minuten eine Ruptur der Barriere induzierte (Kapitel 3, Dierks et al. 2022). Was CVB2-61 und CVB4-57 betrifft, so hatte

die höchste Konzentration (20 μM) beider Verbindungen bei 24-stündiger Anwendung keine signifikante Wirkung auf die Barrierefunktion (Kapitel 3, Dierks et al. 2022), womit auch ein ähnlicher Wirkmechanismus wie GA und Carbenoxolon für CVB2-61 und CVB4-57 ausgeschlossen werden kann. Die mimetischen Peptide, wie Gap26 und Gap27 (Pollok et al. 2011), binden die extrazellulären Domänen der Cx und beeinträchtigen somit wahrscheinlich negativ die Öffnung der Cx-Halbkanäle. Der genaue Wirkmechanismus der mimetischen Peptide ist immer noch unklar, aber mögliche Mechanismen, wie die Bindung an intakte Cx-Kanäle zur Induktion einer Konformationsänderung (Martin et al. 2005) oder indirekte sterische Effekte (Wang et al. 2007), die zur Kanalschließung führen würden, werden diskutiert. Abhängig von der Dauer der Anwendung haben die extrazellulär Cx-bindenden mimetischen Peptide negative Auswirkungen auf die Gap Junction-Kanäle, da sie durch Bindung an Cx-Halbkanäle die Neubildung von Gap Junctions verhindern oder deren Aufspaltung begünstigen (Bodendiek und Raman 2010). Es konnte gezeigt werden, dass CVB2-61 und CVB4-57 die Gap Junction-Bildung und -Kopplung in den Calu-3-Zellen nicht beeinträchtigt (Kapitel 3, Dierks et al. 2022), daher wird einen ähnlichen Mechanismus, wie für die extrazellulär an Cx bindenden mimetischen Peptide, vorerst ausgeschlossen.

Das derzeitige Verständnis der chemischen Voraussetzungen von CVB2-61 und CVB4-57 für die Hemmung ist noch ungeklärt. Um dies zu definieren, könnte die Blockierung der Cx-Halbkanalaktivität durch Strukturanaloga von CVB2-61 und CVB4-57 getestet werden. Hier könnten Unterschiede in der Blockierung der Analoga aufzeigen welches Pharmakophor der Blockierung von Cx-Halbkanälen zuzuordnen ist, wie es z. B. in anderen Studien mit der Diphenyleinheit von 2-APB gezeigt wurde (Tao und Harris 2007). Die Art und Weise der Interaktion zwischen CVB2-61 oder CVB4-57 und den Cx-Halbkanälen sollte weitergehend ermittelt werden. Neben Experimenten wie die Kristallisation von Cx-Halbkanälen in Gegenwart einer der beiden Verbindungen, könnten auch molekulardynamische Simulationen Ansatzpunkte bieten. Ein äquimolares humanes Cx46-Wildtyp-Modell ist verfügbar, seit Schadzek et al. (2019) die Auswirkungen der Cx46N188T-Mutante auf die Bildung von Gap Junctions untersucht haben. Das humane Cx46-Modell basiert auf der hochauflösenden Kristallstruktur von humanem Cx26 (PDB ID: [2ZW3](#)) (Maeda et al. 2009). Daher ist eine Simulation mit dem Cx26-Halbkanal, dem Cx46-Halbkanal und CVB2-61 und CVB4-57 mit detaillierter Strukturverfügbarkeit in Zukunft möglich. Die Simulationen können einige Interaktionspunkte von CVB2-61 und/oder CVB4-57 mit Aminosäuren der Cx aufzeigen. Diese Annahmen können durch Mutationsstudien, bei denen die Verwendung spezifischer Cx26- und Cx46-Mutanten in

transfizierten Zellen durch Farbstoffaufnahmeexperimente überprüft werden, um die Blockierung der beiden Verbindungen in den Mutanten zu testen. In den ersten unveröffentlichten Schritten einer solchen Mutationsstudie zeigten wir, dass CVB2-61 in Farbstoffaufnahmeexperimenten von transfizierten N2a-Zellen mit aktiven Cx-Halbkanälen der Cx46N188T-Mutante (Abbildung 5) keine blockierende Wirkung mehr hatte. Im Gegensatz dazu zeigte CVB4-57 eine Blockierung der Farbstoffaufnahme in transfizierten N2a-Zellen mit aktiven Cx-Halbkanälen der Cx46N188T-Mutante (Abbildung 5). Die Cx46N188T-Mutante hat eine Mutation in der zweiten extrazellulären Schleife des Transmembranproteins (Schadzek et al. 2016; Schadzek et al. 2019). Hierbei ersetzt die Aminosäure Threonin die Aminosäure Asparagin. Die Cx46N188T-Mutante weist weniger verfügbare Wasserstoffbrückenbindungen in der extrazellulären Schleife auf als der Cx46-Wildtyp (Schadzek et al. 2016). Die Wasserstoffbrückenbindung könnte daher für die Blockierung mit CVB2-61 aber nicht CVB4-57 relevant sein. Diese Vorversuche zeigen erste Anhaltspunkte für die Aufklärung der Blockierungsmechanismen von CVB2-61 und CVB4-57.

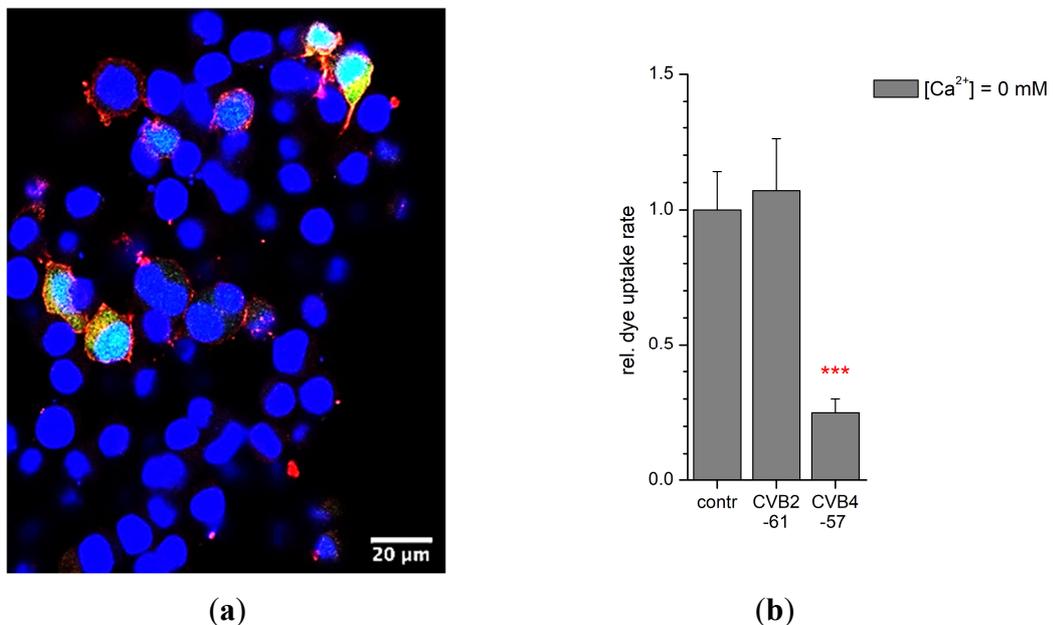


Abbildung 5: Farbstoffaufnahmeexperimente in transfizierten Neuro2a-Zellen, mit der humanen Cx46N188T-Mutante (Schadzek et al. 2016). (a) Mikroskopische Aufnahme von transfizierten Zellen mit hCx46N188T *internal ribosomal entry site* (IRES) grünem Fluoreszenzprotein (GFP). GFP in Grün, anti-Cx46-Antikörper in Rot, Zellkerne mit DNA-Fluoreszenzfarbstoff in Blau, Skala 20 µm. (b) Die Farbstoffaufnahme rate der Zellen ermittelt aus der Ca²⁺-freien Phase des Experiments. CVB2-61 (20 µM) verringerte die Farbstoffaufnahme rate nicht. CVB4-57 (20 µM) zeigte eine signifikante Verringerung der Farbstoffaufnahme. Die Daten wurden anhand von drei unabhängigen Experimenten analysiert, normalisiert und mit der Kontrolle verglichen (Student's t-test, $p < 0,001$ ***, Mittelwert \pm SEM).

4.4 Fazit

Der A_{2B} Adenosinrezeptor wird durch hohe extrazelluläre Adenosinkonzentration stimuliert, die in der Lunge mit pathologischen Ereignissen verbunden sind (Blackburn 2003; Blackburn et al. 2000; Zhou et al. 2009b). Bei einer chronischen Stimulation des A_{2B} Adenosinrezeptors kommt es zu Krankheiten wie Asthma und COPD (Zhou et al. 2009b; Zhou et al. 2011; Zhou et al. 2010). Im ersten Schwerpunkt dieser Arbeit wurde eine Integration von Cx26-Halbkanälen in den A_{2B} Adenosinrezeptorsignalweg in Lungenepithelzellen gezeigt (Kapitel 2, Dierks et al. 2019). Die Aktivierung des A_{2B} Adenosinrezeptors führte in Calu-3-Zellen zu einer verstärkten Cx26-Halbkanalaktivität aufgrund der durch cAMP/PKA gesteigerten Expression von Cx26 messbar auf mRNA- und Proteinebene. Eine durch Adenosin induzierte Verstärkung der Cx26-Halbkanalaktivität können intrazelluläre Moleküle, insbesondere Adenosin und ATP freisetzen, was wiederum zu einer erhöhten extrazellulären Adenosinkonzentration führt. Es ist möglich, dass die chronische Stimulierung des A_{2B} Adenosinrezeptors und die erhöhte Cx26-Halbkanalaktivität in einem Kreislauf zusammenwirken, der eine Entzündung befeuert und aufrechterhält, was zu schädlichen Auswirkungen im Gewebe führen kann (Abbildung 6). In diesem Modell könnte eine gezielte Blockierung der Cx26-Halbkanalaktivität eine mögliche Behandlungsmethode für chronisch entzündliche Erkrankungen des Atemwegsepithels darstellen (Willebrords et al. 2017). Im zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit wurden zwei neue polyphenolische Cx-Halbkanalblocker mit einer Selektivität für Cx26 im Vergleich zu Cx46 ermittelt, CVB2-61 und CVB4-57. Die Analyse beider Verbindungen ermöglichte eine Blockierung der Cx-Halbkanäle, ohne wichtige Gewebeeigenschaften, wie die Barrierefunktion oder die Gap-Junction-Kopplung in Epithelzellen der Atemwege zu beeinträchtigen, was darauf schließen lässt, dass die beiden Verbindungen nicht zytotoxisch sind. Beide Verbindungen, CVB2-61 und CVB4-57, blockierten reversibel die erhöhte Cx26-Halbkanalaktivität in Epithelzellen der Atemwege nach Stimulation des A_{2B} Adenosinrezeptors (Kapitel 3, Dierks et al. 2022). Experimente in denen Calu-3-Zellen mit dem Adenosinrezeptor-Agonisten NECA zusammen mit CVB2-61 oder CVB4-57 kultiviert wurden zeigten, dass die blockierende Wirkung von CVB2-61 und CVB4-57 nicht den Signalweg behinderte, der zu einer erhöhten Cx26-Halbkanalaktivität führte. Dies zeigt, dass es sich um zwei starke Blocker handelt, die vermutlich keine negativen Auswirkungen auf die cAMP/PKA-abhängige Erhöhung von Cx26, messbar auf mRNA- und Proteinebene, haben.

