Aus dem Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

Die Koordination des Gefäßverhaltens in der Mikrozirkulation wird durch Connexine mit spezifischen Eigenschaften vermittelt

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Volker-Jürgen Schmidt

aus
Celle

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Cor de Wit
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Dendorfer
3. Berichterstatter: Prof. Dr med. Helmut Habazettl

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2008
zum Druck genehmigt. Lübeck, den 18.12.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medzinischen Fakultät -

Inhaltsübersicht

1	**EINLEITUNG**	**1**
2	**MATERIAL UND METHODEN**	**16**
2.1	Versuchstiere	16
2.2	Intravitalmikroskopie	17
2.2.1	Versuchsvorbereitung: Narkose, Katheterisierung und Beatmung	17
2.2.2	Präparation des Musculus cremaster	18
2.2.3	Apparativer Versuchsaufbau	19
2.2.4	Mikroapplikation und Mikropipetten	21
2.2.5	Datenaufzeichnung und Durchmesserbestimmung	22
2.2.6	Versuchsprotokolle	22
2.2.6.1	Untersuchung fortgeleiteter Gefäßreaktionen	22
2.2.6.2	Lokalisierte Applikation vasoaktiver Substanzen	23
2.3	Telemetrische Messung der Hämodynamik	24
2.3.1	Senderimplantation	24
2.3.2	Datenaufzeichnung und Versuchsdurchführung	24
2.4	Immunfluoreszenz	25
2.4.1	Präparation und Färbung der Proben	25
2.4.2	Fluoreszenz- und konfokale Lasermikroskopie	26
2.5	Datenverarbeitung	27
2.6	Statistik und graphische Darstellung	28
2.7	Verwendete Substanzen und Lösungen	29
3	**ERGEBNISSE**	**31**
3.1	Connexinexpression in Arterien und Arteriolen	31
3.1.1	Connexin40	31
3.1.2	Connexin45	31
3.2	Makrohämodynamik in Cx40ko- und Cx40KI45-Tieren	34
3.3	Mikrozirkulation in Cx40ko- und Cx40KI45-Tieren	35
3.3.1	Durchmesser der untersuchten Arteriolen	35
3.3.2	Aufsteigende Vasodilatationen	36

3.3.2.1 Lokalisierte Applikation von Acetylcholin 36
3.3.2.2 Lokalisierte Applikation von Bradykinin 38
3.3.2.3 Lokalisierte Applikation von Adenosin 40
3.3.3 Aufsteigende Vasokonstriktionen 42
3.4 Auswirkung eines Cx45-Verlustes in Gefäßmuskelzellen auf die Koordination des Gefäßverhaltens 44

4 DISKUSSION 49

5 ZUSAMMENFASSUNG 60

6 LITERATURVERZEICHNIS 62

7 ANHANG 70

8 PUBLIKATIONEN 71

9 DANKSAGUNG 73

10 LEBENSLAUF 74

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
Ado	Adenosin
ATP	Adenosintriphosphat
Bk	Bradykinin
Ca^{2+}	Kalzium-Ion
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO_2	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
Cx	Connexin
Cx40ko	Connexin40-defiziente Maus
Cx40KI45	Maus mit einem Austausch von Cx40 durch Cx45
EC	Endothelzelle
EDHF	endothelium-derived hyperpolarising factor (endothelialer hyperpolarisierender Faktor)
EET	Epoxyeicosatriensäure
eGFP	enhanced green fluorescent protein
eNOS	endotheliale NO-Synthase
GTP	Guanosintriphosphat
HCO_3^-	Hydrogencarbonat
K^+	Kalium-Ion
KCl	Kaliumchlorid
KG	Kilogramm Körpergewicht
Mg^{2+}	Magnesium-Ion
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
n	Anzahl der Beobachtungen
N_2	Stickstoff
Na^+	Natrium-Ion
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
Nestin-Cre	Nestin-Promotor-kontrollierte Cre-Rekombinase

NO	Stickstoffmonoxid
O_2	Sauerstoff
PBS	phosphat buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PGI_2	Prostazyklin
SO_4^{2-}	Sulfat-Ion
VSM	glatte Gefäßmuskelzelle

1 EINLEITUNG

Physiologischer Hintergrund

Das intakte Kreislaufsystem ermöglicht bei zeitlich und örtlich wechselnder Aktivität innerhalb des Organismus die Erhaltung gleichmäßiger Umgebungs- und Arbeitsbedingungen aller Zellen und Organe (Homöostase). Angetrieben durch ein Druckgefälle zwischen Arterien und Venen führt es Geweben Sauerstoff und Nährstoffe zu, transportiert CO_2 und anfallende Stoffwechselmetabolite ab und sorgt durch die Zirkulation hormoneller Signalstoffe für die chemische Kommunikation zwischen den Organsystemen. Durch die Verteilung von Antigenen, Antikörpern und Immunzellen und durch den Transport von Wärme trägt es darüber hinaus zur Immunabwehr und Temperaturregulation des Organismus bei. In der vorliegenden Arbeit werden die Mechanismen untersucht, mit denen das Kreislaufsystem die Durchblutung einzelner Organgebiete an deren aktuellen Bedarf anpasst. Die Notwendigkeit einer solchen bedarfsorientierten, ökonomischen Umverteilung des Herzzeitvolumens zugunsten einzelner aktiver Organe ergibt sich aus der Tatsache, dass eine gleichzeitige maximale Perfusion der vielen parallel geschalteten Organsysteme durch das begrenzte Herzzeitvolumen nicht möglich ist. Letzteres wird auf dramatische Weise im Rahmen von septischen und anaphylaktischen Krankheitsprozessen deutlich, bei denen es durch die Erniedrigung des allgemeinen Gefäßtonus zu einer unkontrollierten Verteilung des Herzzeitvolumens kommt. Dieser Zustand kann zu einem kritischen Blutdruckabfall bis zu einem kompletten Versagen des Kreislaufs führen.

Um eine kontrollierte bedarfsgerechte Verteilung zu gewährleisten, unterliegt das Herz-Kreislaufsystem einer Vielzahl von Steuerungsmechanismen, die das Blutvolumen, die Herzleistung und den peripheren Gefäßwiderstand regulieren. Generell werden zentrale Steuerungsmechanismen, die durch das vegetative Nervensystem (Symphathikus und Parasymphatikus) und eine Vielzahl von Hormonen (z.B. Adrenalin, Noradrenalin, Renin, Angiotensin, ANP, ADH, Aldosteron etc.) vermittelt werden, von peripheren Mechanismen unterschieden. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den peripheren Steuerungsmechanismen auf der Ebene der Gefäße in der Mikrozirkulation, in denen die Organdurchblutung im Wesentlichen reguliert wird.

Strömungsmechanik und peripherer Gefäßwiderstand

Nach dem Ohmschen Gesetz $I = U / R$ wird der Blutfluss (I) in einem Organgebiet sowohl von der Druckdifferenz (U) zwischen dem arteriellen und venösen System als auch vom lokalen Strömungswiderstand (R) bestimmt. Hierbei ist zu beachten, dass sich der arterielle Blutdruck auch unter maximaler Belastung nicht mehr als verdoppeln kann und der venöse Druck unter diesen Bedingungen eher ansteigt als abnimmt. Daraus folgt, dass extreme Flusssteigerungen in einem Gewebe nicht durch die Anhebung des allgemeinen arteriellen Druckes, sondern nur durch die Senkung des lokalen Strömungswiderstandes erfolgen können. Nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz $R = (8 \cdot \eta \cdot l) / (\pi \cdot r^4)$ wird dieser lokale Strömungswiderstand in der 4. Potenz durch den Radius des Gefäßes (r) beeinflusst, so dass bereits kleine Erweiterungen des Durchmessers zu einer deutlichen Senkung des Widerstandes und zu großen lokalen Flusssteigerungen führen. Durch Änderungen des permanent vorhandenen Anspannungszustandes (Tonus) der glatten Gefäßmuskulatur kann die Gefäßweite vergrößert (Vasodilatation) oder verringert (Vasokonstriktion) und so die Durchblutung in einem weiten Bereich an den aktuellen Bedarf des Organs angepasst werden. Ein besonders ausgeprägter Ruhetonus der arteriellen Gefäße eines Gewebes steigert das Potential der Gefäßerweiterung und damit gleichzeitig die maximal mögliche Durchblutungsreserve eines Gewebes. Ein Gewebe, in dem diese Bedingungen vorherrschen, ist der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Skelettmuskel, in dem aufgrund stark wechselnder funktioneller Anforderungen der Blutfluss bis auf das 50-fache seines Ruhewertes ansteigen kann (Segal und Kurjiaka, 1995). Um Flusssteigerungen dieser Größenordnung zu erreichen, ist allerdings neben der lokalen Gefäßerweiterung ein koordiniertes Gefäßverhalten notwendig, das die gleichsinnige Öffnung einer langen zuführenden Gefäßstrecke ermöglicht (Lash, 1996).

Der zugrunde liegende Mechanismus dieses abgestimmten Gefäßverhaltens ist das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit. Es interessierte, wie Veränderungen des Gefäßtonus hintereinander geschalteter Arteriolen zu einer gleichsinnigen Gesamtantwort koordiniert werden und welche Bedeutung Connexine als Grundelemente der Gap Junctions bei der Informationsvermittlung entlang der Arteriolen spielen.

Mikrozirkulation

Zur Mikrozirkulation zählen definitionsgemäß alle Gefäßabschnitte, die sich zwischen den kleinen Arterien und Venen befinden sowie das dazugehörige Lymphsystem. Die arteriellen Blutgefäße dieses Abschnitts lassen sich nach ihrem Durchmesser in Arteriolen (40-100 µm) und terminale Arteriolen (8-40 µm) unterteilen, an die sich die Kapillaren (4-8 µm) und weiter auf der venösen Seite postkapilläre Venolen (8-30 µm) und Venolen (30-50 µm) anschließen.

Da etwa 45-60 % des arteriellen Gesamtwiderstandes auf die Arteriolen und terminalen Arteriolen entfallen, werden sie auch als Widerstandsgefäße bezeichnet. Im Gegensatz zu den Kapillaren und Venolen können Widerstandsgefäße ihren Durchmesser über den Kontraktionszustand der glatten Muskelzellen in einem großen Ausmaß variieren, so dass sich in ihnen die effektive Regulation der Organdurchblutung vollzieht. Die Endothelzellen und die glatten Muskelzellen ihrer Gefäßwände haben dabei sensorische, ausführende und koordinierende Funktionen.

Endothel

Das Endothel ist ein Verband einschichtiger ca. 140 µm langer und 7 µm breiter Epithelzellen, die die Innenseite der Blutgefäße und des Herzens auskleiden und deren Längsachse parallel zur Längsachse der Gefäße verläuft (Haas und Duling, 1997). Auf der Lumen abgewandten Seite sitzen die Endothelzellen einer Basallamina auf, die von ihnen synthetisiert wird. Die Zellen, die durch Tight Junctions und Gap Junctions (s.u.) untereinander verbunden sind, bilden in größeren Arterien z.T. auch myoendotheliale Gap Junctions zu den umgebenden glatten Muskelzellen aus (Aydin *et al.*, 1991;Sandow und Hill, 2000;Dora *et al.*, 2003;Sokoya *et al.*, 2007). Obwohl auch in der Mikrozirkulation myoendotheliale Verbindungen existieren, sprechen funktionelle Untersuchungen gegen eine effektive Kopplung über myoendotheliale Gap Junctions (Siegl *et al.*, 2005).

Neben seiner Barrierefunktion als Grenzschicht zwischen Blut und Gewebe übernimmt das Endothel eine Vielzahl von metabolischen und regulatorischen Aufgaben, die von der Steuerung der Leukozytenmigration im Rahmen von Entzündungen über die Beeinflussung der Thrombozytenaggregation und Blutgerinnung bis zur Aktivierung und Inaktivierung von Hormonen reichen. Darüber hinaus trägt das Endothel durch die Synthese von endokrin bzw. parakrin wirksamen Substanzen (Autakoiden) entscheidend zur Regulation des Tonus der glatten Gefäßmuskulatur bei (Furchgott und Zawadzki,

1980;Palmer *et al.*, 1987;Davies *et al.*, 1988;de Wit *et al.*, 1993;de Wit *et al.*, 1997). Die Produktion dieser Autakoide kann durch eine Vielzahl von Substanzen (Acetylcholin, Bradykinin, Serotonin, Histamin, Substanz P, ATP, ADP etc.) aber auch durch physikalische Stimuli wie Änderungen der Wandschubspannung oder des O_2-Partialdruckes ausgelöst werden (Pohl und Busse, 1989;Pohl *et al.*, 1991;de Wit *et al.*, 1997).

Zu den wichtigsten vasodilatorisch wirksamen Autakoiden zählt Stickstoffmonoxid, Prostazyklin und ein hyperpolarisierender Faktor (endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF), dessen chemische Identität in Abhängigkeit vom Gefäßgebiet und der Spezies variiert (s.u.). Vasokonstriktorisch wirken dagegen Autakoide wie Endothelin-1, Thromboxan A_2 oder das reaktive Sauerstoffradikal Superoxid-Anion (Stankevicius *et al.*, 2003). Da sie für die lokale Durchblutungsregulation von entscheidender Bedeutung sind, wird die Bildung und Wirkung der drei wichtigsten vasodilatatorisch wirksamen Autakoide nachfolgend genauer erläutert.

Stickstoffmonoxid (NO)

Die Bildung von NO erfolgt im Endothel durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS), die durch die Bindung von Calmodulin-gebundenem Kalzium aktiviert wird und das gasförmige Molekül daraufhin aus der Aminosäure L-Arginin abspaltet (Palmer *et al.*, 1988;Busse *et al.*, 1991). Wegen der Ca^{2+}-Abhängigkeit der eNOS-Aktivierung bewirken rezeptorabhängige und -unabhängige Agonisten, die die endotheliale Kalziumkonzentration erhöhen (z.B. ACh, Bradykinin, Histamin etc.), eine Steigerung der endothelialen NO-Freisetzung. Das freigesetzte NO diffundiert nach seiner Bildung in den glatten Gefäßmuskel und stimuliert dort eine lösliche Guanylatzyklase, welche aus GTP den second messenger cGMP bildet. cGMP aktiviert nun die cGMP-abhängige Proteinkinase und darüber eine Signalkaskade, in der mehrere Proteine phosphoryliert werden und an dessen Ende die glatte Muskelzelle durch das Absinken des intrazellulären Kalziumspiegels einerseits und durch die Kalzium-Desensitivierung des kontraktilen Apparates andererseits relaxiert wird (Rapoport *et al.*, 1983;Rapoport und Murad, 1983;Bolz *et al.*, 2003;Hofmann *et al.*, 2006).

Prostazyklin

Die Synthese des Prostazyklins beginnt wie bei allen Prostaglandinen zunächst mit der Abspaltung von Arachidonsäure aus den Phospholipiden der Zellmembran durch die Ca^{2+}-abhängige Phospholipase A_2. Das Enzym Cyclooxygenase bildet dann aus der Arachidonsäure das Prostaglandin H_2, welches im Anschluss durch die Prostaglandin I_2-Synthase zu Prostazyklin (syn. Prostaglandin I_2) umgewandelt wird.

Unter den vasoaktiven Prostaglandinen gilt Prostazyklin als potentester Vasodilatator (Moncada *et al.*, 1976), dessen Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur durch die Aktivierung einer G-Protein-regulierten Adenylatzyklase vermittelt wird (Smyth und Fitzgerald, 2002). Der daraus resultierende Anstieg des second messenger cAMP führt über die Aktivierung der Proteinkinase A zu einer Phosphorylierung von Proteinen, die eine Relaxation der glatten Muskelzelle bewirken (Shaul *et al.*, 1992).

EDHF

In Versuchen, in denen Vasodilatationen durch unterschiedlichste Stimuli ausgelöst wurden und gleichzeitig die NO- und Prostaglandin-Produktion gehemmt wurde, wurde gezeigt, dass neben NO und Prostazyklin ein weiterer Mediator oder Mechanismus zur endothelabhängigen Vasodilatation beitragen muss. Dieser bewirkt durch die Öffnung kalziumabhängiger Kaliumkanäle (K_{Ca}) eine NO- und Prostaglandin-unabhängige Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen und wurde erstmals in Arteriolen des Meerschweinchens beschrieben (Bolton *et al.*, 1984;Cowan *et al.*, 1993;Murphy und Brayden, 1995;Coleman *et al.*, 2004).

Die mit der Hyperpolarisierung des Membranpotentials einhergehende Leitfähigkeits-minderung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle führt zu einer erniedrigten Kalziumkonzentration in den glatten Muskelzellen, die daraufhin erschlaffen. Unter der Annahme, dass es sich um einen diffusiblen, universellen Faktor handelt, der ähnlich wie NO von Endothelzellen gebildet und freigesetzt wird und dann zu einer Hyperpolarisation der glatten Muskelzelle führt, wurde der englische Begriff des endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) eingeführt. Heute geht man davon aus, dass je nach Spezies, Gefäßgebiet und verwendetem Stimulus unterschiedliche EDHF existieren können (Quilley *et al.*, 1997;Busse *et al.*, 2002;de Wit und Wolfle, 2007;Kohler und Hoyer, 2007). Die bislang entdeckten Substanzen weisen dabei sehr heterogene chemische Strukturen auf und reichen von Epoxyeicosatriensäuren (EET), die

Cytochrom P450-abhängig gebildet werden (Hecker *et al.*, 1994;Fisslthaler *et al.*, 1999;Bolz *et al.*, 2000;Fleming, 2004), über Kaliumionen (Edwards *et al.*, 1998), Hydrogenperoxid (Matoba und Shimokawa, 2003) und CNP (C-Typ natriuretisches Peptid, (Ahluwalia und Hobbs, 2005)) bis zum Endocannabionid Anandamid (Randall und Kendall, 1998). Darüber hinaus gehen einige Autoren anhand von in-vitro Untersuchungen größerer Gefäße davon aus, dass endotheliale Hyperpolarisationen auch direkt über myoendotheliale Gap Junctions auf den glatten Muskel übertragen werden können (Griffith, 2004;Sokoya *et al.*, 2006). Da in diesem Fall kein diffusibler Faktor nötig ist, wird der Vorgang im Englischen als endothelium-derived hyperpolarisation (EDH) und die Dilatation als EDH-type dilation bezeichnet.

Neben dem verwendeten Stimulus und der untersuchten Spezies hat insbesondere der Gefäßdurchmesser einen Einfluss darauf, wie groß der EDHF-Anteil bzw. der NO- oder Prostazyklin-Anteil an der endothelabhängigen Vasodilatation ist. In dem in dieser Arbeit untersuchten murinen Cremastermuskel zeigten bereits frühere Untersuchungen von ACh-induzierten Vasodilatationen einen besonders ausgeprägten EDHF-Anteil im Bereich der Arteriolen (Koeppen *et al.*, 2004).

Glatter Gefäßmuskel

Die 40-150 µm langen und ca. 8 µm breiten Gefäßmuskelzellen verlaufen in zirkulären Bahnen um das Gefäß und können in großen Arterien bis zu 40 übereinander liegende Zellschichten ausbilden. Dieser Muskelmantel nimmt zur Peripherie hin kontinuierlich an Dicke ab und besteht im Bereich der Arteriolen nur noch aus ein bis zwei Zelllagen. Die einzelnen Zellen sind wie die Endothelzellen untereinander über Gap Junctions verbunden. Der für den Gefäßdurchmesser entscheidende Kontraktionszustand der Zellen wird durch die Kalziumsensitivität der Myofilamente und durch die zytoplasmatische Kalziumkonzentration bestimmt. Letztere kann durch chemische Stimuli aber auch durch direkte Änderungen des Membranpotentials variiert werden. Dabei bewirkt eine Depolarisation der Zellmembran eine vergrößerte Öffnungswahrscheinlichkeit spannungsgesteuerter Kalziumkanäle, was durch den resultierenden Kalziumeinstrom zu einer Kontraktion der Muskelzelle führt.

Die Umsetzung des intrazellulären Kalziumanstiegs in eine Muskelkontraktion wird durch das Sensor-Protein Calmodulin vermittelt. Calmodulin aktiviert nach Bindung von Ca^{2+} die Myosinleichtketten-Kinase (MLCK), die das Myofilament Myosin phosphoryliert und

dadurch dessen ATPase-Aktivität steigert. Durch die Spaltung des Myosin-gebundenen ATPs wird die Interaktion der Aktin- und Myosinfilamente und damit die Verkürzung der Muskelzelle ermöglicht. Bei niedrigen zytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentrationen, wie sie bei einer hyperpolarisierten Muskelzelle vorliegen, überwiegt hingegen die Aktivität der Myosinphosphatase, welche durch Dephosphorylierung des Myosins dessen ATPase-Aktivität beendet und damit zur Erschlaffung der Zelle beiträgt (Rapoport *et al.*, 1983). Auf diese Weise kann der Ruhetonus eines Gefäßes reduziert und die lokale Durchblutung gesteigert werden.

Koordination des Gefäßverhaltens

In Organen mit stark wechselnder Stoffwechselaktivität wie dem Skelettmuskel folgt die Durchblutung weitgehend dem aktuellen Bedarf des Gewebes. Für diese funktionelle Hyperämie im arbeitenden Gewebe sind überwiegend lokalchemische Milieuveränderungen wie der sinkende pH-Wert, die Abnahme des O_2-Partialdruckes und der Konzentrationsanstieg von Stoffwechselmetaboliten (Adenosin etc.) verantwortlich. Dieser direkte, dilatierende Einfluss des veränderten Milieus ist allerdings nur denjenigen Arteriolen zugänglich, die sich während der gesteigerten Aktivität unmittelbar im arbeitenden Gewebe befinden. Da jedoch der arterielle Gesamtwiderstand im Sinne der Kirchhoffschen Regeln aus der Summe der Einzelwiderstände der hintereinander geschalteten Gefäßabschnitte resultiert ($R_{gesamt} = R_1 + R_2 + R_3 + R_4$ ... oder $R_{gesamt} = R_{Arteriolen_intramuskulaär} + R_{Arteriolen_stromaufwärts}$) und ein Großteil des Gefäßwiderstandes oberhalb der metabolisch erfassten Arteriolen liegt, reicht die Dilatation dieser terminalen Anteile nicht aus, um die volle Durchblutungsreserve zu mobilisieren. Im Cremastermuskel des Hamsters beispielsweise machen die intramuskulären Arteriolen nur etwa 50% des Gesamtwiderstandes aus (Segal und Duling, 1986a), so dass bei einer maximalen Dilatation dieser Gefäße der Gesamtwiderstand nur halbiert bzw. der Blutfluss nur maximal verdoppelt werden kann. Da im Skelettmuskel aber deutlich höhere Flusssteigerungen (um das 10-50 fache) gemessen wurden (Segal und Kurjiaka, 1995), wird verständlich, dass neben den intramuskulären Arteriolen auch stromaufwärts gelegene Arteriolen, die dem Einfluss des dilatierend wirkenden Mileus nicht unmittelbar zugänglich sind, zeitgleich erweitert werden müssen, um die Gesamtleitfähigkeit des Gefäßbaumes erheblich zu erhöhen.

Die Betrachtungen zeigen, dass ein koordiniertes Gefäßverhalten erreicht werden muss, das gleichsinnige Durchmesseränderungen zwischen terminalen und proximalen Gefäßabschnitten vermittelt.

Aufsteigende Vasodilatationen

Beobachtet man zeitgleich oder kurz nach dem Auftreten einer lokal ausgelösten Vasodilatation eine Durchmessererweiterung der stromaufwärts gelegenen Gefäßabschnitte spricht man von einer aufsteigenden Vasodilatation. Obwohl bereits 1920 erstmals aufsteigende Vasodilatationen an der Zunge des Frosches beschrieben wurden (Krogh, 1920), sind die zugrunde liegenden Mechanismen bis heute nicht vollständig aufgeklärt und scheinen darüber hinaus in Abhängigkeit von Gefäßgröße und Gefäßgebiet zu variieren. Der erste beschriebene und in den letzten Jahrzehnten wieder in den Fokus der Untersuchungen gekommene Mechanismus ist die flussabhängige Vasodilatation. Schon 1933 beschrieb Schretzenmayr, dass sich Leitungsarterien bei Erhöhung der Flussrate dilatieren. Diese Dilatation beruht auf einer erhöhten Flussgeschwindigkeit, die durch die Vasodilatation nachgeschalteter, distaler Stromgebiete ausgelöst wird. Die mit der erhöhten Geschwindigkeit verbundene Zunahme der Wandschubspannung in den stromaufwärts gelegenen Gefäßabschnitten führt zu einer mechanischen Endothel-stimulation. Durch die tangential wirkende Kraft wird in den Endothelzellen die Freisetzung von NO und auch von Prostazyklin ausgelöst, woraufhin sich die umgebenden glatten Muskelzellen relaxieren (Rubanyi *et al.*, 1986;Pohl *et al.*, 1986;Griffith *et al.*, 1987;Pohl *et al.*, 1991). Der Mechanismus scheint vor allem bei aufsteigenden Vaso-dilatationen in größeren, proximal gelegenen Leitungsgefäßen von Bedeutung zu sein.