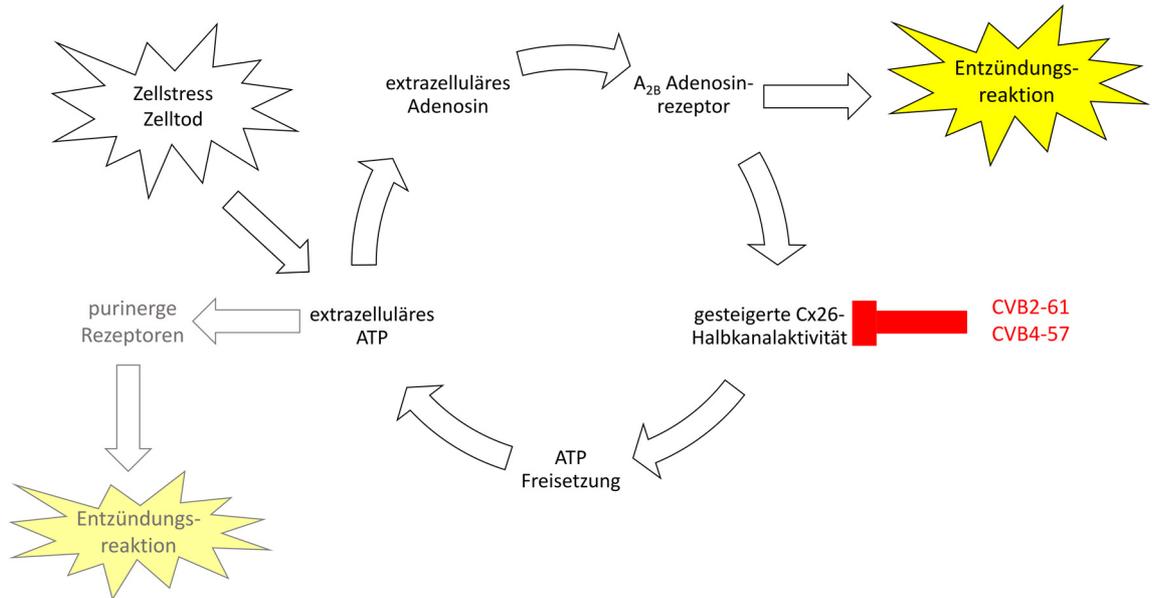


Abbildung 6: Schema eines Kreislaufs der sterilen Entzündung mit den Akteuren Adenosintriphosphat (ATP), Adenosin, A_{2B} Adenosinrezeptor und den ATP-freisetzenden Connexin 26 (Cx)-Halbkanälen. Zellstress, Zelltod erhöhen den extrazellulären ATP-Spiegel. Der extrazelluläre Adenosinspiegel wird durch Spaltung von ATP zu Adenosin erhöht. Extrazelluläres Adenosin stimuliert den A_{2B} Adenosinrezeptor, was zu Entzündungen führen kann (Sun et al. 2006). Es wurde gezeigt, dass der A_{2B} Adenosinrezeptorsignalweg die Cx26-Proteinproduktion erhöhte, was wiederum zu einer gesteigerten Cx26-Halbkanalaktivität führte, die intrazelluläres ATP oder Adenosin freisetzen kann. Ein Kreislauf, der zu einer chronischen, schädlichen Entzündung im Gewebe führen könnte. Die neuen polyphenolischen Cx26-Halbkanalblocker CVB2-61 und CVB4-57 könnten diesen Kreislauf durch Blockierung der Connexin 26-Halbkanalaktivität durchbrechen. Vollständigkeitshalber sei erwähnt, dass extrazelluläres ATP purinerge Rezeptoren (P2X) stimuliert, was ebenfalls zu einer Entzündungsreaktion führen kann (Jones et al. 2014).

Im Gewebe ist die erste Entzündungsreaktion ein Schutzmechanismus, um die Ursache der Entzündung zu beseitigen oder die Entzündung einzudämmen. Eine akute Entzündung führt zu lokal erhöhten Konzentrationen von Signalmolekülen wie ATP und Adenosin, die bei anhaltender erhöhter Konzentration zu einer chronischen und gewebschädigenden, sterilen Entzündung führen. Wir haben einen möglichen Zusammenhang identifiziert, bei dem durch Adenosinsignalwege eine verstärkte Cx26-Halbkanalaktivität (Kapitel 2, Dierks et al. 2019) vermehrt intrazelluläres ATP und Adenosin freisetzen kann, was zu einer chronischen Stimulierung des A_{2B} Adenosinrezeptors führt und in einer chronischen Entzündungsreaktion resultieren kann (Abbildung 6). Die beiden potenten Cx-Halbkanalblocker CVB2-61 und CVB4-57 blockieren nachweislich die verstärkte Cx26-Halbkanalaktivität durch die Stimulierung

des A_{2B} Adenosinrezeptors (Kapitel 3, Dierks et al. 2022). Daher wird hier vorgeschlagen die mögliche Freisetzung von Adenosin und ATP durch die Stimulierung des A_{2B} Adenosinrezeptors-bedingte Steigerung der Cx26-Halbkanalaktivität mit CVB2-61 oder CVB4-57 zu blockieren. Der Kreislauf, der zu einer kontinuierlich erhöhten extrazellulären Adenosinkonzentration und anschließender chronischen Stimulierung des A_{2B} Adenosinrezeptors führt, der mit einer chronischen Entzündung im Gewebe einhergeht, kann somit unterbrochen werden (Abbildung 6).

Literaturverzeichnis

- Abudara, Verónica; Bechberger, John; Freitas-Andrade, Moises; Bock, Marijke de; Wang, Nan; Bultynck, Geert et al. (2014): The connexin43 mimetic peptide Gap19 inhibits hemichannels without altering gap junctional communication in astrocytes. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 8, S. 306. DOI: 10.3389/fncel.2014.00306.
- Ahmad, Shoeb; Evans, W. Howard (2002): Post-translational integration and oligomerization of connexin 26 in plasma membranes and evidence of formation of membrane pores. Implications for the assembly of gap junctions. In: *The Biochemical journal* 365 (Pt 3), S. 693–699. DOI: 10.1042/BJ20011572.
- AlFindee, Madher N.; Subedi, Yagya P.; Fiori, Mariana C.; Krishnan, Srinivasan; Kjellgren, Abbey; Altenberg, Guillermo A.; Chang, Cheng-Wei T. (2018): Inhibition of Connexin Hemichannels by New Amphiphilic Aminoglycosides without Antibiotic Activity. In: *ACS medicinal chemistry letters* 9 (7), S. 697–701. DOI: 10.1021/acsmchemlett.8b00158.
- Anselmi, Fabio; Hernandez, Victor H.; Crispino, Giulia; Seydel, Anke; Ortolano, Saida; Roper, Stephen D. et al. (2008): ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca^{2+} signals across the inner ear. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (48), S. 18770–18775. DOI: 10.1073/pnas.0800793105.
- Anvari, Farshad; Sharma, Ashish K.; Fernandez, Lucas G.; Hranjec, Tjasa; Ravid, Katya; Kron, Irving L.; Laubach, Victor E. (2010): Tissue-derived proinflammatory effect of adenosine A2B receptor in lung ischemia-reperfusion injury. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 140 (4), S. 871–877. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2010.06.051.
- Arzola-Martínez, Lillian; Benavente, Rebeca; Vega, Génesis; Ríos, Mariana; Fonseca, Wendy; Rasky, Andrew J. et al. (2021): Blocking ATP-releasing channels prevents high extracellular ATP levels and airway hyperreactivity in an asthmatic mouse model. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 321 (2), L466–L476. DOI: 10.1152/ajplung.00450.2020.
- Bedner, Peter; Steinhäuser, Christian; Theis, Martin (2012): Functional redundancy and compensation among members of gap junction protein families? In: *Biochimica et biophysica acta* 1818 (8), S. 1971–1984. DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.10.016.
- Begandt, Daniela; Bader, Almke; Antonopoulos, Georgios C.; Schomaker, Markus; Kalies, Stefan; Meyer, Heiko et al. (2015): Gold nanoparticle-mediated (GNOME) laser perforation. A new method for a high-throughput analysis of gap junction intercellular coupling. In: *Journal of bioenergetics and biomembranes* 47 (5), S. 441–449. DOI: 10.1007/s10863-015-9623-y.
- Beyer, E. C.; Paul, D. L.; Goodenough, D. A. (1987): Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. In: *The Journal of cell biology* 105 (6 Pt 1), S. 2621–2629. DOI: 10.1083/jcb.105.6.2621.
- Beyer, Eric C.; Berthoud, Viviana M. (2009): The Family of Connexin Genes. In: Andrew L. Harris und Darren Locke (Hg.): *Connexins*. Totowa, NJ: Humana Press, S. 3–26.
- Blackburn, M. R.; Volmer, J. B.; Thrasher, J. L.; Zhong, H.; Crosby, J. R.; Lee, J. J.; Kellems, R. E. (2000): Metabolic consequences of adenosine deaminase deficiency in mice are associated with defects in alveogenesis, pulmonary inflammation, and airway obstruction. In: *The Journal of experimental medicine* 192 (2), S. 159–170. DOI: 10.1084/jem.192.2.159.
- Blackburn, Michael R. (2003): Too much of a good thing: adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 24 (2), S. 66–70. DOI: 10.1016/S0165-6147(02)00045-7.
- Bock, Marijke de; Culot, Maxime; Wang, Nan; Bol, Mélissa; Decrock, Elke; Vuyst, Elke de et al. (2011): Connexin channels provide a target to manipulate brain endothelial calcium dynamics and

- blood-brain barrier permeability. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31 (9), S. 1942–1957. DOI: 10.1038/jcbfm.2011.86.
- Bock, Marijke de; Culot, Maxime; Wang, Nan; Da Costa, Anaëlle; Decrock, Elke; Bol, Méliëssa et al. (2012): Low extracellular Ca²⁺ conditions induce an increase in brain endothelial permeability that involves intercellular Ca²⁺ waves. In: *Brain research* 1487, S. 78–87. DOI: 10.1016/j.brainres.2012.06.046.
- Bodendiek, S. B.; Raman, G. (2010): Connexin modulators and their potential targets under the magnifying glass. In: *Current medicinal chemistry* 17 (34), S. 4191–4230. DOI: 10.2174/092986710793348563.
- Braet, Katleen; Aspeslagh, Sandrine; Vandamme, Wouter; Willecke, Klaus; Martin, Patricia E. M.; Evans, W. Howard; Leybaert, Luc (2003): Pharmacological sensitivity of ATP release triggered by photoliberation of inositol-1,4,5-trisphosphate and zero extracellular calcium in brain endothelial cells. In: *Journal of cellular physiology* 197 (2), S. 205–213. DOI: 10.1002/jcp.10365.
- Brokamp, Cole; Todd, Jacob; Montemagno, Carlo; Wendell, David (2012): Electrophysiology of single and aggregate Cx43 hemichannels. In: *PloS one* 7 (10), e47775. DOI: 10.1371/journal.pone.0047775.
- Cagnina, Rebecca E.; Ramos, Susan I.; Marshall, Melissa A.; Wang, Guoquan; Frazier, C. Renea; Linden, Joel (2009): Adenosine A2B receptors are highly expressed on murine type II alveolar epithelial cells. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 297 (3), L467–74. DOI: 10.1152/ajplung.90553.2008.
- Calder, Bennett W.; Matthew Rhett, Joshua; Bainbridge, Heather; Fann, Stephen A.; Gourdie, Robert G.; Yost, Michael J. (2015): Inhibition of connexin 43 hemichannel-mediated ATP release attenuates early inflammation during the foreign body response. In: *Tissue engineering. Part A* 21 (11-12), S. 1752–1762. DOI: 10.1089/ten.tea.2014.0651.
- Camaioni, Emidio; Di Francesco, Emanuela; Vittori, Sauro; Volpini, Rosaria; Cristalli, Gloria (1997): Adenosine receptor agonists: Synthesis and biological evaluation of the diastereoisomers of 2-(3-hydroxy-3-phenyl-1-propyn-1-yl)NECA. In: *Bioorganic & medicinal chemistry* 5 (12), S. 2267–2275. DOI: 10.1016/S0968-0896(97)00172-7.
- Chen, Grace Y.; Nuñez, Gabriel (2010): Sterile inflammation. Sensing and reacting to damage. In: *Nature reviews. Immunology* 10 (12), S. 826–837. DOI: 10.1038/nri2873.
- Clair, Caroline; Combettes, Laurent; Pierre, Fabienne; Sansonetti, Philippe; van Tran Nhieu, Guy (2008): Extracellular-loop peptide antibodies reveal a predominant hemichannel organization of connexins in polarized intestinal cells. In: *Experimental cell research* 314 (6), S. 1250–1265. DOI: 10.1016/j.yexcr.2007.12.021.
- Collis, Michael G.; Hourani, Susanna M.O. (1993): Adenosine receptor subtypes. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 14 (10), S. 361–366. DOI: 10.1016/0165-6147(93)90094-Z.
- Contreras, Jorge E.; Sáez, Juan C.; Bukauskas, Feliksas F.; Bennett, Michael V. L. (2003): Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (20), S. 11388–11393. DOI: 10.1073/pnas.1434298100.
- Cotrina, M. L.; Lin, J. H.; Alves-Rodrigues, A.; Liu, S.; Li, J.; Azmi-Ghadimi, H. et al. (1998): Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (26), S. 15735–15740. DOI: 10.1073/pnas.95.26.15735.
- Danesh-Meyer, Helen V.; Kerr, Nathan M.; Zhang, Jie; Eady, Elizabeth K.; O'Carroll, Simon J.; Nicholson, Louise F. B. et al. (2012): Connexin43 mimetic peptide reduces vascular leak and retinal ganglion cell death following retinal ischaemia. In: *Brain : a journal of neurology* 135 (Pt 2), S. 506–520. DOI: 10.1093/brain/awr338.

- Davidson, Joanne O.; Green, Colin R.; Nicholson, Louise F. B.; O'Carroll, Simon J.; Fraser, Mhoyra; Bennet, Laura; Gunn, Alistair Jan (2012): Connexin hemichannel blockade improves outcomes in a model of fetal ischemia. In: *Annals of neurology* 71 (1), S. 121–132. DOI: 10.1002/ana.22654.
- Davis, C. William; Lazarowski, Eduardo (2008): Coupling of airway ciliary activity and mucin secretion to mechanical stresses by purinergic signaling. In: *Respiratory physiology & neurobiology* 163 (1-3), S. 208–213. DOI: 10.1016/j.resp.2008.05.015.
- Decrock, E.; Vuyst, E. de; Vinken, M.; van Moorhem, M.; Vranckx, K.; Wang, N. et al. (2009): Connexin 43 hemichannels contribute to the propagation of apoptotic cell death in a rat C6 glioma cell model. In: *Cell death and differentiation* 16 (1), S. 151–163. DOI: 10.1038/cdd.2008.138.
- D'hondt, Catheleyne; Ponsaerts, Raf; Smedt, Humbert de; Vinken, Mathieu; Vuyst, Elke de; Bock, Marijke de et al. (2011): Pannexin channels in ATP release and beyond: an unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum. In: *Cellular signalling* 23 (2), S. 305–316. DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.07.018.
- Dierks, Anne; Bader, Almke; Lechrich, Tina; Ngezahayo, Anaclét (2019): Stimulation of the A2B Adenosine Receptor Subtype Enhances Connexin26 Hemichannel Activity in Small Airway Epithelial Cells. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 53 (4), S. 606–622. DOI: 10.33594/000000160.
- Dierks, Anne; Vanucci-Bacqué, Corinne; Schäfer, Anne-Marie; Lechrich, Tina; Ruhe, Frederike; Schadzek, Patrik et al. (2022): The Bioactive Phenolic Agents Diaryl Ether CVB2-61 and Diarylheptanoid CVB4-57 as Connexin Hemichannel Blockers. In: *Pharmaceuticals* 15 (10), S. 1173. DOI: 10.3390/ph15101173.
- Donnelly, Steven; English, Grant; Zwart-Storm, Eugene A. de; Lang, Sue; van Steensel, Maurice A. M.; Martin, Patricia E. (2012): Differential susceptibility of Cx26 mutations associated with epidermal dysplasias to peptidoglycan derived from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. In: *Experimental dermatology* 21 (8), S. 592–598. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2012.01521.x.
- Driver, A. G.; Kukoly, C. A.; Ali, S.; Mustafa, S. J. (1993): Adenosine in bronchoalveolar lavage fluid in asthma. In: *The American review of respiratory disease* 148 (1), S. 91–97. DOI: 10.1164/ajrccm/148.1.91.
- Eckle, Tobias; Faigle, Marion; Grenz, Almut; Laucher, Stefanie; Thompson, Linda F.; Eltzschig, Holger K. (2008a): A2B adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak. In: *Blood* 111 (4), S. 2024–2035. DOI: 10.1182/blood-2007-10-117044.
- Eckle, Tobias; Grenz, Almut; Laucher, Stefanie; Eltzschig, Holger K. (2008b): A2B adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 118 (10), S. 3301–3315. DOI: 10.1172/JCI34203.
- Eckle, Tobias; Kewley, Emily M.; Brodsky, Kelley S.; Tak, Eunyoung; Bonney, Stephanie; Gobel, Merit et al. (2014): Identification of hypoxia-inducible factor HIF-1A as transcriptional regulator of the A2B adenosine receptor during acute lung injury. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192 (3), S. 1249–1256. DOI: 10.4049/jimmunol.1100593.
- Eckle, Tobias; Koeppen, Michael; Eltzschig, Holger K. (2009): Role of extracellular adenosine in acute lung injury. In: *Physiology (Bethesda, Md.)* 24, S. 298–306. DOI: 10.1152/physiol.00022.2009.
- Eltzschig, Holger K.; Eckle, Tobias; Mager, Alice; Küper, Natalie; Karcher, Christian; Weissmüller, Thomas et al. (2006): ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. In: *Circulation research* 99 (10), S. 1100–1108. DOI: 10.1161/01.RES.0000250174.31269.70.
- Eskandari, S.; Zampighi, G. A.; Leung, D. W.; Wright, E. M.; Loo, D. D. F. (2002): Inhibition of gap junction hemichannels by chloride channel blockers. In: *The Journal of membrane biology* 185 (2), S. 93–102. DOI: 10.1007/s00232-001-0115-0.