Als weitere Ursache der aufsteigenden Vasodilatation ist auch ein venöser Transport von dilatierend wirkenden Stoffwechselmetaboliten (z.B. Adenosin) aus dem arbeitenden Muskel in stromaufwärts gelegene Regionen denkbar, bei dem eine anschließende Diffusion in die Wand der stromaufwärts gelegenen, benachbarten Arteriolen zur Dilatation dieser vorgeschalteten Gefäße führt. Obwohl dieser als veno-arterielle Diffusion bezeichnete Mechanismus experimentell durch die Infusion von Adenosin in Venolen des Hamsters nachgewiesen werden konnte (Hester, 1990), ist er nur dann effektiv, wenn zwischen abtransportierenden Venolen und den benachbarten Arteriolen eine sehr kleine Diffusionsstrecke besteht. Da aufsteigende Dilatationen jedoch auch an isoliert

verlaufenden Arteriolen beobachtet werden und darüber hinaus mit einer für die Diffusion untypischen hohen Geschwindigkeit vermittelt werden, bleibt die veno-arterielle Diffusion in der Skelettmuskulatur als wesentliche Ursache aufsteigender Vasodilatationen umstritten und ist eher von theoretischem Interesse.

Ein Mechanismus, der in den letzten Jahrzehnten bei der Frage nach der Ursache von aufsteigenden Vasodilatationen zunehmend an Bedeutung gewonnen hat, ist die sog. fortgeleitete Gefäßreaktion oder fortgeleitete Antwort (engl.: conducted response). Bereits 1959 hatte Hilton die Vermutung, dass den aufsteigenden Vasodilatationen im Skelettmuskel eine Signalvermittlung innerhalb der arteriellen Gefäßwand zugrunde liegt (Hilton, 1959). Duling und Segal bestätigten diese Hypothese, indem sie zeigten, dass durch die streng lokalisierte Applikation einer vasoaktiven Substanz an die Gefäßwand mittels einer Mikropipette nicht nur eine lokale Vasodilatation sondern auch eine stromauf- und stromabwärts fortgeleitete Dilatation ausgelöst werden kann, welche unabhängig von der Diffusion und Konvektion der verwendeten Substanz ist (Duling und Berne, 1970; Segal und Duling, 1986a;Segal und Duling, 1986b). Die mittels Intravitalmikroskopie an Skelettmuskeln von Hamstern durchgeführten Untersuchungen zeigten weiterhin, dass sich solche Dilatationen in Abhängigkeit vom verwendeten Stimulus mit unterschiedlichen Eigenschaften ausbreiten. Neben lokalisiert applizierten Substanzen konnten auch nervale Muskelstimulationen oder vorübergehend ausgelöste Ischämien der terminalen Skelettmuskelarteriolen aufsteigende Vasodilatationen bis in extramuskulär gelegene Gefäßabschnitte auslösen (Segal und Duling, 1986a;Murrant und Sarelius, 2000;Segal und Jacobs, 2001).

Dass die Antwort auf eine Substanz, die in der Lage ist, eine lokale Gefäßreaktion auszulösen, nicht zwangsläufig immer fortgeleitet wird, zeigten spätere Versuche mit dem NO-Donor Nitroprussid-Natrium (Gustafsson und Holstein-Rathlou, 1999;Hoepfl *et al.*, 2002). So führte die lokale Applikation von NO zwar zu einer lokalen Dilatation, die vergleichbar zur Antwort auf ACh war, jedoch nur nach ACh war auch eine Dilatation in der Entfernung zu beobachten. Dieser Befund zeigt auch, dass in den Arteriolen des Skelettmuskels die alleinige Dilatation eines Gefäßes nicht ausreicht, um eine aufsteigende Antwort im Sinne einer flussinduzierten Vasodilatation (s.o.) zu induzieren. Gegen die Beteiligung flussinduzierter Vasodilatationen im Skelettmuskel spricht weiterhin die hohe Geschwindigkeit, mit der sich die fortgeleiteten Antworten ausbreiten.

Während die flussinduzierte Vasodilatation das Maximum der Dilatation erst nach etwa 30-150 Sekunden erreicht (Pohl *et al.*, 1986), ist die Dilatation in der Entfernung bei fortgeleiteten Gefäßantworten schon innerhalb einer Sekunde vollständig ausgebildet und die zeitliche Verzögerung zur lokalen Antwort somit minimal (Segal und Duling, 1987). Es konnte im Muskel darüber hinaus experimentell nachgewiesen werden, dass auch bei Abwesenheit des Stimulus Wandschubspannung, im Experiment durchgeführt mittels einer Unterbrechung des Blutflusses in einer Arteriole, keine Änderung der Fortleitung von lokal induzierten Dilatationen eintritt (Segal und Duling, 1986b). Neben der Unabhängigkeit von Blutfluss und veno-arterieller Diffusion konnte durch die Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle mittels Tetrodotoxin gezeigt werden, dass die fortgeleiteten Gefäßreaktionen nicht auf nervalen Reflexen beruhen oder durch nervale Impulse moduliert werden (Segal und Duling, 1987;Segal und Duling, 1989).
Zusammenfassend deuten die Befunde, wie Hilton bereits vermutete, auf eine Signalausbreitung innerhalb der Gefäßwand hin.

Entstehung und Vermittlung fortgeleiteter Gefäßantworten

Die hohe Geschwindigkeit, mit der sich fortgeleitete Gefäßantworten entlang der Skelettmuskelarteriolen ausbreiten, deutet auf eine Beteiligung elektrischer Impulse bei der Signalvermittlung. Membranpotentialmessungen an Arteriolen der Hamsterbackentasche zeigten 1992 erstmals, dass periodische Schwankungen des Gefäßtonus (spontane Vasomotionen) zeitlich synchron mit Schwankungen des Membranpotentials in den Gefäßwandzellen einhergehen (Segal und Beny, 1992). Drei Jahre später konnte an isolierten Arteriolen der Hamsterbackentasche demonstriert werden, dass sich Membranpotentialänderungen der Gefäßwandzellen zeitlich synchron zu den fortgeleiteten Vasomotorantworten entlang der Arteriole ausbreiten und in ihrer Höhe mit der Amplitude der Gefäßreaktion korrelieren (Xia und Duling, 1995). Welsh und Segal konnten diesen Zusammenhang kurze Zeit später erstmals auch unter in vivo-Bedingungen an Arteriolen der Hamsterbackentasche aufzeigen (Welsh und Segal, 1998). So führte die lokalisierte Applikation von Kaliumchlorid, Phenylephrin oder Noradrenalin zu einer Depolarisation der glatten Muskelzellen, die sich entlang der Gefäßwand ausbreitete und an entfernten Gefäßstellen zeitlich synchron mit einer Konstriktion des Gefäßes auftrat. Auf der anderen Seite induzierte Acetylcholin eine sich ausbreitende Hyperpolarisation in den Endothelzellen und glatten Muskelzellen, die mit einer fortgeleiteten Vasodilatation

einherging. Diese Befunde machen es wahrscheinlich, dass den fortgeleiteten Gefäßantworten tatsächlich Membranpotentialänderungen zugrunde liegen, die sich entlang der Gefäßwand ausbreiten.

Da sich das elektrische Signal, wie im Beispiel der ACh-Dilatation, dabei über eine größere Strecke fortleitet, als es bei einer passiven elektrotonischen Ladungsverschiebung zu erwarten wäre, muss das Signal darüber hinaus durch einen bisher unbekannten Vestärkungsmechanismus entlang der Arteriole regeneriert werden (Crane *et al.*, 2004).

Gap Junctions

Auf der Suche nach einem Vermittler des zellübergreifenden elektrischen Signals entlang der Arteriolen wurde bereits Ende der 80er Jahre die Rolle von Gap Junctions diskutiert. Gap Junctions sind kanalbildende Zellverbindungen, bei denen sich die Membranen benachbarter Zellen sehr nahe kommen (Abstand: 2 nm, gap = Spalt) und intrazelluläre Räume funktionell miteinander verbunden werden. Auf den korrespondierenden Zellmembranen befinden sich jeweils dichte Ansammlungen von integralen Membranproteinen, die als Connexone (Halbkanäle) bezeichnet werden. Aufgebaut ist ein Connexon aus 6 Proteinuntereinheiten (Connexine), welche sich ringförmig um eine zentrale Pore anordnen. Indem sich zwei Halbkanäle benachbarter Zellen zusammenlagern, entstehen interzelluläre Poren, die relativ unspezifisch von Ionen, Wasser und niedermolekularen Verbindungen mit einem Durchmesser bis 1,5 nm und einer Masse bis 1 kDa passiert werden können (Kumar und Gilula, 1996). Auf diese Weise können benachbarte Zellen sowohl metabolisch (Glucose, second messenger etc.) als auch elektrisch, wie die Impulsfortleitung im Herzen eindrucksvoll zeigt, miteinander gekoppelt werden.

Die Zell-zu-Zell-Kopplung über Gap Junctions wurde erstmalig 1959 in Krebsen beschrieben (Fursphan und Potter, 1959). Von den Strukturproteinen der Gap Junctions, den Connexinen, die nach ihrem Molekulargewicht benannt werden, sind bis heute 21 Subtypen im menschlichen Genom und 20 im Genom der Maus nachgewiesen worden. Trotz dieser relativ großen Anzahl wurden im kardiovaskulären System beider Spezies bis heute jedoch ausschließlich die Connexine Cx37, Cx40, Cx43 und Cx45 nachgewiesen (Sohl und Willecke, 2004). Untersuchungen an größeren arteriellen Blutgefäßen zeigten, dass Endothelzellen Cx37, Cx40 und teilweise auch Cx43 exprimieren, während glatte Gefäßmuskelzellen vor allem Cx43 und Cx45, in seltenen Fällen jedoch auch Cx37 und Cx40 aufweisen (Haefliger *et al.*, 2004;de Wit, 2004). Obwohl Cx37, Cx40 und Cx43

auch in Arteriolen gefunden wurden (Little *et al.*, 1995), ist die genaue Lokalisation der Connexine in den Gefäßen der Mikrozirkulation bis heute nicht abschließend geklärt.

Gap Junctions in der Mikrozirkulation

Bereits früh zeigte sich, dass die unspezifische Gap Junction-Entkopplung durch Sucrose-Lösung, Octanol oder hohe CO_2-Konzentrationen die Fortleitung von Acetycholin- und Kaliumchlorid-induzierten Gefäßreaktionen abschwächen und unterbrechen kann (Segal und Duling, 1987;Segal und Duling, 1989). Neben der unspezifischen Gap Junction-Blockade stehen heutzutage Verfahren zur Verfügung, die eine differenzierte Betrachtung einzelner Connexine und deren Funktionen erlauben. Eine dieser Möglichkeiten ist der Einsatz pharmakologischer Substanzen, die als GAP-Peptide bezeichnet werden. Diese ca. 20 Aminosäuren langen Peptide lagern sich an die extrazellulären Domänen der Connexine und blockieren so den Kanal oder seine Bildung. Die Anwendung der Peptide eignet sich insbesondere für in vitro-Untersuchungen an Zellkulturen oder isolierten Gefäßen (Karagiannis *et al.*, 2004;Martin *et al.*, 2005;Matchkov *et al.*, 2006;Lang *et al.*, 2007). Unter in vivo-Bedingungen kann jedoch die hohe Konzentration der Substanzen, die für eine vollständige Blockade der Connexine erforderlich ist, kaum erreicht werden. Darüber hinaus können pharmakologische Wechselwirkungen der hoch konzentrierten Stoffe die tatsächlichen Folgen der Connexin-Blockade imitieren oder modifizieren, so dass sich das Verfahren zum jetzigen Zeitpunkt nur bedingt für die Untersuchung von Connexin-Funktionen unter in vivo-Bedingungen eignet.

Ein anderer Weg, Erkenntnisse über die Funktionen einzelner Connexine bei der Koordination des Gefäßverhaltens unter in vivo-Bedingungen zu erhalten, ist die Untersuchung genetisch modifizierter Mäuse, bei denen das Gen für ein Connexin mittels homologer Rekombination aus dem Genom der Tiere entfernt wurde. In solchen Tieren führt der Verlust von Cx40 bei der Untersuchung fortgeleiteter Gefäßantworten (ACh, Bradykinin) zu einer Abnahme der Amplitude der Dilatation mit wachsendem Abstand von der Stimulationsstelle (de Wit *et al.*, 2000). Darüber hinaus entwickeln Cx40-defiziente Mäuse einen ausgeprägten arteriellen Hypertonus (de Wit *et al.*, 2000;Kurtz *et al.*, 2007;Wagner *et al.*, 2007). Obwohl die Untersuchungen belegen, dass Cx40 eine entscheidende Rolle bei der Koordination der Gefäßantworten und der Blutdruckregulation spielt, ist über die funktionelle Bedeutung der anderen vaskulären Connexine (Cx37, Cx43 und Cx45) bis heute wenig bekannt. Weiterführende Untersuchungen werden dadurch

limitiert, dass Mäuse mit einer globalen Cx43-Defizienz (perinataler Tod) oder mit einer Cx45-Defizienz (Tod in utero) nicht lebensfähig sind (Kumai *et al.*, 2000;Eckardt *et al.*, 2004).

Aufgrund der Vielfalt der exprimierten Connexine und aufgrund der Tatsache, dass in gewissen Organsystemen wie dem kardiovaskulären System nur bestimmte Connexin-Subtypen vorkommen, stellt sich die Frage, ob Connexine eigenständige Funktionen aufweisen oder ob sie untereinander ohne funktionelle Konsequenzen austauschbar sind. Erste Einblicke in diese grundlegende Fragestellung gelangen durch die Untersuchung von Mäusen, in denen das Gen eines bestimmten Connexins biallelisch durch ein anderes Connexin ersetzt wurde. Dadurch konnte unter anderem gezeigt werden, dass die perinatale Letalität der Cx43-defizienten Mäuse durch den Einbau von Cx40 oder Cx32 verhindert werden kann (Plum *et al.*, 2000). Trotzdem weisen die so erzeugten Tiere unterschiedliche Phänotypen untereinander und gegenüber den Wildtypen auf und leiden z.T. unter schweren funktionellen Störungen wie kardialen Herzrhythmusstörungen oder Sterilität, was auf die Existenz von speziellen Eigenschaften der einzelnen Connexine und deren Notwendigkeit für die Aufrechterhaltung von Funktionen hindeutet.

Zielsetzung der Arbeit

Zentrales Thema der vorliegenden Arbeit sind die Funktionen einzelner Connexine bei der Koordination des Gefäßverhaltens in der Mikrozirkulation des Skelettmuskels. Dazu wurden Arteriolen des Cremastermuskels in narkotisierten Mäusen mit Hilfe von Mikropipetten lokal stimuliert und die fortgeleiteten Gefäßantworten mittels Intravitalmikroskopie analysiert.

Es wurden folgenden Fragestellungen untersucht:

1) Ist Cx40 in der Mikrozirkulation durch Cx45 funktionell ersetzbar?

Obwohl sich über Knockout-Tiere Rückschlüsse über physiologische Organfunktionen von Connexinen gewinnen lassen, lässt dies offen, ob Connexine eigenständige Funktionen bei der Signalfortleitung in der Mikrozirkulation aufweisen oder ob sie funktionell durch andere Mitglieder der Connexin-Familie austauschbar sind. Um dieser Frage nachzugehen, wurden transgene Mäuse untersucht, in denen das funktionell bekannte Cx40 durch ein anderes Connexin (Cx45) biallelisch ersetzt worden war (Cx40KI45). In diesen Tieren wurde die Fortleitung von Gefäßantworten untersucht und mit der in Cx40-defizienten Tieren und Wildtypen verglichen.

2) Kann Cx45 die Funktion von Cx40 bei der Blutdruckregulation ersetzen?

Untersuchungen des Blutdrucks Cx40-defizienter Tiere weisen auf die Bedeutung von Cx40 bei der Blutdruckregulation hin (de Wit *et al.*, 2000;Kurtz *et al.*, 2007;Wagner *et al.*, 2007). Hierbei spielt das Renin-Angiotensin-System eine wichtige Rolle. Mit der telemetrisch über implantierte Sender durchgeführten Blutdruckmessung (Wildtyp, Cx40ko, Cx40KI45) wurde untersucht, ob die Regulation des Blutdrucks durch ein anderes Connexin (Cx45) anstelle des Cx40 gewährleistet werden kann.

3) In welchen Zellen werden Connexine in arteriellen Gefäßen exprimiert?

Neben den funktionellen Experimenten wurde mit immunhistochemischen Verfahren die Expression von Cx40 und Cx45 in der Gefäßwand der Arteriolen und in der Aorta untersucht. Die Zusammenführung der morphologischen und funktionellen Befunde lässt Rückschlüsse auf die Signalwege in der Gefäßwand und weitergehende Einblicke in die

Connexin-vermittelte Fortleitung von Gefäßantworten zu. Weiterhin wurden hierdurch der Verlust von Cx40 und der Ersatz von Cx40 durch Cx45 in den Cx40KI45-Tieren überprüft.

4) Welche Bedeutung hat Cx45 bei der Fortleitung von Gefäßantworten?

Um Einblicke in die funktionelle Rolle von Cx45 bei Koordination des Gefäßverhaltens zu erhalten, wurden Mäuse mit einem glattmuskelspezifischen Cx45-Knouckout untersucht, die im Gegensatz zu Tieren mit einem globalen Knockout lebensfähig sind. Mit Hilfe dieser Tiere sollte die physiologische Bedeutung von Cx45 bei der Fortleitung von Gefäßantworten entlang des glatten Gefäßmuskels untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an männlichen Mäusen mit unterschiedlichen Genotypen durchgeführt. Als Wildtypkontrolle dienten C57BL/6-Mäuse aus der Versuchstierzucht des Physiologischen Instituts der Universität zu Lübeck. Zu den genetisch veränderten Tieren zählten C57BL/6-Mäuse, die durch einen Gen-Knockout defizient für Connexin(Cx)40 waren (Cx40ko) und ebenfalls aus der institutseigenen Zucht stammten. Darüber hinaus erhielten wir freundlicherweise von Prof. Gros (Univ. de la Méditerranée, Marseille) genetisch modifizierte Mäuse, in denen das Cx40-Gen mittels homologer Rekombination biallelisch durch Cx45 ersetzt worden war (Cx40KI45). Durch eine in unserem Tierstall durchgeführte Rückkreuzung mit C57BL/6-Mäusen erhielten die Cx40KI45-Tiere einen allgemeinen genetischen Hintergrund, der mit den anderen untersuchten Maustämmen aus eigener Zucht vergleichbar war. Auf diese Weise konnten Beeinflussungen der Ergebnisse durch Rassenunterschiede vermieden werden. Mittels PCR aus Schwanzproben wurde der Genotyp aller genetisch modifizierten Mäuse festgestellt. Die Wildtyp-, Cx40ko- und Cx40KI45-Tiere wurden im Alter von 2 bis 6 Monaten untersucht und hatten bei Versuchsbeginn ein Gewicht von 21 bis 29 g.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Mäuse untersucht, deren glatte Gefäßmuskelzellen defizient für Cx45 waren. Dieser zellspezifische Genverlust wurde durch ein konditionales Knockout-Verfahren erzielt (Crelox-System). Hierbei entfernte eine Cre-Rekombinase, die unter der Kontrolle eines glattmuskelspezifisch aktiven Promotors (Nestin-Promotor) stand, das Cx45-Gen aus dem Genom der glatten Muskelzellen (Maxeiner *et al.*, 2005). Als Ansatzstellen für das Schneideenzym dienten zwei loxP-Sequenzen, mit denen das Gen beidseits flankiert worden war (flanked by loxP-sites = „floxed“). Die uns von Prof. Willecke (Bonn) freundlicherweise zur Verfügung gestellten Mäuse hatten bei Versuchsbeginn ein Alter von 8 bis 12 Monaten und ein Gewicht zwischen 24 und 38 g. Als Wildtypkontrollen dienten Wurfgeschwister, denen die Cre-Rekombinase und der aktivierende Promotor fehlten.

Alle Versuchstiere hatten freien Zugang zu Standardfutter und Trinkwasser. Die Tierversuche wurden den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes entsprechend durchgeführt und waren durch das Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Landwirtschaft des Landes Schleswig-Holstein genehmigt worden (s. Anhang).

2.2 Intravitalmikroskopie

2.2.1 Versuchsvorbereitung: Narkose, Katheterisierung und Beatmung

Das Versuchstier wurde gewogen und durch eine intraperitoneale Injektion von Midazolam (5 mg/kg KG), Fentanyl (0,05 mg/kg KG) und Medetomidin (0,5 mg/kg KG) narkotisiert. Nach Einsetzen des Toleranzstadiums nach 5-10 Minuten begann die Präparation der Maus mit der Rasur der vorderen Halspartie und der Genitalregion.

Zur Erleichterung der Spontanatmung und zur späteren Beatmung wurde das Versuchstier anschließend tracheotomiert. Mit einem 1 cm langen, medianen Hautschnitt wurde hierfür zunächst die ventrale Halspartie eröffnet. Anschließend wurde die Trachea dargestellt und zwischen zwei Knorpelspangen mit einem Skalpell eingeschnitten. Durch die Öffnung wurde ein 1 cm langer Tubus aus Polyethylen (PE 50, Schubert, Hamburg) in die Luftröhre eingeführt und mit zwei Bindfäden fixiert.

Zur kontinuierlichen Narkoseinfusion wurde anschließend ein zentralvenöser Zugang gelegt. Hierfür wurde die rechte Vena jugularis lateral der Trachea dargestellt und mit zwei Schlingen aus Bindfaden aufgespannt (Abb. 2.1). Anschließend wurde das Gefäß mit einer Mikroschere eingeschnitten und ein mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllter Polyethylenkatheter (PE 10, Schubert, Hamburg) in das Lumen eingeführt. Nach dem Lösen der Halteschlingen wurde der Katheter vorsichtig vorgeschoben und mit drei Bindfäden am Gefäß fixiert. Nachdem die intraluminale Lage des Katheters durch Blutaspiration oder Flüssigkeitsinjektion getestet wurde, erfolgte die Applikation der Narkoselösung kontinuierlich über einen Perfusor (2 - 4 µl/min: 0,2 mg/ml Midazolam, 0,002 mg/ml Fentanyl und 0,02 mg/ml Medetomidin; Perfusor Typ 540101, TSE Systems, Bad Homburg). Nach Abschluss der Cremasterpräparation wurde das Versuchstier über den Trachealtubus kontrolliert beatmet (Beatmungsfrequenz 160-170 /min, Beatmungsdruck 2 cm H_2O, Respirator, Hugo-Basile, Italien).

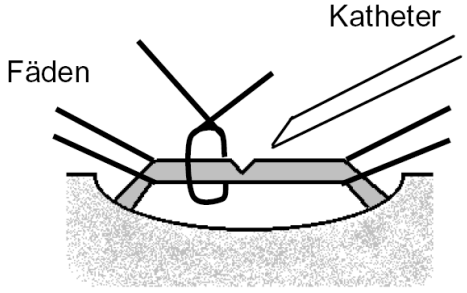

Abb. 2.1: Hals mit aufgespannter Jugularvene, seitliche Ansicht.
Die Abbildung zeigt das eingeschnittene Gefäß kurz vor der Einführung des Venenkatheters.

2.2.2 Präparation des Musculus cremaster

Zur Intravitalmikroskopie der Arteriolen der Mikrozirkulation wurde der rechte Musculus cremaster nach der Methode von Baez (Baez, 1973), die geringfügig modifiziert wurde, präpariert. Dafür wurde die narkotisierte Maus auf einen Mikroskopiertisch aus Plexiglas mit beheizter Bodenplatte (institutseigene Werkstatt) gelagert. Anschließend wurde das rechte Skrotum mit 34°C warmer Krebs-Lösung (s. Abschnitt 2.2.3) superfundiert und mit einer Mikroschere am distalen Pol eröffnet. Von der vorderen Mittellinie ausgehend wurde die Inzision nach laterokranial bis in die rechte Inguinalregion erweitert und die darunter liegende Muskelfaszie abpräpariert. An der Spitze des freiliegenden Muskelsacks wurde ein atraumatischer Faden (Prolene® 6/0, Ethicon, Hamburg) fixiert, über den der Cremastermuskel senkrecht aufgespannt wurde, um anheftende Bindegewebsreste zu lösen und den Muskel zu mobilisieren. Anschließend wurde der Muskel nach kaudal auf eine im Mikroskopiertisch integrierte Glasplatte ausgelagert und der apikale Faden in einem angrenzenden Silikonring fixiert. Mit einer Mikroschere wurde der aufgespannte Muskelsack dann unter größtmöglicher Schonung der Gefäßarkaden vom distalen Pol bis zu seiner Basis eröffnet. Die Seitenränder des nun flächig aufliegenden Muskels wurden mit 2-3 Einzelknopfnähten (atraumatischer Faden) fixiert und durch Einnähen in den Silikonring aufgespannt (Abb. 2.2). Zur Vergrößerung des Sichtfeldes wurden Hoden und Nebenhoden durch Trennung des zum Cremastermuskel ziehenden Bindegewebsstranges mobilisiert und anschließend in die Bauchhöhle reponiert.