- Esseltine, Jessica L.; Laird, Dale W. (2016): Next-Generation Connexin and Pannexin Cell Biology. In: *Trends in cell biology* 26 (12), S. 944–955. DOI: 10.1016/j.tcb.2016.06.003.
- Evans, W. H.; Ahmad, S.; Diez, J.; George, C. H.; Kendall, J. M.; Martin, P. E. (1999): Trafficking pathways leading to the formation of gap junctions. In: *Novartis Foundation symposium* 219, 44–54; discussion 54–9. DOI: 10.1002/9780470515587.ch4.
- Evans, W. H.; Boitano, S. (2001): Connexin mimetic peptides: specific inhibitors of gap-junctional intercellular communication. In: *Biochemical Society transactions* 29 (Pt 4), S. 606–612. DOI: 10.1042/bst0290606.
- Feoktistov, I.; Biaggioni, I.; Polosa, R.; Holgate, S. T. (1998): Adenosine A2B receptors: a novel therapeutic target in asthma? In: *Trends in Pharmacological Sciences* 19 (4), S. 148–153. DOI: 10.1016/s0165-6147(98)01179-1.
- Fishman, Glenn I.; Eddy, Roger L.; Shows, Thomas B.; Rosenthal, Lawrence; Leinwand, Leslie A. (1991): The human connexin gene family of gap junction proteins. Distinct chromosomal locations but similar structures. In: *Genomics* 10 (1), S. 250–256. DOI: 10.1016/0888-7543(91)90507-b.
- Foster, Kimberly A.; Avery, Michael L.; Yazdaniyan, Mehran; Audus, Kenneth L. (2000): Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery. In: *International Journal of Pharmaceutics* 208 (1-2), S. 1–11. DOI: 10.1016/S0378-5173(00)00452-X.
- Fredholm, B. B. (2007): Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. In: *Cell death and differentiation* 14 (7), S. 1315–1323. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402132.
- Fredholm, B. B.; Irenius, E.; Kull, B.; Schulte, G. (2001): Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. In: *Biochemical pharmacology* 61 (4), S. 443–448. DOI: 10.1016/S0006-2952(00)00570-0.
- García-Vega, Laura; O'Shaughnessy, Erin M.; Jan, Afnan; Bartholomew, Chris; Martin, Patricia E. (2019): Connexin 26 and 43 play a role in regulating proinflammatory events in the epidermis. In: *Journal of cellular physiology*. DOI: 10.1002/jcp.28206.
- Gjertsen, B. T.; Mellgren, G.; Otten, A.; Maronde, E.; Genieser, H. G.; Jastorff, B. et al. (1995): Novel (Rp)-cAMPS analogs as tools for inhibition of cAMP-kinase in cell culture. Basal cAMP-kinase activity modulates interleukin-1 beta action. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (35), S. 20599–20607. DOI: 10.1074/jbc.270.35.20599.
- Go, Mitsuru; Kojima, Takashi; Takano, Ken-ichi; Murata, Masaki; Koizumi, Junichi; Kurose, Makoto et al. (2006): Connexin 26 expression prevents down-regulation of barrier and fence functions of tight junctions by Na⁺/K⁺-ATPase inhibitor ouabain in human airway epithelial cell line Calu-3. In: *Experimental cell research* 312 (19), S. 3847–3856. DOI: 10.1016/j.yexcr.2006.08.014.
- Goodenough, Daniel A.; Paul, David L. (2003): Beyond the gap. Functions of unpaired connexon channels. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 4 (4), S. 285–294. DOI: 10.1038/nrm1072.
- Goodenough, Daniel A.; Paul, David L. (2009): Gap junctions. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1 (1), a002576. DOI: 10.1101/cshperspect.a002576.
- Guilford, P.; Ben Arab, S.; Blanchard, S.; Levilliers, J.; Weissenbach, J.; Belkahia, A.; Petit, C. (1994): A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. In: *Nature genetics* 6 (1), S. 24–28. DOI: 10.1038/ng0194-24.
- Haskó, György; Csóka, Balázs; Németh, Zoltán H.; Vizi, E. Sylvester; Pacher, Pál (2009): A(2B) adenosine receptors in immunity and inflammation. In: *Trends in immunology* 30 (6), S. 263–270. DOI: 10.1016/j.it.2009.04.001.
- Haskó, György; Linden, Joel; Cronstein, Bruce; Pacher, Pál (2008): Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. In: *Nature reviews. Drug discovery* 7 (9), S. 759–770. DOI: 10.1038/nrd2638.

- Hatada, E. N.; Krappmann, D.; Scheidereit, C. (2000): NF-kappaB and the innate immune response. In: *Current opinion in immunology* 12 (1), S. 52–58. DOI: 10.1016/S0952-7915(99)00050-3.
- Henjakovic, M.; Sewald, K.; Switalla, S.; Kaiser, D.; Müller, M.; Veres, T. Z. et al. (2008): Ex vivo testing of immune responses in precision-cut lung slices. In: *Toxicology and applied pharmacology* 231 (1), S. 68–76. DOI: 10.1016/j.taap.2008.04.003.
- Hernandez, Maite; Shao, Qing; Yang, Xiang-Jiao; Luh, Shi-Ping; Kandouz, Mustapha; Batist, Gerald et al. (2006): A histone deacetylation-dependent mechanism for transcriptional repression of the gap junction gene cx43 in prostate cancer cells. In: *The Prostate* 66 (11), S. 1151–1161. DOI: 10.1002/pros.20451.
- Hervé, Jean-Claude; Derangeon, Mickaël; Bahbouhi, Bouchaib; Mesnil, Marc; Sarrouilhe, Denis (2007): The connexin turnover, an important modulating factor of the level of cell-to-cell junctional communication. Comparison with other integral membrane proteins. In: *The Journal of membrane biology* 217 (1-3), S. 21–33. DOI: 10.1007/s00232-007-9054-8.
- Hoegl, Sandra; Brodsky, Kelley S.; Blackburn, Michael R.; Karmouty-Quintana, Harry; Zwissler, Bernhard; Eltzschig, Holger K. (2015): Alveolar Epithelial A2B Adenosine Receptors in Pulmonary Protection during Acute Lung Injury. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195 (4), S. 1815–1824. DOI: 10.4049/jimmunol.1401957.
- Huszár, E.; Vass, G.; Vizi, E.; Csoma, Zs; Barát, E.; Molnár Világos, Gy et al. (2002): Adenosine in exhaled breath condensate in healthy volunteers and in patients with asthma. In: *The European respiratory journal* 20 (6), S. 1393–1398. DOI: 10.1183/09031936.02.00005002.
- Jain, Akash; Chaudhary, Jasmine; Khaira, Harpreet; Chopra, Bhawna; Dhingra, Ashwani (2021): Piperazine. A Promising Scaffold with Analgesic and Anti-inflammatory Potential. In: *Drug research* 71 (2), S. 62–72. DOI: 10.1055/a-1323-2813.
- Jones, Heather D.; Crother, Timothy R.; Gonzalez-Villalobos, Romer A.; Jupelli, Madhulika; Chen, Shuang; Dagvadorj, Jargalsaikhan et al. (2014): The NLRP3 inflammasome is required for the development of hypoxemia in LPS/mechanical ventilation acute lung injury. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 50 (2), S. 270–280. DOI: 10.1165/rcmb.2013-0087OC.
- Kadonaga, James T.; Carner, Kristin R.; Masiarz, Frank R.; Tjian, Robert (1987): Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. In: *Cell* 51 (6), S. 1079–1090. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90594-0.
- Kielian, Tammy (2008): Glial connexins and gap junctions in CNS inflammation and disease. In: *Journal of neurochemistry* 106 (3), S. 1000–1016. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05405.x.
- Kolachala, V.; Asamoah, V.; Wang, L.; Obertone, T. S.; Ziegler, T. R.; Merlin, D.; Sitaraman, S. V. (2005): TNF-alpha upregulates adenosine 2b (A2b) receptor expression and signaling in intestinal epithelial cells: a basis for A2bR overexpression in colitis. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62 (22), S. 2647–2657. DOI: 10.1007/s00018-005-5328-4.
- Koval, M.; Harley, J. E.; Hick, E.; Steinberg, T. H. (1997): Connexin46 is retained as monomers in a trans-Golgi compartment of osteoblastic cells. In: *The Journal of cell biology* 137 (4), S. 847–857. DOI: 10.1083/jcb.137.4.847.
- Krause, G.; Protze, J.; Piontek, J. (2015): Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal structures. In: *Seminars in cell & developmental biology* 42, S. 3–12. DOI: 10.1016/j.semcdb.2015.04.010.
- Kreda, Silvia M.; Okada, Seiko F.; van Heusden, Catharina A.; O'Neal, Wanda; Gabriel, Sherif; Abdullah, Lubna et al. (2007): Coordinated release of nucleotides and mucin from human airway epithelial Calu-3 cells. In: *The Journal of physiology* 584 (Pt 1), S. 245–259. DOI: 10.1113/jphysiol.2007.139840.