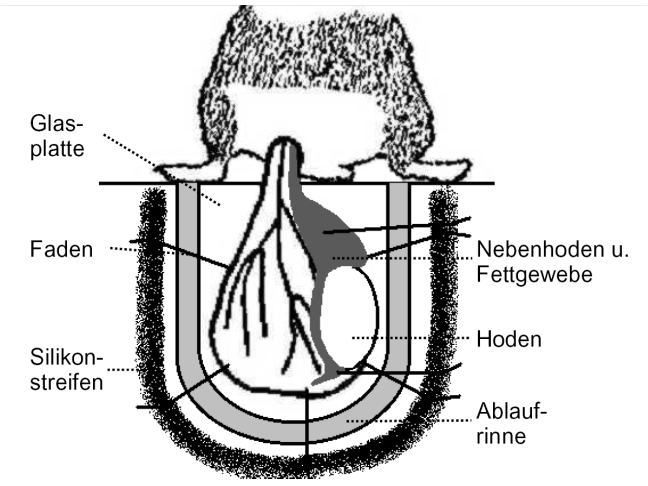

Abb. 2.2: Cremasterpräparation
Der ausgelagerte Muskel wurde mit Hilfe von atraumatischen Fäden, die in einem Silikonstreifen fixiert wurden, über der Glasplatte locker aufgespannt. Hoden und Nebenhoden wurden nach Darstellung des M. cremaster zurück in die Bauchhöhle geschoben.

2.2.3 Apparativer Versuchsaufbau

Nach Abschluss der Präparation wurde die Versuchsplattform mit der Maus auf ein binokulares Mikroskop (Axioskop 2 FS, Zeiss, Jena) mit fixierter Arbeitsplattform („fixed stage“) montiert. Während die Versuchsplattform und die Instrumente zur Positionierung der Mikropipetten fest mit der Tischplatte verbunden waren, wurde das Mikroskop zur Durchmusterung des Muskels auf einer verschieblichen Bühne frei über das Präparat bewegt. Hierdurch konnte der gesamte Gefäßbaum beobachtet werden, ohne dabei die Position der eingebrachten Pipetten zu verändern. Das Mikroskop verfügte über Wasserimmersionsobjektive mit 10- und 40-facher Vergößerung (numerische Apertur: 0,3 / 0,75) und großem Arbeitsabstand. Zur Vergrößerung dienten darüber hinaus 10-fach Okulare. Die Apertur des Kondensor betrug 0,32.

Die zur Stimulation der Arteriolen eingesetzten Glasmikropipetten waren über einen Pipettenhalter (Eppendorf) mit einem Mikromanipulator (Light-Weight Manipulator M-152 mit One Dimensional Oil Hydraulic Micromanipulator MMO-22, Narishige, Japan) verbunden, mit dem die eingespannte Pipette in allen Ebenen bewegt und dadurch zielgenau neben der untersuchten Arteriole platziert werden konnte.

Ein pneumatischer Druckgeber (PDES-02D, npi electronic GmbH, Tamm), mit dem der Pipettenhalter über einen Teflonschlauch in Verbindung stand, löste per Knopfdruck einen frei wählbaren Druckimpuls aus (50-1000ms, 1,4 bar), der auf das Innere der Pipette übertragen wurde und zur Abgabe einer sehr geringen Menge vasoaktiver Flüssigkeit an der Pipettenspitze führte.

Superfusionssystem

Mit dem Ziel eine möglichst physiologische Umgebung zu schaffen und das Gewebe vor dem Austrocknen zu schützen, wurde der Cremastermuskel von Beginn an kontinuierlich mit 34°C warmer (Wärmekreislauf), Bicarbonat-gepufferter Salzlösung (Krebs-Lösung) superfundiert. Die ionale Zusammensetzung der eingesetzten Krebs-Lösung entsprach dabei annähernd dem physiologischen Milieu des Extrazellulärraumes (in mmol/L: Na^+ 143, K^+ 6, Ca^{2+} 2,5, Mg^{2+} 1,2, Cl^- 128, HCO_3^- 25, SO_4^{2-} 1,2, $H_2PO_4^-$ 1,2). Durch eine kontinuierliche Begasung der Lösung mit 95% N_2 und 5% CO_2 stellte sich ein pCO_2-Wert von 40 mmHg ein, welcher zusammen mit der eingesetzten HCO_3^--Konzentration einen konstanten pH-Wert von ca. 7,4 gewährleistete. Durch die Beimischung des Sauerstoffs der Umgebungsluft betrug der gemessene O_2-Partialdruck der Lösung etwa

30 mmHg. Die Krebs-Lösung wurde mit einer Flussrate von 8 ml/min über den Muskel superfundiert und diente gleichzeitig als Immersionsmedium für die eingesetzten Objektive.

Substanzen, die eine globale Wirkung auf alle Gefäße des Muskels erzielen sollten, wurden der Superfusionslösung mit Hilfe einer Rollerpumpe (Minipuls 3, Gilson, Frankreich) beigemischt. Die gelöste zu untersuchende Substanz wurde dabei 100-fach konzentriert mit einer Flussrate von 0,08 ml/min in die Superfusionslösung appliziert. In Abbildung 2.3 ist der Aufbau des Superfusionssystems, das während der Intravitalmikroskopie verwendet wurde, schematisch dargestellt.

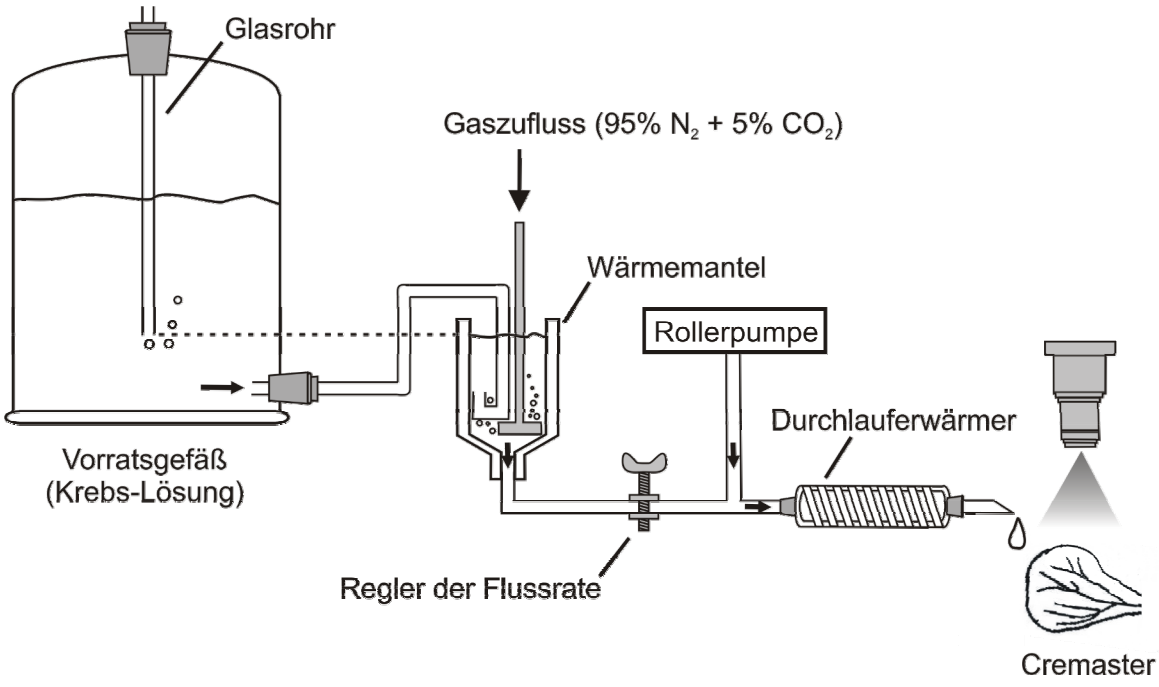

Abb. 2.3: Superfusionssystem.
Die Krebslösung aus dem Vorratsgefäß floss in ein zweites Gefäß, in dem die Lösung mit einem Gasgemisch equilibriert wurde, um einen konstanten pH-Wert von 7,4 zu erhalten. Während der Passage des zweiten Gefäßes, das von einem Wärmemantel umgeben war, und während des Durchtritts durch den Durchlauferwärmer erwärmte sich die Lösung und erreichte den Muskel mit einer Temperatur von 34°C. Die Flussrate wurde durch einen zwischengeschalteten Regler auf 8 ml/min eingestellt. Mit einer Rollerpumpe konnten der Superfusionslösung über einen Nebenzugang Substanzen beigemischt werden.

2.2.4 Mikroapplikation und Mikropipetten

Da bei der Untersuchung fortgeleiteter Gefäßreaktionen eine streng auf die Applikationsstelle lokalisierte Wirkung erwünscht war, wurden die Substanzen mit einer Glasmikropipette perivaskulär (Abb. 2.4), dicht neben die Wand der Arteriole appliziert (Abstand zur Arteriole: 5-15 µm). Die durch den pneumatischen Druckgeber kurzzeitig erzeugte Druckerhöhung (50-1000 ms, 1,4 bar) in der Pipette setzte eine sehr geringe Menge vasoaktiver Lösung (< 10 nl) an der Pipettenspitze frei. Eine erfolgreiche Applikation konnte durch ein kurzes Auseinanderweichen des umgebenden Gewebes oder durch eine auftretende Gefäßreaktion (Vasodilatation bzw. –konstriktion) verifiziert werden.

Die verwendeten Mikropipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren mit internem Filament (Aussendurchmesser 1 mm, Innendurchmesser 0,58 mm, Länge 100 mm) an einem Mikropipettenpuller gezogen (Flaming /Brown Micropipette Puller Modell P-97, Sutter Instrument Co., USA). Um die Penetrationseigenschaften der Pipetten zu verbessern und um die Öffnung der Pipettenspitze auf 2 µm zu erweitern, wurden die gezogenen Pipetten auf einem Mikropipetten-Schleiftisch (institutseigene Werkstatt) unter mikroskopischer Sicht (Auflichtmikroskop M650, Wild, Schweiz) nass geschliffen.

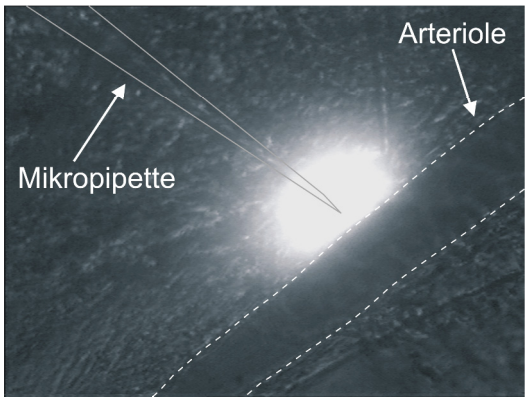

Abb. 2.4: Mikroapplikation.
Die Mikropipette wurde dicht neben der Wand der Arteriole (gestrichelte Linie) platziert. Der applizierte Bolus, der durch einen fluoreszierenden Farbstoff sichtbar wird, wirkte auf die Gefäßwand, ohne in das Lumen der Arteriole einzudringen.

2.2.5 Datenaufzeichnung und Gefäßdurchmesserbestimmung

Eine an den Strahlengang des Mikroskops angeschlossene Videokamera (XC-77CE, PCO Computer Optics, Kehlheim) projizierte das mikroskopische Bild auf einen externen Bildschirm (PVM-1442 QM, Sony, Japan) und ermöglichte die Videoaufzeichnung (Videorekorder, AG-5700, Panasonic, Japan) der Mikrozirkulation. Zur Auswertung der einzelnen Beobachtungen wurde mittels Videotimer ein zeitliches Signal in das Bild eingeblendet. Anhand der dokumentierten Zeiten konnten die Beobachtungen nach dem Versuch den einzelnen Gefäßstellen und Stimulationen zugeordnet werden.

Zur Bestimmung der Änderung des Gefäßdurchmessers wurden die Videoaufnahmen digitalisiert (LAB View Software, National Instruments) und als Abfolge von Einzelbildern (Frequenz 1 Hz) auf einem Computer (Pentium 4 mit Videoeingang) gespeichert. Mit einem speziellen Messprogramm (institutseigene Entwicklung) wurde anschließend der Innendurchmesser der Arteriole in jedem Einzelbild ermittelt. Die Kalibrierung des Messprogramms erfolgte mit einem Objektmikrometer, dessen Abbildung durch das Mikroskop aufgezeichnet und anschließend am Computer digitalisiert wurde.

Für die Aufzeichnung von Fluoreszenzaufnahmen wurde die Videokamera durch eine lichtempfindliche Kamera (C8484-O5G, Hamamatsu, Japan) ersetzt, deren Bild auf einem externen Computer (Wasabi Bildverarbeitungssoftware, Hamamatsu, Japan) wiedergegeben und gespeichert wurde. Zur Anregung wurde eine Quecksilberlampe mit eigenem Vorschaltegerät verwendet (HBO 100 Watt, Osram, München). Der verwendete Filtersatz wies eine Anregungswellenlänge von 488 nm, einen Strahlenteiler von 510 nm und einen Langpassfilter von 520 nm auf (Filtersatz Nr. 9, Zeiss, Jena).

2.2.6 Versuchsprotokolle

2.2.6.1 Untersuchung fortgeleiteter Gefäßreaktionen

Für die Untersuchung der fortgeleiteten Gefäßreaktionen wurden Arteriolen ausgewählt, die in ihrem Verlauf wenig Abzweigungen und Kalibersprünge aufwiesen. Weitere Einschlusskriterien waren ein ausreichender Gefäßmuskeltonus sowie ein Gefäßdurchmesser kleiner 40 µm.

Nachdem die Stimulationspipette dicht neben der Arteriole platziert war, wurde zunächst die Gefäßreaktion an der Applikationsstelle vor, während und nach Stimulation mit der zu

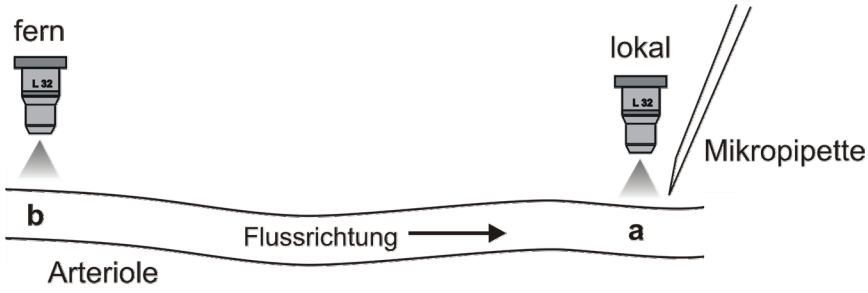

Abb. 2.5: Beobachtung der lokalen und fortgeleiteten Gefäßreaktion.
Die Antwort des Gefäßes auf eine lokalisierte Stimulation wurde zunächst an der Applikationsstelle (a) und im Anschluss an der entfernten, stromaufwärts gelegenen Stelle (b) beobachtet. Die Position der Mikropipette blieb dabei unverändert.

untersuchenden Substanz beobachtet. Erfolgte eine deutliche und reproduzierbare lokale Vasomotorantwort, wurden im nächsten Schritt entfernte Abschnitte desselben Gefäßes nach erneuter lokaler Stimulation beobachtet (Abb. 2.5). Um einen möglichen konvektiven Transport der applizierten Substanzen mit dem Blutstrom in das Beobachtungsgebiet zu vermeiden, wurden ausschließlich entfernte Stellen untersucht, die sich stromaufwärts der Applikationsstelle befanden. Die Gefäßreaktion an einer Beobachtungsstelle wurde jeweils 30 Sekunden vor bis 90 Sekunden nach der Stimulation aufgezeichnet. Für jede Beobachtungsstelle wurden mindestens zwei Beobachtungsreihen durchgeführt, um einen gemittelten Wert der Gefäßreaktion zu erhalten.

Am Ende des Versuches wurde durch die gleichzeitige Superfusion von Nitroprussid-Natrium, Adenosin und Acetylcholin (jeweils 30 µM) der maximale Durchmesser des Gefäßes an jeder beobachteten Stelle bestimmt. Der Wert wurde als maximal mögliche Dilatation des Gefäßes angesehen und in der späteren Versuchsauswertung verwendet.

2.2.6.2 Lokalisierte Applikation vasoaktiver Substanzen

Zur Auslösung fortgeleiteter Gefäßdilatationen wurden Acetycholin (1 mmol/L), Adenosin (10 mmol/L) und Bradykinin (10 mmol/L) als Stimulationssubstanzen verwendet. Neben der lokalen Antwort wurde die Fortleitung der Vasodilatationen in einer Entfernung von 600 und 1200 µm stromaufwärts der Stimulationspipette untersucht. Fortgeleitete Gefäßkonstriktionen wurden durch die Applikation einer hochkonzentrierten Kaliumchloridlösung (KCl, 3 mol/L) induziert und die fortgeleiteten Antworten in einem Abstand von 300, 600 und 900 µm stromaufwärts von der Applikationsstelle beobachtet.

2.3 Telemetrische Messung der Hämodynamik

2.3.1 Senderimplantation

Zur Erfassung hämodynamischer Parameter (arterieller Blutdruck und Herzfrequenz) in nichtnarkotisierten Mäusen wurde den Versuchstieren ein telemetrischer Sender (Modell PhysioTel® PA-C20**,** DSI, USA) mit Anschluss in die Arteria carotis implantiert. Dazu wurde die Maus mit Isofluran narkotisiert und in Bauchlage gelagert. Nach einem dorsalen Hautschnitt in Höhe der Brustwirbelsäule wurde durch Lösung der Oberhaut eine subkutane Tasche geschaffen, in welche der Sender eingebracht wurde. Nachdem die Maus auf den Rücken umgelagert und der Hals durch einen medianen Schnitt eröffnet wurde, erfolgte die Freipräparation der A. carotis. Durch vorsichtiges Lösen der lateralen Halshaut vom Unterhautgewebe konnte der vom Sender ausgehende Messkatheter von dorsal auf subkutanem Weg in die geöffnete Halspartie überführt werden. Für die Messkatheterimplantation in die A. carotis wurde zunächst der Blutfluß der Halsschlagader durch Spannung eines Baumwollfadens am kaudalen Ende des Gefäßes unterbrochen. Anschließend wurde das Gefäß kranial abgebunden und etwa in der Mitte des Halses durch eine Inzision eröffnet. Nach Einführung der Meßsonde in die eröffnete A. carotis wurde der Katheter mit zwei Baumwollfäden fixiert und die distale Kompression gelöst. Die Hautschnitte wurden abschließend mit Einzelknopfnähten verschlossen (Prolene® 6/0, Ethicon, Hamburg). Nach Abschluss der Hautnähte wurde die Inhalationsnarkose beendet und die Maus zurück in ihren Käfig gelagert, in dem sie wenige Minuten später wieder aus der Narkose erwachte.

2.3.2 Datenaufzeichnung und Versuchsdurchführung

Die vom implantierten Sender erfassten Daten wurden an eine Empfänger-Plattform (Modell PhysioTel® RPC-1, NSI, USA) unterhalb des Käfigs übertragen. Mit einem Datenaufzeichnungsprogramm (Dataquest A.R.T®., DSI, USA) wurden die Werte kontinuierlich auf einem Computersystem gespeichert und nachträglich ausgewertet. Die Herzfrequenz konnte aufgrund der hohen Datenaufnahmerate (500 Hz) aus der Änderung des Blutdrucks ermittelt werden. Die Kreislaufparameter wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen nach der Implantation gemessen. Die Messungen wurden zu einer festgelegten Tageszeit (14-15 Uhr) durchgeführt, um den Einfluss von zirkardianen Schwankungen auf die hämodynamischen Parameter zu minimieren.

2.4 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurde die Expression bestimmter Connexine in der Gefäßwand der Aorta und der Cremasterarteriolen untersucht. Bei dem verwendeten indirekten Verfahren wurden die Proben im ersten Schritt mit einem monoklonalen Antikörper gegen Cx40 (Cx40-Rabbit-Anti-Mouse-AB 1726, Chemicon International, Temecula CA, USA) oder gegen Cx45 (Cx45-rabbit-anti-mouse-AB 1745, Chemicon International) inkubiert. Bei erfolgter Bindung an das Zielprotein konnte der Immunkomplex durch einen zweiten, fluoreszenzkonjugierten Antikörper (Alexa Fluor 594 Goat Anti-Rabbit, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) visualisiert werden. Für die spätere fluoreszenz- und lasermikroskopische Analyse wurden die Präparate zusätzlich mit einem Zellkern-Farbstoff behandelt (Bisbenzimid H33342, Calbiochem, Darmstadt oder Sytox® Green, Invitrogen, Carlsbad CA, USA).

2.4.1 Präparation und Färbung der Proben

Zur Probengewinnung wurde die Maus narkotisiert und der Cremastermuskel sowie die Aorta freipräpariert. Nachdem die Maus durch einen Genickbruch getötet wurde, wurden Muskel und Aorta reseziert und in eine Probenkammer (Well) mit Gelboden (Sylgard) überführt. Der Cremastermuskel und die längs eröffnete Aorta wurden anschließend auf dem Kammerboden mit Präpariernadeln flächig fixiert. Die luminale Seite der Aorta zeigte dabei nach oben.

Nachdem die Proben fixiert (4,5% Formaldehyd, 5 min) und mehrmals mit Phosphat gepufferter Lösung (PBS) gewaschen wurden, wurden sie mit einem Puffer aus 2% BSA (bovines Serumalbumin) und 0,2 % Triton-X 100 in PBS permeabilisiert und blockiert (2 h). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Cx40-Ak, 1:400, bei 4°C über Nacht) in blockierender Pufferlösung (2 % BSA / 0,2 % Triton-X 100 / PBS). Nach der Reinigung der Proben von nicht gebundenen Antikörpern (1h mit 1% Triton-X 100 in PBS, 2 x 30 min mit PBS) wurden die Connexin-gebundenen Antikörper mit dem fluoreszenzkonjugierten Anti-IgG-Antikörper Alexa Fluor 594 (1:800) visualisiert und die Zellkerne mit Kernfarbstoffen angefärbt.

Im Gegensatz zu Cx40 wurde bei der Cx45-Färbung der primäre Antikörper (Cx45-Ak, 1:200) für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Außerdem wurden für die Cx45-Färbung der Cremasterarteriolen die Fixierlösung, die Waschlösung und der primäre Antikörper nicht

nur global sondern auch intraluminal über einen Zugang in der Aorta abdominalis in die Arteriolen appliziert. Nach Auswaschen des Cx45-Antikörpers wurde der Cremaster-muskel abgetrennt und wie bei der oben beschriebenen Cx40-Färbung weiterbehandelt.

Nach Abschluss der Färbung wurden alle Präparate auf Objektträger überführt und dort unter größtmöglicher Schonung flächig ausgebreitet. Nach Zugabe des Polyvinylacetats Mowiol (Calbiochem, Darmstadt) wurden die Proben luftdicht unter einem Deckglas eingebettet und für mindestens 12 Stunden zum Trocknen in einer dunklen Kammer gelagert.

2.4.2 Fluoreszenz- und konfokale Lasermikroskopie

Die initiale Durchmusterung der immungefärbten Präparate erfolgte an einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2 Imaging Fluoreszenzmikroskop, Zeiss, Jena), das mit 20- und 40-fach Objektiven (Plan-Neofluar, numerische Apertur: 0,5 / 0,75) sowie 10-fach Okularen ausgestattet war. Eine angeschlossene Digitalkamera (AxioCam, Zeiss, Jena) übertrug das mikroskopische Bild zur Speicherung auf ein angeschlossenes Computersystem.

Zusätzlich wurden hochauflösende Aufnahmen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop gewonnen (LSM 5 Meta, Zeiss, Jena), welches in Kooperation mit dem Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck verwendet wurde. Das Verfahren ermöglichte scharfe Abbildungen horizontaler „optischer Schnitte“ bis in Gewebetiefen von etwa 100 µm. Die gewonnen Bilddatensätze wurden von einem angeschlossenen Computer-system verarbeitet und gespeichert. Einzelbilder wurden in einer Größe von 512 x 512 Bildpunkten aufgezeichnet.

Das Mikroskop war mit einem 20-fach Objektiv (Plan Apochromat, num. Apertur: 0,75), einem 40- und 63-fach Wasserimmersionsobjektiv (C-Apochromat, num. Apertur: 1,2 / 1,2) sowie mit zwei 10-fach Okularen ausgestattet. Zur Anregung der Licht emittierenden Fluorophore wurden ein Helium/Neon- (sekundärer Antikörper) sowie ein Argon-Laser (Kernfarbstoff) verwendet.

2.5 Datenverarbeitung

Die Verarbeitung der gemessenen Gefäßdurchmesser und der Blutdruck- und Herzfrequenzdaten erfolgte mit einem programmierbaren Statistikprogramm (Stata 8.2®, Stata Corporation, College Station Texas, USA). Vasodilatationen wurden als Prozent der maximal möglichen Dilatation angegeben, um eine Beurteilung unabhängig vom Kontraktionszustand und dem absoluten Durchmesser der Arteriole zu ermöglichen. Die maximal mögliche Dilatation (D_{max}) entspricht dem maximalen Durchmesser des Gefäßes, der am Ende des Versuches durch die gleichzeitige Superfusion von Acetylcholin, Adenosin und Nitroprussid-Natrium ermittelt wurde (siehe 2.2.7.1).
Die Normalisierung erfolgte nach folgender Formel:

Größe der Dilatation = % der maximalen Dilatation

$$= (D_{Stim} - D_{Ruhe}) / (D_{max} - D_{Ruhe}) \times 100$$

(D = Durchmesser, $_{Ruhe}$ = vor Stimulation, $_{Stim}$ = nach Stimulation, $_{max}$ = maximal)

Vasokonstriktionen wurden als prozentuale Änderungen vom Ruhewert (D_{Ruhe}) angegeben. Die maximal mögliche Änderung wurde erreicht, wenn der Gefäßdurchmesser nach Stimulation null betrug. Zur Normalisierung wurde folgende Formel verwendet:

Größe der Konstriktion = % der maximalen Änderung

$$= (D_{Stim} / D_{Ruhe}) \times 100 - 100$$

2.6 Statistik und graphische Darstellung

Abbildungen und Tabellen zeigen arithmetische Mittelwerte absoluter und normalisierter Werte ± Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Die statistische Signifikanz der gewonnenen Ergebnisse wurde, je nachdem ob Vergleiche innerhalb einer Gruppe oder zwischen den Gruppen vorgenommen wurden, mit dem t-Test für gepaarte bzw. ungepaarte Werte geprüft. Bei multiplen Paarvergleichen wurde zusätzlich eine Korrektur nach Bonferroni durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% ($p < 0,05$) galt als statistisch signifikant.

Die statistische Auswertung und die Datenverarbeitung (2.5) erfolgten mit dem Statistikprogramm Stata®. Mit dem Programm SigmaPlot® (Ver. 8.0, Systat Software Inc., San Jose CA, USA) wurden die gewonnenen Daten graphisch dargestellt. Die Abbildungen und Skizzen im Methodenteil wurden mit dem Graphikprogramm CorelDRAW® angefertigt (Ver. 10, Corel Corporation, Ottawa, Kanada).

2.7 Verwendete Substanzen und Lösungen

Substanz	Hersteller
Acetylcholin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Adenosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Alexa Flour 594 Goat Anti-Rabbit	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Bisbenzimid H33342	Calbiochem, Darmstadt
Bradykinin	Bachem, Weil am Rhein
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Cx40-Rabbit-Anti-Mouse-AB 1726	Chemicon International, Temecula CA, USA
Cx45-Rabbit-Anti-Mouse-AB 1745	Chemicon International, Temecula CA, USA
Fentanyl	Curamed, Karlsruhe
Formaldehyd	Roche Pharma AG, Grenzbach-Whyhlen
Gasgemisch 95% N_2, 5% CO_2	Linde, München
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Medetomidin	Pfizer Pharma GmbH**,** Karlsruhe
Midazolam	Dormicum®, Roche, Grenzbach-Whyhlen
Mowiol	Calbiochem, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Nitroprussid-Natrium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Pentobarbital	Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos
Sytox® Green	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
Triton-X 100	Merck KGaA, Darmstadt

Lösung	**Zusammensetzung**
Blockier- und Permeabilisierungslösung:	2% BSA 0,2% Triton-X 100 in PBS gelöst
Krebslösung:	Zusammensetzung s. 2.2.3
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS):	137 mmol/l NaCl 2,7 mmol/l KCl 8,1 mmol/l Na_2HPO_4 in entionisiertem Wasser gelöst
Waschlösung:	1% Triton-X 100 in PBS gelöst

Die zur Herstellung der Lösungen verwendeten Salze wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen und in entionisiertem Wasser (SG-Reinstwassersystem Typ RS 90-4/US, Hamburg) gelöst.

3 ERGEBNISSE

3.1 Connexinexpression in Arterien und Arteriolen

In diesen Versuchen wurde die Expression von Cx40 und Cx45 in den Arteriolen der Mikrozirkulation und in der Aorta von Wildtyp-Mäusen und genetisch modifizierten Mäusen untersucht.

3.1.1 Connexin40

Im Wildtyp zeigte sich sowohl in der Aorta (Abb. 3.1 A und D) als auch in Arteriolen des Cremastermuskels (Abb. 3.1 E) eine deutliche Connexin40-Expression entlang der endothelialen Zellmembranen. Die markierten Endothelzellen konnten dabei durch ihre typische longitudinale Form identifiziert und durch ihre Längsausrichtung zur Gefäßachse von den zirkulär verlaufenden Gefäßmuskelzellen abgegrenzt werden. Den Erwartungen entsprechend konnte sowohl in den Cx40-defizienten Tieren (Abb. 3.1 B und F) als auch in den Tieren, in denen Cx40 biallelisch durch Cx45 ersetzt worden war (Cx40KI45), kein Cx40 in der Gefäßwand nachgewiesen werden (Abb. 3.1 C und G).
In Präparaten, in denen der primäre Antikörper nicht appliziert wurde, war keine Färbung zu erkennen (nicht gezeigt). Die Ergebnisse weisen auf eine endothelspezifische Expression von Cx40 in der Gefäßwand hin und bestätigen darüber hinaus den erfolgreichen Verlust von Cx40 in den genetisch modifizierten Tieren.

3.1.2 Connexin45

Cx45 konnte im Wildtyp nicht in der Aorta dafür aber in den Arteriolen des Cremastermuskels nachgewiesen werden. Im Unterschied zu Cx40 wurde Cx45 aber nicht in den Endothelzellen sondern in den zirkulär verlaufenden Gefäßmuskelzellen exprimiert (Abb. 3.2 B). Neben der zellspezifischen Cx45-Expression (glatter Gefäßmuskel) im Wildtyp konnte auch der regelrechte Austausch von Cx40 durch Cx45 in transgenen Cx40KI45-Tieren nachgewiesen werden. Sowohl in der Aorta (Abb. 3.2 A und C) als auch in Arteriolen des Cremastersmuskels (Abb. 3.2 E) konnte hierbei eine endotheliale Expression von Cx45 nachgewiesen werden, die der Expression von Cx40 im Wildtyp entsprach (Abb. 3.2 D und F).

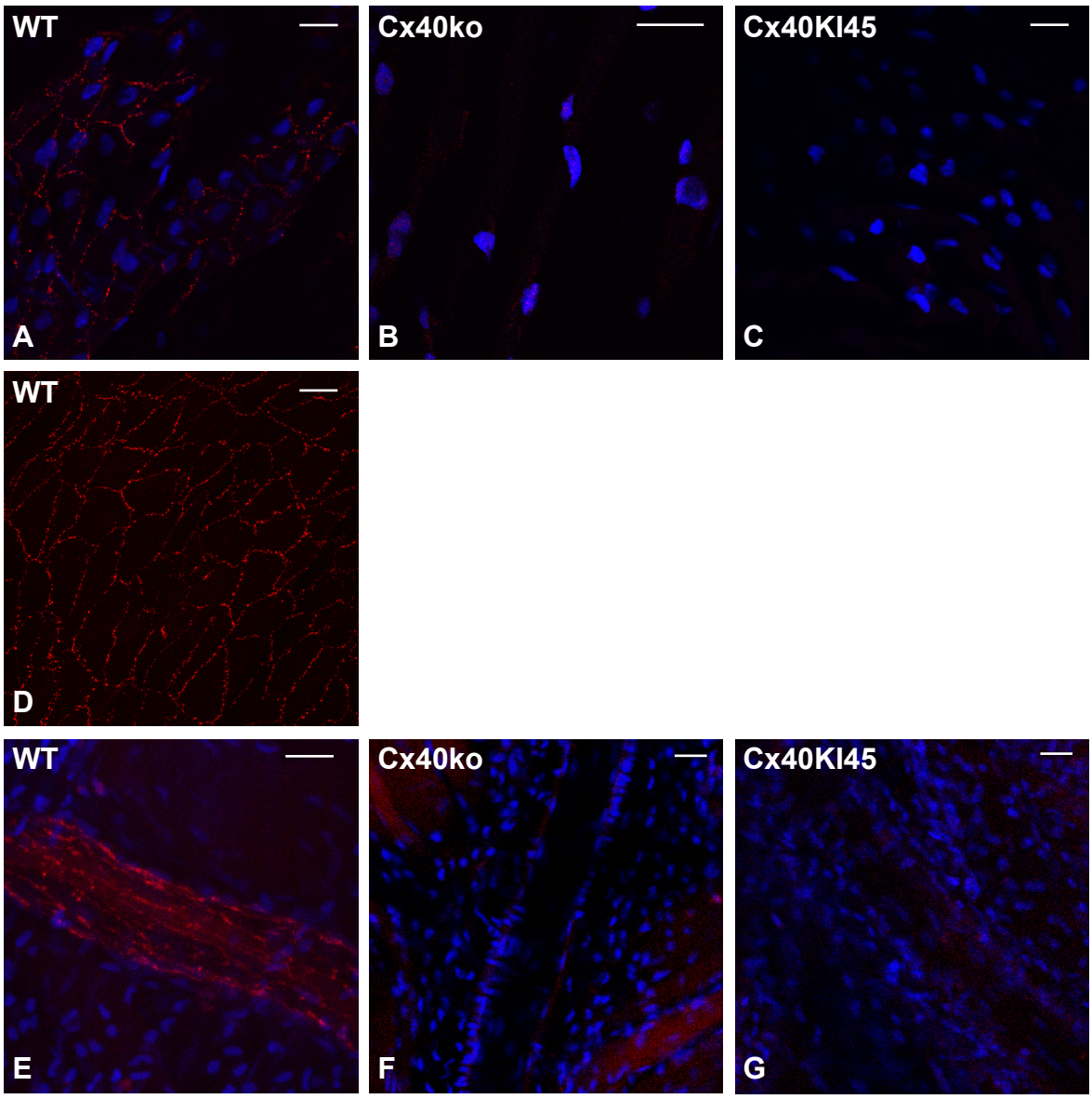

Abb. 3.1: Vaskuläre Expression von Connexin40 im Wildtyp und in genetisch modifizierten Mäusen. Alle Präparate in den gezeigten Aufnahmen wurden mit einem primären Antikörper, der gegen Cx40 gerichtet ist, behandelt. Im Wildtyp findet sich Cx40 (rot) an den Grenzen der Endothelzellen von Aorta (A und D) und Cremasterarteriolen (E).
Cx40ko- (B, Aorta; F, Arteriole) und Cx40KI45-Tiere (C, Aorta; G, Arteriole) wiesen weder in der Aorta noch in den Mikrozirkulationsgefäßen Cx40 auf. Die Färbung der Zellkerne (blau) erfolgte mit DAPI oder Sytox® green. Die Balkenlänge entspricht 20 µm.

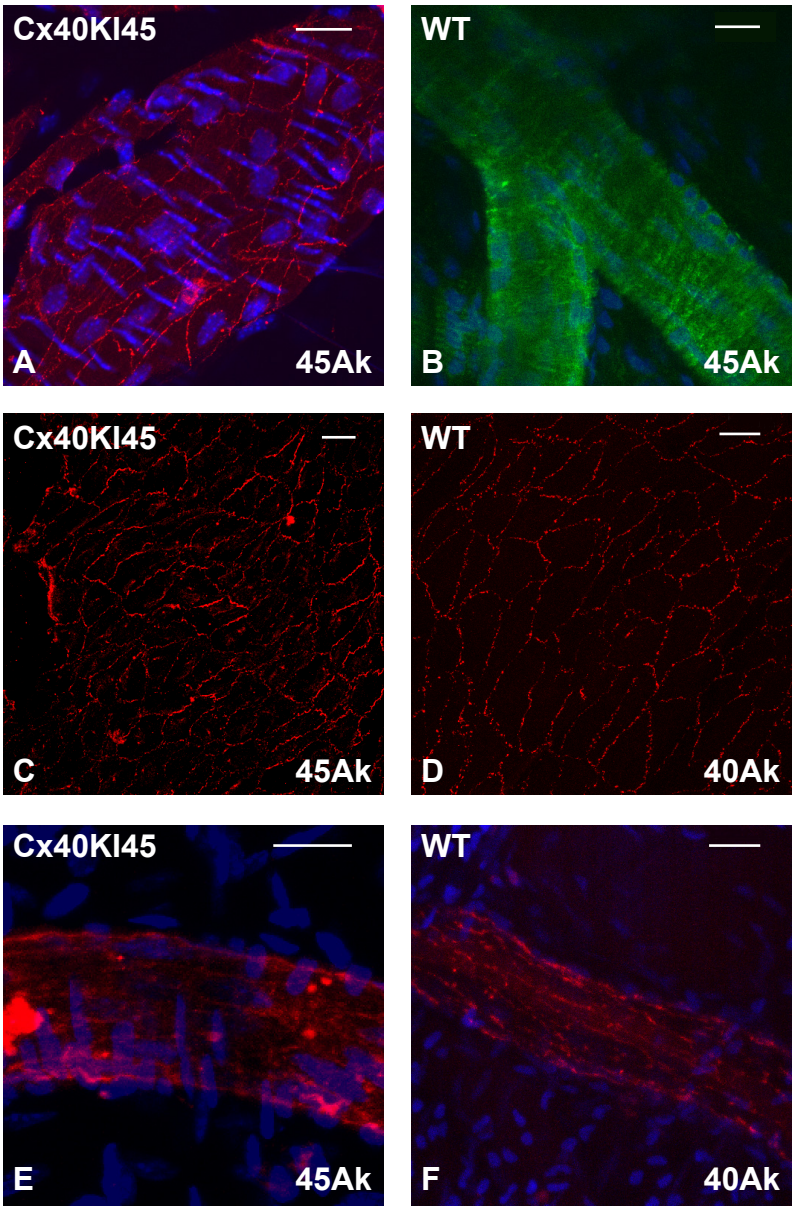

Abb. 3.2: Expression von Cx45 und Cx40 in der Gefäßwand von Wildtyp- und Cx40KI45-Mäusen. Cx45 lässt sich in den Arteriolen des Wildtyps in schwacher Intensität an den Grenzen der zirkulär verlaufenden glatten Gefäßmuskelzellen nachweisen (B).
Im Gegensatz dazu findet sich in Gefäßen der Cx40KI45-Tiere eine deutliche Expression von Cx45, welches hier v.a. in der Membran der Endothelzellen (A und C = Aorta; E = Cremasterarteriole) lokalisiert ist. Das Muster der Cx45-Färbung ist dabei nahezu identisch mit dem Expressionsmuster von Cx40 im Wildtyp (D = Aorta; F = Cremasterarteriole). Die Färbung der Zellkerne (blau) erfolgte mit DAPI oder Sytox® green. Die Balkenlänge entspricht 20 µm.

45Ak = Cx45-spezifischer Antikörper

40Ak = Cx40-spezifischer Antikörper

3.2 Makrohämodynamik in Cx40ko- und Cx40KI45-Tieren

Der arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz wurden radiotelemetrisch in nicht narkotisierten Tieren (Wildtyp, Cx40ko, Cx40KI45) über einen Zeitraum von 4 Tagen gemessen. Sowohl die genetisch modifizierten Tiere als auch die Kontrolltiere wiesen über die gesamte Messperiode stabile Blutdruckwerte auf (Abb. 3.4 A). Der mittlere arterielle Druck der Wildtyp-Kontrollgruppe (n = 14) lag nach zweitägiger Stabilisierung im Mittel bei 116±1 mmHg mit einer Spannbreite von 106 bis 121 mmHg. Im Gegensatz dazu entwickelten die Tiere mit einer Defizienz für Cx40 einen signifikanten arteriellen Hypertonus (n = 5; Mittelwert 161±1 mmHg; Spannbreite 156 – 163 mmHg; P<0,001 vs. WT). Obwohl der mittlere arterielle Druck in Cx40KI45-Tieren (n = 13; Mittelwert 133±8 mmHg; Spannbreite 100 – 156 mmHg) gegenüber der Wildtyp-Gruppe erhöht war (P<0,001), lag er deutlich unter dem arteriellen Druck der Cx40-defizienten Tiere (P<0,001). Aus Abbildung 3.3 A wird deutlich, dass der arterielle Druck der Cx40KI45-Tiere annähernd in der Mitte zwischen Wildtyp und Cx40ko-Tieren liegt. Trotz der auffälligen Blutdruckdifferenzen war die Herzfrequenz in allen Genotypen vergleichbar (Abb. 3.4 B; Wildtyp, 579±23 bpm; Cx40ko, 553±34 bpm; Cx40KI45, 582±19 bpm).

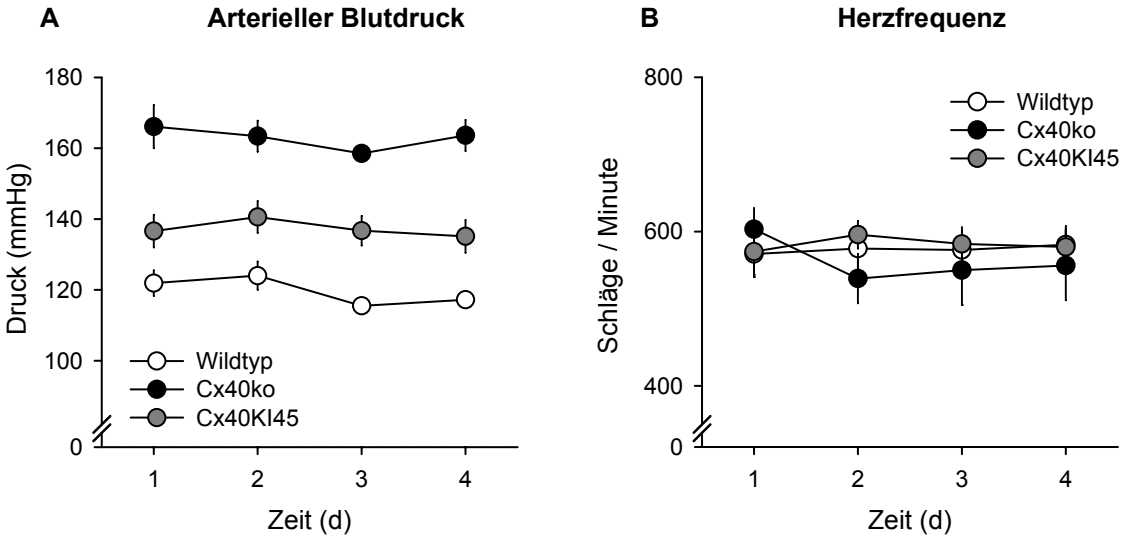

Abb. 3.3: Telemetrische Aufzeichnung von arteriellem Blutdruck und Herzfrequenz.
In Abbildung **A** ist der mittlere Druck, gemessen in der Arteria carotis, vom 1. bis zum 4. Tag nach Transmitterimplantation dargestellt. Während Cx40-defiziente Tiere einen ausgeprägten Hypertonus aufwiesen, lag der arterielle Druck in Cx40KI45-Tieren signifikant darunter. Trotz des reduzierten Bluthochdrucks waren die Druckwerte der Cx40KI45-Tiere gegenüber den Wildtypen signifikant erhöht. Bezüglich der Herzfrequenz (Abbildung **B**) bestanden keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

3.3 Mikrozirkulation in Cx40ko- und Cx40KI45-Tieren

In diesen Experimenten wurde die Fortleitung lokal ausgelöster Vasodilatationen und Vasokonstriktionen in Wildtyp-, Cx40ko- und Cx40KI45-Mäusen untersucht. Hierzu wurden vasoaktive Substanzen mittels Glasmikropipetten streng lokalisiert neben die Wand der Arteriolen appliziert. Gemessen wurde der zeitliche Verlauf der Änderung des Gefäßdurchmessers an der Applikationsstelle sowie an entfernten, stromaufwärts gelegenen Stellen vor und nach der lokalen Stimulation.

3.3.1 Durchmesser der untersuchten Arteriolen

In der Versuchsreihe wurden insgesamt 86 Arteriolen in 35 Mäusen untersucht. Während der maximale Gefäßdurchmesser im Mittel 35±1 µm betrug, wiesen die Arteriolen einen mittleren Ruhedurchmesser von 16±1 µm auf. Zwischen den einzelnen Genotypen bestanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Ruhe- und Maximaldurchmesser (Tab. 3.1).

Tab. 3.1. Ruhe- und Maximaldurchmesser in Arteriolen verschiedener Genotypen

			Durchmesser (µm)	
Genotyp	Tiere (n)	Gefäße (n)	Ruhe	Maximum
Wildtyp	12	26	16±1	33±1
Cx40ko	11	30	16±1	35±1
Cx40KI45	12	30	17±1	36±1

Der arterioläre Ruhedurchmesser wurde in jedem Gefäß vor der Applikation des Stimulus bestimmt. Am Ende des Experiments wurde der Cremastermuskel mit einer Kombination aus Nitroprussid-Natrium, Adenosin und Acetycholin (je 30 µM) superfundiert und so der Maximaldurchmesser der untersuchten Arteriolen bestimmt. Die Durchmesser der drei Genotypen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Gefäßdurchmesser sind als Mittelwerte ± SEM angegeben.

3.3.2 Aufsteigende Vasodilatationen

3.3.2.1 Lokalisierte Applikation von Acetylcholin

Eine kurze Injektion von Acetylcholin (1 mmol/l) neben die Wand der Arteriole induzierte in Wildtyp-Tieren eine Dilatation, die sich nach stromauf- und stromabwärts ausbreitete. An der Applikationsstelle erreichte die Dilatation innerhalb von 6,8±0,8 Sekunden ein Maximum von 48±5% der Dilatationskapazität und bildete sich in 19,3±2,7 Sekunden wieder zurück. In den genetisch modifizierten Tieren induzierte Acetycholin eine nahezu identische Antwort an der Stimulationsstelle mit einer maximalen Dilatation von 53±3% (Cx40ko) und 49±4% (Cx40KI45) und einer vergleichbaren Zeit bis zum Erreichen der maximalen Antwort (Cx40ko sowie Cx40KI45: 5,9±0,5 s). Auch die Gesamtdauer der Dilatation unterschied sich nicht signifikant vom Wildtyp (Cx40ko, 14±1,2 s; Cx40KI45, 15,9±1,6 s). In allen drei Genotypen wurde die lokale Antwort mit hoher Geschwindigkeit nach stromaufwärts fortgeleitet (Abb. 3.4), so dass die Gefäße in 1200 µm Entfernung ohne messbare Zeitverzögerung (< 0,5 s) dilatierten. Aus Abbildung 3.4 wird deutlich, dass die Dilatation im Wildtyp selbst an der entferntesten Beobachtungstelle (1200 µm) eine nahezu unveränderte Amplitude (44±4%) und Dauer (15±3,1 s) aufweist. Im Kontrast dazu nahm die Amplitude und die Dauer der Dilatation in Cx40ko-Tieren mit wachsender Entfernung von der Applikationsstelle kontinuierlich ab (1200µm: max. Dilatation: 25±3%; $P<0,05$ vs. WT; Dauer der Dilatation: 8,8±0,6 s; $P<0,05$ vs. WT). Wie in Cx40ko-Tieren war auch in Cx40KI45-Tieren eine signifikante Verschlechterung der fortgeleiteten Gefäßantworten zu beobachten (1200 µm: max. Dilatation 24,3±2%; $P<0,05$ vs. WT; Dauer der Dilatation: 10,1±0,67 s, $P<0,05$ vs. WT). Bei genauerem Vergleich weisen beiden Genotypen (Cx40ko, Cx40KI45) eine fast identische Abnahme der Amplitude (Abb. 3.4 und Abb. 3.5) und der Dilatationsdauer (Abb. 3.4) mit wachsender Entfernung von der Applikationsstelle auf.