- Kumar, Naresh; Goel, Nidhi (2019): Phenolic acids. Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. In: *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)* 24, e00370. DOI: 10.1016/j.btre.2019.e00370.
- Kwon, Taekyung; Harris, Andrew L.; Rossi, Angelo; Bargiello, Thaddeus A. (2011): Molecular dynamics simulations of the Cx26 hemichannel: evaluation of structural models with Brownian dynamics. In: *The Journal of general physiology* 138 (5), S. 475–493. DOI: 10.1085/jgp.201110679.
- Laird, D. W.; Puranam, K. L.; Revel, J. P. (1991): Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. In: *The Biochemical journal* 273(Pt 1), S. 67–72. DOI: 10.1042/bj2730067.
- Laird, Dale W. (2005): Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. In: *Biochimica et biophysica acta* 1711 (2), S. 172–182. DOI: 10.1016/j.bbamem.2004.09.009.
- Laird, Dale W. (2006): Life cycle of connexins in health and disease. In: *The Biochemical journal* 394 (Pt 3), S. 527–543. DOI: 10.1042/BJ20051922.
- Lauf, Undine; Giepmans, Ben N. G.; Lopez, Patricia; Braconnot, Sebastien; Chen, Shu-Chih; Falk, Matthias M. (2002): Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (16), S. 10446–10451. DOI: 10.1073/pnas.162055899.
- Levit, Noah A.; Sellitto, Caterina; Wang, Hong-Zhan; Li, Leping; Srinivas, Miduturu; Brink, Peter R.; White, Thomas W. (2015): Aberrant connexin26 hemichannels underlying keratitis-ichthyosis-deafness syndrome are potently inhibited by mefloquine. In: *The Journal of investigative dermatology* 135 (4), S. 1033–1042. DOI: 10.1038/jid.2014.408.
- Li, Hong-Xia; Liang, Xiao-Yan; Wu, Jiong-He; Yuan, Ya-Ping; Gao, Yue; Cai, Shao-Hua (2021): Simvastatin attenuates acute lung injury by activation of A2B adenosine receptor. In: *Toxicology and applied pharmacology* 422, S. 115460. DOI: 10.1016/j.taap.2021.115460.
- Li, Liang; Zhang, Zhichao; Peng, Jiyun; Wang, Yagang; Zhu, Qing (2014): Cooperation of luteinizing hormone signaling pathways in preovulatory avian follicles regulates circadian clock expression in granulosa cell. In: *Molecular and cellular biochemistry* 394 (1-2), S. 31–41. DOI: 10.1007/s11010-014-2078-3.
- Liu, Xinhe; Gangoso, Ester; Yi, Chenju; Jeanson, Tiffany; Kandelman, Stanislas; Mantz, Jean; Giaume, Christian (2016): General anesthetics have differential inhibitory effects on gap junction channels and hemichannels in astrocytes and neurons. In: *Glia* 64 (4), S. 524–536. DOI: 10.1002/glia.22946.
- Locke, Darren; Koreen, Irina V.; Liu, Jade Yu; Harris, Andrew L. (2004): Reversible pore block of connexin channels by cyclodextrins. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (22), S. 22883–22892. DOI: 10.1074/jbc.M401980200.
- Lopez, William; Ramachandran, Jayalakshmi; Alsamarah, Abdelaziz; Luo, Yun; Harris, Andrew L.; Contreras, Jorge E. (2016): Mechanism of gating by calcium in connexin hemichannels. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (49), E7986–E7995. DOI: 10.1073/pnas.1609378113.
- Losa, Davide; Chanson, Marc (2015): The lung communication network. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72 (15), S. 2793–2808. DOI: 10.1007/s00018-015-1960-9.
- Losa, Davide; Chanson, Marc; Crespin, Sophie (2011): Connexins as therapeutic targets in lung disease. In: *Expert opinion on therapeutic targets* 15 (8), S. 989–1002. DOI: 10.1517/14728222.2011.584875.

- Maeda, Shoji; Nakagawa, So; Suga, Michihiro; Yamashita, Eiki; Oshima, Atsunori; Fujiyoshi, Yoshinori; Tsukihara, Tomitake (2009): Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. In: *Nature* 458 (7238), S. 597–602. DOI: 10.1038/nature07869.
- Maeda, Shoji; Tsukihara, Tomitake (2011): Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68 (7), S. 1115–1129. DOI: 10.1007/s00018-010-0551-z.
- Malekinejad, Mojtaba; Pashaee, Mohammad Reza; Malekinejad, Hassan (2022): 18β-Glycyrrhetic acid altered the intestinal permeability in the human Caco-2 monolayer cell model. In: *European journal of nutrition* 61 (7), S. 3437–3447. DOI: 10.1007/s00394-022-02900-4.
- Martin, Patricia E. M.; Wall, Colin; Griffith, Tudor M. (2005): Effects of connexin-mimetic peptides on gap junction functionality and connexin expression in cultured vascular cells. In: *British journal of pharmacology* 144 (5), S. 617–627. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706102.
- Matchkov, Vladimir V.; Rahman, Awahan; Peng, Hongli; Nilsson, Holger; Aalkjaer, Christian (2004): Junctional and nonjunctional effects of heptanol and glycyrrhetic acid derivatives in rat mesenteric small arteries. In: *British journal of pharmacology* 142 (6), S. 961–972. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705870.
- Mazereeuw-Hautier, J.; Bitoun, E.; Chevrant-Breton, J.; Man, S. Y. K.; Bodemer, C.; Prins, C. et al. (2007): Keratitis-ichthyosis-deafness syndrome: disease expression and spectrum of connexin 26 (GJB2) mutations in 14 patients. In: *The British journal of dermatology* 156 (5), S. 1015–1019. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2007.07806.x.
- Mugisho, Odunayo O.; Green, Colin R.; Kho, Dan T.; Zhang, Jie; Graham, E. Scott; Acosta, Monica L.; Rupenthal, Ilva D. (2018): The inflammasome pathway is amplified and perpetuated in an auto-crine manner through connexin43 hemichannel mediated ATP release. In: *Biochimica et biophysica acta. General subjects* 1862 (3), S. 385–393. DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.11.015.
- Mukherjee, Srimoyee; Sengupta Bandyopadhyay, Sumita (2018): Mechanism of prostaglandin E2-induced transcriptional up-regulation of Oncostatin-M by CREB and Sp1. In: *The Biochemical journal* 475 (2), S. 477–494. DOI: 10.1042/BCJ20170545.
- Musil, L. S.; Goodenough, D. A. (1993): Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. In: *Cell* 74 (6), S. 1065–1077. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90728-9.
- Mustafa, S. Jamal; Nadeem, Ahmed; Fan, Ming; Zhong, Hongyan; Belardinelli, Luiz; Zeng, Dewan (2007): Effect of a specific and selective A(2B) adenosine receptor antagonist on adenosine agonist AMP and allergen-induced airway responsiveness and cellular influx in a mouse model of asthma. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 320 (3), S. 1246–1251. DOI: 10.1124/jpet.106.112250.
- Negoro, Hiromitsu; Okinami, Takeshi; Kanematsu, Akihiro; Imamura, Masaaki; Tabata, Yasuhiko; Ogawa, Osamu (2013): Role of Rev-erba domains for transactivation of the connexin43 promoter with Sp1. In: *FEBS letters* 587 (1), S. 98–103. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.11.021.
- Németh, Zoltán H.; Leibovich, S. Joseph; Deitch, Edwin A.; Vizi, E. Sylvester; Szabó, Csaba; Hasko, Gyorgy (2003): cDNA microarray analysis reveals a nuclear factor-kappaB-independent regulation of macrophage function by adenosine. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 306 (3), S. 1042–1049. DOI: 10.1124/jpet.103.052944.
- Nielsen, Morten Schak; Axelsen, Lene Nygaard; Sorgen, Paul L.; Verma, Vandana; Delmar, Mario; Holstein-Rathlou, Niels-Henrik (2012): Gap junctions. In: *Comprehensive Physiology* 2 (3), S. 1981–2035. DOI: 10.1002/cphy.c110051.
- O'Carroll, Simon J.; Alkadhi, Mamoun; Nicholson, Louise F. B.; Green, Colin R. (2008): Connexin 43 mimetic peptides reduce swelling, astrogliosis, and neuronal cell death after spinal cord injury. In: *Cell communication & adhesion* 15 (1), S. 27–42. DOI: 10.1080/15419060802014164.

- Okamoto, Takayuki; Suzuki, Koji (2017): The Role of Gap Junction-Mediated Endothelial Cell-Cell Interaction in the Crosstalk between Inflammation and Blood Coagulation. In: *International journal of molecular sciences* 18 (11). DOI: 10.3390/ijms18112254.
- Orellana, Juan A.; Bernhardt, Rommy von; Giaume, Christian; Sáez, Juan C. (2012a): Glial hemichannels and their involvement in aging and neurodegenerative diseases. In: *Reviews in the neurosciences* 23 (2), S. 163–177. DOI: 10.1515/revneuro-2011-0065.
- Orellana, Juan A.; Sánchez, Helmuth A.; Schalper, Kurt A.; Figueroa, Vania; Sáez, Juan C. (2012b): Regulation of intercellular calcium signaling through calcium interactions with connexin-based channels. In: *Advances in experimental medicine and biology* 740, S. 777–794. DOI: 10.1007/978-94-007-2888-2_34.
- Orellana, Juan Andres; Sáez, Juan Carlos; Bennett, Michael Vander Lann; Berman, Joan Weinberger; Morgello, Susan; Eugenin, Eliseo Alberto (2014): HIV increases the release of dickkopf-1 protein from human astrocytes by a Cx43 hemichannel-dependent mechanism. In: *Journal of neurochemistry* 128 (5), S. 752–763. DOI: 10.1111/jnc.12492.
- Ortolano, Saida; Di Pasquale, Giovanni; Crispino, Giulia; Anselmi, Fabio; Mammano, Fabio; Chiorini, John A. (2008): Coordinated control of connexin 26 and connexin 30 at the regulatory and functional level in the inner ear. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (48), S. 18776–18781. DOI: 10.1073/pnas.0800831105.
- Oviedo-Orta, Ernesto; Howard Evans, W. (2004): Gap junctions and connexin-mediated communication in the immune system. In: *Biochimica et biophysica acta* 1662 (1-2), S. 102–112. DOI: 10.1016/j.bbamem.2003.10.021.
- Oyamada, Masahito; Oyamada, Yumiko; Takamatsu, Tetsuro (2005): Regulation of connexin expression. In: *Biochimica et biophysica acta* 1719 (1-2), S. 6–23. DOI: 10.1016/j.bbamem.2005.11.002.
- Oyamada, Masahito; Takebe, Kumiko; Oyamada, Yumiko (2013): Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. In: *Biochimica et biophysica acta* 1828 (1), S. 118–133. DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.12.031.
- Pedroza, Mesias; Schneider, Daniel J.; Karmouty-Quintana, Harry; Coote, Julie; Shaw, Stevan; Corrigan, Rebecca et al. (2011): Interleukin-6 contributes to inflammation and remodeling in a model of adenosine mediated lung injury. In: *PloS one* 6 (7), e22667. DOI: 10.1371/journal.pone.0022667.
- Pfenniger, Anna; Wohlwend, Annelise; Kwak, Brenda R. (2011): Mutations in connexin genes and disease. In: *European journal of clinical investigation* 41 (1), S. 103–116. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2010.02378.x.
- Pollok, Simone; Pfeiffer, Ann-Catherine; Lobmann, Ralf; Wright, Catherine S.; Moll, Ingrid; Martin, Patricia E. M.; Brandner, Johanna M. (2011): Connexin 43 mimetic peptide Gap27 reveals potential differences in the role of Cx43 in wound repair between diabetic and non-diabetic cells. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 15 (4), S. 861–873. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01057.x.
- Prasanna Kumar, S.; Shilpa, P.; Salimath, Bharathi P. (2009): Withaferin A suppresses the expression of vascular endothelial growth factor in Ehrlich ascites tumor cells via Sp1 transcription factor. In: *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 3 (2), S. 138–148. Online verfügbar unter <https://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ctbp&volume=3&issue=2&article=003>.
- Rabionet, Raquel; López-Bigas, Núria; Arbonès, Maria Lourdes; Estivill, Xavier (2002): Connexin mutations in hearing loss, dermatological and neurological disorders. In: *Trends in molecular medicine* 8 (5), S. 205–212. DOI: 10.1016/s1471-4914(02)02327-4.
- Retamal, Mauricio A.; Reyes, Edison P.; García, Isaac E.; Pinto, Bernardo; Martínez, Agustín D.; González, Carlos (2015): Diseases associated with leaky hemichannels. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 9, S. 267. DOI: 10.3389/fncel.2015.00267.