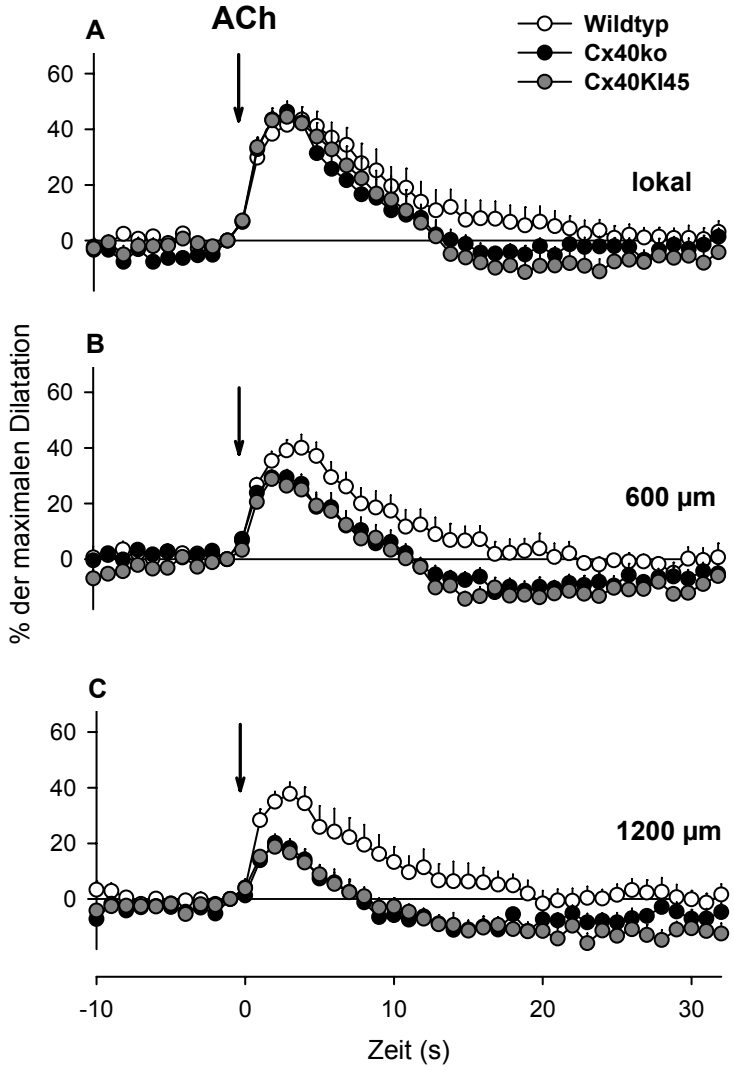

Abb. 3.4: Gefäßdilatationen an der Applikationsstelle und an entfernten Stellen im zeitlichen Verlauf nach Stimulation mit Acetylcholin (ACh). Eine kurze (<0,5 s) und lokalisierte Stimulation mit ACh mittels Mikropipette verursachte an der Stimulationsstelle (**A**) eine vergleichbare Dilatation in Wildtyp- (n=6), Cx40ko- (n=9) und Cx40KI45-Mäusen (n=8), die sich rasch (<0,5 s) in strom-aufwärts gelegene Gefäßabschnitte ausbreitete. Während im Wildtyp die Größe der Dilatation in der Entfernung (600 µm [**B**]; 1200 µm [**C**]) unverändert blieb, nahm die Amplitude in Cx40ko- und Cx40KI45-Tieren mit zunehmender Distanz von der Applikationsstelle kontinuierlich ab. Die Größe der Dilatation ist als Prozent des maximal möglichen Gefäßdurchmessers wiedergegeben. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der ACh-Applikation. In jedem Genotyp wurden 6 bis 9 Arteriolen (n) an mindestens 5 Tieren untersucht. Dargestellt sind, wie auch in allen nachfolgenden Abbildungen, die Mittelwerte ± SEM.

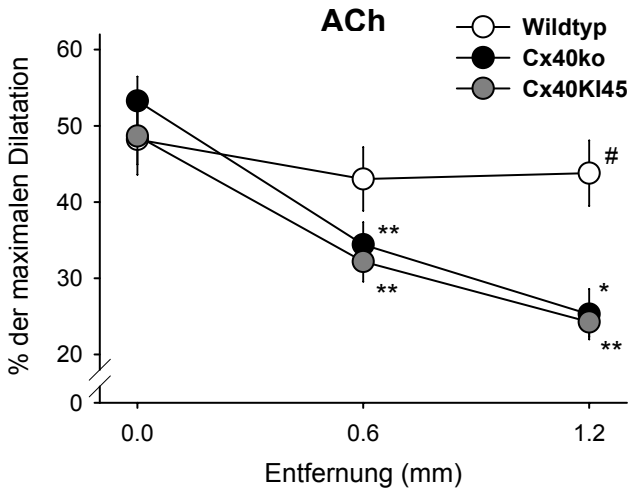

Abb. 3.5: Maximale Amplitude der ACh-induzierten Dilatation aufgetragen gegen die Entfernung von der Applikationsstelle. Trotz zunehmender Distanz von der Mikropipette blieb die Amplitude der maximalen Dilatation im Wildtyp nahezu identisch, während sie in Cx40ko- und Cx40KI45-Tieren signifikant abfiel. Auffallend ist der ähnliche Kurvenverlauf in beiden genetisch modifizierten Gruppen. Die Größe der Dilatation ist als Prozent des maximal möglichen Gefäßdurchmessers angegeben.

*P<0,05, ** P<0,001 vs. nächste stromabwärts gelegene Stelle; # P<0,01 vs. Cx40ko und Cx40KI45

3.3.2.2 Lokalisierte Applikation von Bradykinin

In dieser Versuchsreihe wurde Bradykinin (10 mmol/l) als weiterer endothelabhängiger Dilatator zur lokalisierten Stimulation der Arteriolen verwendet. Auch Bradykinin löste nach seiner Applikation eine Dilatation an der lokalen Beobachtungsstelle aus, die jedoch gegenüber ACh einige Besonderheiten aufwies. Einerseits war die Amplitude der lokalen Antwort größer (WT, 73±3% vs. 48±5% bei ACh). Auf der anderen Seite dauerte es länger, bis der Maximalwert der lokalen Dilatation erreicht wurde (WT, 28,6±1,3 s vs. 6,8±0,8 s bei ACh), weshalb sich infolgedessen auch die Gesamtdauer der lokalen Antwort gegenüber ACh verlängerte (WT, 62±3 s vs. 19,3±2,7 s bei ACh). Analog zu ACh war allerdings auch nach Bradykinin eine nahezu identische lokale Dilatation in allen Tieren zu beobachten (Abb. 3.6 und Abb. 3.7). Die Amplitude und Dauer der lokalen Dilatation wies dabei keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den genetisch veränderten Tieren auf (Cx40ko: 69±4%, 65±3 s; Cx40KI45: 76±3%, 69±1 s). In allen Tieren wurde die Dilatation rasch entlang des Gefäßes fortgeleitet (Abb. 3.6). Wie bei der lokalen Antwort waren bei ACh- und Bradykinin-induzierten Dilatationen auch in Bezug auf die Fortleitung

der Gefäßantworten Parallelen vorhanden. So blieb nach Bradykinin die Amplitude der Dilatation im Wildtyp selbst an der entferntesten Beobachtungsstelle unvermindert stark ausgeprägt (1200µm: 75±3%), während sich die maximale Amplitude in Cx40ko- und in Cx40KI45-Tieren mit zunehmender Entfernung von der Applikationsstelle signifikant reduzierte (Abb. 3.7). Neben der Amplitude nahm auch die Dauer der Dilatation in den genetisch modifizierten Tieren mit wachsender Distanz ab (1200 µm: Cx40ko, 42±4 s, P<0,001 vs. lokal; Cx40KI45, 55±4 s, P<0,001 vs. lokal), während sie im Wildtyp konstant blieb (1200 µm: 59±3 s, P = ns vs. lokal).

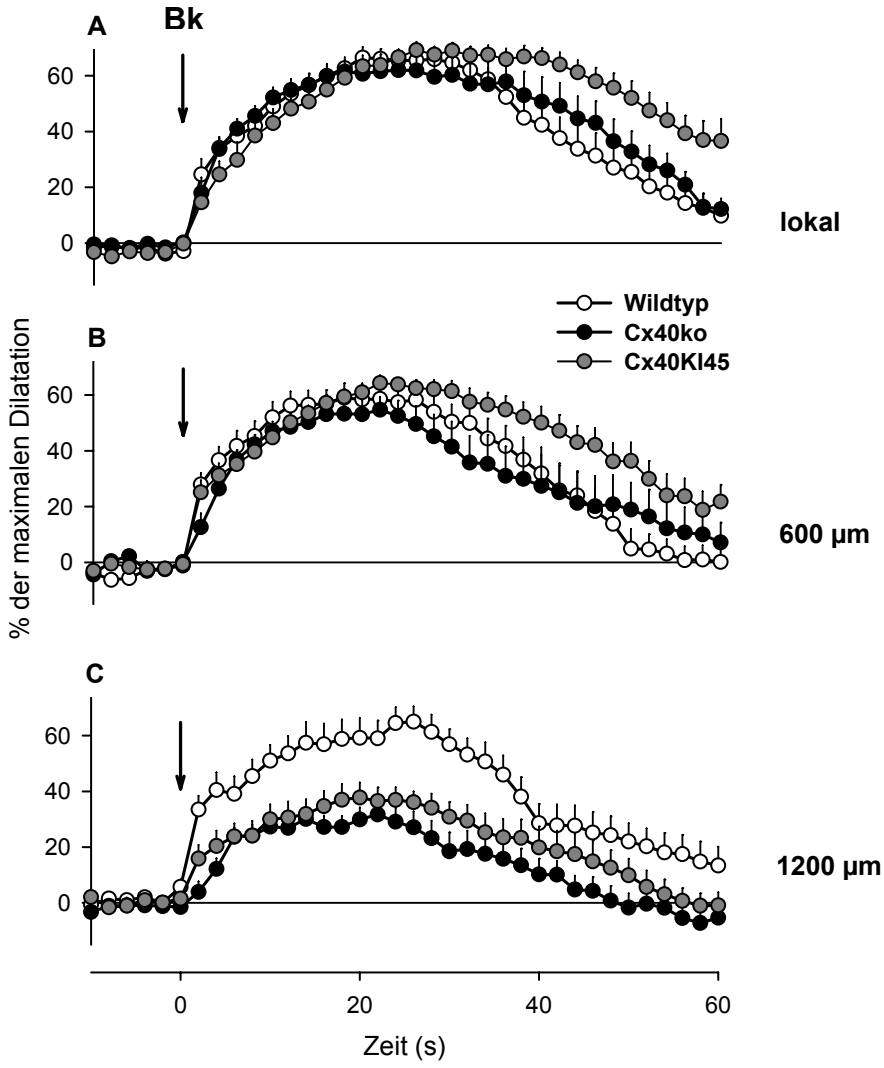

Abb. 3.6: Dilatationen an der Applikationsstelle und an entfernten Positionen im zeitlichen Verlauf nach Stimulation mit Bradykinin (Bk). Die lokalisierte Stimulation mit Bk verursachte eine vergleichbare lokale Dilatation (**A**) in Wildtyp-, Cx40ko- und Cx40KI45-Mäusen. Mit zunehmender Entfernung von der Applikationsstelle (600 µm [**B**] und 1200 µm [**C**]) zeigte sich eine signifikante und gleichartige Reduzierung der Amplitude in den Cx40ko- und Cx40KI45-Mäusen. In jedem Genotyp wurden 7 oder 8 Arteriolen (n) in 5 bis 6 Tieren untersucht.

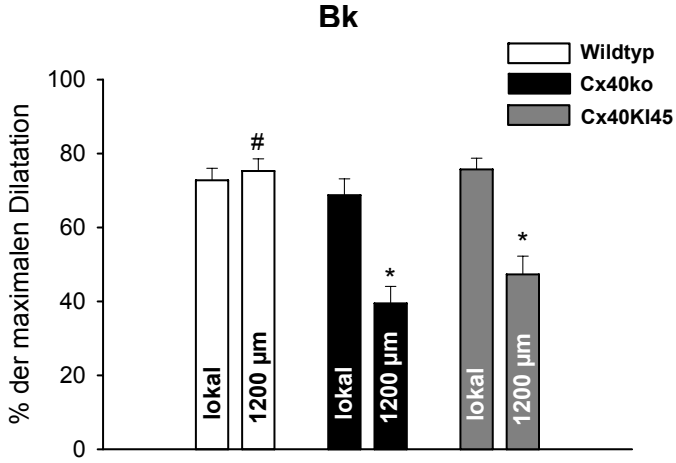

Abb. 3.7: Maximale Amplitude der lokalen und entfernten Dilatation nach Bradykinin-Stimulation.
Cx40ko- und Cx40KI45-Tiere zeigten eine gleichartige Verminderung der entfernten Gefäßreaktion.

* P<0,001 vs. lokale Stelle
# P<0,001 vs. Cx40ko und Cx40KI45

Trotz unterschiedlicher Charakteristika scheinen sich Dilatationen nach Stimulation mit ACh und Bradykinin mit ähnlichen Eigenschaften in Bezug auf die Relevanz von Cx40 entlang der Gefäßwand auszubreiten.

3.3.2.3 Lokalisierte Applikation von Adenosin

Der Vasodilatator Adenosin (10 mmol/l) erzeugte bei lokalisierter Applikation in allen Genotypen (Wildtyp, Cx40ko, Cx40KI45) eine maximale lokale Dilatation von über 50 % (Abb. 3.9). Die beobachtete Dilatationsdauer lag dabei in etwa zwischen der Dauer der lokalen ACh- und Bradykinin-Dilatation. Im Gegensatz zu ACh und Bradykinin fand sich jedoch bei Adenosin bereits im Wildtyp eine kontinuierliche Abnahme der maximalen Amplitude mit wachsender Entfernung von der Applikationsstelle (Abb. 3.9). Eine vergleichbare Abnahme der Amplitude fand sich ebenso in Cx40ko- und Cx40KI45-Tieren (Abb. 3.8 und Abb. 3.9). Wie die Amplitudengröße war auch die zeitliche Dauer der fortgeleiteten Dilatationen in den drei Genotypen nicht signifikant voneinander verschieden (1200 µm: wt, 35±5 s; Cx40ko, 29±4 s; Cx40KI45, 30±5 s).

Die abgeschwächte Fortleitung im Wildtyp und die gleichartige Fortleitung der Adenosin-Antworten in den transgenen Tieren deuten auf Unterschiede in der Signalvermittlung von Adenosin-Dilatationen gegenüber den ACh- und Bradykinin-induzierten Dilatationen hin.

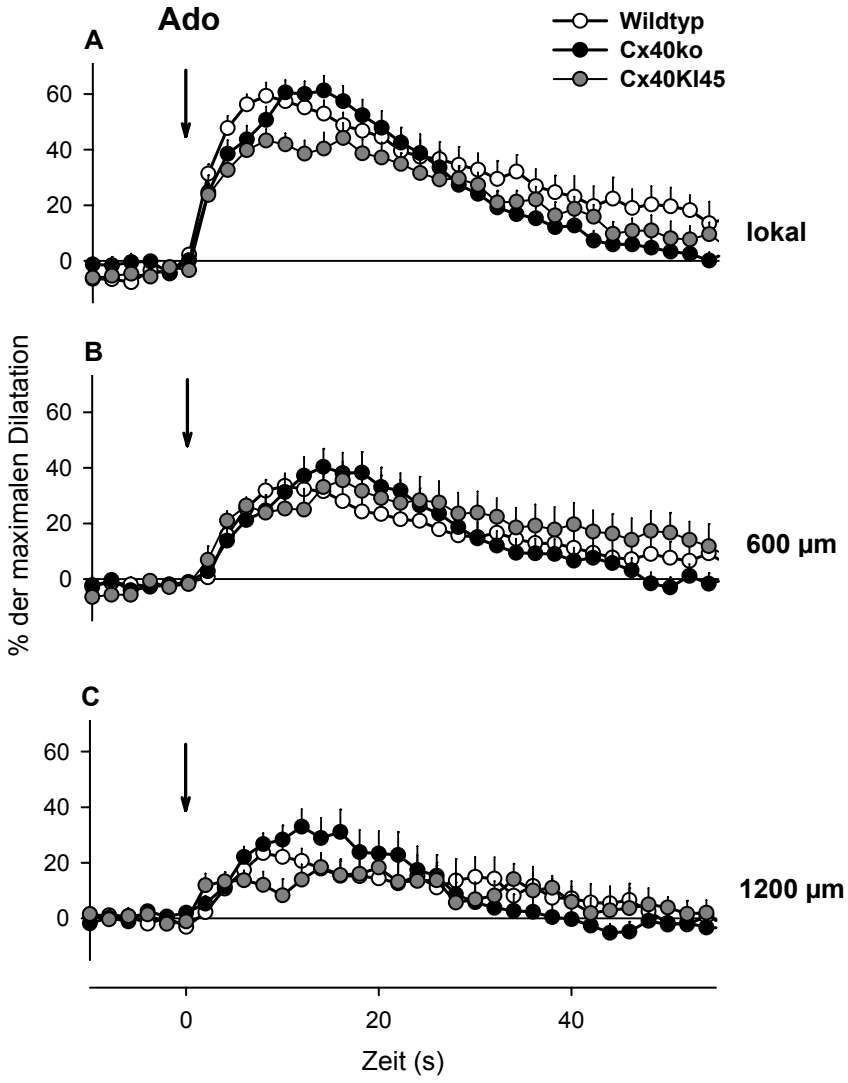

Abb. 3.8: Dilatationen an der Applikationsstelle und an entfernten Gefäßstellen im zeitlichen Verlauf nach Stimulation mit Adenosin (Ado). In allen Genotypen induzierte Adenosin eine vergleichbare lokale Dilatation, deren Amplitude sich mit wachsender Entfernung zur Applikationsstelle kontinuierlich verminderte (**A** lokal; **B** 600 µm; **C** 1200 µm). Es wurden 6 bis 7 Arteriolen in 5 Tieren je Genotyp untersucht.

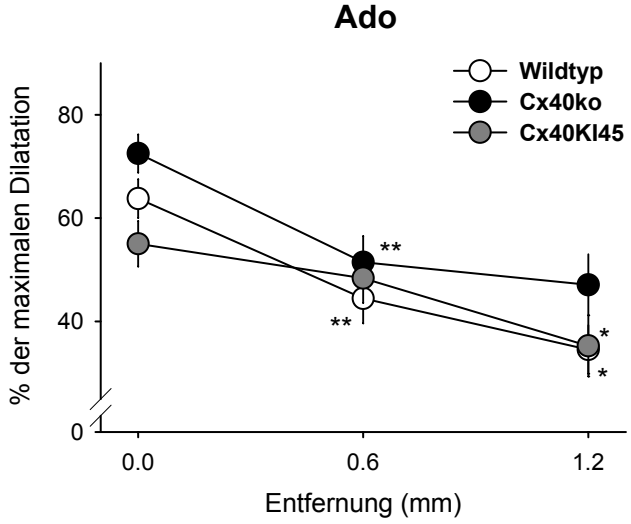

Abb. 3.9: Maximale Amplitude der Adenosin-induzierten Dilatation aufgetragen gegen die Entfernung von der Applikationsstelle. Im Gegensatz zur ACh- und Bradykininin-Dilatation nahm die Amplitude der Adenosin-Antwort schon im Wildtyp mit zunehmender Entfernung von der Mikropipette (0.0 mm) signifikant ab und war vergleichbar mit dem Amplitudenverlauf in Cx40ko- und Cx40KI45-Tieren.

* P<0,05, ** P<0,001 vs. nächste stromabwärts gelegene Stelle

3.3.3 Aufsteigende Vasokonstriktionen

Neben Gefäßdilatationen wurde auch die Fortleitung von Gefäßkonstriktionen entlang der Arteriolen untersucht. Hierzu wurde in gleicher Weise eine depolarisierende Kaliumchloridlösung (3 mol/L) mittels Mikropipette neben die Wand der Arteriole injiziert. Diese Stimulation induzierte eine Vasokonstriktion an der Applikationsstelle, die sich in allen Genotypen nach nur etwa 8 Sekunden zurückbildete. Die Amplitude der lokalen Vasokonstriktion war in allen Genotypen annähernd identisch (WT, -54±4,2%; Cx40ko, -50±3%; Cx40KI45, -57±3%). Die relativ kurze lokale Antwort wurde in allen Tieren ohne messbare Zeitverzögerung in entfernte, stromaufwärts gelegene Gefäßregionen weitergeleitet, wobei die Amplitude der Konstriktion sowohl in den genetisch modifizierten Tieren (900 µm: Cx40ko, 11±2,9%; Cx40KI45, 14±1,3%) als auch im Wildtyp (900 µm: 15±4,6%) mit wachsender Entfernung von der Stimulationstelle abfiel (Abb. 3.10 und Abb. 3.11). Ähnlich wie bei den Antworten auf Adenosin wiesen auch KCl-induzierte Konstriktionen im Wildtyp und in den transgenen Tieren eine vergleichbare Abnahme der Amplitude mit wachsender Distanz von der Mikropipette auf (Abb. 3.11).

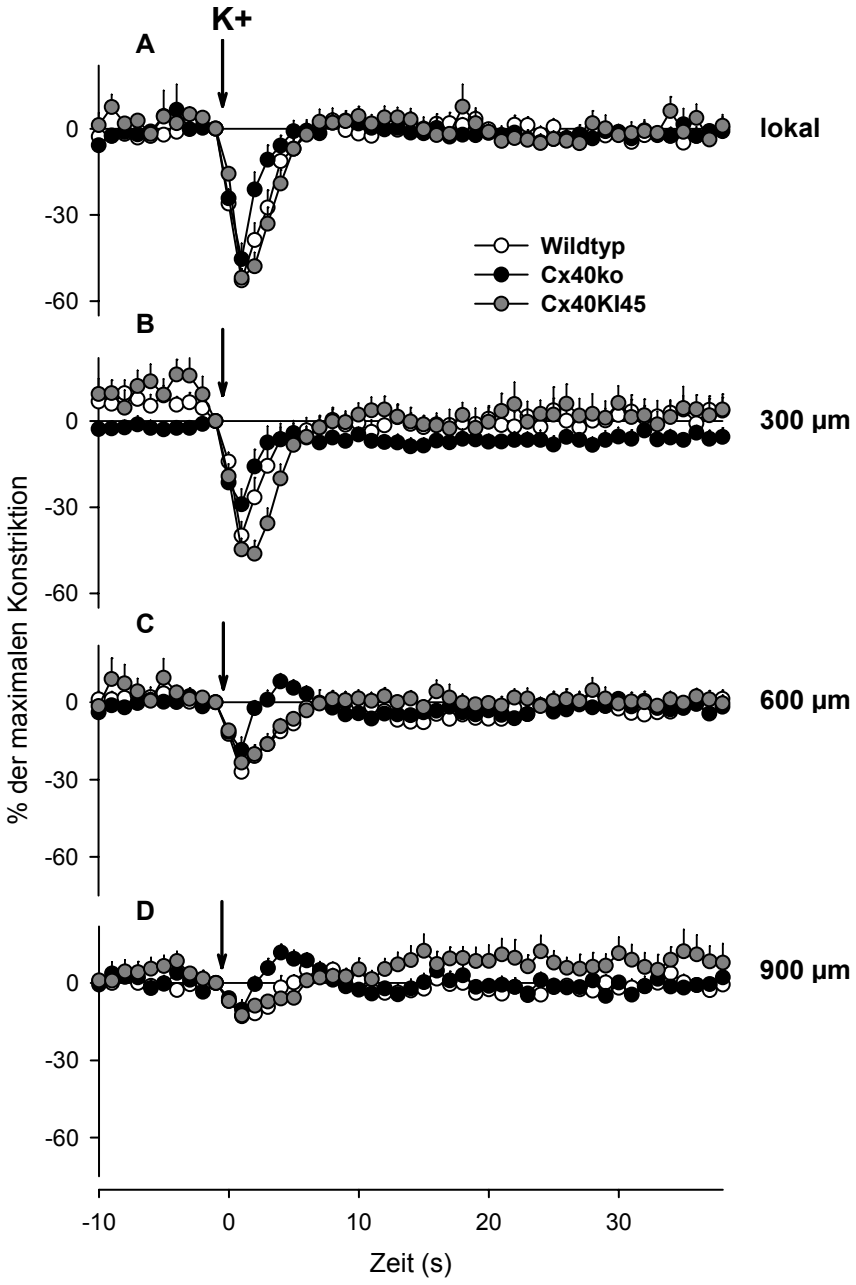

Abb. 3.10: Zeitlicher Verlauf von Konstriktionen an der Applikationsstelle und an entfernten Gefäßstellen nach Stimulation mit depolarisierender Kaliumchloridlösung (KCl). Cx40ko-, Cx40KI45- und Wildtyp-Mäuse reagierten auf die lokalisierte Stimulation mit einer gleichartigen und rasch verlaufenden lokalen Vasokonstriktion (**A**). Mit zunehmender Distanz (**B** 300 µm; **C** 600 µm, **D** 900 µm) nahm die Amplitude der Konstriktion in allen Genotypen ab. Vasokonstriktionen wurden als prozentuale Änderungen vom Ruhewert angegeben. In jedem Genotyp wurden 6 bis 7 Arteriolen in 5 Tieren untersucht.

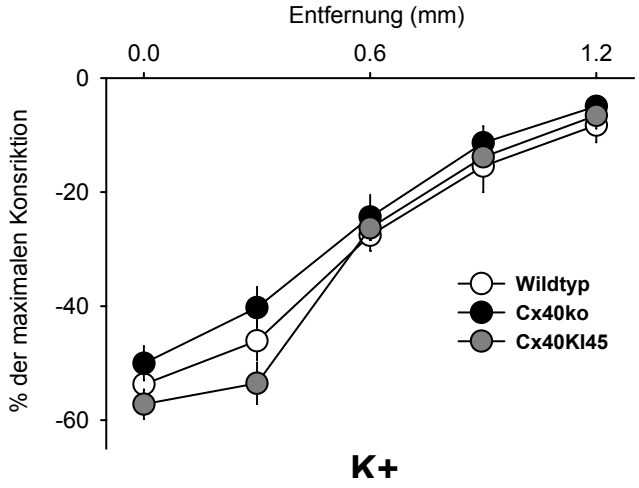

Abb. 3.11: Maximale Amplitude der lokalen und fortgeleiteten Vasokonstriktion nach KCl-Stimulation. Dargestellt ist die Amplitude der Gefäßantwort in Bezug zur Entfernung von der Applikationsstelle. Vasokonstriktionen wiesen nahezu identische Amplituden an lokalen und entfernten Stellen in allen Genotypen auf. Insgesamt zeigte sich ein stetiger Abfall der fortgeleiteten Gefäßreaktion.

3.4 Auswirkung eines Cx45-Verlustes in Gefäßmuskelzellen auf die Koordination des Gefäßverhaltens

In dieser Versuchsreihe wurde die Funktion von Cx45 in den glatten Gefäßmuskelzellen, in denen es vorwiegend lokalisiert ist (s. Abschnitt 3.1.2 und Abb. 3.2), untersucht. Da der globale Knockout von Cx45 nicht lebensfähig ist (Kruger *et al.*, 2000;Kumai *et al.*, 2000), wurden die Versuche an Mäusen mit einem zellspezifischen Cx45-Verlust in glatten Muskelzellen durchgeführt (Kooperation mit Prof. Willecke, Bonn). Der zellspezifische Genverlust wurde durch ein konditionales Knockout-Verfahren ermöglicht, bei dem das Schneideenzym Cre-Rekombinase und der Promotor des relativ spezifisch im glatten Muskel gebildeten Filamentproteins Nestin (Nestin-Promotor) so in das Genom der Maus integriert wurden, dass die Expression des Schneideenzyms durch den Nestin-Promotor kontrolliert wurde. Hierdurch kam es zu einer glattmuskelspezifischen Expression der Cre-Rekombinase, die daraufhin das Cx45-Gen aus dem Genom der glatten Muskelzellen entfernte (Maxeiner *et al.*, 2005). Ansatzstellen für das Schneideenzym waren zwei loxP-Sequenzen, die das Cx45-Gen beidseits flankierten (flanked by loxP-sites = „floxed“). Die erfolgreiche Entfernung des gefloxten Gens wurde fluoreszenzmikroskopisch durch den Nachweis des Fluorophors eGFP (enhanced green fluorescent protein) kontrolliert, das

hinter dem Cx45-Gen in die DNA der Maus eingebracht worden war. Da sich zwischen dem Cx45-Gen und der eGFP-Sequenz zusätzlich eine loxP-markierte Stop-Sequenz befand, erfolgte die eGFP-Expression nur bei Aktivität der Cre-Rekombinase. Durch den Nachweis von eGFP konnte somit die Entfernung der miteinander verbundenen loxP-markierten Sequenzen (Stop-Sequenz und Cx45-Gen) bestätigt werden.

In den durchgeführten fluorenzmikroskopischen Untersuchungen wiesen Cx45-gefloxte Tiere mit einem eingebrachten Nestin-Promotor in der Tat eine deutliche Expression von eGFP auf (Abb. 3.12 A und C), wodurch der Verlust von Cx45 experimentell belegt werden konnte. Anhand ihres zirkulären Verlaufes ließen sich die eGFP-haltigen Zellen weiterhin eindeutig als arterioläre Muskelzellen identifizieren. In gefloxten Kontrolltieren (Wurfgeschwister), denen die Cre-Rekombinase und der kontrollierende Nestin-Promotor fehlten, konnte erwartungsgemäß kein Fluoreszenzsignal detektiert werden (Abb. 3.12 B und D).

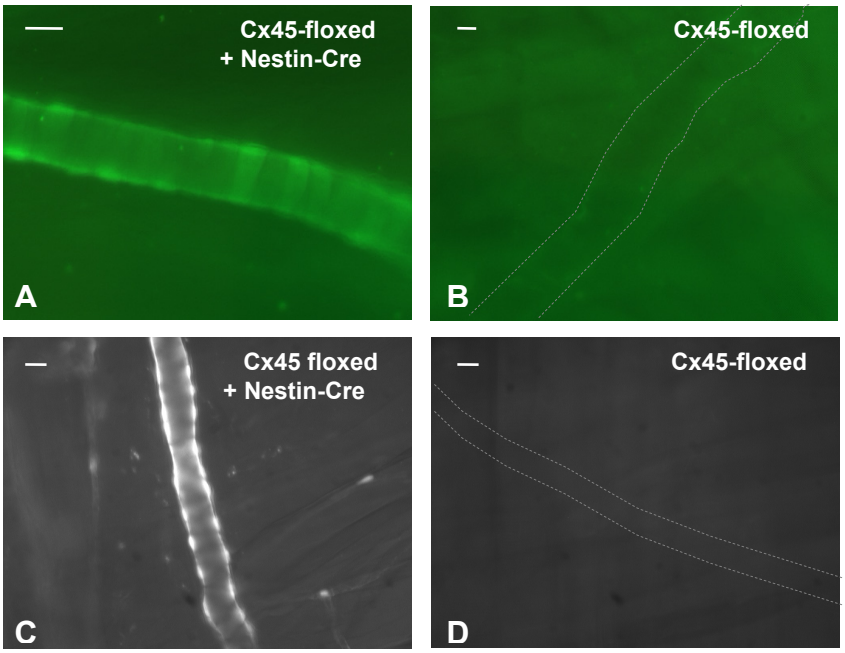

Abb. 3.12: Kontrolle des Cx45-Verlustes in glatten Gefäßmuskelzellen der Cremasterarteriolen durch Nachweis von eGFP. In Tieren, die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines Nestin-Promotors aufwiesen, wurden das gefloxte Cx45-Gen und die gefloxte eGFP-blockierende Sequenz entfernt, was fluoreszenzmikroskopisch durch den Nachweis von eGFP in den zirkulär verlaufenden Gefäßmuskelzellen nachgewiesen wurde (A und C). In Kontrolltieren, die lediglich das gefloxte Cx45-Gen mit der durch das Stop-Signal getrennten eGFP-Sequenz, aber keine Cre-Rekombinase aufwiesen, wurde erwartungsgemäß kein Fluoreszenzsignal detektiert (B und D). Während die oberen Abbildung (A und B) an isolierten Cremastermuskeln gewonnen wurden, zeigen die unteren Abblidungen (C und D) in vivo-Aufnahmen, die während der Intravitalmikroskopie unter Fluoreszenzanregung entstanden sind. Die Länge der Balken entspricht 20 µm. Die gestrichelten Linien markieren die Wände der Arteriolen.

Zur Charakterisierung der Koordination des Gefäßverhaltens wurde in Tieren mit einer glattmuskelspezifischen Cx45-Defizienz und in der Kontrollgruppe die Ausbreitung von Vasokonstriktionen beobachtet, die wie in Abschnitt 3.3 durch eine lokalisierte Stimulation mit KCl (3 mol/L) induziert wurden.

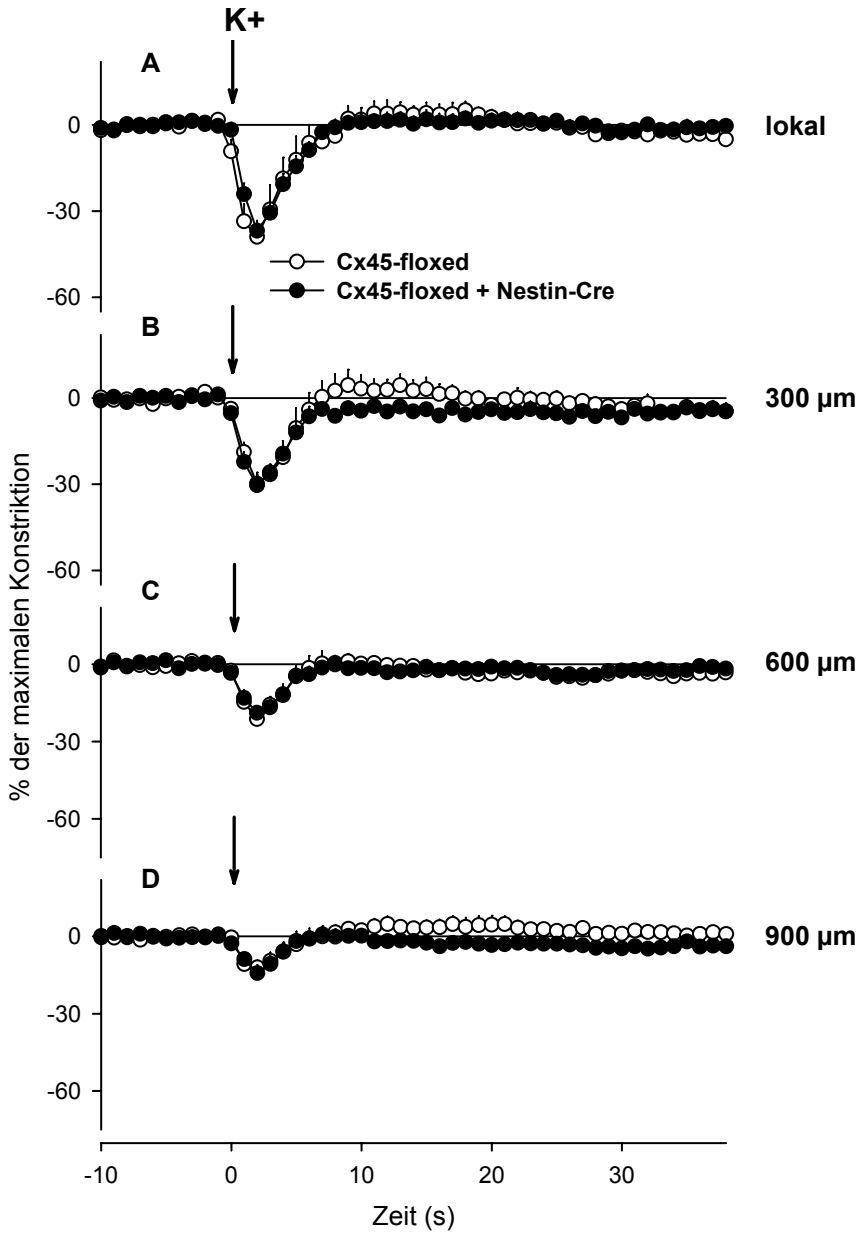

Abb. 3.13: Zeitlicher Verlauf von Konstriktionen an der Applikationsstelle und an entfernten Gefäßstellen nach Stimulation mit Kaliumchloridlösung (KCl). Die lokalisierte KCl-Applikation induzierte in Mäusen mit einem glattmuskelspezifischen Cx45-Verlust (Cx45-floxed + Nestin-Cre) sowohl lokal (**A**) als auch in entfernten Beobachtungsregionen (**B** 300 µm; **C** 600 µm, **D** 900 µm) eine nahezu identische Vasokonstriktion wie in der Kontrollgruppe (Cx45 floxed). Konstriktionen wurden als prozentuale Änderungen vom Ruhewert angegeben. Der Zeitpunkt der KCl-Applikation ist durch Pfeile markiert. Es wurden 6 (Cx45-floxed) bzw. 8 Arteriolen (Cx45-floxed + Nestin-Cre) in jeweils 4 Tieren untersucht.

Der Stimulus löste in Kontrolltieren (Cx45-floxed) ähnlich wie in den Beobachtungen unter Punkt 3.3.3 eine rasche Vasokonstriktion aus, die sich ohne Zeitverzögerung jedoch mit abnehmender Amplitude entlang des Gefäßes ausbreitete (Abb. 3.13). Ohne signifikante Unterschiede bezüglich Amplitude und Dauer gegenüber der Kontrollgruppe wurde die Konstriktion auch in Tieren mit einer Cx45-Defizienz der glatten Muskelzellen (Cx45-floxed + Nestin-Cre) in die Entfernung fortgeleitet (900 µm: Cx45-floxed, -14,1±3,1%; Cx45-floxed + Nestin-Cre, -15,4±2,9%).

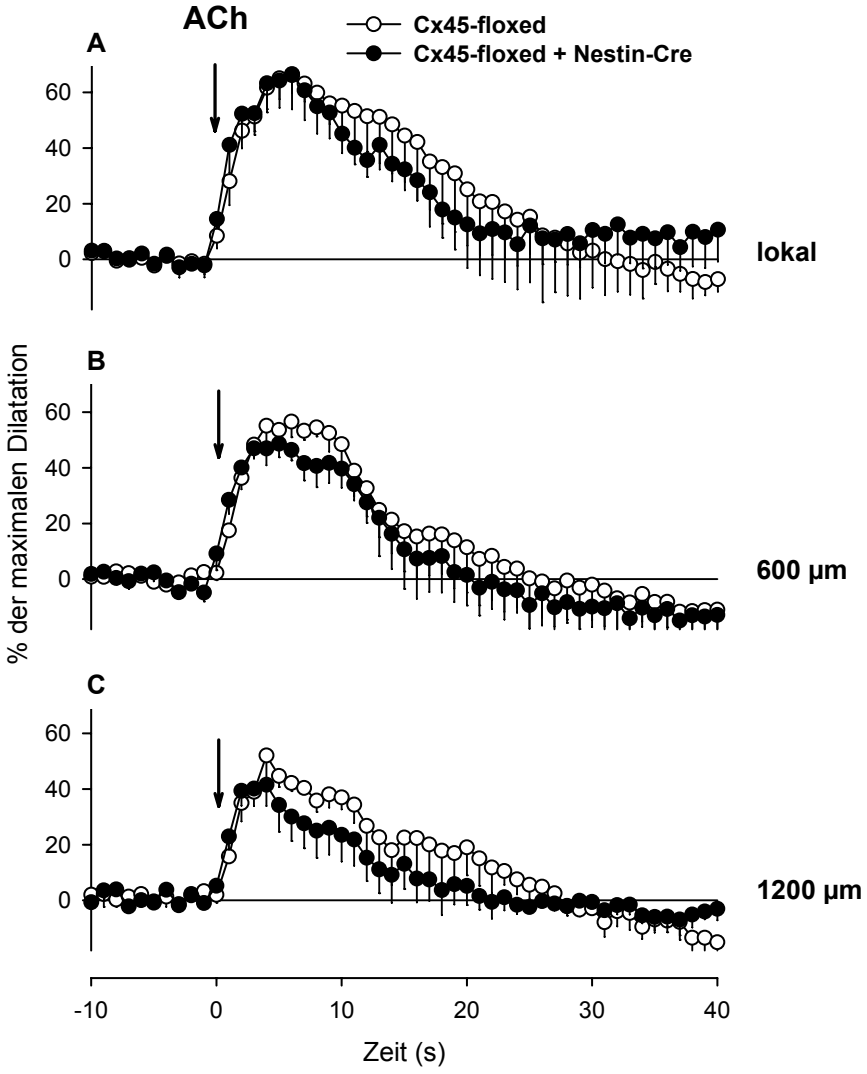

Abb. 3.14: Dilatationen an der Applikationsstelle und an entfernten Gefäßstellen im zeitlichen Verlauf nach Stimulation mit ACh. ACh (1 mmol/l) induzierte in der Kontrollgruppe (Cx45-floxed, n = 3 Arteriolen in 3 Tieren) und in Tieren mit einer glattmuskulären Cx45-Defizienz (Cx45-floxed + Nestin-Cre, n = 4 Arteriolen in 4 Tieren) vergleichbare Antworten sowohl an der lokalen Stelle (**A**) als auch in der Entfernung (**B** + **C**).

Analog zu KCl wurden auch ACh-induzierte Gefäßantworten ohne signifikante Unterschiede in Kontrolltieren und Tieren mit einer glattmuskelspezifischen Cx45-Defizienz fortgeleitet (Abb. 3.14). Das Fehlen von Cx45 in glatten Gefäßmuskelzellen führt zumindest bei den hier verwendeten Substanzen zu keiner Beeinträchtigung der Ausbreitung lokal ausgelöster Gefäßantworten.

4 DISKUSSION

Spezifische Connexin-Funktionen in der Mikrozirkulation

Durch die Mikroapplikation vasoaktiver Substanzen mittels Glaspipetten konnten in den Cremasterarteriolen narkotisierter Mäuse lokale Gefäßreaktionen ausgelöst werden, die sich ohne zeitlich messbare Verzögerung (< 0,5s) nach stromauf- und stromabwärts entlang des Gefäßes ausbreiteten. Dies zeigt, dass eine lokal induzierte Gefäßantwort das Verhalten des gesamten Gefäßes koordinieren kann und so die Durchblutung der Muskulatur deutlich erhöht werden kann. Die hohen Geschwindigkeiten, mit denen die Antworten fortgeleitet wurden, deuten auf eine Beteiligung elektrischer Signale hin. Frühere Membranpotentialmessungen an Arteriolen des Hamsters zeigten, dass die Fortleitung ACh-induzierter Dilatationen mit einer Hyperpolarisation in Endothel- und glatten Muskelzellen vergesellschaftet ist, die sich entlang der Arteriole ausbreitet (Emerson und Segal, 2000;Emerson und Segal, 2001). Fortgeleitete Konstriktionen nach KCl-Stimulation wurden hingegen von einer Depolarisation entlang der glatten Gefäß-muskelschicht begleitet (Welsh und Segal, 1998;Emerson und Segal, 2000;Emerson und Segal, 2001). Zusammenfassend legen die Befunde nahe, dass elektrische Signale die Entstehung und Fortleitung der lokal ausgelösten Gefäßantworten vermitteln.

Basis für diese elektrische Signalübertragung ist eine intakte Kopplung der Gefäßzellen über Gap Junctions, deren Strukturproteine (Connexine) zwischen Menschen und Mäusen große Homologien aufweisen und von denen vier Subtypen (Cx40, Cx37, Cx43, Cx45) im kardiovaskulären System exprimiert werden (Sohl und Willecke, 2004). Da im Menschen und in der Maus bis heute 21 bzw. 20 unterschiedliche Connexine gefunden wurden (Sohl und Willecke, 2004), stellt sich die Frage, aus welchem Grund eine so große Vielfalt besteht und warum in einigen Organen nur ganz bestimmte Connexine exprimiert werden. Ein denkbarer Grund für dieses Phänomen könnte in einer funktionellen Spezifität der einzelnen Connexine liegen. So wäre es durchaus vorstellbar, dass in Organen nur diejenigen Connexine exprimiert werden, die aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften am besten zu den Anforderungen im jeweiligen Gewebe passen. Ob Connexine aber tatsächlich über eigenständige Funktionen verfügen, ist bislang nur in wenigen Arbeiten untersucht worden (Plum *et al.*, 2000;Alcolea *et al.*, 2004). Obwohl diese Befunde auf eine funktionelle Spezifität einzelner Connexine hindeuten, ist bis heute nicht bekannt, ob die in den Gefäßen vorkommenden Connexine spezifische Eigenschaften bei der Koordination

des Gefäßverhaltens aufweisen. Um eine Antwort auf diese Frage zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Funktion des vaskulär exprimierten Cx40 in der Mikrozirkulation durch ein anderes vaskuläres Connexin (Cx45) ersetzt werden kann. Hierfür wurden als direkte Kontrollen auch Tiere mit einer globalen Cx40-Defizienz (Cx40ko) untersucht.

Charakteristisch für Cx40 ist das endothelspezifische Expressionsmuster, das sich in der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch durch eine punktförmige Verteilung von Cx40 entlang der Endothelzellmembranen in der Aorta und in den Arteriolen der Mikrozirkulation nachweisen ließ. Da eine Färbung der glatten Gefäßmuskelzellen mit Cx40-spezifischen Antikörpern ausblieb, ist es wahrscheinlich, dass Cx40 dort nicht exprimiert wird. Andere Autoren fanden Cx40 ebenfalls vor allem in den Endothelzellen, wenngleich es in seltenen Fällen auch in den glatten Gefäßmuskelzellen beschrieben wurde (Gustafsson *et al.*, 2003;Haefliger *et al.*, 2004;de Wit, 2004). Funktionell fand sich in Cx40-defizienten Tieren nach Stimulation mit ACh und Bradykinin eine deutliche Abnahme der Dilatationsamplitude mit wachsender Distanz von der Mikropipette im Vergleich zum Wildtyp. Dies belegt die zentrale Bedeutung von Cx40 bei der Vermittlung von fortgeleiteten Vasodilatationen und bestätigt die Ergebnisse früherer Arbeiten (de Wit *et al.*, 2000), in denen darüber hinaus gezeigt wurde, dass auch die Fortleitung elektrisch induzierter Vasodilatationen in Cx40-defizienten Tieren abgeschwächt ist (Figueroa *et al.*, 2003). Trotz der eingeschränkten Fortleitung war auch in Cx40ko-Tieren immer noch eine geringe Vasodilatation an entfernten Gefäßstellen zu beobachten. Diese verbleibende Ausbreitung der Dilatationen könnte durch Gap Junctions vermittelt werden, die nicht aus Cx40 sondern aus einem anderen endothelial exprimierten Connexin aufgebaut sind. Als möglicher Kandidat kommt hierfür vor allem Cx37 in Betracht, das ebenfalls in Endothelzellen der Cremasterarteriolen exprimiert wird (Looft-Wilson *et al.*, 2004).
Es ist weiterhin denkbar, dass eine durch ACh oder Bradykinin hervorgerufene endotheliale Hyperpolarisation den Cx40-abhängigen Signalweg über das Endothel umgeht, indem sie sich entlang der zirkulär verlaufenden glatten Muskelzellschicht ausbreitet.

Zur Untersuchung der funktionellen Spezifität von Cx40 in der Mikrozirkulation wurden genetisch modifizierte Mäuse untersucht, in denen Cx40 mittels homologer Rekombination biallelisch durch Cx45 ersetzt worden war (Cx40KI45). Der regelrechte Austausch der

beiden Gap Junction bildenden Strukturproteine konnte durch immunhistochemische Untersuchungen belegt werden. Cx45 wurde in diesen Tieren sowohl in Endothelzellen der Aorta als auch der Mikrozirkulationsgefäße exprimiert und wie Cx40 im Wildtyp in die Membran der Endothelzellen integriert. Trotz der Präsenz von Cx45 in der Membran waren die Fortleitungseigenschaften (ACh und Bradykinin) gegenüber Cx40-defizienten Tieren nicht verbessert. Cx40KI45- und Cx40ko-Tiere wiesen eine identische Abnahme der Dilatationsamplitude auf, während die Amplitude im Wildtyp sowohl nach ACh- als auch nach Bradykinin-Stimulation auch mit wachsender Entfernung von der Applikationsstelle annähernd unverändert blieb. Dies zeigt, dass Cx45 nicht in der Lage ist, Cx40-Funktionen bei der Signalvermittlung entlang der Arteriolen zu ersetzen oder auch nur partiell wiederherzustellen. Demzufolge verfügen Connexine in der Mikrozirkulation über spezifische, funktionelle Eigenschaften und sind nicht ohne funktionelle Konsequenzen gegeneinander austauschbar.

Die Ursachen der funktionellen Spezifität von Cx40 in der Mikrozirkulation sind vermutlich in besonderen Kanaleigenschaften der aus Cx40 bestehenden Gap Junctions zu suchen. Kanäle, die aus Cx40 aufgebaut sind und in Cx40-überexprimierenden Zellen untersucht wurden (Bukauskas *et al.*, 1995), besitzen eine hohe und einheitliche Leitfähigkeit (~200 pS), während die in-vitro-Leitfähigkeit reiner Cx45-Kanäle (~35 pS) deutlich niedriger ausfällt (van Veen *et al.*, 2000). Darüber hinaus wird die Öffnungswahrscheinlichkeit von Cx45-Kanälen wesentlich empfindlicher als bei Cx40-Kanälen durch Veränderungen der transmembranösen und transjunktionalen Spannung moduliert, was zu einem unterschiedlichen Schaltverhalten der Kanäle führen kann (Beblo *et al.*, 1995;Barrio *et al.*, 1997). Da die Leitfähigkeit von Cx40- und Cx45-Kanälen zudem in unterschiedlicher Weise durch den Phosphorylierungszustand des Kanals beeinflusst wird, könnten auch diese Abweichungen zu der Unfähigkeit des Cx45, die Cx40-Funktion in Arteriolen in vivo zu ersetzen, beitragen (van Veen *et al.*, 2000;van Rijen *et al.*, 2000). Ferner sollte auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Cx45 vielleicht in geringerem Maße als Cx40 die Bildung sog. heteromerer Gap Junctions, d.h. Gap Junctions, die aus unterschiedlichen Connexin-Subtypen aufgebaut sind, zulassen könnte (de Wit, 2004). Letztlich wäre es auch denkbar, dass durch den Cx40-Verlust ein verändertes Expressionsverhalten der übrigen vaskulären Connexine resultiert und dadurch insgesamt die Fortleitungsfähigkeit verschlechtert wird. Tatsächlich konnte im Endothel

muriner Aorten gezeigt werden, dass die Expression von Cx43 in Cx40-defizienten Tieren erniedrigt ist und dass das verbliebene Cx43 eher im Zellinneren als in der Endothelzellmembran lokalisiert ist (Isakson *et al.*, 2006). Auf der anderen Seite konnte Cx43 bis heute nicht in den Endothelzellen der Cremasterarteriolen nachgewiesen werden (Looft-Wilson *et al.*, 2004), weswegen ein Effekt durch die veränderte Cx43-Expression nicht plausibel auf die untersuchten Arteriolen der vorliegenden Arbeit übertragbar ist. Welche der diskutierten Möglichkeiten den Ausschlag dafür gibt, dass das elektrische Signal entlang der Cx45-Kanäle abnimmt, während es sich über Cx40-Kanäle so ausbreitet, dass selbst an weit entfernten Beobachtungstellen unverändert starke Dilatationen ausgelöst werden können, muss durch zukünftige Untersuchungen geklärt werden. Ein Ansatz hierfür wäre beispielsweise die Untersuchung der Zellkopplung durch elektrische Methoden während einer gezielten Veränderung des Phosphorylierungsstatus der Gap Junctions.