- Rhett, J. Matthew; Jourdan, Jane; Gourdie, Robert G. (2011): Connexin 43 connexon to gap junction transition is regulated by zonula occludens-1. In: *Molecular biology of the cell* 22 (9), S. 1516–1528. DOI: 10.1091/mbc.e10-06-0548.
- Ridley, Caroline; Thornton, David J. (2018): Mucins: the frontline defence of the lung. In: *Biochemical Society transactions* 46 (5), S. 1099–1106. DOI: 10.1042/BST20170402.
- Ripps, Harris; Qian, Haohua; Zakevicius, Jane (2002): Pharmacological enhancement of hemi-gap-junctional currents in *Xenopus* oocytes. In: *Journal of neuroscience methods* 121 (1), S. 81–92. DOI: 10.1016/s0165-0270(02)00243-1.
- Ripps, Harris; Qian, Haohua; Zakevicius, Jane (2004): Properties of connexin26 hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. In: *Cellular and molecular neurobiology* 24 (5), S. 647–665. DOI: 10.1023/b:cemn.0000036403.43484.3d.
- Riteau, Nicolas; Gasse, Pamela; Fauconnier, Louis; Gombault, Aurélie; Couegnat, Marion; Fick, Lizette et al. (2010): Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 182 (6), S. 774–783. DOI: 10.1164/rccm.201003-0359OC.
- Robertson, Jennifer; Lang, Sue; Lambert, Peter A.; Martin, Patricia E. (2010): Peptidoglycan derived from *Staphylococcus epidermidis* induces Connexin43 hemichannel activity with consequences on the innate immune response in endothelial cells. In: *The Biochemical journal* 432 (1), S. 133–143. DOI: 10.1042/BJ20091753.
- Rohlf, C.; Ahmad, S.; Borellini, F.; Lei, J.; Glazer, R. I. (1997): Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (34), S. 21137–21141. DOI: 10.1074/jbc.272.34.21137.
- Ross, E. M.; Gilman, A. G. (1980): Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase. In: *Annual review of biochemistry* 49, S. 533–564. DOI: 10.1146/annurev.bi.49.070180.002533.
- Sáez, Juan C.; Retamal, Mauricio A.; Basilio, Daniel; Bukauskas, Feliksas F.; Bennett, Michael V. L. (2005): Connexin-based gap junction hemichannels. Gating mechanisms. In: *Biochimica et biophysica acta* 1711 (2), S. 215–224. DOI: 10.1016/j.bbamem.2005.01.014.
- Sánchez, Helmuth A.; Mese, Gülistan; Srinivas, Miduturu; White, Thomas W.; Verselis, Vytas K. (2010): Differentially altered Ca²⁺ regulation and Ca²⁺ permeability in Cx26 hemichannels formed by the A40V and G45E mutations that cause keratitis ichthyosis deafness syndrome. In: *The Journal of general physiology* 136 (1), S. 47–62. DOI: 10.1085/jgp.201010433.
- Sarieddine, Maya Z. Richani; Scheckenbach, K. E. Ludwig; Foglia, Bernard; Maass, Karen; Garcia, Irène; Kwak, Brenda R.; Chanson, Marc (2009): Connexin43 modulates neutrophil recruitment to the lung. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 13 (11-12), S. 4560–4570. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00654.x.
- Schadzek, Patrik; Hermes, Doris; Stahl, Yannick; Dilger, Nadine; Ngezahayo, Anaclet (2018): Concatenation of Human Connexin26 (hCx26) and Human Connexin46 (hCx46) for the Analysis of Heteromeric Gap Junction Hemichannels and Heterotypic Gap Junction Channels. In: *International journal of molecular sciences* 19 (9). DOI: 10.3390/ijms19092742.
- Schadzek, Patrik; Schlingmann, Barbara; Schaarschmidt, Frank; Lindner, Julia; Koval, Michael; Heisterkamp, Alexander et al. (2016): The cataract related mutation N188T in human connexin46 (hCx46) revealed a critical role for residue N188 in the docking process of gap junction channels. In: *Biochimica et biophysica acta* 1858 (1), S. 57–66. DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.10.001.
- Schadzek, Patrik; Stahl, Yannick; Preller, Matthias; Ngezahayo, Anaclet (2019): Analysis of the dominant mutation N188T of human connexin46 (hCx46) using concatenation and molecular dynamics simulation. In: *FEBS open bio* 9 (5), S. 840–850. DOI: 10.1002/2211-5463.12624.

- Schalper, Kurt A.; Orellana, Juan A.; Berthoud, Viviana M.; Sáez, Juan C. (2009): Dysfunctions of the diffusional membrane pathways mediated by hemichannels in inherited and acquired human diseases. In: *Current vascular pharmacology* 7 (4), S. 486–505. DOI: 10.2174/157016109789043937.
- Schingnitz, Ulrich; Hartmann, Katherine; Macmanus, Christopher F.; Eckle, Tobias; Zug, Stephanie; Colgan, Sean P.; Eltzschig, Holger K. (2010): Signaling through the A2B adenosine receptor dampens endotoxin-induced acute lung injury. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (9), S. 5271–5279. DOI: 10.4049/jimmunol.0903035.
- Schlingmann, Barbara; Molina, Samuel A.; Koval, Michael (2015): Claudins: Gatekeepers of lung epithelial function. In: *Seminars in cell & developmental biology* 42, S. 47–57. DOI: 10.1016/j.semcdb.2015.04.009.
- Seki, Akiko; Coombs, Wanda; Taffet, Steven M.; Delmar, Mario (2004): Loss of electrical communication, but not plaque formation, after mutations in the cytoplasmic loop of connexin43. In: *Heart rhythm* 1 (2), S. 227–233. DOI: 10.1016/j.hrthm.2004.03.066.
- Seminario-Vidal, Lucia; Kreda, Silvia; Jones, Lisa; O'Neal, Wanda; Trejo, Joann; Boucher, Richard C.; Lazarowski, Eduardo R. (2009): Thrombin promotes release of ATP from lung epithelial cells through coordinated activation of rho- and Ca²⁺-dependent signaling pathways. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (31), S. 20638–20648. DOI: 10.1074/jbc.M109.004762.
- Sewald, Katherina; Danov, Olga (2022): Infection of Human Precision-Cut Lung Slices with the Influenza Virus. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2506, S. 119–134. DOI: 10.1007/978-1-0716-2364-0_9.
- Sitaraman, Shanthi V.; Wang, Lixin; Wong, Michelle; Bruewer, Matthias; Hobert, Michael; Yun, C-H et al. (2002): The adenosine 2b receptor is recruited to the plasma membrane and associates with E3KARP and Ezrin upon agonist stimulation. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (36), S. 33188–33195. DOI: 10.1074/jbc.M202522200.
- Söhl, Goran; Willecke, Klaus (2004): Gap junctions and the connexin protein family. In: *Cardiovascular research* 62 (2), S. 228–232. DOI: 10.1016/j.cardiores.2003.11.013.
- Solan, Joell L.; Lampe, Paul D. (2009): Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. In: *The Biochemical journal* 419 (2), S. 261–272. DOI: 10.1042/BJ20082319.
- Spray, David C.; Rozental, Renato; Srinivas, Miduturu (2002): Prospects for rational development of pharmacological gap junction channel blockers. In: *Current drug targets* 3 (6), S. 455–464. DOI: 10.2174/1389450023347353.
- Stanke, Frauke; Janciauskiene, Sabina; Tamm, Stephanie; Wrenger, Sabine; Raddatz, Ellen Luise; Jonigk, Danny; Braubach, Peter (2021): Effect of Alpha-1 Antitrypsin on CFTR Levels in Primary Human Airway Epithelial Cells Grown at the Air-Liquid-Interface. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 26 (9). DOI: 10.3390/molecules26092639.
- Strohmeier, G. R.; Reppert, S. M.; Lencer, W. I.; Madara, J. L. (1995): The A2b adenosine receptor mediates cAMP responses to adenosine receptor agonists in human intestinal epithelia. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (5), S. 2387–2394. DOI: 10.1074/jbc.270.5.2387.
- Sun, Chun-Xiao; Zhong, Hongyan; Mohsenin, Amir; Morschl, Eva; Chunn, Janci L.; Molina, Jose G. et al. (2006): Role of A2B adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury. In: *The Journal of clinical investigation* 116 (8), S. 2173–2182. DOI: 10.1172/JCI27303.
- Sun, Ying; Duan, Yuanyuan; Eisenstein, Anna S.; Hu, Wenbao; Quintana, Adrien; Lam, Wai Kwan et al. (2012): A novel mechanism of control of NFκB activation and inflammation involving A2B adenosine receptors. In: *Journal of cell science* 125 (Pt 19), S. 4507–4517. DOI: 10.1242/jcs.105023.

- Sun, Ying; Wu, Fan; Sun, Fengqiang; Huang, Pingbo (2008): Adenosine promotes IL-6 release in airway epithelia. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180 (6), S. 4173–4181. DOI: 10.4049/jimmunol.180.6.4173.
- Tao, Liang; Harris, Andrew L. (2007): 2-aminoethoxydiphenyl borate directly inhibits channels composed of connexin26 and/or connexin32. In: *Molecular pharmacology* 71 (2), S. 570–579. DOI: 10.1124/mol.106.027508.
- Thomas, Tamsin; Jordan, Karen; Simek, Jamie; Shao, Qing; Jedeszko, Chris; Walton, Paul; Laird, Dale W. (2005): Mechanisms of Cx43 and Cx26 transport to the plasma membrane and gap junction regeneration. In: *Journal of cell science* 118 (Pt 19), S. 4451–4462. DOI: 10.1242/jcs.02569.
- Umeda, Kazuaki; Ikenouchi, Junichi; Katahira-Tayama, Sayaka; Furuse, Kyoko; Sasaki, Hiroyuki; Nakayama, Mayumi et al. (2006): ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. In: *Cell* 126 (4), S. 741–754. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.043.
- Vanucci-Bacqué, Corinne; Camare, Caroline; Carayon, Chantal; Bernis, Corinne; Baltas, Michel; Nègre-Salvayre, Anne; Bedos-Belval, Florence (2016): Synthesis and evaluation of antioxidant phenolic diaryl hydrazones as potent antiangiogenic agents in atherosclerosis. In: *Bioorganic & medicinal chemistry* 24 (16), S. 3571–3578. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.05.067.
- Vinken, Mathieu; Decrock, Elke; Vuyst, Elke de; Bock, Marijke de; Vandenbroucke, Roosmarijn E.; Geest, Bruno G. de et al. (2010): Connexin32 hemichannels contribute to the apoptotic-to-necrotic transition during Fas-mediated hepatocyte cell death. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67 (6), S. 907–918. DOI: 10.1007/s00018-009-0220-2.
- Vuyst, Elke de; Decrock, Elke; Cabooter, Liesbet; Dubyak, George R.; Naus, Christian C.; Evans, W. Howard; Leybaert, Luc (2006): Intracellular calcium changes trigger connexin 32 hemichannel opening. In: *The EMBO journal* 25 (1), S. 34–44. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600908.
- Vuyst, Elke de; Wang, Nan; Decrock, Elke; Bock, Marijke de; Vinken, Mathieu; van Moorchem, Marijke et al. (2009): Ca²⁺ regulation of connexin 43 hemichannels in C6 glioma and glial cells. In: *Cell calcium* 46 (3), S. 176–187. DOI: 10.1016/j.ceca.2009.07.002.
- Waisman, Ari; Liblau, Roland S.; Becher, Burkhard (2015): Innate and adaptive immune responses in the CNS. In: *The Lancet Neurology* 14 (9), S. 945–955. DOI: 10.1016/s1474-4422(15)00141-6.
- Wang, Junjie; Ma, Meiyun; Locovei, Silviu; Keane, Robert W.; Dahl, Gerhard (2007): Modulation of membrane channel currents by gap junction protein mimetic peptides: size matters. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 293 (3), C1112-9. DOI: 10.1152/ajpcell.00097.2007.
- Wang, Nan; Bock, Marijke de; Decrock, Elke; Bol, Mélissa; Gadicherla, Ashish; Bultynck, Geert; Leybaert, Luc (2013): Connexin targeting peptides as inhibitors of voltage- and intracellular Ca²⁺-triggered Cx43 hemichannel opening. In: *Neuropharmacology* 75, S. 506–516. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.08.021.
- Wang, Yuchi; Wong, Lid B.; Mao, Hua (2010): Creation of a long-lifespan ciliated epithelial tissue structure using a 3D collagen scaffold. In: *Biomaterials* 31 (5), S. 848–853. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.098.
- Ware, L. B.; Matthay, M. A. (2000): The acute respiratory distress syndrome. In: *The New England journal of medicine* 342 (18), S. 1334–1349. DOI: 10.1056/NEJM200005043421806.
- Wei, Chih-Jen; Francis, Richard; Xu, Xin; Lo, Cecilia W. (2005): Connexin43 associated with an N-cadherin-containing multiprotein complex is required for gap junction formation in NIH3T3 cells. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (20), S. 19925–19936. DOI: 10.1074/jbc.M412921200.
- Willebrords, Joost; Crespo Yanguas, Sara; Maes, Michaël; Decrock, Elke; Wang, Nan; Leybaert, Luc et al. (2016): Connexins and their channels in inflammation. In: *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 51 (6), S. 413–439. DOI: 10.1080/10409238.2016.1204980.

- Willebrords, Joost; Maes, Michaël; Crespo Yanguas, Sara; Vinken, Mathieu (2017): Inhibitors of connexin and pannexin channels as potential therapeutics. In: *Pharmacology & therapeutics* 180, S. 144–160. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.07.001.
- Willecke, Klaus; Eiberger, Jürgen; Degen, Joachim; Eckardt, Dominik; Romualdi, Alessandro; Güldenagel, Martin et al. (2002): Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. In: *Biological chemistry* 383 (5), S. 725–737. DOI: 10.1515/BC.2002.076.
- Xu, Liang; Carrer, Andrea; Zonta, Francesco; Qu, Zhihu; Ma, Peixiang; Li, Sheng et al. (2017): Design and Characterization of a Human Monoclonal Antibody that Modulates Mutant Connexin 26 Hemichannels Implicated in Deafness and Skin Disorders. In: *Frontiers in molecular neuroscience* 10, S. 298. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00298.
- Yang, Dan; Zhang, Ying; Nguyen, Hao G.; Koupenova, Milka; Chauhan, Anil K.; Makitalo, Maria et al. (2006): The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion. In: *The Journal of clinical investigation* 116 (7), S. 1913–1923. DOI: 10.1172/JCI27933.
- Yegutkin, Gennady G. (2008): Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. In: *Biochimica et biophysica acta* 1783 (5), S. 673–694. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.024.
- Yi, Chenju; Ezan, Pascal; Fernández, Paola; Schmitt, Julien; Sáez, Juan C.; Giaume, Christian; Koulakoff, Annette (2017): Inhibition of glial hemichannels by boldine treatment reduces neuronal suffering in a murine model of Alzheimer's disease. In: *Glia* 65 (10), S. 1607–1625. DOI: 10.1002/glia.23182.
- Zelová, Hana; Hošek, Jan (2013): TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. In: *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 62 (7), S. 641–651. DOI: 10.1007/s00011-013-0633-0.
- Zhang, Fan; Cheng, Joseph; Lam, George; Jin, David K.; Vincent, Loïc; Hackett, Neil R. et al. (2005): Adenovirus vector E4 gene regulates connexin 40 and 43 expression in endothelial cells via PKA and PI3K signal pathways. In: *Circulation research* 96 (9), S. 950–957. DOI: 10.1161/01.RES.0000165867.95291.7b.
- Zhang, J. T.; Chen, M.; Foote, C. I.; Nicholson, B. J. (1996): Membrane integration of in vitro-translated gap junctional proteins. Co- and post-translational mechanisms. In: *Molecular biology of the cell* 7 (3), S. 471–482. DOI: 10.1091/mbc.7.3.471.
- Zhang, Jie; O'Carroll, Simon J.; Henare, Kimiora; Ching, Lai-Ming; Ormonde, Susan; Nicholson, Louise F. B. et al. (2014): Connexin hemichannel induced vascular leak suggests a new paradigm for cancer therapy. In: *FEBS letters* 588 (8), S. 1365–1371. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.02.003.
- Zhang, Tingting; Wang, Yanyan; Xia, Qin; Tu, Zhiyi; Sun, Jiajun; Jing, Qi et al. (2021): Propofol Mediated Protection of the Brain From Ischemia/Reperfusion Injury Through the Regulation of Microglial Connexin 43. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 9, S. 637233. DOI: 10.3389/fcell.2021.637233.
- Zhong, Hongyan; Wu, Yuzhi; Belardinelli, Luiz; Zeng, Dewan (2006): A2B adenosine receptors induce IL-19 from bronchial epithelial cells, resulting in TNF-alpha increase. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 35 (5), S. 587–592. DOI: 10.1165/rcmb.2005-0476OC.
- Zhou, Yang; Mohsenin, Amir; Morschl, Eva; Young, Hays W. J.; Molina, Jose G.; Ma, Wenbin et al. (2009a): Enhanced airway inflammation and remodeling in adenosine deaminase-deficient mice lacking the A2B adenosine receptor. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (12), S. 8037–8046. DOI: 10.4049/jimmunol.0900515.
- Zhou, Yang; Murthy, Jayasimha N.; Zeng, Dewan; Belardinelli, Luiz; Blackburn, Michael R. (2010): Alterations in adenosine metabolism and signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. In: *PloS one* 5 (2), e9224. DOI: 10.1371/journal.pone.0009224.

Zhou, Yang; Schneider, Daniel J.; Blackburn, Michael R. (2009b): Adenosine signaling and the regulation of chronic lung disease. In: *Pharmacology & therapeutics* 123 (1), S. 105–116. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2009.04.003.

Zhou, Yang; Schneider, Daniel J.; Morschl, Eva; Song, Ling; Pedroza, Mesias; Karmouty-Quintana, Harry et al. (2011): Distinct roles for the A2B adenosine receptor in acute and chronic stages of bleomycin-induced lung injury. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186 (2), S. 1097–1106. DOI: 10.4049/jimmunol.1002907.

Zimmermann, H. (2000): Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 362 (4-5), S. 299–309. DOI: 10.1007/s002100000309.

Danksagung

Ich möchte meinem Doktor(groß)vater Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo für einfach alles danken. Er gab mir die Möglichkeit, Inspiration und Freiheit des Experimentierens in seinem Labor. Zudem die Unterstützung mit konstruktiver Kritik an der Organisation meiner Gedanken in Textform. Durch seinen ansteckenden jugendlichen Geist und dem Mut den eigenen Gedanken und Vorstellungen freien Lauf zu lassen und „zu spielen“, ermöglichte die Entwicklung und Vollendung dieser Promotionsarbeit. Er hat einen maßgeblichen Beitrag nicht nur an meiner wissenschaftlichen Entwicklung, sondern auch meiner Lebenseinstellung.

Ich möchte Prof. Dr. Peter Clauß und Prof. Dr. Helge Küster für die Annahme als Korreferenten und Prüfungsvorsitzenden danken.

Ich danke dem „Büro für ChancenVielfalt“ für eine Promotionsabschlussförderung und die damit einhergehende Unterstützung von frischgebackenen Eltern in der Promotion. Ebenso danke ich der Belegschaft der KiTa Spatzennest der Stadt Seelze.

Ich möchte dem lieben Kollegium des ehemaligen Institutes für Biophysik und der jetzigen Abteilung für Zellbiologie und Biophysik danken, für ein tolles Arbeitsklima und die Unterstützung sowohl fachlich als auch privat. Ich danke Daniela dafür, dass sie mich in dieses Institut integriert hat. Ich danke Frank und Nora für die Umsetzung aller Gedanken in Form von Werkstattarbeiten. Ich danke Heidi und Helma unseren TA's für ihre Freundschaft und die Versorgung mit leckerem Essen. Ich danke Patrik, Nadine und Fred für ihre Unterstützung sowohl fachlich als auch freundschaftlich. Ich danke all meinen Studierenden: Masina, Philip, Vicky, Anne-Marie, Jess und Tina für ihre wertvolle Unterstützung bei den Experimenten in dieser Promotionsarbeit und dafür, dass sie immer „frischen Wind“ in das Labor gebracht haben. Ich danke insbesondere meinen Kolleginnen Almke und Anne für alles was sie mir beigebracht haben. Ich danke Almke dafür, dass sie mir das Herz für die Wissenschaft geöffnet und immer an mich geglaubt hat, wenn es mir selbst sehr schwer viel. Und ich danke beiden für alle „nicht-wissenschaftlichen“ Aktivitäten und Gespräche aus denen eine enge Freundschaft entstand.

Ich danke auch meinen Freundinnen Inken und Kristina, die mich im Master und Bachelor begleitet, aufgeheitert und mit ihrer Intelligenz und ihrem Fleiß zur Höchstleistung angetrieben haben. Ich danke meinem sehr guten langjährigen Freund Jonas

Danksagung

(Finne) als „Leidensgenossen“ und wünsche ihm für seine Promotion ein grandioses Finale.

Ich danke meiner Familie. Meinen Eltern, Schwiegereltern und meiner Schwester sowie ihrem Lebensgefährten. Ich danke insbesondere meinem Mann und meinen beiden Kindern. Die alle schwierigen und glücklichen Umstände während meiner Promotion so großartig mitgemacht haben und mich immer unterstützt haben. Die mir die Motivation gegeben haben alles aus mir rauszuholen und noch so viel mehr, als ich mir je hätte vorstellen können.

Curriculum Vitae

Name Anne Dierks, geb. Klett

Geburtstag 17.07.1990

Geburtsort Bremerhaven

Ausbildung

- 2018-2023 *Promotionsstudentin*, Institut für Zellbiologie und Biophysik, Abteilung für Zellphysiologie und Biophysik, Leibniz Universität Hannover
- 2022-2023 Mutterschutz und Elternzeit
- 2019-2020 Mutterschutz und Elternzeit
-
- 2015-2017 *Masterstudium in Life Science*, Leibniz Universität Hannover; Hauptfächer: Molekularbiologie, Bioprozesstechnik; Titel der Masterarbeit: „Funktionale Interaktionen zwischen dem Zytoskelett und Gap Junctions“
- 2016 *Forschungspraktikum* am TECHNION-Israel Institute of Technology, Faculty of Biotechnology and Food Engineering, Haifa; Thema: “*Engineering GH52 β -xylosidase from Geobacillus stearothermophilus for efficient synthesis of xylooligosaccharides*”
-
- 2012-2015 *Bachelorstudium in Life Science*, Leibniz Universität Hannover; Titel der Bachelorarbeit: Analyse von Ca^{2+} -abhängigen Regulationsmechanismen der Gap Junction-abhängigen Zellkommunikation in hCMEC/D3-Zellen“
-
- 2009-2012 *Examinierte Gesundheits- und Krankenpflegerin*, Pflegeakademie Klinikum Bremerhaven-Reinkenheide gGmbH
- 2008-2009 *Berufsvorbereitendes Soziales Jahr (BSJ)*, Lebenshilfe e.V., Bremerhaven
- 2008 *Abitur*, Gymnasium Geschwister Scholl, Bremerhaven

Publikationsliste

Dierks A., Vanucci-Bacqué C., Schäfer A-M., Lehrich T., Ruhe F., Schadzek P., Bedos-Belval F., Ngezahayo A. (2022) The Bioactive Phenolic Agents Diaryl Ether CVB2-61 and Diarylheptanoid CVB4-57 as Connexin Hemichannel Blockers. *Pharmaceuticals (Basel)*, **15(10)**:1173. DOI: 10.3390/ph15101173.

Dierks A., Bader A., Lehrich T., Ngezahayo A. (2019) Stimulation of the A_{2B} Adenosine Receptor Subtype Enhances Connexin26 Hemichannel Activity in Small Airway Epithelial Cells. *Cell Physiol Biochem.*, **53(4)**:606-622. DOI: 10.33594/000000160.

Berkelmann L., Bader A., Meshksar S., **Dierks A.**, Majernik G. H., Krauss J. K., Schwabe K., Manteuffel D., Ngezahayo A. (2019) Tumour-treating fields (TTFields): Investigations on the mechanism of action by electromagnetic exposure of cells in telophase/cytokinesis. *Sci Rep*, **9(1)**:7362. DOI: 10.1038/s41598-019-43621-9.

Bader A., Bintig W., Begandt D., **Klett A.**, Siller I. G., Gregor C., Schaarschmidt F., Weksler B., Romero I., Couraud P. O., Hell S. W., Ngezahayo A. (2017) Adenosine receptors regulate gap junction coupling of the human cerebral microvascular endothelial cells hCMEC/D3 by Ca²⁺ influx through CNG channels. *J Physiol*, **595(8)**: 2497-2517. DOI: 10.1113/JP273150.

Repanas A., Bader A., **Klett A.**, Ngezahayo A., Glasmacher B. (2016) The effect of dipyridamole embedded in a drug delivery system made by electrospun nanofibers on aortic endothelial cells. *J Drug Deliv Sci Technol*, **35**: 343-352. DOI: 10.1016/j.jddst.2016.08.011.

Konferenz Talk

Dierks A., Lehrich T., Tamm S., Braubach P., Stanke F., Ngezahayo A.* (2022) Increased Activity of Cx26 Hemichannel in Epithelial Cells of the Respiratory Airways in Response to Lipopolysaccharide. Europhysiology 2022 of the Physiology Society, Copenhagen, Denmark.

Dierks A., Lehrich T., Schäfer A-M., Tamm S., Braubach P., Stanke F., Bedos-Belval F., Ngezahayo A.* (2022) LPS Enhances the Cx26 Hemichannel Activity in Epithelial Cells of the Respiratory Airways. International Gap Junction Conference 2022, Coruna, Spain.

Dierks A., Lehrich T., Ngezahayo A.* (2019) Adenosine Signalling and Connexin Hemichannels in the Epithelium of Human Respiratory Airway. 98th Annual Meeting of the German Society of Physiology, Ulm, Germany

Dierks A., Bader A., Lehrich T., Ngezahayo A.* (2019) Induction of Cx26 hemichannels in respiratory airway epithelial cells by stimulation of the A_{2B} adenosine receptor. International Gap Junction Conference 2019, Victoria, Kanada.

* Diese Autoren präsentierten.

Bader A. *, Bintig W., **Klett A.**, Ngezahayo A. (2017) CNG Channel – Dependent Regulation of Gap Junction Coupling Activated by Adenosine Receptors in Cerebral Microvascular Endothelial Cells. International Gap Junction Conference 2017, Glasgow, United Kingdom.

Bader A. *, Begandt D., **Klett A.**, Bintig W., Ngezahayo A. (2016) Adenosine Receptors Regulate Gap Junction Coupling in Endothelial Cells by Different Pathways. 95th Annual Meeting of the German Society of Physiology, Lübeck, Germany.

Konferenz Poster

Dierks A., Bader A., Lehrich T., Ngezahayo A.* (2019) Stimulation of A_{2B} Adenosine Receptors Enhances Activity of Connexin26 Hemichannels in Epithelial Cells of the Human Respiratory Airway. 2019 Annual Meeting of the American Society of Cell Biology, Washington DC, USA.

Klett A.*, Bader A., Becker A., Ngezahayo A. (2018) Regulation of Gap Junction Coupling in Human Colon Epithelial Cells by Adenosine Signalling. Europhysiology 2018 of the Physiology Society, London, United Kingdom.

Bader A. *, **Klett A.**, Lüdeke P., Heisterkamp A., Ngezahayo A. (2018) Gold nanoparticle-mediated laser perforation (GNOME LP)/dye transfer: a convenient method to analyse connexin channels in tissue-engineered cell culture systems. Europhysiology 2018 of the Physiology Society, London, United Kingdom.

Bader A. *, **Klett A.**, Schmitt K.J.K., Ngezahayo A. (2016) Activation of Adenosine Receptors in Endothelial Cells Increases Connexin 43 Gap Junction Plaques: Analysis of Dynamic Changes in Connexin 43 Synthesis and Localisation. 2016 Annual Meeting of the American Society of Cell Biology, San Francisco, USA.

Klett A.*, Bader A., Schmitt K., Ngezahayo A. (2016) Evaluation of Dynamic Changes of Connexin43 in Endothelial Cells Using Non-Canonical Amino Acid Tagging. 95th Annual Meeting of the Deutsche Physiologische Gesellschaft, Lübeck, Germany.

Bader A. *, Begandt D., **Klett A.**, Bintig W., Ngezahayo A. (2015) Regulation of Gap Junction Coupling by Adenosine Receptors in Endothelial Cells. 2015 Annual Meeting of the American Society of Cell Biology, San Diego, USA.

* Diese Autoren präsentierten.