Die unterschiedlichen Befunde in der Gefäßwand von Wildtypen und Cx40KI45-Tieren sind auf Seite 53 (Abb. 4.1 und Abb. 4.2) schematisch zusammengefasst.

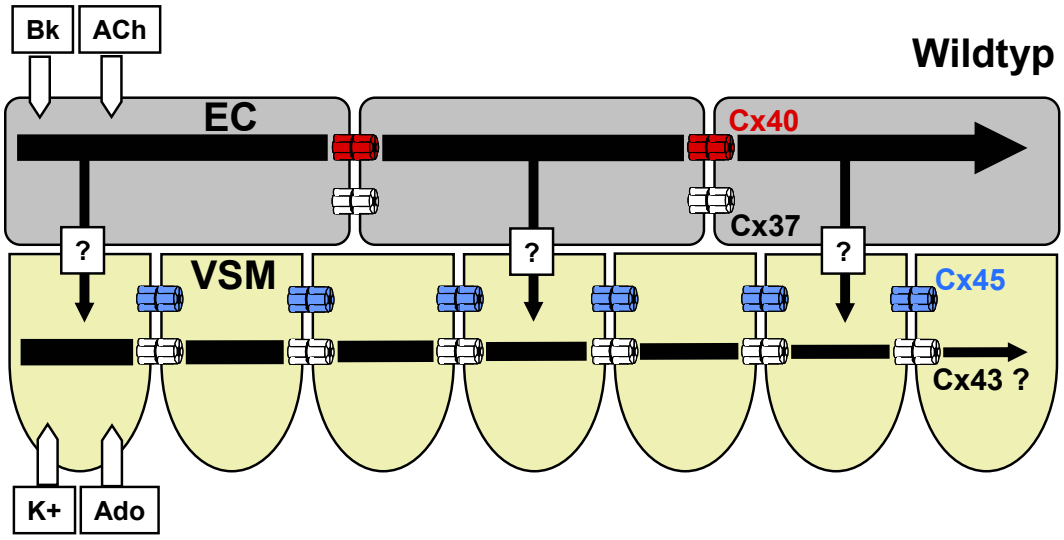

Abb. 4.1: Signalwege in der Gefäßwand von Arteriolen.
Cx40 (rot) wird nur in Endothelzellen (EC) exprimiert und ist essentiell für die Fortleitung von ACh- und Bradykinin-induzierten Gefäßantworten, die sich entlang des Endothels ausbreiten. Die Hyperpolarisation der EC nach ACh und Bradykinin wird durch einen bisher unbekannten Faktor (EDHF) auf die glatten Gefäßmuskelzellen (VSM) übertragen, die daraufhin erschlaffen. Adenosin- und KCl-induzierte Gefäßantworten breiten sich hingegen über die glatte Gefäßmuskelschicht aus. Im Gegensatz zum Endothel kommt es bei der glattmuskulären Fortleitung zu einer kontinuierlichen Abnahme der Amplitude der Gefäßantworten. Die glattmuskuläre Signalfortleitung erfolgt dabei nicht über das spezifisch im glatten Muskel exprimierte Cx45 (blau), sondern vermutlich über ein anderes glattmuskuläres Connexin (z.B. Cx43).

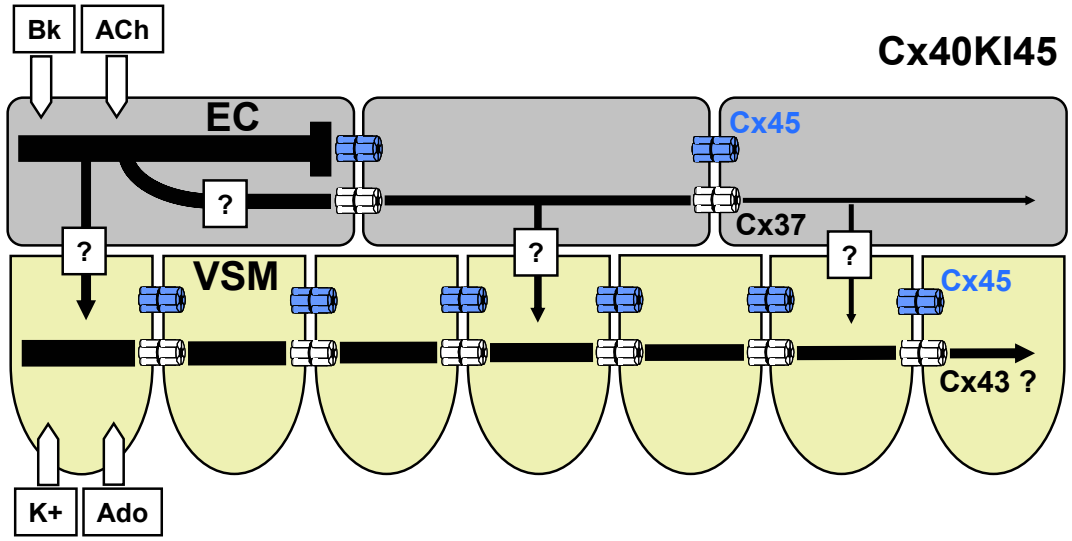

Abb. 4.2: Signalwege in Arteriolen von Cx40KI45-Tieren.
Der Ersatz von Cx40 durch Cx45 führt zu einer deutlich beeinträchtigten Fortleitung der ACh- und Bradykinin-Antworten und zu keiner verbesserten Fortleitung gegenüber Cx40-defizienten Tieren. Cx45 kann demnach die Cx40-Funktion bei der Signalvermittlung nicht ersetzen. Die verbleibende geringe Vasodilatation nach Ausfall des endothelialen Cx40-abhängigen Leitungsweges an entfernten Gefäßstellen könnte über die glatte Gefäßmuskelschicht oder über ein anderes endothelial exprimiertes Connexin (z.B. Cx37) mit schlechteren Leitungseigenschaften vermittelt werden.

Cx40 und myoendotheliale Gap Junctions

Elektrische Signale können über homozelluläre Gap Junctions zwischen Endothelzellen oder glatten Muskelzellen weite Strecken entlang des Gefäßes zurücklegen. Es ist denkbar, dass sich zudem auch zwischen den Endothelzellen und glatten Muskelzellen Gap Junctions befinden, die über die Bildung einer myoendothelialen Kopplung zum transversalen Signalfluss in den Gefäßen beitragen. Eine endotheliale Hyperpolarisation nach ACh oder Bradykinin könnte so direkt auf den glatten Gefäßmuskel übertragen werden, ohne dass ein diffusibler Faktor aus den Endothelzellen (EDHF = endothelium-derived hyperpolarising factor) dafür notwendig wäre. Obwohl Cx40, wie die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, hauptsächlich in Endothelzellen exprimiert wird, ist auch dessen Beteiligung an heterozellulären Gap Junctions vorstellbar. In größeren, isolierten Gefäßen, z.B. in Zerebral- und Mesenterialarterien, konnten myoendotheliale Gap Junctions immunhistochemisch nachgewiesen werden und die Übertragung endothelabhängiger Gefäßantworten auf den glatten Gefäßmuskel durch Gap Junction-Entkoppler oder spezifische Connexin-Inhibitoren reduziert bzw. aufgehoben werden (Sandow und Hill, 2000;Dora *et al.*, 2003;Mather *et al.*, 2005;Haddock *et al.*, 2006). Weiterhin konnte in Endothelzellen der Mesenterialarterien die Beteiligung von Cx40 an myoendothelialen Gap Junctions sowohl funktionell als auch morphologisch nachgewiesen werden (Mather *et al.*, 2005).

Im Gegensatz zu diesen in vitro-Befunden sprechen Messungen in vivo in Arteriolen der Mikrozirkulation gegen einen freien Ladungsaustausch zwischen Endothel und glatter Muskelschicht durch myoendotheliale Gap Junctions. So wurde gezeigt, dass Endothelzellen und glatte Muskelzellen in Cremasterarteriolen von Mäusen sehr unterschiedliche Ruhemenbranpotentiale aufweisen (Siegl *et al.*, 2005). In weiteren in vivo-Untersuchungen in Arteriolen aus der Hamsterbackentasche konnte beobachtet werden, dass fortgeleitete Gefäßantworten, die über eine Zellschicht (Endothel oder glatter Muskel) vermittelt werden, sich nicht ausbreiten können, wenn die vermittelnde Zellschicht selektiv und punktuell unterbrochen wird (Budel *et al.*, 2003). Bei einer ausgeprägten myoendothelialen Kopplung würde man jedoch erwarten, dass das elektrische Signal die Endothel- oder Muskelzellunterbrechung durch Passage der parallel verlaufenden Zellschicht überspringt, so dass die Gefäßantwort auch über die Läsion hinaus weitergeleitet wird.

Wenn Cx40 in Cremasterarteriolen von Mäusen an der Bildung myoendothelialer Gap Junctions beteiligt ist, sollte eine Abschwächung der EDHF-mediierten Vasodilatationen in

Cx40ko-Tieren zu beobachten sein. Dies war aber nach globaler ACh-Applikation nur in einem geringem Ausmaß gegeben (de Wit *et al.*, 2000) und auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach lokaler Stimulation eine annähernd identische Antwort (nach ACh, Adenosin und Bradykinin) an der Stimulationsstelle in Cx40-defizienten Tieren und Wildtypen. Erst mit wachsender Entfernung von der Mikropipette traten Unterschiede in der Amplitudenhöhe zwischen den Genotypen auf. Dies zeigt, dass Cx40 bei der homozellulären Kopplung entlang des Gefäßes von Bedeutung ist, während myoendotheliale Kanäle nicht auf Cx40 angewiesen sind oder keine Rolle bei der endothelvermittelten Hyperpolarisation des glatten Muskels spielen.

Glatter Muskel und Endothel als eigenständige Leitungsbahnen

Der Verlust von Cx40 oder der Austausch von Cx40 durch Cx45 führt zu einer verschlechterten Fortleitung der ACh- und Bradykinin-Antworten. Im Gegensatz dazu wurde die Fortleitung der Adenosin-Dilatationen durch die Manipulationen des Cx40 nicht beeinträchtigt und deutet somit auf einen Cx40-unabhängigen Signalweg hin. Da Cx40 im Endothel aber nicht in den glatten Muskelzellen exprimiert wird, ist es denkbar, dass Adenosin-induzierte Dilatationen im Gegensatz zu den endothelabhängigen ACh- und Bradykinin-Antworten nicht das Endothel sondern die glatte Gefäßmuskelschicht als primären Fortleitungsweg nutzen. Es könnten also zwei separate elektrische Leitungswege in den Arteriolen existieren. Auffallend ist weiterhin, dass die Amplitude der Adenosin-Dilatation im Unterschied zu ACh und Bradykinin schon im Wildtyp mit wachsender Entfernung von der Applikationsstelle kontinuierlich abnimmt. Da der lange zirkuläre Leitungsweg und der hohe elektrische Widerstand zwischen den glatten Muskelzellen (90 MΩ versus 3 MΩ zwischen Endothelzellen; (Diep *et al.*, 2005)) zu einer stärkeren Abnahme des elektrischen Signals führt, spricht die stetige Minderung der Amplitude nach Adenosin dafür, dass die elektrische Erregung hier nicht über das Endothel sondern entlang der glatten Gefäßmuskelzellen fortgeleitet wird. Interessanterweise war nach Verlust von Cx40 und dem damit verbundenem Verlust des intakten endothelialen Leitungsweges auch nach ACh und Bradykinin eine ähnliche Abnahme der Amplitude zu beobachten. Dies lässt vermuten, dass unter diesen Umständen die verbleibende Dilatation in der Entfernung ebenfalls durch eine Fortleitung entlang des glatten Gefäßmuskels erreicht wurde. Neben Adenosin wurden auch KCl-induzierte Konstriktionen Cx40-unabhängig und mit einer kontinuierlich abnehmenden Amplitude in den Wildtypen fortgeleitet, so dass auch

hier am ehesten von einer glattmuskulären Signalfortleitung auszugehen ist. Versuche, in denen die Ausbreitung KCl-induzierter Konstriktionen durch eine punktuelle Zerstörung der glatten Gefäßmuskelschicht unterbrochen werden konnte (Budel *et al.*, 2003), unterstützen diese Vermutung.

Zusammenfassend deuten die Befunde auf zwei separate Signalpfade in der Gefäßwand hin, die für die Koordination der Gefäßantworten verantwortlich sind. Welcher Signal- bzw. Leitungsweg genutzt wird, hängt von der Art des verwendeten Stimulus ab. Die glatte Gefäßmuskulatur bildet dabei einen Cx40-unabhängigen Signalweg über den Gefäßreaktionen nach Adenosin- und KCl-Stimulation fortgeleitet werden, während sich ACh- und Bradykinin-induzierte Dilatationen Cx40-abhängig über einen endothelialen Leitungsweg ausbreiten.
Die Befunde sind in Abbildung 4.1 (S. 53) schematisch zusammengefasst.

Spezifische Connexin-Funktionen bei der Blutdruckregulation

In den telemetrischen Blutdruckmessungen an nichtnarkotisierten Mäusen zeigte sich, dass ein Verlust von Cx40 mit einem Anstieg des arteriellen Mitteldruckes um ca. 45 mmHg einhergeht. Dieser ausgeprägte Hypertonus wurde bereits mit einer nicht-telemetrischen Methode beschrieben (de Wit *et al.*, 2003) und konnte durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden. Die beschriebene Koordinationstörung entlang des Gefäßes in Cx40-defizienten Tieren könnte in einer Erhöhung des peripheren Widerstandes resultieren und so zur Druckerhöhung beitragen. Interessanterweise zeigten kürzlich veröffentlichte Arbeiten, dass in Cx40-defizienten Mäusen auch die Regulation der Renin-Sekretion, die eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutdrucks spielt, gestört ist (Kurtz *et al.*, 2007;Wagner *et al.*, 2007;Krattinger *et al.*, 2007). In diesen Tieren findet sich eine ausgeprägte Hyperreninämie, die durch die vermehrte Bildung von Angiotensin II einen Blutdruckanstieg begünstigt. Dieser Reninexzess ist einerseits bedingt durch einen fehlenden negativen Feedback der Druckerhöhung auf die Reninsekretion andererseits auch durch eine Dislokation der Renin-produzierenden Zellen innerhalb des juxtaglomerulären Apparates, wodurch der enge Kontakt zwischen den Gefäßzellen und den Renin-produzierenden Zellen aufgehoben wird. Unklar bleibt jedoch, in welchem Maße die vaskulären und renalen Faktoren die Höhe des Cx40-assoziierten Hypertonus bedingen. Ein Maus-Modell mit einem endothelspezifischen Cx40-Knockout, bei dem also nur die

vaskuläre Komponente betroffen ist, könnte in der Zukunft zur Klärung dieser Fragestellung beitragen.

Um zu klären, ob Cx45 in der Lage ist, Cx40-Funktionen bei der Regulation des arteriellen Blutdrucks wiederherzustellen, wurden Blutdruckmessungen in Cx40KI45-Tieren durchgeführt. Obwohl Cx45 die Funktion von Cx40 bei der Koordination des Gefäßverhaltens in keiner Weise ersetzen konnte, zeigte sich bei der Blutdruckmessung der Cx40KI45-Tiere überraschender Weise eine nur mäßige Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks um etwa 20 mmHg (vs. 45 mmHg in Cx40ko). Der Befund deutet darauf hin, dass Cx45 in anderen Organbereichen als der Mikrozirkulation zumindest teilweise in der Lage ist, Cx40 funktionell zu ersetzen. Weiterhin belegt es eindrucksvoll, dass das genetisch eingebrachte Cx45 funktionsfähig ist. Interessante Befunde, die hier weitere Klärung versprechen, sollte die Untersuchung der Reninspiegel in diesen Tieren liefern.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Heterogenität des durch Cx45 erreichten Ersatzes (Mikrozirkulation vs. Blutdruck) findet sich auch in einer anderen Studie wieder, die sich mit der Erregungsleitung des Herzens beschäftigt hat. Hier war Cx45 zwar in der Lage, den Verlust von Cx40 im AV-Knoten, im rechten Vorhof und der rechten Herzkammer funktionell zu ersetzen, im linken Ventrikel hingegen war die Impulsfortleitung trotz des Einbaus von Cx45 anstelle von Cx40 deutlich verzögert (Alcolea *et al.*, 2004).

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Befunde in der vorliegenden Arbeit könnte zunächst die Länge der Signalstrecke sein. Da bei der Signalfortleitung entlang der Arteriolen große Distanzen zurückgelegt werden, sind diese Leitungspfade möglicherweise auf besonders gut leitende Gap Junctions angewiesen, so dass ein Ersatz mit dem Connexin niedriger Leitfähigkeit (Cx45) zur Dekompensation der Signalfortleitung führt. Bei kurzen Signalstrecken, wie sie bei der Kontaktzone zwischen Gefäßzellen und Renin-bildenden Zellen gegeben sind, könnte der Ersatz von Cx40 durch Cx45 dagegen eher toleriert werden, und so die negative Rückkopplung des Druckes auf die Reninbildung wiederhergestellt werden. Andererseits könnten differente Signale, die es zu übertragen gilt, eine Rolle spielen. Während in Gefäßen die Membranpotentialübertragung kritisch ist, könnte in der Niere die Weiterleitung von Kalzium in Form von sich ausbreitenden Ca^{2+}-Wellen (Ca^{2+}-wave) beteiligt sein (Hanner *et al.*, 2008;Toma *et al.*, 2008). Während die Eigenschaften des Cx45 die Potentialübertragung stark beeinträchtigen, könnte die

Übertragung von Ca^{2+} als second messenger noch gut möglich sein. Weiterführende Untersuchungen in den Nieren der Cx40KI45-Tiere müssen darüber hinaus klären, ob Cx45 die normale Positionierung der Renin-produzierenden Zellen innerhalb des juxtaglomerulären Apparates wiederherstellen kann.

Obwohl eine große strukturelle und örtliche Homogenität zwischen den murinen und genuinen Connexinen des kardiovaskulären Systems besteht (Sohl und Willecke, 2004), ist die endgültige Übertragbarkeit der Befunde auf den Menschen nicht ohne Weiteres zu beweisen. Hinweise lieferten allerdings Befunde an Menschen, die einen seltenen Polymorphismus für das Cx40-Gen aufweisen (Firouzi *et al.*, 2006). Insbesondere männliche Träger dieser Cx40-Variante, die durch eine Mutation im Promotor zu einer verminderten Expression des Connexins führt, hatten ein signifikant erhöhtes Risiko, an einer arteriellen Hypertonie zu erkranken.

Cx45 im glattmuskulären Signalweg

Mittels Immunhistochemie im Wildtyp und anhand genetisch manipulierter Mäuse zeigt diese Arbeit, dass Cx45 in den glatten Gefäßmuskelzellen der Arteriolen exprimiert wird. In den genetisch veränderten Tieren wurde nach der glattmuskelspezifischen Ausschaltung von Cx45 eGFP exprimiert. Dadurch konnte sowohl die Aktivität des Cx45-Gens unter physiologischen Bedingungen als auch der erfolgreiche Knockout von Cx45 in den glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden. Die Behandlung von Wildtypen mit Cx45-spezifischen Antikörpern zeigte weiterhin, dass Cx45 in der Zellmembran der glatten Muskelzellen lokalisiert ist (schematisch in Abb. 4.1 dargestellt). Frühere Untersuchungen in arteriellen Leitungsgefäßen (Aorta, Zerebralarterien) fanden ebenfalls eine glattmuskelspezifische Expression von Cx45 in der Gefäßwand (Ko *et al.*, 2001;Li und Simard, 2001; Haefliger *et al.*, 2004).

Nach Ausschaltung des glattmuskulären Cx45 bleibt die Fortleitung der KCl- und ACh-induzierten Gefäßantworten ohne eine messbare Abschwächung intakt. Im Fall von ACh war dieser Befund zu erwarten, da die Antworten wie oben beschrieben über einen endothelialen Leitungsweg fortgeleitet werden und deswegen nicht vom Cx45-Verlust der glatten Muskelzellen betroffen sind.

Da gezeigt wurde, dass sich KCl-induzierte Konstriktionen unabhängig von Cx40 und von der Endothelzellschicht ausbreiten, werden sie wahrscheinlich entlang der glatten Gefäßmuskelschicht fortgeleitet (s. Abb. 4.1). Trotz der nachweisbaren glattmuskel-

spezifischen Cx45-Expression im Wildtyp und der erfolgten Ausschaltung des Cx45 blieb die Fortleitung der Konstriktion nach KCl-Stimulation unbeeinträchtigt. Cx45 scheint demnach in der glatten Muskelzellschicht anders als Cx40 in der Endothelzellschicht eine untergeordnete Rolle bei der Ausbreitung elektrischer Signale zu spielen. Möglicherweise ist die Expression von Cx45 in den Muskelzellen eher gering. Da in glatten Muskelzellen größerer Arterien ein hoher Cx43-Anteil beschrieben wurde (Yeh *et al.*, 1998), ist es weiterhin denkbar, dass nicht Cx45 sondern Cx43 hauptverantwortlich für eine intakte Kopplung der Gefäßmuskelzellen ist. Obwohl Cx43 tatsächlich auch in der glatten Muskulatur von Mikrozirkulationsgefäßen im Hamster nachgewiesen wurde (Little *et al.*, 1995), ist über seine Funktion in den Arteriolen jedoch bis heute wenig bekannt. Dies ist auch bedingt dadurch, dass bis jetzt kein spezifischer Blocker für Cx43 existiert und ein globaler Knockout von Cx43 zum perinatalem Tod der Mäuse führt (Eckardt *et al.*, 2004). Auch ein zellspezisches Knockout-Modell für Cx43 steht zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung.

Interessanterweise scheinen auch Adenosin-induzierte Dilatationen, die ebenfalls über die Muskelschicht fortgeleitet werden (siehe oben), durch den Cx45-Verlust der Gefäß-muskelzellen unbeeinflusst zu sein, wie sich in ersten Untersuchungen zeigte. Leider reichte jedoch die Anzahl der zur Verfügung gestellten Tiere nicht aus, um diese Fragestellung abschließend zu beurteilen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Funktionell ist eine Koordination entlang des Gefäßbaumes von großer Bedeutung, denn nur eine gleichsinnige Antwort entlang einer großen Gefäßstrecke erlaubt maximale Durchblutungsänderungen. Grundlage dieser fortgeleiteten Gefäßreaktionen sind elektrische Signale, die sich über Gap Junctions zwischen den Gefäßwandzellen über weite Strecken ausbreiten und so entfernte Gefäßantworten auslösen. Dies wurde in der Mikrozirkulation in vivo untersucht, indem Arteriolen des Cremastermuskels in narkotisierten Mäusen mit Mikropipetten lokal stimuliert wurden. Durch die Applikation eines Mikrobolus (<10 nl) vasoaktiver Substanz konnten lokale Gefäßreaktionen ausgelöst werden, die sich ohne messbare Zeitverzögerung (< 0,5s) entlang des Gefäßes ausbreiteten. Ziel der Arbeit war es, anhand von genetisch modifizierten Tieren die funktionelle Rolle der Gap Junction-bildenden Strukturproteine (Connexine) zu untersuchen. Die Applikation von ACh und Bradykinin löste im Wildtyp eine Dilatation aus, die sich bis zur entferntesten Beobachtungsstelle (1200 µm) ohne Abschwächung der Amplitude ausbreitete, während Dilatationen nach Adenosin ebenfalls fortgeleitet wurden, die Amplitude jedoch kontinuierlich abnahm. Das endothelspezifisch exprimierte Connexin40 hat bei der Fortleitung nach ACh und Bradykinin eine entscheidende Rolle wie in Cx40-defizienten Tieren erkennbar wurde. Im Gegensatz dazu waren die Adenosin- und KCl-induzierten Antworten unabhängig von Cx40. Die Befunde deuten auf zwei separate Signalwege in den Arteriolen hin, ein Cx40-abhängiger endothelialer (ACh, Bradykinin) und ein Cx40-unabhängiger glattmuskulärer Signalweg (Adenosin, KCl). Der endotheliale Leitungspfad ist dabei spezifisch auf Cx40 angewiesen, da in Tieren, in denen Cx40 nachweislich durch Cx45 ersetzt wurde (Cx40KI45), die Fortleitung endothelial vermittelter Antworten (ACh, Bradykinin) in identischer Weise wie in Cx40ko-Tieren abgeschwächt war. Dies zeigt eindrucksvoll, das Connexine in der Mikrozirkulation nicht funktionell gegeneinander austauschbar sind und spezifische Funktionen aufweisen.

Verlässt man die Mikrozirkulation, so ist Cx45 in anderen Organbereichen partiell in der Lage, den Verlust von Cx40 zu kompensieren, denn der Hypertonus in Cx40ko-Tieren war nach Ersatz durch Cx45 zumindest abgeschwächt. Obwohl Cx45 in glatten Muskelzellen der Arteriolen nachgewiesen wurde, hatte dessen Verlust keine funktionelle Konsequenz auf die Ausbreitung von Dilatationen oder Konstriktionen, weswegen Cx45 im Unter-

schied zu Cx40 eine untergeordnete Rolle bei der Ausbreitung elektrischer Signale entlang der Arteriolen einzunehmen scheint.

Zusammenfassend zeigt sich, dass spezifische Eigenschaften einzelner Connexine entscheidend für eine intakte Koordination des Gefäßverhaltens in der Mikrozirkulation sind. Diese individuellen Eigenschaften könnten eine Erklärung für die große Vielfalt der Connexin-Subtypen in Säugetieren sein. Das Auftreten zweier eigenständiger Signalwege in der Gefäßwand und die stimulationsabhängigen Charakteristika der Gefäßantworten deuten die Komplexität der peripheren Durchblutungsregulation durch elektrische Signale an. Die Entwicklung weiterer Knockout-Modelle und spezifischer Connexin-Hemmstoffe könnte in Zukunft entscheidend zur Erforschung dieses differenzierten und faszinierenden Systems beitragen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Ahluwalia A und Hobbs AJ (2005). Endothelium-derived C-type natriuretic peptide: more than just a hyperpolarizing factor. *Trends Pharmacol Sci* **26**, 162-167.

Alcolea S, Jarry-Guichard T, de BJ, Gonzalez D, Lamers W, Coppen S, Barrio L, Jongsma H, Gros D, van RH (2004). Replacement of connexin40 by connexin45 in the mouse: impact on cardiac electrical conduction. *Circ Res* **94**, 100-109.

Aydin F, Rosenblum WI, Povlishock JT (1991). Myoendothelial junctions in human brain arterioles. *Stroke* **22**, 1592-1597.

Baez S (1973). An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc Res* **5**, 384-394.

Barrio LC, Capel J, Jarillo JA, Castro C, Revilla A (1997). Species-specific voltage-gating properties of connexin-45 junctions expressed in Xenopus oocytes. *Biophys J* **73**, 757-769.

Beblo DA, Wang HZ, Beyer EC, Westphale EM, Veenstra RD (1995). Unique conductance, gating, and selective permeability properties of gap junction channels formed by connexin40. *Circ Res* **77**, 813-822.

Bolton TB, Lang RJ, Takewaki T (1984). Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J Physiol* **351**, 549-572.

Bolz SS, Fisslthaler B, Pieperhoff S, de WC, Fleming I, Busse R, Pohl U (2000). Antisense oligonucleotides against cytochrome P450 2C8 attenuate EDHF-mediated Ca(2+) changes and dilation in isolated resistance arteries. *FASEB J* **14**, 255-260.

Bolz SS, Vogel L, Sollinger D, Derwand R, de WC, Loirand G, Pohl U (2003). Nitric oxide-induced decrease in calcium sensitivity of resistance arteries is attributable to activation of the myosin light chain phosphatase and antagonized by the RhoA/Rho kinase pathway. *Circulation* **107**, 3081-3087.

Budel S, Bartlett IS, Segal SS (2003). Homocellular conduction along endothelium and smooth muscle of arterioles in hamster cheek pouch: unmasking an NO wave. *Circ Res* **93**, 61-68.

Bukauskas FF, Elfgang C, Willecke K, Weingart R (1995). Biophysical properties of gap junction channels formed by mouse connexin40 in induced pairs of transfected human HeLa cells. *Biophys J* **68**, 2289-2298.

Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH (2002). EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 374-380.

Busse R, Luckhoff A, Mulsch A (1991). Cellular mechanisms controlling EDRF/NO formation in endothelial cells. *Basic Res Cardiol* **86 Suppl 2**, 7-16.

Coleman HA, Tare M, Parkington HC (2004). Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **31**, 641-649.

Cowan CL, Palacino JJ, Najibi S, Cohen RA (1993). Potassium channel-mediated relaxation to acetylcholine in rabbit arteries. *J Pharmacol Exp Ther* **266**, 1482-1489.

Crane GJ, Neild TO, Segal SS (2004). Contribution of active membrane processes to conducted hyperpolarization in arterioles of hamster cheek pouch. *Microcirculation* **11**, 425-433.

Davies PF, Olesen SP, Clapham DE, Morrel EM, Schoen FJ (1988). Endothelial communication. State of the art lecture. *Hypertension* **11**, 563-572.

de Wit C (2004). Connexins pave the way for vascular communication. *News Physiol Sci* **19**, 148-153.

de Wit C, Roos F, Bolz SS, Kirchhoff S, Kruger O, Willecke K, Pohl U (2000). Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice. *Circ Res* **86**, 649-655.

de Wit C, Roos F, Bolz SS, Pohl U (2003). Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion. *Physiological Genomics* **13**, 169-177.

de Wit C, Schafer C, von BP, Bolz SS, Pohl U (1997). Elevation of plasma viscosity induces sustained NO-mediated dilation in the hamster cremaster microcirculation in vivo. *Pflugers Arch* **434**, 354-361.

de Wit C, von BP, Pohl U (1993). Mediator role of prostaglandins in acetylcholine-induced vasodilation and control of resting vascular diameter in the hamster cremaster microcirculation in vivo. *J Vasc Res* **30**, 272-278.

de Wit C und Wolfle SE (2007). EDHF and gap junctions: Important regulators of vascular tone within the microcirculation. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **8**, 11-25.

Diep HK, Vigmond EJ, Segal SS, Welsh DG (2005). Defining electrical communication in skeletal muscle resistance arteries: a computational approach. *J Physiol* **568**, 267-281.

Dora KA, Sandow SL, Gallagher NT, Takano H, Rummery NM, Hill CE, Garland CJ (2003). Myoendothelial gap junctions may provide the pathway for EDHF in mouse mesenteric artery. *J Vasc Res* **40**, 480-490.

Duling BR und Berne RM (1970). Propagated vasodilation in the microcirculation of the hamster cheek pouch. *Circ Res* **26**, 163-170.

Eckardt D, Theis M, Degen J, Ott T, van Rijen HV, Kirchhoff S, Kim JS, de Bakker JM, Willecke K (2004). Functional role of connexin43 gap junction channels in adult mouse heart assessed by inducible gene deletion. *J Mol Cell Cardiol* **36**, 101-110.

Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH (1998). K+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* **396**, 269-272.

Emerson GG und Segal SS (2000). Endothelial cell pathway for conduction of hyperpolarization and vasodilation along hamster feed artery. *Circ Res* **86**, 94-100.

Emerson GG und Segal SS (2001). Electrical activation of endothelium evokes vasodilation and hyperpolarization along hamster feed arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H160-H167.

Figueroa XF, Paul DL, Simon AM, Goodenough DA, Day KH, Damon DN, Duling BR (2003). Central role of connexin40 in the propagation of electrically activated vasodilation in mouse cremasteric arterioles in vivo. *Circ Res* **92**, 793-800.

Firouzi M, Kok B, Spiering W, Busjahn A, Bezzina CR, Ruijter JM, Koeleman BP, Schipper M, Groenewegen WA, Jongsma HJ, de Leeuw PW (2006). Polymorphisms in human connexin40 gene promoter are associated with increased risk of hypertension in men. *J Hypertens* **24**, 325-330.

Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R (1999). Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* **401**, 493-497.

Fleming I (2004). Cytochrome P450 epoxygenases as EDHF synthase(s). *Pharmacol Res* **49**, 525-533.

Furchgott RF und Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376.

Fursphan EJ und Potter DD (1959). Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J Physiol* **145**, 289-325.

Griffith TM (2004). Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? *Br J Pharmacol* **141**, 881-903.

Griffith TM, Edwards DH, Davies RL, Harrison TJ, Evans KT (1987). EDRF coordinates the behaviour of vascular resistance vessels. *Nature* **329**, 442-445.

Gustafsson F und Holstein-Rathlou N (1999). Conducted vasomotor responses in arterioles: characteristics, mechanisms and physiological significance. *Acta Physiol Scand* **167**, 11-21.

Gustafsson F, Mikkelsen HB, Arensbak B, Thuneberg L, Neve S, Jensen LJ, Holstein-Rathlou NH (2003). Expression of connexin 37, 40 and 43 in rat mesenteric arterioles and resistance arteries. *Histochem Cell Biol* **119**, 139-148.

Haas TL und Duling BR (1997). Morphology favors an endothelial cell pathway for longitudinal conduction within arterioles. *Microvasc Res* **53**, 113-120.

Haddock RE, Grayson TH, Brackenbury TD, Meaney KR, Neylon CB, Sandow SL, Hill CE (2006). Endothelial coordination of cerebral vasomotion via myoendothelial gap junctions containing connexins 37 and 40. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H2047-H2056.

Haefliger JA, Nicod P, Meda P (2004). Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovasc Res* **62**, 345-356.

Hanner F, von MJ, Maxeiner S, Toma I, Sipos A, Kruger O, Willecke K, Peti-Peterdi J (2008). Connexin45 is expressed in the juxtaglomerular apparatus and is involved in the regulation of renin secretion and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.

Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, Busse R (1994). Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J Physiol* **481 (Pt 2)**, 407-414.

Hester RL (1990). Venular-arteriolar diffusion of adenosine in hamster cremaster microcirculation. *Am J Physiol* **258**, H1918-H1924.

Hilton SM (1959). A peripheral arterial conducting mechanism underlying dilatation of the femoral artery and concerned in functional vasodilatation in skeletal muscle. *J Physiol* **149**, 93-111.

Hoepfl B, Rodenwaldt B, Pohl U, de Wit C (2002). EDHF, but not NO or prostaglandins, is critical to evoke a conducted dilation upon ACh in hamster arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H996-H1004.

Hofmann F, Feil R, Kleppisch T, Schlossmann J (2006). Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev* **86**, 1-23.

Isakson BE, Damon DN, Day KH, Liao Y, Duling BR (2006). Connexin40 and connexin43 in mouse aortic endothelium: evidence for coordinated regulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H1199-H1205.

Karagiannis J, Rand M, Li CG (2004). Role of gap junctions in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated vasodilatation in rat renal artery. *Acta Pharmacol Sin* **25**, 1031-1037.

Ko YS, Coppen SR, Dupont E, Rothery S, Severs NJ (2001). Regional differentiation of desmin, connexin43, and connexin45 expression patterns in rat aortic smooth muscle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 355-364.

Koeppen M, Feil R, Siegl D, Feil S, Hofmann F, Pohl U, de WC (2004). cGMP-dependent protein kinase mediates NO- but not acetylcholine-induced dilations in resistance vessels in vivo. *Hypertension* **44**, 952-955.

Kohler R und Hoyer J (2007). The endothelium-derived hyperpolarizing factor: insights from genetic animal models. *Kidney Int* **72**, 145-150.

Krattinger N, Capponi A, Mazzolai L, Aubert JF, Caille D, Nicod P, Waeber G, Meda P, Haefliger JA (2007). Connexin40 regulates renin production and blood pressure. *Kidney Int* **72**, 814-822.

Krogh A (1920). Studies on the capillariometer mechanism: I. The reaction to stimuli and the innervation of the blood vessels in the tongue of the frog. *J Physiol* **53**, 399-419.

Kruger O, Plum A, Kim JS, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, Kirchhoff S, Traub O, Lamers WH, Willecke K (2000). Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development* **127**, 4179-4193.

Kumai M, Nishii K, Nakamura K, Takeda N, Suzuki M, Shibata Y (2000). Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development* **127**, 3501-3512.

Kumar NM und Gilula NB (1996). The gap junction communication channel. *Cell* **84**, 381-388.

Kurtz L, Schweda F, de Wit C, Kriz W, Witzgall R, Warth R, Sauter A, Kurtz A, Wagner C (2007). Lack of connexin 40 causes displacement of renin-producing cells from afferent arterioles to the extraglomerular mesangium. *Journal of the American Society of Nephrology* **18**, 1103-1111.

Lang NN, Luksha L, Newby DE, Kublickiene K (2007). Connexin 43 mediates endothelium-derived hyperpolarizing factor-induced vasodilatation in subcutaneous resistance arteries from healthy pregnant women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H1026-H1032.

Lash JM (1996). Regulation of skeletal muscle blood flow during contractions. *Proc Soc Exp Biol Med* **211**, 218-235.

Li X und Simard JM (2001). Connexin45 gap junction channels in rat cerebral vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H1890-H1898.

Little TL, Beyer EC, Duling BR (1995). Connexin 43 and connexin 40 gap junctional proteins are present in arteriolar smooth muscle and endothelium in vivo. *Am J Physiol* **268**, H729-H739.

Looft-Wilson RC, Payne GW, Segal SS (2004). Connexin expression and conducted vasodilation along arteriolar endothelium in mouse skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* **97**, 1152-1158.

Martin PE, Wall C, Griffith TM (2005). Effects of connexin-mimetic peptides on gap junction functionality and connexin expression in cultured vascular cells. *Br J Pharmacol* **144**, 617-627.

Matchkov VV, Rahman A, Bakker LM, Griffith TM, Nilsson H, Aalkjaer C (2006). Analysis of effects of connexin-mimetic peptides in rat mesenteric small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H357-H367.

Mather S, Dora KA, Sandow SL, Winter P, Garland CJ (2005). Rapid endothelial cell-selective loading of connexin 40 antibody blocks endothelium-derived hyperpolarizing factor dilation in rat small mesenteric arteries. *Circ Res* **97**, 399-407.

Matoba T und Shimokawa H (2003). Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Pharmacol Sci* **92**, 1-6.

Maxeiner S, Dedek K, Janssen-Bienhold U, Ammermuller J, Brune H, Kirsch T, Pieper M, Degen J, Kruger O, Willecke K, Weiler R (2005). Deletion of connexin45 in mouse retinal neurons disrupts the rod/cone signaling pathway between AII amacrine and ON cone bipolar cells and leads to impaired visual transmission. *J Neurosci* **25**, 566-576.

Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* **263**, 663-665.

Murphy ME und Brayden JE (1995). Apamin-sensitive K+ channels mediate an endothelium-dependent hyperpolarization in rabbit mesenteric arteries. *J Physiol* **489 (Pt 3)**, 723-734.

Murrant CL und Sarelius IH (2000). Local and remote arteriolar dilations initiated by skeletal muscle contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, H2285-H2294.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**, 664-666.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526.

Plum A, Hallas G, Magin T, Dombrowski F, Hagendorff A, Schumacher B, Wolpert C, Kim J, Lamers WH, Evert M, Meda P, Traub O, Willecke K (2000). Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr Biol* **10**, 1083-1091.

Pohl U und Busse R (1989). Hypoxia stimulates release of endothelium-derived relaxant factor. *Am J Physiol* **256**, H1595-H1600.

Pohl U, Herlan K, Huang A, Bassenge E (1991). EDRF-mediated shear-induced dilation opposes myogenic vasoconstriction in small rabbit arteries. *Am J Physiol* **261**, H2016-H2023.

Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E (1986). Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* **8**, 37-44.

Quilley J, Fulton D, McGiff JC (1997). Hyperpolarizing factors. *Biochem Pharmacol* **54**, 1059-1070.

Randall MD und Kendall DA (1998). Anandamide and endothelium-derived hyperpolarizing factor act via a common vasorelaxant mechanism in rat mesentery. *Eur J Pharmacol* **346**, 51-53.

Rapoport RM, Draznin MB, Murad F (1983). Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* **306**, 174-176.

Rapoport RM und Murad F (1983). Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* **52**, 352-357.

Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM (1986). Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* **250**, H1145-H1149.

Sandow SL und Hill CE (2000). Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses. *Circ Res* **86**, 341-346.

Segal SS und Beny JL (1992). Intracellular recording and dye transfer in arterioles during blood flow control. *Am J Physiol* **263**, H1-H7.

Segal SS und Duling BR (1986a). Communication between feed arteries and microvessels in hamster striated muscle: segmental vascular responses are functionally coordinated. *Circ Res* **59**, 283-290.

Segal SS und Duling BR (1986b). Flow control among microvessels coordinated by intercellular conduction. *Science* **234**, 868-870.

Segal SS und Duling BR (1987). Propagation of vasodilation in resistance vessels of the hamster: development and review of a working hypothesis. *Circ Res* **61**, II20-II25.

Segal SS und Duling BR (1989). Conduction of vasomotor responses in arterioles: a role for cell-to-cell coupling? *Am J Physiol* **256**, H838-H845.

Segal SS und Jacobs TL (2001). Role for endothelial cell conduction in ascending vasodilatation and exercise hyperaemia in hamster skeletal muscle. *J Physiol* **536**, 937-946.

Segal SS und Kurjiaka DT (1995). Coordination of blood flow control in the resistance vasculature of skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* **27**, 1158-1164.

Shaul PW, Farrar MA, Magness RR (1992). Prostacyclin synthesis and stimulation of cyclic AMP production in ovine fetal vasculature: heterogeneity in pulmonary and systemic arteries. *Dev Pharmacol Ther* **18**, 89-99.

Siegl D, Koeppen M, Wolfle SE, Pohl U, de Wit C (2005). Myoendothelial coupling is not prominent in arterioles within the mouse cremaster microcirculation in vivo. *Circ Res* **97**, 781-788.

Smyth EM und Fitzgerald GA (2002). Human prostacyclin receptor. *Vitam Horm* **65**, 149-165.

Sohl G und Willecke K (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* **62**, 228-232.

Sokoya EM, Burns AR, Marrelli SP, Chen J (2007). Myoendothelial gap junction frequency does not account for sex differences in EDHF responses in rat MCA. *Microvasc Res* **74**, 39-44.

Sokoya EM, Burns AR, Setiawan CT, Coleman HA, Parkington HC, Tare M (2006). Evidence for the involvement of myoendothelial gap junctions in EDHF-mediated relaxation in the rat middle cerebral artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H385-H393.

Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, Simonsen U (2003). [Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors]. *Medicina (Kaunas)* **39**, 333-341.

Toma I, Bansal E, Meer EJ, Kang JJ, Vargas SL, Peti-Peterdi J (2008). Connexin 40 and ATP-dependent intercellular calcium wave in renal glomerular endothelial cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**, R1769-R1776.

van Rijen HV, van Veen TA, Hermans MM, Jongsma HJ (2000). Human connexin40 gap junction channels are modulated by cAMP. *Cardiovasc Res* **45**, 941-951.

van Veen TA, van Rijen HV, Jongsma HJ (2000). Electrical conductance of mouse connexin45 gap junction channels is modulated by phosphorylation. *Cardiovasc Res* **46**, 496-510.

Wagner C, de Wit C, Kurtz L, Grunberger C, Kurtz A, Schweda F (2007). Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion. *Circ Res* **100**, 556-563.

Welsh DG und Segal SS (1998). Endothelial and smooth muscle cell conduction in arterioles controlling blood flow. *Am J Physiol* **274**, H178-H186.

Xia J und Duling BR (1995). Electromechanical coupling and the conducted vasomotor response. *Am J Physiol* **269**, H2022-H2030.

Yeh HI, Rothery S, Dupont E, Coppen SR, Severs NJ (1998). Individual gap junction plaques contain multiple connexins in arterial endothelium. *Circ Res* **83**, 1248-1263.

7 ANHANG

Die Versuchsdurchführung erfolgte nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes und war durch das Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Landwirtschaft des Landes Schleswig-Holstein genehmigt worden (V 742-72241.122-2, 08/03 und V312-72241.122-2, 05/06).

8 PUBLIKATIONEN

Veröffentlichungen in begutachteten Journalen:

Wölfle SE*, **Schmidt VJ***, Hoepfl B, Gebert A, Alcoléa S, Gros D, de Wit C (2007). Connexin45 cannot replace the function of Connexin40 in conducting endothelium-dependent dilations along arterioles. *Circ Res* **101**, 1292-1299 (mit Titelbild und Editorial)
* geteilte Erstautorenschaft

Schmidt VJ, Wölfle SE, Boettcher M, de Wit C (2008). Gap junctions synchronize vascular tone within the microcirculation. *Pharmacol Rep* **60**, 68-74

de Wit C, Boettcher M, **Schmidt VJ** (2008). Signaling across myoendothelial gap junctions – Fact or fiction? *Cell Commun Adhes* **15**(3), 231-245

Kongressbeiträge als Abstractpublikationen:

Schmidt VJ, Hoepfl B, Alcoléa S, Gros D, de Wit C (2006). Specific requirements for gap junctions: Connexin45 (Cx45) cannot replace the function Cx40 in vessels. *Act Physio Scand* **186** (Suppl 1): 93, Joint Meeting of the German Society of Physiology and the Federation of European Physiological Societies (FEPS), München

Schmidt VJ, Hoepfl B, Alcoléa S, Gros D, de Wit C (2006). Connexin45 (Cx45) cannot replace the function Cx40 in arterioles. *FASEB J* **20** (Suppl): A274, Annual Meeting of American Societies for Experimental Biology (FASEB), San Francisco CA

Schmidt VJ, Hoepfl B, Alcoléa S, Gros D, de Wit C (2006). Not just a channel: Replacement of Connexin40 with Cx45 abrogates gap junctional communication in arterioles. *J Vasc Res* **43**: 544, Annual Meeting of the German Society for Microcirculation and Vascular Biology, München (Young investigator award session)

Schmidt VJ, Hoepfl B, Alcolea S, Gros D, de Wit C (2006). Not just a channel: Specific connexin properties are required for gap junctional communication in arterioles. *J Vasc Res* **43** (Suppl 1): 16, 24th Conference of the European Society for Microcirculation, Amsterdam

Hoepfl B, **Schmidt VJ**, Siegl D, de Wit C (2005). A hyperpolarisation, but not nitric oxide, is necessary for ACh- and Bk-induced conducted responses. *Pflugers Arch* **449** (Suppl 1): S25, Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Physiologie, Göttingen

Hoepfl B, **Schmidt VJ**, de Wit C (2006). Different contributions of endothelial autacoids to the initiation of conducted dilations in response to ACh and bradykinin. *J Vasc Res* **43**: 46, Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Mikrozirkulation, Rostock

Wölfle SE, **Schmidt VJ**, Hoyer J, Kohler R, de Wit C (2006). Different K+-channels contribute to onset and amplification of conducting dilations initiated by ACh and adenosine in vivo. *J Vasc Res* **43**: 553, Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Mikrozirkulation, München

de Wit C, Wölfle SE, **Schmidt VJ**, Wagner C, Schweda F, Kurtz A (2007). Cx40 is necessary for conduction of dilations and renin secretion and can only be partially replaced by Cx45. *Microcirculation* **14**: 537, 8th World Congress for Microcirculation, Milwaukee WI

de Wit C, **Schmidt VJ**, Wölfle SE (2008). Communication along the vascular wall: distinct connexins and pathways involved. *J Vasc Res* **45** (Suppl 1): 2, 9th International Symposium on Resistance Arteries, Hamilton Island (Australien)

9 DANKSAGUNG

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Cor de Wit, dessen stetige Förderung wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen hat. Durch viele Anregungen, kritische Diskussionen und durch seine motivierende Begeisterung für das Forschungsgebiet hat Prof. de Wit mein wissenschaftliches Interesse und meine wissenschaftliche Denkweise nachhaltig geprägt. Für das überdurchschnittliche Engagement, die stete Gesprächsbereitschaft und für die kompetente Hilfestellung bin ich sehr dankbar.

Weiterhin danke ich ganz besonders Herrn Dr. med. Bernd Hoepfl, der mich sorgfältig in die experimentellen Methoden eingearbeitet hat und der durch viele hilfreiche Tipps und Kniffe am PC und am Versuchsaufbau die Entwicklung eigenständiger Problemlösungsstrategien in mir gefördert hat.

Frau Rita Meuer möchte ich für die warmherzige, hilfsbereite und kompetente Unterstützung im Labor danken. Durch ihre menschlichen Fähigkeiten hat sie maßgeblich zur guten Atmosphäre innerhalb der Arbeitsgruppe und auch zur mentalen Überwindung mancher frustraner Versuchstage beigetragen. Ebenso möchte ich Herrn Markus Boettcher für seine Hilfsbereitschaft bei technischen Fragen und für die gute kollegiale Zusammenarbeit danken.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann, Direktor des Physiologischen Instituts der Universität zu Lübeck, danke ich für die freundliche Aufnahme im Institut und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.
Prof. Gros und Prof. Willecke danke ich für die Zurverfügungstellung der genetisch modifizierten Tiere sowie Prof. Gebert für die Nutzung des konfokalen Mikroskops.

Für die besonders wichtige emotionale Unterstützung, aber auch für viele hilfreiche Anregungen und Kritiken bei der Fertigstellung des Manuskripts bin ich Anja Miesel im Besonderen dankbar.
Ein großer Dank gilt schließlich meinen Eltern und Geschwistern, die in entscheidenden Momenten bedingungslos zu mir standen und mir jederzeit Rückhalt boten.

10 LEBENSLAUF

Persönliche Angaben

Name:	Volker-Jürgen Schmidt
Geburtstag/-ort:	14.02.1979 in Celle
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

1985-1991	Grundschule und Orientierungsstufe Klein Hehlen, Celle
1991-1994	Hermann-Billung Gymnasium, Celle
1994-1998	Kaiserin-Auguste-Victoria Gymnasium, Celle
06/1998	Allgemeine Hochschulreife

Studium

2001-2007	Studiums der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
09/2003	Ärztliche Vorprüfung
12/2007	Ärztliche Prüfung und Approbation als Arzt

Beruf

seit 01/2008	Wissenschaftlicher Angestellter, Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck

Dissertation

03/2005-07/2006	Experimentelle Arbeiten am Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck