

**Aus dem Institut für Physiologie
der Universität zu Lübeck**

**„Hyperpolarisation durch K^+ -Kanäle und myoendotheliale Kopplung über Connexin40
als wichtige endotheliale Dilatationsmechanismen in Leitungs- und
Widerstandsgefäßen“**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaft

vorgelegt von
Markus Böttcher
aus Oldenburg in Holstein
Lübeck 2010

1. Berichterstatter/Berichterstatlerin: Prof. Dr. med. C. de Wit
2. Berichterstatter/Berichterstatlerin: Prof. Dr. rer. nat. E. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 21.06.2011

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Aufbau und physikalische Gesetzmäßigkeiten.....	1
1.1.1	Diffusion und Konvektion.....	1
1.1.2	Das Kreislaufsystem.....	2
1.2	Morphologie der Blutgefäße.....	4
1.2.1	Endothel	5
1.2.2	Glatte Gefäßmuskulatur	5
1.3	Angiogenese	6
1.4	Lokale Regulation des Muskeltonus durch das Endothel.....	7
1.4.1	Stickstoffmonoxid (NO).....	7
1.4.2	Prostaglandin I ₂ (PGI ₂).....	8
1.4.3	EDHF	8
1.5	Ziel der Arbeit	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Material.....	14
2.1.1	Versuchstiere	14
2.1.2	Mikropipetten	14
2.1.3	Lösungen	14
2.2	Methoden	16
2.2.1	Isolierung genomischer DNA.....	16
2.2.2	Genotypisierung der Versuchstiere	17
2.2.3	Präparation von Leitungsgefäßen und kleinen Arterien für <i>in vitro</i> Untersuchungen	18
2.2.4	Untersuchung der Angiogenese <i>in vitro</i>	21
2.2.5	Untersuchung von Gefäßantworten.....	22
2.2.6	Immunmarkierung.....	25

2.2.7	Statistische Auswertung	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Charakterisierung und Quantifizierung der Angiogenese <i>in vitro</i>	28
3.1.1	Bildaufbereitung mit AQuaL.....	28
3.1.2	Quantifizierung der Angiogenese.....	30
3.1.3	Vergleich der Flächen- und Längenmessung	33
3.1.4	Bestimmung der Kulturbedingungen	34
3.1.5	Charakterisierung der auswachsenden Zellen	35
3.2	Mediatoren der Angiogenese.....	36
3.2.1	Effekt von NO in der Angiogenese	36
3.2.2	Connexin40 bei der Angiogenese	38
3.3	Untersuchung der Gefäßregulation.....	39
3.3.1	Methodische Entwicklung.....	39
3.3.2	NO und PGI ₂ in unterschiedlichen Gefäßen	45
3.3.3	NO ist der Hauptmediator in Leitungsgefäßen	49
3.3.4	Connexinexpression in der A. femoralis	50
3.3.5	NO-medierte Dilatation und Connexine in Leitungsgefäßen.....	51
3.3.6	Ca ²⁺ -abhängiger K ⁺ -Kanal (IK) bei der NO-medierten Dilatationen	53
3.3.7	IK und SK bei der EDHF-vermittelten Dilatation kleiner Arterien	55
3.3.8	Connexin40-Expression in kleinen Arterien	64
3.3.9	Isobare Untersuchungen.....	67
3.3.10	EDHF-medierte Dilatation <i>in vivo</i>	68
3.4	Endotheliales Connexin40 ist relevant	70
3.4.1	Expression des Connexin40 im Endothel.....	71
3.4.2	Endotheliales Connexin40 ist unter isometrischen Bedingungen erforderlich ..	71
3.4.3	Isobare Bedingungen erfordern kein endotheliales Connexin40	73
3.4.4	Zusammenfassung der verschiedenen Versuchsbedingungen	75
4	Diskussion.....	78

4.1	Untersuchung der Angiogenese <i>in vitro</i>	78
4.1.1	AQuaL.....	78
4.1.2	Quantifizierung der Angiogeneseaktivität	80
4.1.3	FGF-abhängige Angiogenese	81
4.1.4	Abhängigkeit der Angiogenese von Connexin40.....	82
4.2	Untersuchung der Gefäßregulation.....	82
4.2.1	Unterschiede bei <i>in vitro</i> Gefäßuntersuchungen	83
4.3	Immunhistochemischer Nachweis des Connexin40	84
4.4	Mediatoren endothelvermittelter Dilatationen.....	85
4.4.1	Beteiligung der verschiedenen Autakoide.....	85
4.4.2	Connexine und Ca^{2+} -abhängigen K^{+} -Kanäle bei NO-medierten Dilatationen in Leitungsgefäßen	86
4.4.3	IK und SK bei der EDHF-vermittelten Dilatation in kleinen Arterien	87
4.4.4	NO/ PGI_2 und EDHF im Vergleich.....	88
4.4.5	Connexin40 und EDHF-medierte Dilatationen.....	89
5	Zusammenfassung.....	92
6	Literaturverzeichnis	93
7	Anhang.....	99
7.1	Abkürzungsverzeichnis	99
7.2	Publikationen und Kongressbeiträge	100
7.3	Danksagung	102

1 Einleitung

Einzelligen Organismen genügt zur Deckung ihres metabolischen Bedarfs die Diffusion der notwendigen Metabolite und des erforderlichen Sauerstoffs. Vielzelligen Organismen hingegen reicht dieser einfache physikalische Prozess aufgrund der langen Diffusionsstrecke und der damit verbundenen langen Diffusionszeit nicht für die adäquate Versorgung jeder einzelnen Zelle. Ihre Größe und Komplexität erfordert zusätzlich den über längere Strecken deutlich schnelleren konvektiven Transport, der durch das Herz-Kreislaufsystem bereitgestellt und aufrecht erhalten wird. Dieses besteht aus einem in sich geschlossenen System parallel und seriell verbundener Blutgefäße, in dem der nötige Perfusionsdruck (arterieller Blutdruck) vom Herzen erzeugt wird. Neben dem für die Aufrechterhaltung der gerichteten Strömung erforderlichen Druckgradienten ist das Herzzeitvolumen, die Gesamtstromstärke im Kreislaufsystem, ein weiterer wichtiger Faktor für die Versorgung des Organismus. Es ist das pro Zeiteinheit verfügbare Volumen, dass für die Versorgung aller Organe bereitgestellt wird. Da der Metabolismus der Organe abhängig ist von deren Aktivität und das Herzzeitvolumen prinzipiell begrenzt ist, muss die Verteilung des Herzzeitvolumens reguliert werden. Diese Regulation erfolgt einerseits organübergreifend zur Aufrechterhaltung des Perfusionsdrucks, andererseits über die organinterne Anpassung der Stromstärke durch die Veränderung der lokalen Strömungswiderstände zur adäquaten Organperfusion. Neben dem Transport der Atemgase O_2 und CO_2 und der notwendigen Metabolite spielt das Kreislaufsystem eine wichtige Rolle bei der Thermoregulation, der Immunabwehr und der hormonellen Signalvermittlung.

1.1 Aufbau und physikalische Gesetzmäßigkeiten

1.1.1 Diffusion und Konvektion

Diffusion ist ein auf thermischer Eigenbewegung der Moleküle beruhender passiver Prozess. Diese Eigenbewegung erfolgt zufällig in alle Richtungen des Raumes und die Zeit für das Überwinden einer Distanz nimmt quadratisch mit dem Abstand zu. Daraus resultiert, dass die Diffusion über kurze Strecken schnell (Glucose: 10^{-6} s für 0.1 μm) und über längere Strecken (15,4 h für 1 cm) langsam ist und somit nicht für die Versorgung größerer Organismen ausreicht. Konvektion hingegen ist ein aktiver Prozess, in dem Moleküle in einem gerichtet strömenden Medium innerhalb von Sekunden über größere Distanzen transportiert werden. An der Versorgung des Organismus sind sowohl Diffusion als auch Konvektion beteiligt.

1.1.2 Das Kreislaufsystem

Das Kreislaufsystem besteht aus dem Körper- und dem Lungenkreislauf. Diese sind über das Herz, welches die gerichtete Strömung des Blutes aufrecht erhält, miteinander verbunden. Im Körperkreislauf wird das Blut, ausgehend vom linken Ventrikel, durch die Aorta zu den großen Arterien geleitet, durch die es zu den verschiedenen Organgebieten gelangt. In ihnen verzweigen sich die Arterien in die Arteriolen, die sogenannten Widerstandsgefäße, welche sich in unzählige, nur aus Endothel bestehende, Kapillaren verzweigen, in denen Austauschvorgänge mit den umgebenden Geweben über Diffusion stattfinden. Durch die Kapillaren gelangt das Blut in die Venolen, welche wiederum in die Venen übergehen, die sich zu einer Vene vereinen, die abschließend in den rechten Vorhof mündet. Über den Lungenkreislauf gelangt das Blut vom rechten Ventrikel durch die Lungen, in denen der O₂- und der CO₂-Austausch über Diffusion stattfindet, in den linken Vorhof zum Herzen zurück.

Ebenso wie jede andere Flüssigkeit setzt auch das Blut der Strömung einen Widerstand entgegen. Der Gesamtwiderstand (R_{ges}) in Serie geschalteter Gefäße ist die Summe der Einzelwiderstände (R_n).

$$R_{ges} = R_1 + R_2 + \dots + R_n$$

In parallel geschalteten Gefäßen hingegen addieren sich die Leitfähigkeiten (L_n).

$$L_{ges} = L_1 + L_2 + \dots + L_n$$

Die Leitfähigkeit ist der reziproke Wert des Widerstandes, so dass der reziproke Wert des Gesamtwiderstandes die Summe der reziproken Werte der Einzelwiderstände ist.

$$\frac{1}{R_{ges}} = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} + \dots + \frac{1}{R_n}$$

Für den Widerstand wiederum gilt das Hagen-Poiseuille Gesetz welches besagt, dass der Widerstand (R) unter anderem proportional der Viskosität (η) des Blutes und der Gefäßlänge (l) und umgekehrt proportional der vierten Potenz des Gefäßradius (r) ist.

$$R = \frac{8 \times \eta \times l}{\pi \times r^4}$$

In Analogie zum Ohmschen Gesetz zeigt das Gesetz von Darcy, dass die Stromstärke (F) proportional der Druckdifferenz (ΔP) und umgekehrt proportional dem Gefäßwiderstand (R) ist.

$$F = \frac{\Delta P}{R}$$

Aus diesen beiden Gesetzen ergibt sich das Poiseuille-Gesetz, nach dem die Stromstärke (F) unter anderem proportional der vierten Potenz des Gefäßradius (r) und der Druckdifferenz (ΔP) und umgekehrt proportional der Viskosität (η) und der Gefäßlänge (l).

$$F = \Delta P \times \frac{\pi \times r^4}{8 \times \eta \times l}$$

Aufgrund der Durchmesser der Aorta, der großen und mittleren Arterien ist der Strömungswiderstand in ihnen gering, was nur einen geringen Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks zur Folge hat. Des Weiteren ist die Wand dieser Gefäße elastisch, was zur Folge hat, dass diese Gefäße die Volumenschwankungen, die durch den Herzschlag erzeugt werden, dämpfen und dadurch die pulsierende Strömung in einen mehr kontinuierlichen Strom wandeln. Erst im Bereich der kleinen Arterien und der Arteriolen (Durchmesser < 200 μm) kommt es zu einer erheblichen Minderung des mittleren arteriellen Blutdrucks, weshalb letztere auch als Widerstandsgefäße bezeichnet werden (1). Da der Widerstand umgekehrt proportional zur vierten Potenz des Gefäßradius ist, führen selbst geringe Änderungen des Durchmessers der Arteriolen zu einer erheblichen Veränderung des peripheren Widerstandes. Aus diesen Gründen ergibt sich, dass auch die Regulation der Organdurchblutung hauptsächlich auf der aktiven Änderung des Gefäßdurchmessers im Bereich der Arteriolen beruht. Deren Konstriktion führt zu einer Erhöhung des peripheren Widerstandes und somit zu einer geringeren Durchblutung (Perfusion) und zu einem geringen Filtrationsdruck in den Kapillaren. Wird bei Bedarf die Durchblutung lokal erhöht, ist die maximale Durchblutung determiniert durch die vorgeschalteten Gefäße. Durch die sogenannte fortgeleitete Gefäßantwort wird die Organdurchblutung maximiert, indem in stromaufwärts gelegenen Arteriolen der Gefäßwiderstand ebenfalls gesenkt wird. Durch diesen Mechanismus kann die Organdurchblutung maximal gesteigert werden, zum Beispiel im Skelettmuskel im Vergleich zur Ruhedurchblutung um das 25-30fache.

Die Anpassung der Organdurchblutung durch die Veränderung der peripheren Widerstände setzt voraus, dass die glatte Muskulatur der Gefäße schon in Ruhe aktiv Spannung entwickelt (Ruhetonus), von der aus eine Dilatation oder auch eine weitere Konstriktion möglich ist. Am Beispiel der Skelettmuskulatur, welche unter Ruhebedingungen eine Flussrate von 10 ml/min pro 100 g Gewebe aufweist, diese dann aber bei Aktivität um das 25-fache auf bis zu 250 ml/min pro 100 g Gewebe steigern kann, wird deutlich, dass die Durchblutung erheblich

gesteigert werden kann. Der Ruhetonus beruht zum Einen auf der Reaktion der glatten Muskulatur auf die Wandspannung und ist somit bestimmt durch den transmuralen Druck. Bereits im Jahre 1902 wies W. M. Bayliss (2) nach, dass ein isoliertes Gefäß auf die Erhöhung des Drucks und damit einer Dehnung mit einer Kontraktion reagiert und dass umgekehrt die Verminderung des Drucks zu einer Dilatation führt. Dieser sogenannte Bayliss-Effekt beruht unter anderem auf der Ryanodin-Rezeptor-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (3). Zum Anderen unterliegt der Ruhetonus der Kontrolle des vegetativen Nervensystems. Dabei ist das von sympathischen Nervenfasern freigesetzte Noradrenalin, welches über die Bindung an α -Rezeptoren die Konstriktion vermittelt, der Haupteffektor der neuronalen Kontrolle. Die aus dem Nebennierenmark sezernierten Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin modulieren ebenfalls den Ruhetonus der glatten Gefäßmuskulatur. Ebenso wie das Noradrenalin wirkt auch das Adrenalin meist durch die Bindung an α -adrenerge Rezeptoren vasokonstriktorisch. In Geweben, die über eine hohe Dichte β -adrenerge Rezeptoren verfügen, wie zum Beispiel im Myokard, der Leber und der Skelettmuskulatur, induziert Adrenalin in geringen Konzentrationen aber eine Vasodilatation. Als Faktor der humoralen Tonusmodulation ist das Angiotensin II zu nennen. Gebildet wird es durch das endotheliale Angiotensin-I-konvertierende Enzym (ACE) aus Angiotensin I, welches seinerseits durch die enzymatische Aktivität des Renins, dessen Substrat das Angiotensinogen ist, synthetisiert wird. Renin wird von den Epithelzellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere in die Blutbahn sezerniert, wohingegen das Angiotensinogen hauptsächlich in der Leber und im Fettgewebe synthetisiert wird.

1.2 Morphologie der Blutgefäße

Arterien bestehen aus der Tunica intima, der T. media und der T. adventitia. Die T. intima, bestehend aus dem Endothel und der aufgelagerten Membrana elastica interna, grenzt das Gefäßlumen gegen das Blut ab. Umgeben ist sie von der, aus Bindegewebs- und glatten Muskelzellen bestehenden, T. media, welche, je nach Gefäßgröße, in mehreren Schichten vorliegen. Weiterhin ist die Membrana elastica externa Teil der T. media. Diese trennt die T. media von der aufgelagerten, hauptsächlich aus extrazellulärer Matrix bestehenden, T. adventitia. Im Folgenden werden die glatte Gefäßmuskulatur und das Endothel näher beschrieben.

1.2.1 Endothel

Aus nur einer Zellschicht bestehend kleidet das Endothel alle Gefäße aus und stellt eine Barriere dar, die das Gefäßlumen von dem umgebenden Gewebe trennt. Seine regulatorische Funktion beim Transport von Molekülen aus dem Lumen in das umgebende Gewebe und umgekehrt beruht auf Zell-Zellverbindungen, die aus tight-junctions bestehen. Diese sind insbesondere im Bereich der arteriellen Blutbahn ausgebildet. Endothelzellen liegen, im Gegensatz zu den Zellen des glatten Gefäßmuskels, parallel zur Längsachse (4) und lassen sich dadurch im mikroskopischen Bild morphologisch von den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur unterscheiden. Sie haben eine Länge von ca. 140µm und eine Breite von ca. 7µm (4) und neben der Bedeutung während der Angiogenese wirken sie durch die Synthese und Freisetzung vasoaktiver Substanzen auf den Kontraktionszustand der glatten Gefäßmuskulatur. Aufgrund ihrer Lokalisation an der Grenze zum Blut sind die Zellen des Endothels der Schubspannung des strömenden Blutes ausgesetzt, welche bei einer Erhöhung zu einer gesteigerten Stickstoffmonoxid (NO)-Synthese in den Endothelzellen und somit zur Dilatation führt. Diese flussinduzierte Dilatation führt zu einer weiteren Steigerung der Flussrate in Gefäßabschnitten, die der Mikrozirkulation vorgeschaltet sind, was zu einer Steigerung der Perfusion in der Mikrozirkulation führt, die nur mit einer lokal begrenzten Dilatation nicht möglich wäre. Weiterhin sind Endothelzellen an der Blutgerinnung beteiligt und ermöglichen den Durchtritt der Leukozyten aus der Blutbahn in das umgebende Gewebe.

1.2.2 Glatte Gefäßmuskulatur

Zellen der glatten Gefäßmuskulatur umgeben, quer zur Gefäß-Längsachse liegend, größtenteils mehrschichtig das Endothel. Mit einer Länge von ca. 66µm und einer Breite von ca. 8µm unterscheiden sie sich morphologisch sowohl in ihrer Größe als auch ihrer Ausrichtung von den Endothelzellen. Ebenso wie die quergestreifte Muskulatur reagiert die glatte Muskulatur auf die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit einer Veränderung des Kontraktionszustandes. Im glatten Muskel wird die Actin-Myosin-Wechselwirkung durch die Phosphorylierung des Myosins erreicht. Über das Enzym Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) erfolgt die Phosphorylierung und über die Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) die Dephosphorylierung des Myosins. Im Gegensatz zur MLCP ist die Aktivität der MLCK Ca^{2+} -abhängig, die über den Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex aktiviert wird. Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zur Erhöhung der Aktivität der MLCK und somit zur Kontraktion. In den Zellen der glatten Muskulatur beruht die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hauptsächlich auf der IP_3 -induzierten Freisetzung aus

dem endoplasmatischen Retikulum (sarco-endoplasmic reticulum, SER). Unter ATP-Verbrauch wird das freigesetzte Ca^{2+} über Transporter (SERCA; sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) wieder in das endoplasmatische Retikulum transportiert. Der Aktivitätszustand der MLCP wird unabhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch die Proteinkinase A (PKA) und die Proteinkinase G (PKG) erhöht, wodurch eine Relaxation des glatten Muskels hervorgerufen wird, was als Ca^{2+} -Desensitivierung bezeichnet wird (5). G-Protein vermittelte Signalwege sind in den glatten Gefäßmuskelzellen an der Veränderung des Kontraktionszustandes beteiligt. Sie wirken einerseits über die Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration andererseits über die Regulation der Aktivität der MLCP.

1.3 Angiogenese

An der Neubildung von Blutgefäßen lassen sich Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese unterscheiden (6,7). Als Vaskulogenese wird die Bildung von Kapillaren durch das Aneinanderlagern sogenannter undifferenzierter Vorläuferzellen, der Angioblasten, während der Embryonalentwicklung bezeichnet. Im Gegensatz dazu bezeichnet die Angiogenese die Neubildung von Blutgefäßen aus bereits bestehenden Blutgefäßen. Als weiterer Prozess des Gefäßwachstums ist die Arteriogenese zu nennen, die eine Umstrukturierung und Erweiterung bestehender Blutgefäße (Kapillaren) beschreibt (8). Bei vielen Erkrankungen liegt eine Veränderung der Angiogenese- als auch der Arteriogeneseaktivität vor, was dazu geführt hat, dass diese Prozesse von herausragender Bedeutung für die Therapie solcher Erkrankungen geworden sind.

Im Gegensatz zur Embryonalentwicklung ist die Teilungsaktivität der Endothelzellen im adulten Organismus herabgesetzt und die Angiogenese ist in ihnen hauptsächlich auf die Wundheilung und die Proliferation des Endometriums während des Menstruationszyklus reduziert und sichert so die adäquate Versorgung der Gewebe (9,10). Neben diesen Prozessen ist sie an pathologischen Prozessen wie dem Tumorwachstum beteiligt (11,12). Ohne Anbindung der Tumore an das Herz-Kreislaufsystem können diese auf Grund der Mangelversorgung durch die lange Diffusionsstrecke und der daraus resultierenden Hypoxie im Inneren des Tumors (13) nur bis zu einer Größe von wenigen Millimetern anwachsen. Daher ist die Untersuchung der Angiogenese in der Krebsforschung von bedeutender Rolle (14). So wurden z. B. Angiostatin und Endostatin als Inhibitoren der Angiogenese identifiziert (15,16). Einer der Hauptinduktoren der Angiogenese ist eine Sauerstoffmangelversorgung (Hypoxie) des umgebenden Gewebes (17). Die Angiogenese beruht auf einer komplexen

Interaktion vaskulärer Zellen mit dem sie umgebenden Gewebe. Angrenzende Zellen sezernieren zum Beispiel den Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF: fibroblast growth factor; (18,19)) oder den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF: vascular endothelial growth factor (19,20)), welche die Angiogenese in den Endothelzellen über endothelzell-spezifische Tyrosin-Kinase Rezeptoren induzieren. FGF liegt human in 22 verschiedenen Isoformen vor, von denen hauptsächlich der FGF-2, oftmals auch als bFGF (basic fibroblast growth factor) bezeichnet, Angiogeneseaktivität aufweist. Sowohl VEGF als auch FGF-2 steigern die Expression der NO-Synthase und induzieren durch die Erhöhung der NO-Konzentration die Angiogenese. Beginnend mit dem proteolytischen Abbau (z.B. Metalloproteinasen; MMP) der extrazellulären Matrix durch die Zellen des Endothels, beginnen diese, ebenso wie Perizyten und glatte Gefäßmuskelzellen, zu proliferieren und in das Gewebe zu migrieren. Daraufhin erfolgt während der Morphogenese die Ausbildung des Gefäßlumens.

1.4 Lokale Regulation des Muskeltonus durch das Endothel

Furchgott und Zawadzki zeigten bereits im Jahre 1982 die Beteiligung des Endothels an der Regulation des Gefäßtonus in Arterien, die sie aus Kaninchen isoliert hatten (21). Seitdem wurde die Beteiligung des Endothels an der Regulation des Kontraktionszustandes des glatten Gefäßmuskels an weiteren Arterien verschiedener Spezies, inklusive des Menschen, nachgewiesen. Diese lokale Kontrolle des Tonus beruht auf der endothelialen Synthese und Freisetzung vasoaktiver Substanzen, die als Autakoide bezeichnet werden. Neben diesen Autakoiden könnten auch direkte heterozelluläre Kontakte an der Regulation des Kontraktionszustandes beteiligt sein, die eine elektrotonische Ausbreitung von Membranpotentialänderungen ermöglichen (22,23). Die Mediatoren, die zur Relaxation des glatten Muskels führen und auf die nachfolgend näher eingegangen wird, sind Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandine (PGI_2) und der endothelabhängige hyperpolarisierende Faktor (EDHF), deren Relevanz sich in Abhängigkeit von der Gefäßgröße (24-29) verändert.

1.4.1 Stickstoffmonoxid (NO)

Als ein Mediator endothelabhängiger Dilatationen wurde Stickstoffmonoxid identifiziert (21,30). Grundlage der NO-Freisetzung ist eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration im Endothel, die zu einer Aktivitätssteigerung der konstitutiv exprimierten endothelialen NO-Synthase (eNOS) führt. Diese setzt aus der Aminosäure L-Arginin unter

Abspaltung von L-Citrullin NO frei (31). Als weitere NO-Synthase ist die induzierbare NO-Synthase (iNOS) zu nennen, die bei Entzündungsreaktionen auch im Endothel aktiviert wird. NO kann frei durch die Zellmembranen in die Zellen der glatten Gefäßmuskulatur diffundieren. In diesen steigert sie die Aktivität der löslichen Guanylatzyklase, welche die Bildung zyklischen Guanosin-monophosphats (cGMP) aus Guanosin-Triphosphat (GTP) katalysiert. Die Erhöhung der cGMP-Konzentration führt zur Steigerung der Aktivität der Proteinkinase G, welche wiederum die Aktivität der MLCP erhöht, wodurch es zur Dilatation kommt. Weiterhin führt die Aktivierung der Proteinkinase G zur Absenkung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, was zusätzlich die Aktivität der MLCK herabsetzt.

1.4.2 Prostaglandin I₂ (PGI₂)

Der erste Schritt der Freisetzung des Prostaglandin I₂ (PGI₂) (32) ist die Abspaltung von Arachidonsäure aus Phospholipiden der Zellmembran durch die membranständige Phospholipase A₂ (33) im Endothel. Arachidonsäure steht anschließend der Cyclooxygenase (Cox) als Substrat zur Verfügung. Derzeit sind zwei Isoformen der Cyclooxygenase, die Cox-1 und Cox-2, bekannt. Cox-1 wird in Endothelzellen konstitutiv exprimiert. Cox-2 ist induzierbar und hauptsächlich bei Entzündungsreaktionen beteiligt. Als Reaktionsprodukt der Cyclooxygenasen entsteht Prostaglandin H welches die Vorstufe der Eicosanoide, der biologisch wirksamen Metabolite der Arachidonsäure, darstellt. Substanzen der Gruppe der Eicosanoide verfügen über verschiedene Eigenschaften. So wirkt das in Thrombozyten gebildete Thromboxan A₂ vasokonstriktorisches und das in Endothelzellen gebildete Prostacyclin (Prostaglandin I₂, PGI₂) vasodilatatorisch. PGI₂-induzierte Dilatationen beruhen auf der rezeptor-vermittelten und G-Protein gekoppelten Aktivierung der glattmuskulären Adenylatzyklase welche zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt. Diese Erhöhung der cAMP-Konzentration führt wiederum zur Aktivierung der Proteinkinase A. Neben dem Absinken der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt die Steigerung der Aktivität der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase zur Dilatation.

1.4.3 EDHF

Bereits in den Jahren ab 1982 deuteten die ersten Ergebnisse darauf hin, dass es neben NO und PGI₂ einen weiteren Mechanismus endothelabhängiger Dilatationen geben muss (34). Charakteristisch für EDHF-medierte Dilatationen (25,35) sind die endothelabhängige Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur und die Unabhängigkeit von den Mediatoren NO und PGI₂ (36,37). Die Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen führt zu einer Verminderung der Leitfähigkeit spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und somit zu einer

Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Da EDHF einen dilatatorischen Mechanismus und nicht einen genau spezifizierten Faktor bezeichnet, wird nachfolgend von EDHF-Typ Dilatationen gesprochen. Als mögliche Mediatoren EDHF-vermittelter Dilatationen gelten K^+ -Ionen (38), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (39), EETs (40-43) und das C-Typ natriuretische Peptid (CNP) (44,45). Während K^+ , H_2O_2 und EETs allgemein als EDHF akzeptiert sind, ist das CNP als möglicher EDHF Gegenstand kontroverser Diskussionen (46-48). Zusätzlich zu den diffundierenden Faktoren können EDHF-Typ Dilatationen auch auf einer Ladungsverschiebung über direkte heterozelluläre Zellverbindungen beruhen, die von Connexinen gebildet werden (49-54). Über diese Connexine sind das Endothel und die glatte Muskulatur elektrisch gekoppelt und eine Agonisten-vermittelte Hyperpolarisation des Endothels kann sich direkt auf die Zellen der glatten Gefäßmuskulatur ausbreiten. Die Agonisten-vermittelte Hyperpolarisation des Endothels wiederum basiert auf der Veränderung der Leitfähigkeit Calcium-abhängiger K^+ -Kanäle in der Membran der Endothelzellen. Nachfolgend wird näher auf Ca^{2+} -abhängige- K^+ -Kanäle und Connexine eingegangen.

1.4.3.1 K^+ -Kanäle im vaskulären System

Grundlegend für die Aufrechterhaltung des intrazellulären Milieus einer Zelle ist die Zellmembran, die für Ionen nahezu undurchlässig ist. In ihr ist die elektrogene Na^+ - K^+ -ATPase lokalisiert, durch deren Aktivität die intrazelluläre K^+ -Konzentration (Myozyt: 140 mM) im Vergleich zum Extrazellularraum (4 mM) erhöht wird. Dabei sinkt die intrazelluläre Na^+ -Konzentration (10 mM) unter den Wert des Extrazellularraumes (140 mM). Da die Na^+ - K^+ -ATPase je drei Na^+ und zwei K^+ -Ionen transportiert und negative Ladungen in der Zelle verbleiben, bildet sich ein negatives elektrisches Potenzial, das Membranpotenzial, aus. Allerdings ist der Beitrag dieses ungleichen Transports von Ladungen zum tatsächlich gemessenen Potenzial mit wenigen mV gering. Die Hauptaufgabe der Na^+ - K^+ -ATPase besteht darin, den Konzentrationsgradienten der K^+ -Ionen aufrecht zu erhalten. Da die Leitfähigkeit der Membran für K^+ durch das Vorhandensein von geöffneten K^+ -Kanälen sehr hoch ist, strömt K^+ aus den Zellen. Durch diesen K^+ -Ausstrom und Verhinderung des Ladungsausgleichs sinkt das Membranpotenzial theoretisch bis zum Erreichen des K^+ -Gleichgewichtspotenzials, welches sich durch die Nernst-Gleichung berechnen lässt. Das Gleichgewichtspotenzial ist die Spannung, bei der trotz eines Konzentrationsgradienten keine Ionen mehr fließen. Für K^+ liegt es für die angegebenen K^+ -Konzentrationen bei -94 mV. Allerdings wird dieser theoretische Wert nicht erreicht, da zum Beispiel die Selektivität der K^+ -Kanäle nicht absolut ist und auf diesem Wege Na^+ -Ionen in die Zelle gelangen und somit

das Potenzial verringern. Somit beruht das Ruhemembranpotenzial auf den Konzentrationsgradienten der verschiedenen Ionen sowie auf der Leitfähigkeit der Membran für diese Ionen, die durch Kanalproteine bestimmt wird. Durch diese Kanäle strömen die Ionen unter Verlust ihrer Hydrathülle (55,56). Die Veränderung der Leitfähigkeit für verschiedene Ionen verändert das Potenzial der Zelle. Diffundieren verstärkt Na^+ -Ionen in die Zelle, führt dies zu einer Depolarisation. Im Gegensatz dazu führt ein verstärkter K^+ -Ausstrom zu einer Hyperpolarisation. Diese Veränderung des elektrischen Potenzials wiederum verändert die Aktivität zellulärer Mechanismen. In Endothelzellen variiert das Membranpotenzial zwischen -30 und -68 mV. Unabhängig von dem letztendlich freigesetzten Faktor besteht der initiale Schritt endothelvermittelter Dilatationen in der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in den Zellen des Endothels. Dieser $[\text{Ca}^{2+}]$ -Anstieg führt zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle und somit zur Hyperpolarisation der Endothelzellen. Die Gruppe Ca^{2+} -abhängiger Kanäle ist in drei Gruppen unterteilt, deren Gemeinsamkeit darin besteht, dass jeder Kanal aus vier porenbildenden Untereinheiten besteht (57). Anhand ihrer Leitfähigkeiten werden sie in Kanäle geringer (SK; $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$) (58), mittlerer (IK; $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$) (59) und großer (BK) Leitfähigkeit unterteilt. SK und IK werden in Endothelzellen exprimiert, wohingegen BK in der glatten Muskulatur vorzufinden sind. Die Relevanz der SK und IK bei EDHF-medierte Dilatationen konnte bereits an verschiedenen Arterien nachgewiesen werden (60-62).

1.4.3.2 Connexine

Direkte homo- oder heterozelluläre Zellkontakte werden über Connexine vermittelt. Diese stellen eine Gruppe von Proteinen dar, die über vier transmembranäre Domänen verfügen (Abb. 1, C). Ein Hexamer aus Connexinen bildet einen Halbkanal (Connexon, Abb. 1, B), durch den Moleküle bis zu 1kDa, somit auch Ionen und Signalmoleküle wie Inositoltriphosphat (IP_3) und zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP), diffundieren können (63). Lagern sich Halbkanäle benachbarter Zellen aneinander, bilden diese eine cytoplasmatische Verbindung, die den direkten Stoff- und Ladungstransfer ermöglicht (Abb. 1, A). Dadurch wird der Widerstand zwischen den gekoppelten Zellen stark herabgesetzt und Ladungsänderungen können sich elektrotonisch und somit ohne große zeitliche Verzögerung ausbreiten. In nahezu allen Geweben ist eine zellspezifische Expression verschiedener Connexine nachweisbar. So werden in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur hauptsächlich Connexin43 und Connexin45 exprimiert, wohingegen die Expression von Connexin37 und Connexin40 in Zellen des Endothels überwiegt.

In Blutgefäßen ermöglichen Connexine die schnelle und koordinierte Regulation des Gefäßverhaltens. Homozelluläre Gap Junctions im Endothel (64) und der glatten Gefäßmuskulatur stellen Informationswege dar, über die sich Signale entlang der Gefäße ausbreiten können. Als weiterer Informationsweg ist die myoendotheliale Kopplung zu nennen, die eine heterozelluläre Verbindung des Endothels mit der glatten Gefäßmuskulatur darstellt (50,65).

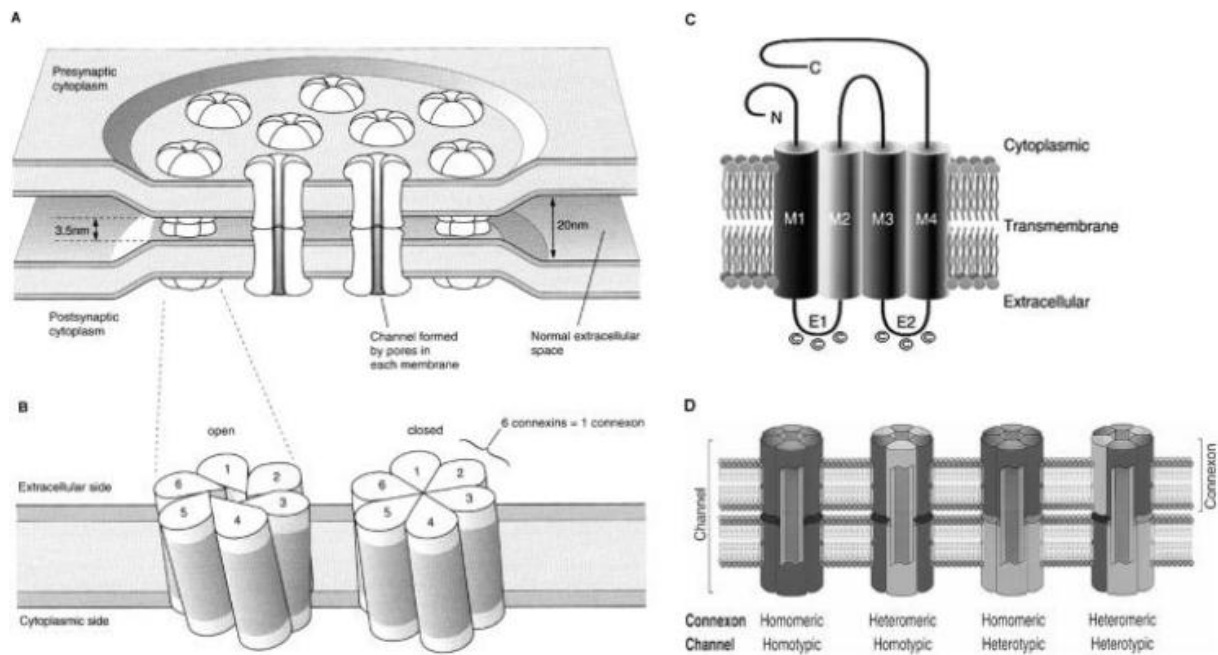


Abb. 1: Aufbau interzellulärer Verbindungen (Gap junctions)

Anreicherung von Connexinen in Plaques (A). Jeder Halbkanal besteht aus sechs Untereinheiten (B). Jede Untereinheit besteht aus vier membrandurchspannenden Domänen (C). Hetero- und homomere Kanäle können ausgebildet sein (D). (aus Willecke, K., et al., 2002, Biol Chem 383, 725-737)

1.4.3.3 Zusammenspiel von Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen und Connexinen

Aus den bisherigen Ausführungen ergibt sich die Frage, welche Mediatoren an endothelvermittelten Dilatationen in Leitungsgefäßen und kleinen Arterien in Mäusen relevant sind und worauf eine mögliche EDHF-mediierte Dilatation beruht. Sind Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle erforderlich und kann es sich beim EDHF auch um eine Ladungsänderung handeln, die sich über heterozelluläre Kopplung vom Endothel auf den glatten Muskel ohne einen extrazellulären mediiierenden Faktor ausbreitet (Abb. 2)?

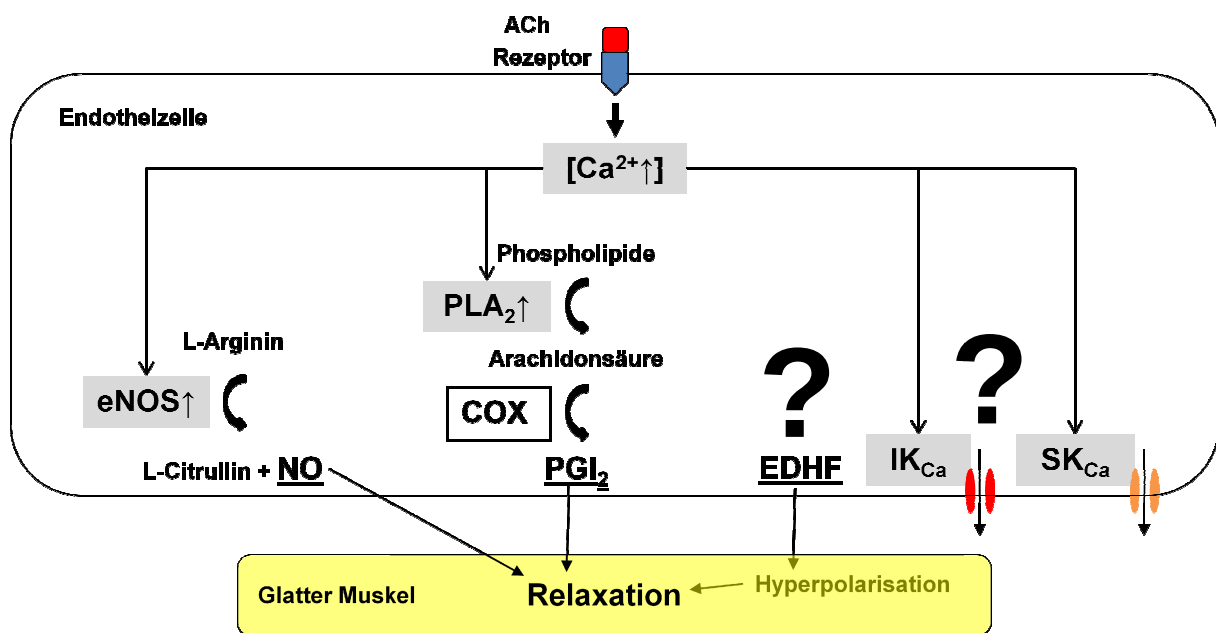


Abb. 2: Endothelvermittelte Dilatation

Die Bindung von ACh an Rezeptoren der Endothelzelle führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und im weiteren Verlauf zur Freisetzung endothelialer Autakoide (NO, PGI₂, EDHF). Diese führen zu einer Relaxation der umgebenden glatten Muskulatur. EDHF induziert die Hyperpolarisation der glatten Muskulatur. Möglicherweise wird diese Hyperpolarisation über Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle im Endothel hervorgerufen und statt über einen Faktor über Gap Junctions in die glatte Muskulatur übertragen.

1.5 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit soll untersucht werden, die / der

- Rolle von Connexin40 bei der Angiogenese.
 - Dazu muss eine Methode zur ex vivo Untersuchung etabliert werden. In diesem Zusammenhang soll eine Software für die Datenaufbereitung und Erfassung implementiert werden.
- Beitrag von EDHF in verschiedenen Gefäßtypen bei endothelabhängigen Dilatationen
- Relevanz endothelialer Kaliumkanäle bei der Freisetzung der endothelialen Mediatoren Stickstoffmonoxid und EDHF
- kompensatorischen Effekte von NO/PGI₂ und EDHF in Widerstandsgefäßen
- Rolle des Connexin40 und dessen Beitrag bei der myoendothelialen Kopplung *in vitro* und *in vivo*

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Genehmigt wurden die Versuche von dem Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Landwirtschaft des Landes Schleswig-Holstein (21/A24/05, 21/1i/06, interne Tierversuchsnummer). In Übereinstimmung mit den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes wurden die Versuche an weiblichen und männlichen Mäusen durchgeführt, die in der Tierhaltung der Universität zu Lübeck gezüchtet und gehalten wurden. Bis zu sechs Tiere waren in einem Typ 2 Makrolonkäfig untergebracht und hatten freien Zugang zu Standardfutter und Wasser.

2.1.2 Mikropipetten

Mikropipetten für die Verwendung im Druckmyographen und die Immunmarkierung wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Durchmesser: außen 1 mm, innen 0.58 mm; Länge 100 mm (Science Products GmbH, Hofheim) mit einem Mikropipettenpuller (Model P-20 Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) mit folgendem Programm hergestellt:

Haltepipetten	
Heat	308
Pull	150
Velocity	120
Time	150

Anschließend wurden die ausgezogenen Kapillaren mit einem Feuerzeug erhitzt und in die benötigte Form gebracht. Weiterhin wurde das unbearbeitete scharfkantige Ende kurz erhitzt, um es abzurunden und damit ein Beschädigen der anzuschließenden Schläuche zu minimieren.

2.1.3 Lösungen

2.1.3.1 Physiologische Kochsalz-Lösung (PSS)

Für die Untersuchung der Gefäßantworten *in vitro* und *in vivo* wurde eine 25-fach konzentrierte physiologische Kochsalzlösung (PSS) bereitgestellt.

Lösung 1:			
Chemikalie	Konzentration [mMol/L]	Menge [g/L]	
NaCl	118.99	173.850	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
KCl	4.69	8.750	Sigma-Aldrich, Steinheim
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.50	9.200	Merck, Darmstadt

Lösung 2:			
Chemikalie	Konzentration [mMol/L]	Menge [g/L]	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.17	7.225	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	1.18	4.025	Merck, Darmstadt

Lösung 3:			
Chemikalie	Konzentration [mMol/L]	Menge [g/L]	
EDTA	0.03	0.250	Merck, Darmstadt

Für die Herstellung der 25x Stammlösung wurden die Chemikalien für ein Endvolumen von 500 mL abgewogen und in destilliertem Wasser gelöst (Lösung 1: 400 mL; Lösung 2,3: je 35 mL, Lösung 3 wurde etwas erwärmt), zusammengeführt, auf ein Endvolumen von 500 mL verdünnt, sterilfiltriert (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht), zu je 50 mL in Reagenzgefäßen (Sarstedt) aliquotiert und bei 4°C gelagert.

Zu Beginn der Versuche wurden 500 mL Gebrauchslösung (1x PSS) (20 mL 25x PSS auf 500 mL aq. bidest) bereitgestellt, der zusätzlich NaHCO₃ (Endkonzentration 25 mMol/L, Sigma-Aldrich, Steinheim) und Glucose (Endkonzentration 5.50 mMol/L, Sigma-Aldrich) zugefügt wurden. Nachfolgend wurde die 1x PSS 30 min mit Carbogen begast und anschließend im Wasserbad bei 37°C gelagert. Für die Hemmung der NO-Synthase und der Cyclooxygenase wurde eine weitere 1x PSS angesetzt, in der zusätzlich noch Indomethacin (Endkonzentration: 3 µMol/L, Promedica Gruppo Chiesi, Parma, Italien) und L-Nitro-Arginin (66) (Endkonzentration: 300 µMol/L, Sigma-Aldrich) gelöst waren.

2.1.3.2 Calciumfreie KREBS Lösung

Für die Bestimmung des Maximaldurchmessers wurde calciumfreie KREBS Lösung verwendet.

Chemikalie	Konzentration [mMol/L]	
NaCl	120.8	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
KCl	3.8	Sigma-Aldrich, Steinheim
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.2	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	20.0	Sigma-Aldrich, Steinheim
KH ₂ PO ₄	1.2	Merck, Darmstadt

2.1.3.3 Narkose

Initial wurden die Tiere mittels intraperitonealer Verabreichung von in Ringer (147 mMol/L Na⁺; 4.0 mMol/L K⁺; 2.2 mMol/L Ca²⁺; 156 mMol/L Cl⁻) gelöstem Fentanyl (0.1 mg/kg), Medetomidin (1 mg/kg) und Midazolam (10 mg/kg) betäubt. Während der Präparation die zusätzliche Gabe von Narkose erforderlich, wurde diese ebenfalls intraperitoneal appliziert. Nach Beendigung der notwendigen Präparationsschritte wurden die Tiere mittels Genickbruch oder der Applikation von Pentobarbital getötet.

2.1.3.4 LAIRD-Puffer für die Isolierung genomischer DNA

Chemikalie	Konzentration [mMol/L]	% [v/v]	
Tris-HCl, pH 8.3	100		Biomol GmbH, Hamburg
EDTA	5		Merck, Darmstadt
NaCl	200		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
20% SDS		0.2	Serva GmbH, Heidelberg

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung genomischer DNA

Kurze Abschnitte (<5 mm) der Schwanzspitzen der Versuchstiere wurden für die Isolierung der genomischen DNA entnommen. Die Proben wurden bei 55°C in LAIRD-Puffer und Proteinase K (0.2 mg/ml, Sigma-Aldrich) 24 Stunden enzymatisch verdaut. Anschließend folgten die Inaktivierung der Proteinase K durch Erwärmen auf 95°C für 20 min und die Fällung der DNA mit eiskaltem Isopropanol während der Zentrifugation (Microzentrifuge MC-13, Amicon, Witten) mit 13000 U/min. Nachfolgend wurden die Überstände verworfen und die DNA-Pellets in einem weiteren Schritt mit Ethanol (70% v/v) gewaschen und zentrifugiert. Nachdem die Überstände verworfen und die Pellets getrocknet waren, wurden diese in TE-Puffer (1 mol/L Tris (pH 8), Biomol GmbH, Hamburg, 0.25 mol/L EDTA, Merck, Darmstadt) gelöst und bei -20°C gelagert.

2.2.2 Genotypisierung der Versuchstiere

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden die Genotypen der Mäuse bestimmt. Die Methode basiert auf der gezielten Amplifikation eines DNA-Bereichs mittels thermostabiler DNA-Polymerasen (Taq-Polymerase (67); Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*, Invitrogen GmbH, Darmstadt) und sequenzspezifischer Primer. Nach Durchführung der PCR wurden die synthetisierten DNA-Fragmente im Agarose-Gel nachgewiesen (1% (w/v) Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf), 0.004% (v/v) Ethidiumbromid (Invitrogen); in TBE Puffer (89 mmol/L Tris, 89 mmol/L Borsäure, 2 mmol/L EDTA; in aq. bidest). Gleichzeitig wurde ein DNA-Marker (100 bp DNA Ladder, Invitrogen) für die Bestimmung der Größe der PCR-Produkte mit aufgetragen. Die verwendeten Primer (Tabelle 1, MWG Biotech AG, Ebersberg) und PCR-Programme (Tabelle 2) sind nachfolgend aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete PCR-Primer

Auflistung der verwendeten PCR-Primer

Genotyp	Primer	DNA-Fragmentgröße [bp]
Cx40:	-/- Primer 5'- GGA TCG GCC ATT GAA CAA GAT GGA TTG CAC -3' 5'- CTG ATG CTC TTC GTC CAG ATC ATC CTG ATC G -3' Wt- Primer 5'- GGG AGA TGA GCA GGC CGA CTT CCG GTG CG -3' 5'- GTA GGG TGC CCT GGA GGA CAA TCT TCC C -3'	494 -/- 314 Wt
Cx40KI45:	Primer 1 5'- AGG CAG GCT CAT GTG GAG CT -3' Primer 2 5'- AGG CTG AAT GGT ATC GCA CC -3' Primer 3 5'- TTCTTC CAG AGC CCG GTG CTG -3'	475 Wt P1 + P2 660 KI P1 + P3
eNOS:	-/- Primer 5'- CCA ATG ACA AGA CGC TGG G -3' 5'- GCG CAA TGT GAG TCC GAA A -3' Wt- Primer 5'- ACA AGT CCT CAC CAC CTT TTC -3' 5'- ACA TCG CCG CAG ACA AAC A -3'	376 -/- 261 Wt
IK _{ca}	Primer 1 5'- CTT TGG ATC CAG ATG TTT CTT GGT GTT AAG -3' Primer 2 5'- GCC ACA GTG TGT CTG TGA GG -3' Primer 3 5'- CGT GCA ATC CAT CTT GTT CA -3'	320 -/- 160 Wt
TIE2	TIE2for 5'- CGC ATA ACC AGT GAA ACA GCA TTG C-3' TIE2rev 5'- CCC TGT GCT CAG ACA GAA ATG AGA -3'	550 TIE2
Cx40 ^{fL}	Cxflox1for 5'- GTG ACA TGA CCT GGA TCT CTG GAG -3' Cxflox1rev 5'- GGC CAT CCT CTG CTA CAT ATG CAG -3' Cxflox2for 5'- CAA TAT CTT CCT ATG TCC TCA TG -3' Cxflox2rev 5'- GGT ACT GGT TAG TTC ACA TTG TT -3'	450 Wt 550 floxed

Tabelle 2: PCR-Programme

Aufgeführt sind die PCR-Programme für die Genotypisierung der verwendeten Mäuse

Cx40^{fl}:

Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [Sekunden]
PCR 1		
1	94	120
5	94	150
	65	30
	72	60
30	94	20
	66	30
	72	60
	72	300

PCR 2

1	94	120
5	94	150
	62	30
	72	60
30	94	20
	64	30
	72	60
	72	300

IK_{Ca}:

Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [Sekunden]
1	94	180
10	94	35
	58	35
	72	60
25	94	35*
	58	35*
	72	50*
1	72	600

*: +5 Sek. Pro Zyklus

Cx40:

Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [Sekunden]
1	94	120
38	94	40
	65	60
	72	60
1	72	420

Cx40KI45:

Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [Sekunden]
1	94	150
38	94	40
	68	30
	72	40
1	72	420

eNOS:

Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [Sekunden]
1	94	60
36	94	30
	55	60
	72	60
1	72	600

TIE2:

Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [Sekunden]
1	94	60
35	94	60
	60	90
	72	120
1	72	420

2.2.3 Präparation von Leitungsgefäßen und kleinen Arterien für *in vitro* Untersuchungen

Alle Präparationsschritte, die in unmittelbarer Nähe zu den Gefäßen durchgeführt werden mussten, wurden unter einem Operationsmikroskop (Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg) mit feinen Pinzetten und einer Gefäßschere (Fine Science Tools, Heidelberg) durchgeführt. Weiterhin wurde versucht, jegliche Berührung des zu isolierenden Gefäßes zu vermeiden. Die Versuchstiere wurden über interperitoneale Gabe des Narkosemittels narkotisiert. Nach Erreichung des Toleranzstadium wurden die Haare an den Körperstellen entfernt, die für die

Präparation zugänglich sein mussten und die Tiere durch Genickbruch getötet. Sofern nicht anders angegeben, wurden isolierte oder freigelegte Gewebe mit PSS vor dem Austrocknen bewahrt.

2.2.3.1 Leitungsgefäße (Aorta)

Vorbereitend wurden Kulturmedien und eine Petrischale mit DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen GmbH, Darmstadt) bereitgestellt und die benötigte Menge Matrigel (BD Bioscience, Heidelberg) auf Eis aufgetaut. Pipettenspitzen für das Pipettieren des Matrigels wurden bei -20°C gelagert und erst kurz vor dessen Applikation bereitgestellt. Kulturplatten (4-well, Nunc, Dänemark) wurden mit runden Deckgläschen versehen.

Die toten Tiere wurden auf einer Präparationsplatte auf der rechten Körperseite liegend fixiert. Der Thorax wurde mit einer stabilen Schere entlang der Wirbelsäule von caudal nach cranial und entlang des unteren Rippenbogens in Richtung der Sternums eröffnet und in Richtung der Vorderextremitäten aufgespannt. Mit einer Gefäßschere und einer Pinzette wurde die Aorta vorsichtig vom umgebenden Gewebe befreit, entnommen und in eine Petrischale mit DMEM überführt.



Abb. 3: Isolierung der Aorta

Der Thorax wurde auf der linken Körperseite entlang der Wirbelsäule eröffnet und in Richtung der Vorderbeine aufgespannt. Anschließend wurde die Aorta vorsichtig entnommen.

2.2.3.2 A. mesenterialis

Das Abdomen der getöteten Tiere wurde entlang der Körpermitte eröffnet und der Dünndarm vorsichtig freigelegt. Mit zwei Fäden wurde ein mehrere Zentimeter langer Abschnitt des Dünndarms abgebunden, zusammen mit dem Mesenterium entnommen und in eine PSS-gefüllte Petrischale überführt und mit mehreren Insektennadeln auf einem Silikonpfropf

fixiert. Mit einer Gefäßschere und einer feinen Pinzette wurden die Mesenterialgefäße freigelegt, entnommen und in PSS auf Eis gelagert.

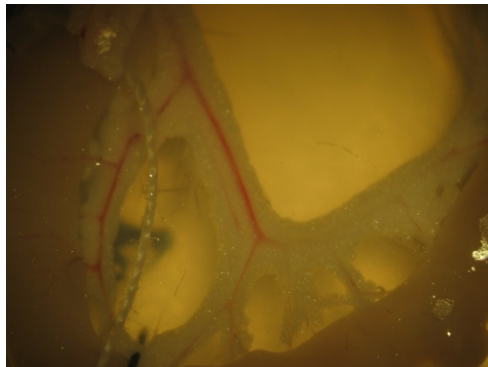


Abb. 4: Dünndarm und Mesenterium

Der entnommene Dünndarm mit dem Mesenterium wurde in eine mit PSS gefüllte Petrischale überführt. Deutlich sichtbar sind die Venen und, undeutlicher, die parallel zu den Venen verlaufenden Arterien, die vorsichtig entfernt wurden.

2.2.3.3 A. femoralis

Die toten Mäuse wurden auf dem Rücken liegend auf einer Präparationsplatte mit Klebestreifen so fixiert, dass die Innenseiten der hinteren Extremitäten frei zugänglich waren. Im Bereich der A. femoralis wurde die Haut großflächig entfernt und der freigelegte Bereich umgehend mit PSS benetzt. Mit feinen Pinzetten und einer Gefäßschere wurden die A. femoralis vorsichtig freigelegt und zuerst stromabwärts und anschließend stromaufwärts mit chirurgischem Faden (11.0 Ethilon, Ethicon, Hamburg) abgebunden. Der Gefäßabschnitt zwischen den Fäden wurde entnommen, in PSS überführt und auf Eis gelagert. Für die Entnahme erwies es sich als zweckmäßig, distal zu beginnen, da eventuell austretendes Blut nicht unmittelbar in den Sichtbereich gerät.

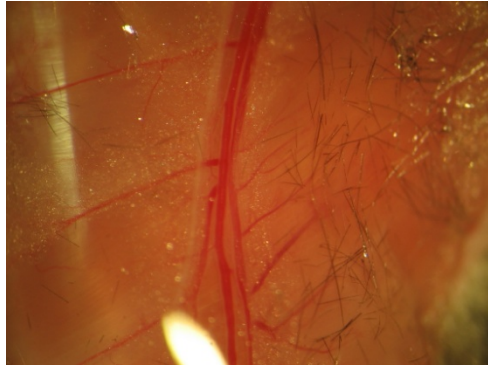


Abb. 5: A. femoralis

Freigelegter Bereich der hinteren Extremität mit A. femoralis, die mit der parallel laufenden Vene zu erkennen ist.

2.2.3.4 Kleine Arterien (*A. gracilis*)

Das getötete Tier wurde in Rückenlage auf einer Präparationsplatte fixiert. Die Haut wurde im Bereich des Musculus gracilis großflächig entfernt und die Muskulatur um die A. gracilis in großem Abstand zur A. gracilis freigelegt, entnommen und in PSS überführt. Das entnommene Gewebe wurde mit der Innenseite nach unten mit zwei Insektennadeln auf dem Silikon befestigt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das Gewebe nicht durch die Positionierung der Nadeln gespannt wurde. Weiterhin wurden die Nadeln nur durch den unteren Bereich des isolierten Gewebes geführt. Die zu isolierenden Gefäße befinden sich zwischen der oberen und der unteren Gewebsschicht. Die obere Gewebsschicht wurde mit Hilfe einer Gefäßschere vorsichtig entfernt und das Gefäß freigelegt. Abschließend wurden die Gefäße an einem Ende gegriffen und mit der feinen Gefäßschere vorsichtig vom Muskel getrennt und in PSS überführt.

2.2.4 Untersuchung der Angiogenese *in vitro*

Unter dem Operationsmikroskop wurde von isolierten Aorten weiteres umgebendes Gewebe entfernt. Eine mit einem ausgezogenen Katheter versehene und mit DMEM gefüllte Spritze wurde verwendet, um vorsichtig in dem jeweiligen Gefäß verbliebenes Blut auszuspielen. Hierfür wurde der Katheter ein kleines Stück in die Aorta eingeführt. Mit einem Skalpell wurden die Enden der Aorta, die während der Präparation mit der Pinzette oder dem Katheter berührt wurden, entfernt und verworfen. Die isolierten, gespülten und vom umliegenden Gewebe befreiten Aorten wurden in ca. 1 mm hohe Ringe geschnitten. Diese wurden mit einer feinen Pinzette auf die Deckgläschen in den Kulturschalen gelegt, wobei je ein Ring in eine Probenkammer verbracht wurde. Die Ringe wurden dann unter der Sterilbank mit Matrigel (20 µL) überschichtet und dieses bei 37°C für 30 min verfestigt. Nach Zugabe von

300 μ L Kulturmedium wurden die Präparate bei 37°C inkubiert. An den Tagen 3 bis 7 wurden Bilder der Präparate am Mikroskop aufgenommen, die mit dem selbstentwickelten Programm AQuaL verarbeitet und ausgewertet wurden. Die abschließende statistische Auswertung der ermittelten Messwerte erfolgte mit der Statistiksoftware Stata (StataCorp LP, College Station, Texas, USA).

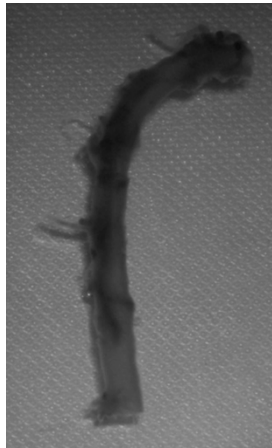


Abb. 6: Isolierte und gereinigte Aorta

Die isolierte Aorta wurde vom umgebenden Gewebe befreit und vorsichtig gespült.

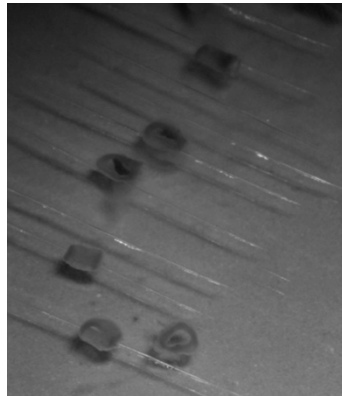


Abb. 7: Aortenringe

Mit einem Skalpell wurde die Aorta in ca. 1mm hohe Ringe geschnitten

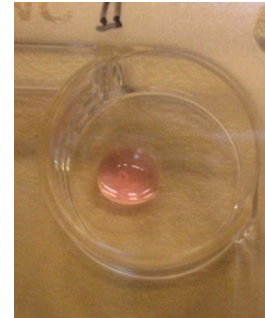


Abb. 8: In Matrigel eingebetteter Aortenring

Diese Ringe wurden in Kulturschalen überführt und mit Matrigel überschichtet. Nach der anschließenden Aushärtung des Matrigels wurde DMEM hinzugegeben.

2.2.5 Untersuchung von Gefäßantworten

2.2.5.1 Gefäßantworten unter isometrischen Bedingungen

Es wurde eine Methode zur isometrischen Untersuchung der Gefäßantworten isolierter Leitungsgefäße (A. femoralis, A. mesenterialis) und kleiner Arterien (A. gracilis) verschiedener Genotypen in einem Drahtmyographen (Wire-Myograph 510A, DMT, Dänemark) etabliert. Dieser verfügt über zwei Einrichtungen für die Aufnahme von Gefäßen mit einer Länge von maximal 2 mm. Grundlage des Verfahrens der isometrischen Gefäßuntersuchung ist die Messung der Kraft, die von einem Gefäß auf zwei Drähte ausgeübt wird, die durch dessen Lumen gespannt sind (Abb. 9, S.24). Für die Leitungsgefäße wurde ein Stahldraht mit 40 μ m und für die kleinen Arterien ein Wolframdraht mit 25 μ m Durchmesser verwendet.

Die isolierten Gefäße wurden mit Hilfe eines Operationsmikroskops in den Myographen gespannt. Zunächst wurde die Probenkammer des Drahtmyographen mit 15 mL PSS gefüllt und die Kraftaufnehmer zurückgesetzt (reset-Funktion der Steuereinheit des Myographen) um die Halterungen automatisch in die Position zu verschieben, in der sie einander berühren. Dies

definiert den Nullpunkt und dient der Bestimmung der Drahtabstände durch die Steuereinheit. Um ein Gefäß einzuspannen, wurde ein ca. 2 cm langes Drahtstück zwischen die Halterungen geklemmt und mit einer der Sicherungsschrauben befestigt. Das isolierten Gefäß wurde vorsichtig in die Probenkammer überführt und eines seiner Enden vorsichtig mit zwei Pinzetten auseinandergezogen und auf den Draht gezogen und im Bereich der Halterung platziert. Anschließend wurde das freie Ende des Drahtes mit der Sicherungsschraube befestigt. Die Halterungen wurden wieder auseinanderbewegt und ein zweiter Draht vorsichtig durch das Gefäß geführt, der in der gegenüberliegenden Halterung befestigt wurde. Waren beide Drähte befestigt, wurden die Halterungen soweit auseinanderbewegt, dass der Abstand der Halterungen dem doppelten Durchmesser der Drähte entsprach. Mit Hilfe eines Okularmikrometers wurde die Länge des aufgespannten Gefäßes gemessen. Abschließend wurde die Pufferlösung gewechselt, die Temperatur auf 37°C eingestellt und die Probenkammer mit Carbogen (5% CO₂, Rest O₂) begast. Nach einer Aufwärmphase von 30 min wurden die gemessenen Kraftwerte auf 0 gesetzt und es erfolgte die Vorspannung der Gefäße.

Durch die Normalisation (Vorspannung) wird die Reaktionsfähigkeit des Gefäßes durch Vorgabe eines erwünschten transmuralen Druckes optimiert (68). Das prinzipielle Vorgehen für die Normalisierung wird nachfolgend näher beschrieben. Initial übt das Gefäß keine Kraft auf die Drähte aus. Der Abstand der Drähte wird schrittweise bis zu einer Zunahme der Kraft um jeweils 2 mN bei Leitungsgefäßen und 0.5 mN bei kleinen Arterien erhöht (Abb. 10). Nach jeder schnellen Auseinanderbewegung der Drähte folgt eine Wartezeit von 60 s in deren Verlauf die ausgeübte Kraft abnimmt. Dieses ist vor allem durch die elastischen Fasern der Gefäße zu erklären. Aus der gemessenen Kraft, die der Wandspannung entspricht, der Gefäßlänge und dem Abstand der Drähte wird der transmurale Druck berechnet. Ist dieser Wert größer als der vorher gewählte, wird auf Grundlage des gemessenen Durchmessers, der Gefäßlänge und der gemessenen Spannung der normalisierte Durchmesser errechnet und eingestellt. Hierbei wird der Abstand der Drähte so eingestellt und nachfolgend konstant gehalten, dass der Gefäßdurchmesser 90% des Gefäßdurchmessers des zuvor eingestellten transmuralen Drucks entspricht. Dieser Schritt ist erforderlich, um die maximale Kontraktionsfähigkeit der Gefäße zu ermöglichen und um standardisierte Bedingungen für die Untersuchungen zu schaffen. Grundlage dieses Verfahrens ist das Gesetz von Laplace, welches besagt, dass die Wandspannung proportional dem Produkt aus Druckdifferenz und Gefäßradius ist. Für die Normalisation wurde die Möglichkeit genutzt, dass die Steuereinheit des Drahtmyographen diese automatisch durchführen kann.

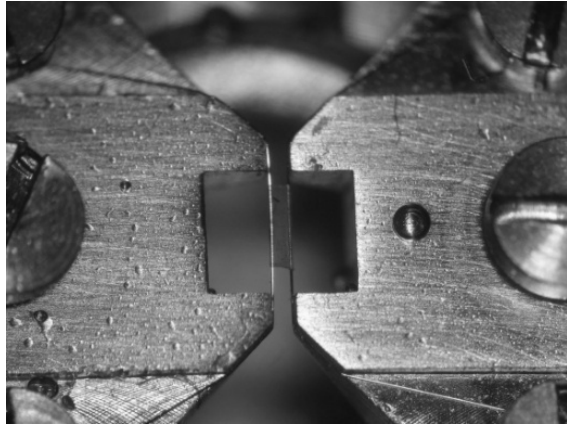


Abb. 9 A. gracilis

A. gracilis im Drahtmyographen nach erfolgter Normalisation. Die Maximallänge zu untersuchender Gefäße beträgt 2 mm.

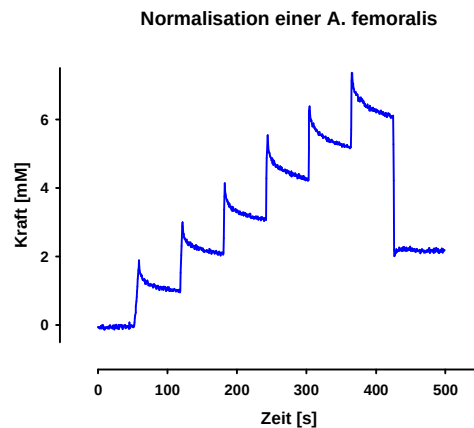


Abb. 10 Normalisation einer A. femoralis

Schrittweise Erhöhung der Wandspannung um je 2 mN mit anschließender Wartezeit von 60 s. Nach Überschreitung des definierten transmuralen Druckes wird der normalisierte Durchmesser eingestellt.

Frühestens 5 min nach erfolgter Normalisation wurde mit der Durchführung des Versuchsprotokolls begonnen. Unter LabView (National Instruments, Texas) wurde ein Programm entwickelt, welches die gemessenen Kraftwerte des jeweiligen Versuches mit einer Frequenz von 2 Hz über die serielle Schnittstelle der Steuereinheit des Myographen ausliest und in einer Textdatei speichert.

Ausgehend von der Kraft (Spannung) nach der Normalisation führt die Applikation von Noradrenalin (NA, Abb. 25, S.41) zur Kontraktion und somit zu einem Anstieg der Kraft. Die nachfolgende Applikation eines Dilatators, wie zum Beispiel Acetylcholin (ACh, Abb. 25, S.41), führt konzentrationsabhängig zu einer Relaxation, die an der Abnahme der Kraft zu erkennen ist.

Gefäße, deren Kraftentwicklung nach Applikation von Noradrenalin unter 0,15 mN lag, wurden verworfen.

2.2.5.2 Gefäßantworten unter isobaren Bedingungen

In der universitätseigenen Werkstatt wurde eine Probenkammer für die Untersuchung isolierter Gefäße an einem inversen Mikroskop angefertigt. Über eine nur grob zu justierende Halterung und einen Mikromanipulator werden zwei ausgezogene und gebogene Glaskapillaren in der Probenkammer positioniert. Auf diese wurden die isolierten Gefäße aufgezogen und mit Knoten (11.0 Ethilon, Ethicon, Hamburg) auf der jeweiligen Kapillare fixiert. Eine der Kapillaren wurde mit PSS gefüllt und an ihrem Ende verschlossen. Die andere wurde mit einem Schlauch an ein Ausgleichsgefäß angeschlossen, das mit PSS gefüllt war. Über dieses wurde mit Hilfe eines Drucktesters nach Gauer ein transmuraler Druck von

60 mmHg eingestellt. PSS aus dem Ausgleichsgefäß wurde durch eine Glaskapillare geleitet, die waagrecht am Mikroskop angebracht war. Eine Luftblase in dieser Kapillare zeigt fließendes Medium und somit Undichtigkeiten an. Gefäße, die undicht waren, wurden verworfen. Die Probenkammer wird mit 37°C warmem Wasser umspült und die Pufferlösung mit Carbogen (5% CO₂, Rest O₂) begast. An den Ablauf der Probenkammer ist eine elektrische Pumpe (KAVAN GmbH, Nürnberg; Netzteil: Alpha Electronica, Italien) angeschlossen. Vasoaktive Substanzen wurden direkt in die Probenkammer pipettiert.

2.2.5.3 Gefäßantworten *in vivo*

Eine Methode zur Untersuchung der Gefäßantworten *in vivo* wurde etabliert. Narkotisierten Mäusen wurde im Bereich des Musculus gracilis die Haut entfernt und der freigelegte Bereich mit PSS benetzt. Falls erforderlich, wurde zusätzliche Narkose intraperitoneal verabreicht. Bindegewebe, welches die Sicht auf die A. gracilis behinderte, wurde vorsichtig entfernt. Die Tiere wurden nach erfolgter Präparation auf den Objektstisch des Mikroskops gelegt, auf dem sich eine elektrische Heizmatte befindet. Zwischen der Heizmatte und dem Rücken der Maus wurde die Temperatur kontinuierlich gemessen und auf 35°C eingestellt. Der freigelegte Bereich wurde jetzt mit 100 µL PSS benetzt und mit einer Schwanenhalslampe beleuchtet. Ein 25x long distance Objektiv wurde verwendet. Für die Bildaufnahme war eine Digitalkamera (Kappa CF8/1, Kappa Optronics GmbH, Gleichen) an das Mikroskop angeschlossen, deren Daten mit Hilfe unseres Programmes AQuaL (69) auf einem Notebook aufgezeichnet und ausgemessen wurden. Der zu untersuchende Bereich in der Nähe des Objektivs mit einer externen Lichtquelle beleuchtet.

2.2.5.4 Versuchsprotokolle

Die Gefäße wurden durch Applikation eines Vasokonstriktors vokontrahiert. Nachfolgend wurden die Dilatatoren kumulativ appliziert.

2.2.6 Immunmarkierung

2.2.6.1 Nachweis der Endothelzellen im Aortenring-Versuch

Die Immunhistochemie wurde an Aortenringpräparaten an dem Tag 7 wie folgt durchgeführt. Soweit nicht anderes angegeben wurden die Chemikalien in 0.5x PBS (Phosphate Buffered Saline) gelöst. Zu Beginn wurden die Präparate mit 3.7% (v/v) Formalin für 2 h fixiert und nachfolgend für 30 s in 1% Triton-X 100 gespült. Daraufhin wurde 3 mal für je 5 min mit PBS gespült. Es folgte die Inkubation mit dem Blockierpuffer (1% BSA, Albumin aus

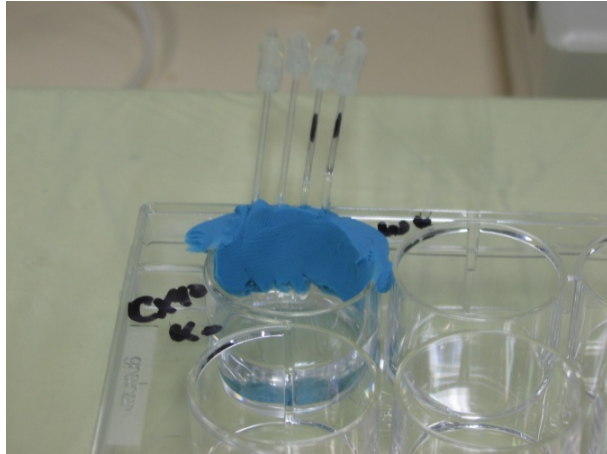
Rinderserum, Serva, Heidelberg) für 2 h. Der primäre Antikörper, gerichtet gegen den endothelzellspezifischen von Willebrand Faktor (vWF, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), wurde 1:200 im Blockierpuffer gelöst und die Präparate über Nacht bei 4° C inkubiert. Darauffolgend wurden die Präparate 5 mal mit PBS für je 10 min gespült. Anschließend wurden die Präparate mit einem FITC-markiertem Antikörper (1:200 in Blockierpuffer) für 1 h inkubiert. Zeitgleich wurde für die Färbung der Kerne etwas Hoechst (Sigma-Aldrich) hinzugegeben. Abschließend wurde 5 mal für je 5 min mit PBS gespült. Die Präparate wurden mit einem Zeiss LSM 5 Meta (Carl Zeiss AG, Oberkochen) mikroskopiert.

2.2.6.2 Connexin40-Nachweis in isolierten kleinen Arterien

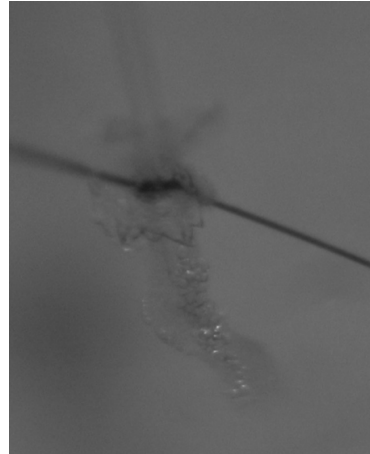
A. gracilis und A. femoralis wurden wie zuvor beschrieben (2.2.3.4) isoliert und in PBS gelagert. Insbesondere bei den kleinen Arterien bestand während der Immunmarkierung die Gefahr, die Gefäße auf Grund ihrer Größe zu verlieren. Um dies zu verhindern, wurden zwei Methoden entwickelt und etabliert, mit denen dieses Risiko minimiert wird.

Für die erste Methode wurden Reaktionsgefäße für die Polymerase-Kettenreaktion verwendet, deren Boden entfernt und durch ein Mikrogitter, wie es in der Transmissions-Elektronenmikroskopie verwendet wird, ersetzt wurde. In diese Reaktionsgefäße wurden die Präparate verbracht. Während der Durchführung der Immunmarkierung wurden die Reaktionsgefäße in die Kulturplatten (4-well, Nunc, Dänemark) gestellt. Lösungen, die für die Immunmarkierung verwendet wurden, wurden durch die Reaktionsgefäße in die Kulturplatten gegeben und außerhalb der Reaktionsgefäße abpipettiert. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass Immunmarkierungen kleiner Präparate zügig und ohne deren Verlust durchgeführt werden können.

Die zweite Methode ermöglicht die Applikation der Lösungen durch das Lumen der isolierten Gefäße. Hierfür wurden Mikropipetten, wie sie im Druck-Myographen verwendet werden, mit Knetmasse an Kulturplatten (12-well, Nunc, Dänemark) befestigt (Abb. 11). Die Spitzen der Kapillaren wurden abgebrochen, bis der nötige Spitzendurchmesser erreicht war. Die Platte wurde mit PBS gefüllt. Mit einer Spritze wurden die Kapillaren luftblasenfrei mit PBS gefüllt. Isolierte Blutgefäße wurden, analog dem Vorgehen im Druckmyographen, auf die Kapillare gezogen und befestigt. Durch die Kapillaren wurde ein Teil der Lösungen durch das Lumen der Gefäße in die Kammer gegeben (Abb. 12). Im Gegensatz zu der vorherig beschriebenen Methode, eignet sich dieses Vorgehen um auch die Zellen des Endothels der Immunmarkierung zugänglich zu machen.

**Abb. 11: Glaskapillaren**

An der Kulturschale wurden Glaskapillaren befestigt auf die die Gefäße aufgezogen wurden.

**Abb. 12: *A. gracilis* aufgezogen auf einer Glaskapillare**

Durch das Aufziehen der isolierten Gefäße auf Glaskapillaren können Lösungen durch das Lumen appliziert werden.

Für die Immunhistochemie wurden die Chemikalien in PBS gelöst und die Färbung wie folgt durchgeführt. Zu Beginn wurden die isolierten Gefäße für 10 min mit 4.5% (v/v) Formalin fixiert und anschließend 3 mal für je 5 min mit PBS gespült. Danach wurden die Präparate 2 h mit Blockierpuffer (1% BSA, Albumin aus Rinderserum, Serva, Heidelberg, 0.2% TritonX-100) inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (anti-Cx40, Millipore, Schwalbach, 1:400 in Blockierpuffer) bei 4° C über Nacht. Danach wurde 2 mal je 20 min mit 1% TritonX-100 und 30 min mit PBS gespült. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Alexa Fluor 594, Invitrogen GmbH, Darmstadt, 1:800 in Blockierpuffer) für 1 h. Abschließend wurden die Präparate 2 mal mit 1% TritonX-100 und 1 mal mit PBS 20 min gespült, auf Objektträger verbracht, in Moviol (Merck, Darmstadt) fixiert und mit einem Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) mikroskopiert.

2.2.7 Statistische Auswertung

Alle Messwerte wurden von den verwendeten Computerprogrammen in Textdateien gespeichert, die in die Statistiksoftware Stata (StataCorp LP, College Station, Texas, USA) eingelesen und ausgewertet wurden. Gruppenübergreifende Signifikanzberechnungen (z.B. Vergleiche verschiedener Genotypen) wurden mittels einer Varianzanalyse (ANOVA; analysis of variance) durchgeführt. Gruppeninterne Auswirkungen der verschiedenen Versuchsbedingungen wurden mittels eines gepaarten t-test auf ihre Signifikanz hin untersucht. Unterschiede der Messreihen wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit der angewandten Signifikanzberechnung unter 5% lag. Für den Vergleich der angewandten Methoden wurden die E_{Max} und E_{50} (70) mit der Statistiksoftware berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung und Quantifizierung der Angiogenese *in vitro*

Neben dem regulatorischen Effekt auf den Tonus der glatten Muskulatur der Blutgefäße ist das Endothel auch maßgeblich an der Neubildung von Blutgefäßen, der Angiogenese, beteiligt. Es wurde eine Methode zur Untersuchung der Angiogenese in isolierten Aortenringen etabliert.

3.1.1 Bildaufbereitung mit AQuaL

Für die Quantifizierung der Angiogenese in Bildern, die mit der digitalen Kamera eines Mikroskops aufgenommen wurden, mangelte es vorhandener Software an den notwendigen Funktionen. Aus diesem Grund wurde ein Computerprogramm für die Bildverarbeitung und Quantifizierung der Angiogenese (AQuaL (69)) unter Verwendung der Programmiersprache Java entwickelt.

Bedingt durch die Größe der Aortenringpräparate und die erforderliche Auflösung für die adäquate Darstellung der sich ausbildenden kapillarähnlichen Strukturen, war es nicht möglich, ein Präparat in einem Bild aufzunehmen. Um dennoch die Präparate als Ganzes auswerten zu können, wurden jeweils mehrere Einzelbilder aufgenommen, aus denen dann, mit Hilfe einer in AQuaL implementierten Funktion, ein Gesamtbild erstellt wurde. Das Zusammensetzen verschiedener Bilder erfordert die Definition der Koordinaten gleicher Strukturen in sich überlagernden Bildbereichen per Mausklick durch den Nutzer. Auf Grundlage dieser Koordinaten wird die Verschiebung der Bilder zueinander (Abb. 13, A) wie folgt berechnet:

$$T = V_1 - V_2$$

Nach Definition gleicher Strukturen in weiteren Bildern (Abb. 13, B) wird deren Verschiebung relativ zum ersten Bild wie folgt berechnet:

$$T_{res} = \sum_{i=1}^n T_i$$

Da die Selektion einer Struktur durch nur einen Mausklick nicht ihre genaue Position wiedergibt und dieses zu Ungenauigkeiten bei der Überlagerung der Bilder führt, werden die

Umgebungsbereiche der selektierten Strukturen miteinander verglichen. Das Programm berechnet den euklidischen Abstand in einem Suchfeld von 31x31 Pixeln zwischen der Struktur im Quellbild und einem Zielfeld von 63x63 Pixeln um die Struktur im Zielbild. Der niedrigste euklidische Abstand bestimmt, in welchem Bereich des Zielfeldes die selektierten Bereiche die größte Ähnlichkeit aufweisen. Der euklidische Abstand ist wie folgt definiert:

$$d_{(z,s)} = \sqrt{\sum_{(x,y) \in \mathbb{N}} (Q_{(x,y)} - Z_{(x+z,y+s)})^2}$$

z, s = Ursprung des Suchfeldes im Zielbild; x, y = Position im Suchfeld

Q = Grauwert im Quellbild; Z = Grauwert im Zielbild

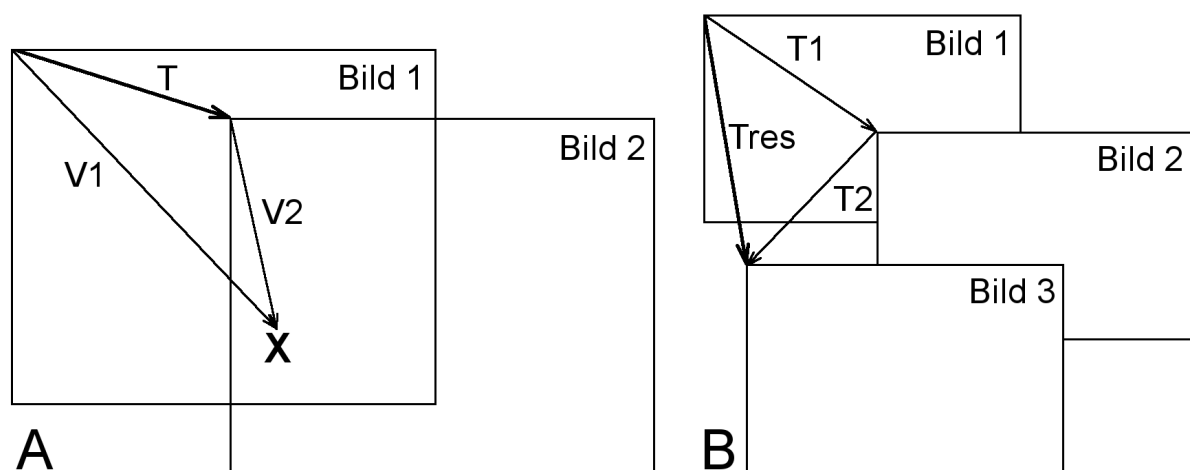


Abb. 13: Ermittlung der Translation der Einzelbilder

A: Die Koordinaten (V1, V2) eines Punktes (X), der sich in zwei unterschiedlichen Bildern (Bild 1, Bild 2) befindet, wird verwendet um die Verschiebung des Koordinatenursprungs des zweiten Bildes zu berechnen (T). B: Die Translationen der Einzelbilder werden genutzt, um die Verschiebung weiterer Bilder (Bild 3) relativ zum Anfangsbild zu berechnen.

Dieses Vorgehen wird beispielhaft in der Abb. 14 dargestellt, wobei die weiße Umrandung der Einzelbilder nur der Illustration des Verfahrens dient. Die Funktion bietet die Möglichkeit der schnellen Erstellung eines zusammengesetzten Bildes für die nachfolgende Quantifizierung.

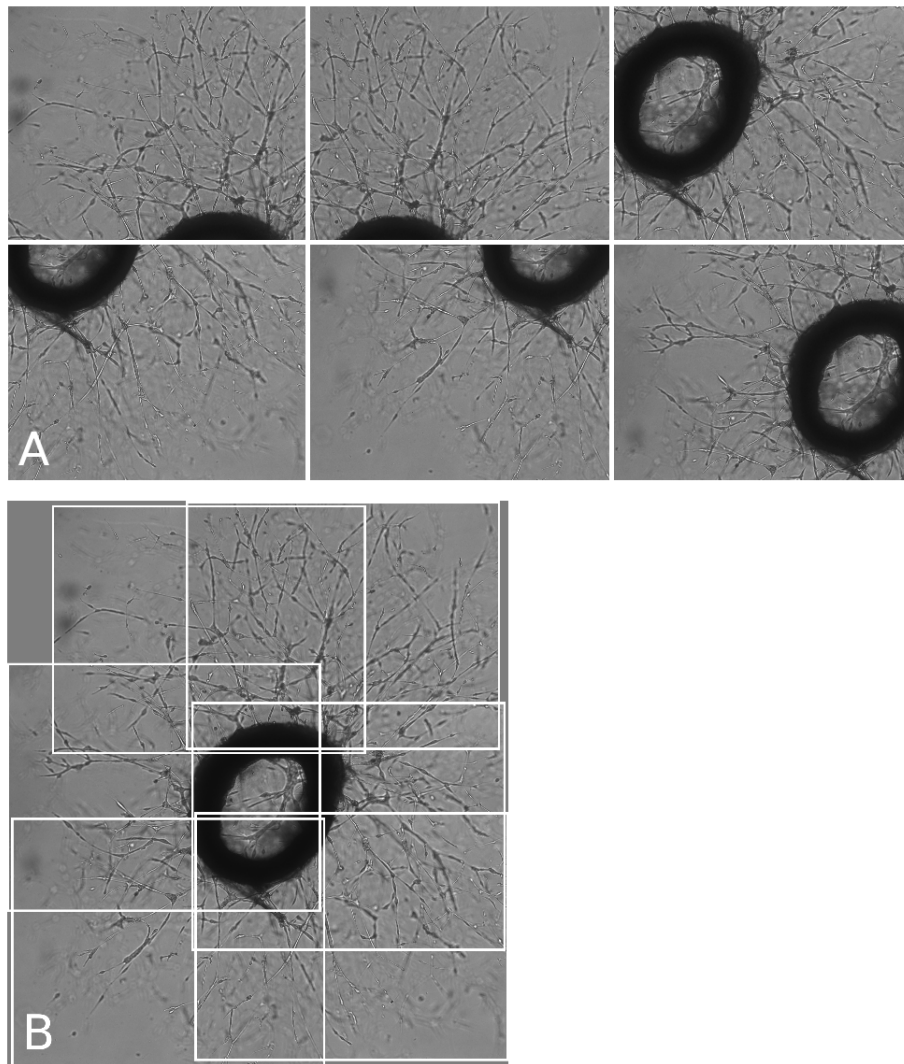


Abb. 14: Berechnung zusammengesetzter Bilder

Aus einer Serie von Einzelbildern (A) erstellt AQUaL das Gesamtbild (B). Die weißen Rechtecke (B) dienen in diesem Falle nur der Illustration der Lage der Einzelbilder.

3.1.2 Quantifizierung der Angiogenese

Für die Quantifizierung der Angiogenese war keine oder nur sehr kostspielige Software vorhanden, welche die benötigten Funktionen bereitstellt. Aus diesem Grund wurde eine Bildauswertung in das Programm implementiert. Sie bietet die Möglichkeit der Bestimmung der von kapillarähnlichen Strukturen überwachsenen Fläche sowie die Längenmessung unter Einbeziehung der Morphologie der kapillarähnlichen Strukturen.

3.1.2.1 Quantifizierung auf Basis der Fläche

Das Bild des Aortenringes (Abb. 14, B) zeigt die vom Aortenring ausgehenden kapillarähnlichen Strukturen. Diese lassen sich durch ihre Kontrastunterschiede zu den restlichen Bildinhalten in einem Prozess der Bildfilterung und Binärisierung isolieren.

Zunächst wird das Bild in ein Grauwertbild (Abb. 15, A) konvertiert. Um die kapillarähnlichen Strukturen aufgrund der Kontrastunterschiede herauszufiltern, wird ein Unschärfefilter (Gaußscher Weichzeichner; gaussian blur), dessen Eigenschaften eingestellt werden können, auf das Bild angewandt. Anschließend wird das weichgezeichnete Bild invertiert und der Mittelwert aus diesem und dem Grauwertbild berechnet und als resultierendes Bild dargestellt (Abb. 15, B). Die dargestellten Histogramme (jeweils links oben) zeigen die Veränderung der Bildinformation. Im Histogramm des ungefilterten Bildes (Abb. 15, A) ist dessen Verteilung der Grauwerte zu erkennen. Nach der Filterung (Abb. 15, B) ist der Hauptanteil des Bildes, beruhend auf dessen geringen Kontrastunterschieden, grau und stellt sich im Histogramm als Peak in dessen Mitte dar (Abb. 15, B). Bereiche, in denen im ungefilterten Bild Kontrastunterschiede zu erkennen sind, haben vom Mittelwert abweichende Grauwerte und repräsentieren die kapillarähnlichen Strukturen, die isoliert werden müssen. Dies geschieht durch die Definition eines oberen und unteren Schwellenwertes (Abb. 15, C, D). Alle Pixel mit Grauwerten zwischen diesen Schwellenwerten werden weiß dargestellt und somit ausgeschlossen. Alle anderen Pixel entstammen kontrastreichen Regionen und sind Teil der kapillarähnlichen Strukturen, die selektiert und schwarz dargestellt werden. Da AQuaL sowohl Originalbild als auch resultierendes Bild anzeigt, kann der Nutzer die Auswirkungen seiner Einstellungen direkt erkennen. Abschließend wird das binärisierte Bild gespeichert und die Anzahl der schwarzen Pixel, als Maß für die überwachsene Fläche, bestimmt und in einer Textdatei gespeichert. Durch Kalibration des Bildes auf die tatsächliche Größe kann auch die tatsächliche Fläche bestimmt werden.

Mit dieser Bildfilterung ist es möglich, die überwachsene Fläche als Maß der Angiogeneseaktivität in mikroskopischen Bildern schnell und reproduzierbar zu quantifizieren.

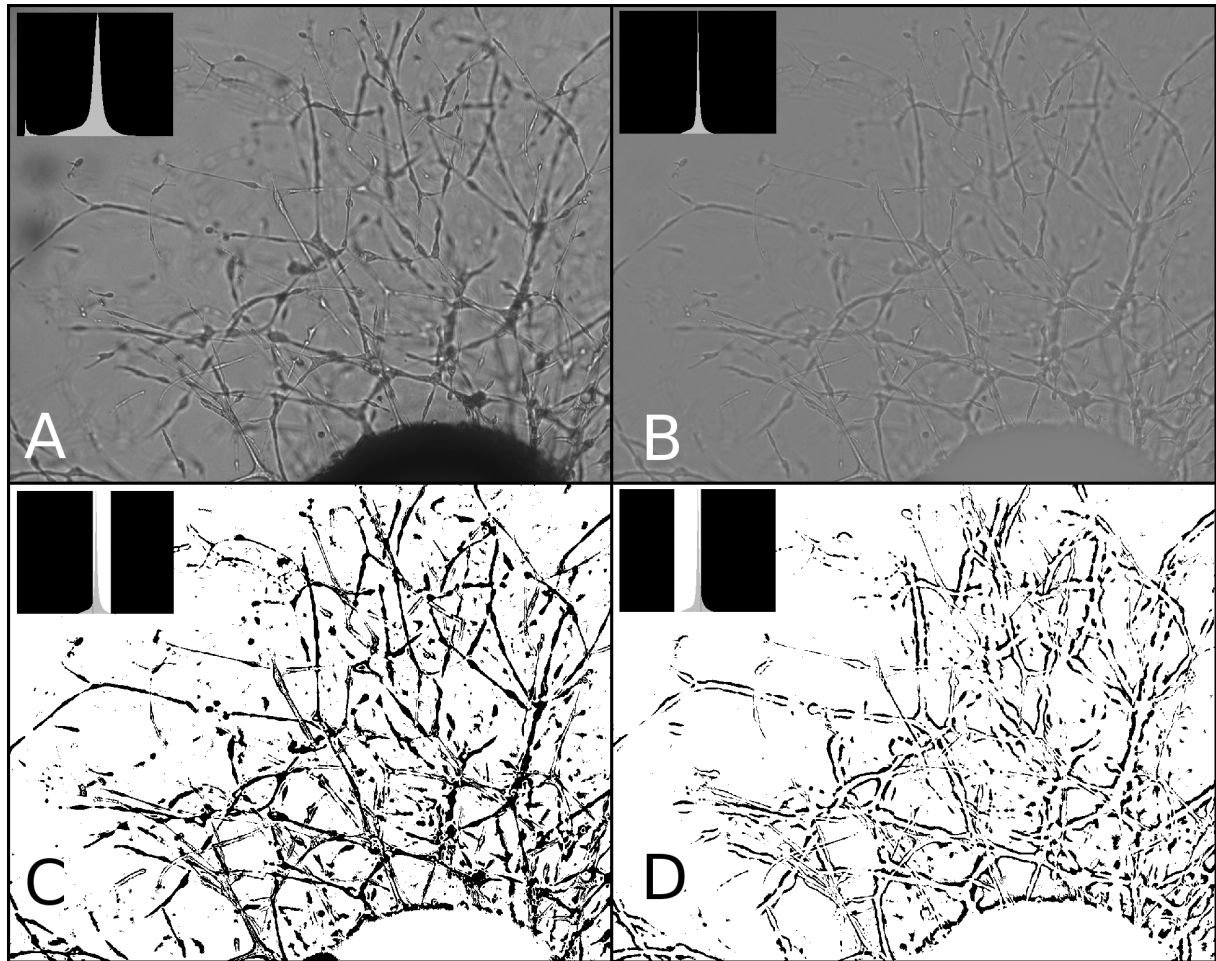


Abb. 15: Isolierung gefäßähnlicher Strukturen

Absolute Grauwertverteilungen sind in Histogrammen dargestellt (links oben im Bild). Ausgehend vom Originalbild, das in ein Grauwertbild umgewandelt wurde (A), erfolgt die Filterung des Bildes (B). Durch die Filterung wird ein Bild generiert, das Informationen über die Kontrastunterschiede im Ausgangsbild (A) enthält. Anhand dieser Kontrastwechsel lassen sich kapillarähnliche Strukturen nach Binärisierung des Bildes darstellen (C, D). Es können entweder die Innen- (C) oder die Außenbereiche der kapillarähnlichen Strukturen (D) selektiert werden.

3.1.2.2 Quantifizierung auf Basis der Länge

Die Flächenmessung hat den Vorteil des geringen Zeitaufwandes, lässt aber keine Aussagen über die Struktur der Kapillaren zu. Aus diesem Grund wurde als weitere Möglichkeit der Quantifizierung eine Längenmessung entwickelt, bei der dem Verlauf der kapillarähnlichen Strukturen durch Mausklicks gefolgt wird (Abb. 16). Um Verzweigungspunkte innerhalb der gewachsenen Struktur zu erfassen, können solche definiert werden. Hiermit kann sowohl die Länge als auch die Anzahl der Verzweigungen bestimmt werden (Abb. 16). Die Ergebnisse der Längenmessung (Abb. 16, Textfeld)) werden ebenfalls in Dateien gespeichert.

Durch die Erweiterung von AQUaL um die Methode der Längenmessung sind Aussagen über das Verzweigungsmuster der kapillarähnlichen Strukturen möglich, was aber einen deutlich erhöhten Zeitaufwand beinhaltet.

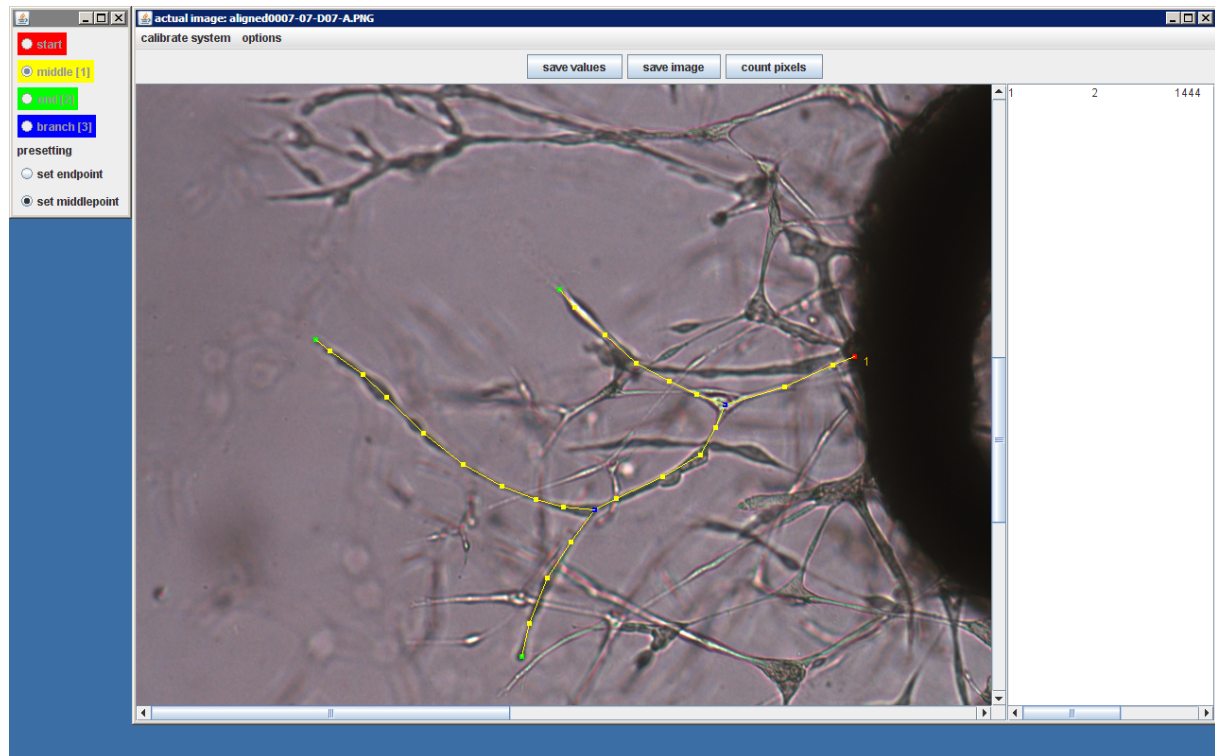


Abb. 16: Computergestützte Längenmessung

AQuaL ermöglicht die Längenmessung unter Berücksichtigung des Verlaufes und des Verzweigungsmusters der kapillarähnlichen Strukturen. Nach der Festlegung eines Startpunktes (rote Quadrate) lassen sich weitere Punkte (gelbe Quadrate) einfügen. Endpunkte (grüne Quadrate) markieren das Ende eines Messpfades. In diesem lassen sich Verzweigungspunkte (blaue Quadrate) definieren, von denen ausgehend die Messung fortgesetzt werden kann. Die Nummer der Messung, die Anzahl der Verzweigungen und die Gesamtlänge werden im Textfeld (rechts) dargestellt und gespeichert.

3.1.3 Vergleich der Flächen- und Längenmessung

Nachfolgend sollte untersucht werden, inwieweit die Daten der Flächen- und Längenmessung korrelieren. Hierfür wurden Aortenringe von 5 Wildtypmäusen angefertigt und die Angiogenese mittels der Flächen- und Längenmessung an den Tagen 3 bis 4 quantifiziert. Insgesamt wurden 157 Beobachtungen miteinander verglichen (Abb. 17, A,B). Die Ergebnisse zeigen, dass die Flächenmessung und die Gesamtlänge aller gemessenen Strukturen signifikant korrelieren (Abb. 17, A; $r = 0,62$). Ebenso korreliert die gemessene Fläche mit der relativen Länge der kapillarähnlichen (Abb. 17, B; $r = 0,67$).

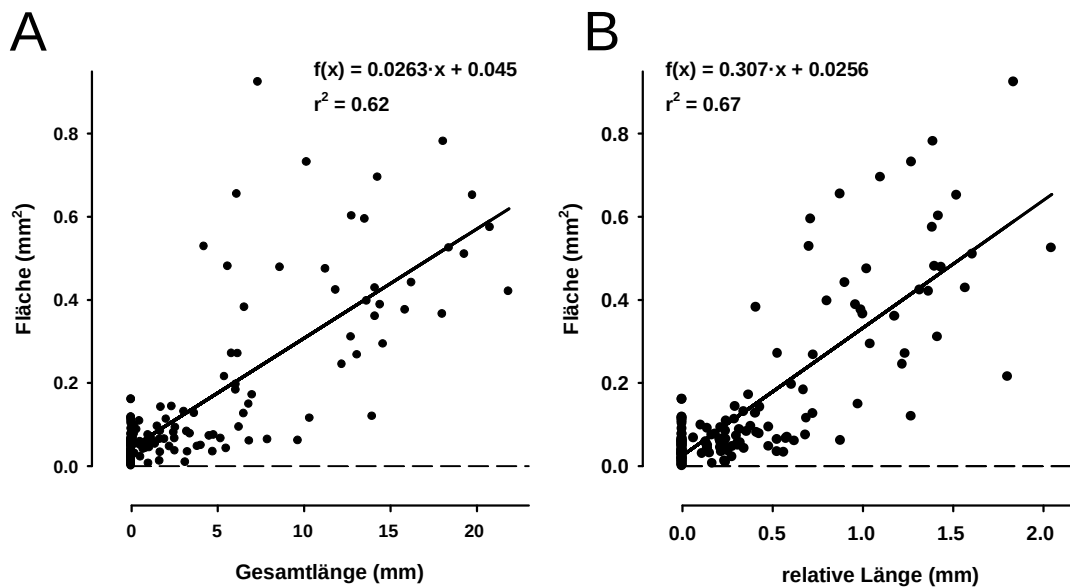


Abb. 17: Korrelation der Flächen- und Längenmessung

Vergleich der Flächenmessung mit der Messung der Gesamtlänge (A) und der relativen Länge (B). Die Geraden (A,B) repräsentieren die Geradengleichung ($f(x)$) der Regressionsberechnung.

Aufgrund der Korrelation der Flächen- und Längenmessung wurden die nachfolgenden Untersuchungen der Angiogenese mit der Flächenmessung quantifiziert, bei der der Zeitaufwand erheblich geringer ist.

3.1.4 Bestimmung der Kulturbedingungen

Für die Induktion der Angiogenese ist das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren notwendig. In einer ersten Versuchsreihe sollten die Kulturbedingungen optimiert werden. Hierfür wurden Aortenringe mit verschiedenen FGF- (basic fibroblast growth factor) und FCS- (fetales Rinderserum Albumin) Konzentrationen inkubiert und die Angiogeneseaktivität untersucht.

Es wurden Aorten von 4 Wildtyp-Tieren isoliert und die Angiogenese an den Tagen 3 bis 7 quantifiziert (Abb. 18). Die alleinige Verwendung von FCS (10% (v/v)) oder in Kombination mit FGF in geringer Konzentration (1 ng/mL) führte nicht zu einer signifikanten Angiogeneseaktivität. FGF in höheren Konzentrationen (5 oder 10 ng/mL) in Verbindung mit FCS (10% (v/v)) induzierten eine signifikant gesteigerte Angiogenese (Abb. 18). Aufgrund der Ergebnisse wurden für alle weiteren Versuche die Konzentrationen 5 oder 10 ng/mL FGF und zusätzlich 10% (v/v) FCS verwendet.

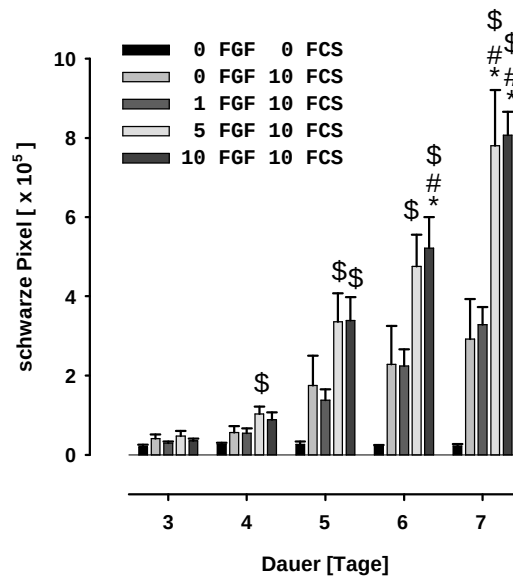


Abb. 18: Zeitlicher Verlauf der Angiogenese-Aktivität.

Die Verwendung von FGF und FCS führte über einen Zeitraum von 3 bis 7 Tagen zu einer signifikanten Steigerung der Angiogeneseaktivität. Quantifiziert wurde diese mit Hilfe der Flächenmessung. $P < 0.05$ gilt für: \$: vs. 0 FGF 0 FCS, *: vs. 0 FGF 10 FCS, #: vs. 1 FGF 10 FCS; Signifikanztest: ANOVA korrigiert nach Bonferroni.

3.1.5 Charakterisierung der auswachsenden Zellen

Im Verlauf der Angiogenese wachsen und migrieren Endothelzellen in die sie umgebende Matrix. Die Kernfärbung der Aortenringpräparate mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst zeigt, dass das entstehende Netzwerk aus vielen aneinander gelagerten Zellen besteht (Abb. 19).

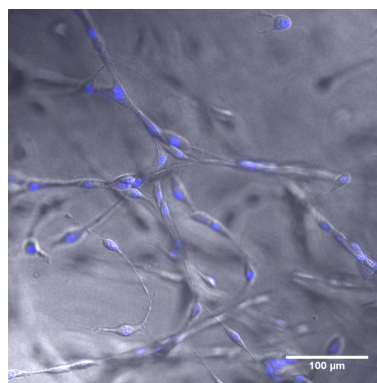


Abb. 19: Kernfärbung der auswachsenden Zellen

Aus dem Aortenring herauswachsende Zellen wurden mit dem Kernfarbstoff Hoechst inkubiert. Abgebildet ist eine Maximalprojektion eines Bildstapels der Kernfärbung, die mit dem Transmissionsbild zusammengesetzt ist.

Zur Identifikation von Endothelzellen wurden Immunmarkierungen gegen das endothelzell-spezifische Protein von Willebrand Faktor durchgeführt. Diese zeigen, dass es sich bei den auswachsenden Zellen hauptsächlich um Endothelzellen handelt (Abb. 20, A, B). Die

Negativkontrolle ohne den primären Antikörper zeigt, dass der sekundäre Antikörper nicht unspezifisch bindet (Abb. 20, C, D). Somit handelt es sich bei auswachsenden Zellen um eine Vielzahl aneinandergelagerter Endothelzellen.

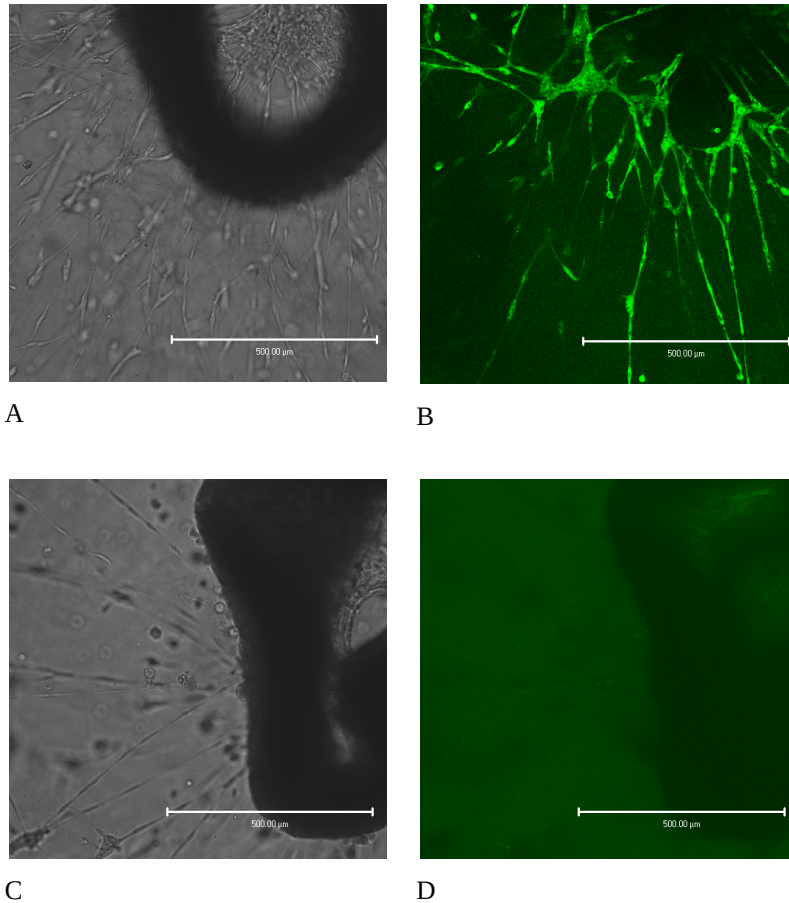


Abb. 20: Immunmarkierung der Endothelzellen

Die Transmissionsbilder (A, C) zeigen die Aortenringe und die auswachsenden Zellen. Die Immunmarkierung des von Willebrand-Faktors zeigt, dass es sich bei den auswachsenden Zellen vor allem um Endothelzellen handelt (B). Ohne den primären Antikörper zeigt sich keine Fluoreszenz auswachsender Zellen (D). Die Fluoreszenzbilder stellen, im Gegensatz zu den Transmissionsbildern nur einen begrenzten Bereich dar, weshalb in ihnen weniger Zellen zu erkennen sind.

3.2 Mediatoren der Angiogenese

In den nachfolgenden Untersuchungen sollte der Einfluss des Stickstoffmonoxids (NO) als Signalmolekül und die Notwendigkeit direkter Zell-Zell-Verbindungen über Connexin40 bei der Angiogenese untersucht werden.

3.2.1 Effekt von NO in der Angiogenese

Es wurde die Angiogenese von Aortenringen (3 Wildtypiere, 6 Ringe) unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von L-Nitro-Arginin (L-NA, 300 µmol/L)

untersucht. Die Inhibition der NO-Synthase hatte keinen Einfluss auf die Angiogeneseaktivität (Abb. 21 A, B).

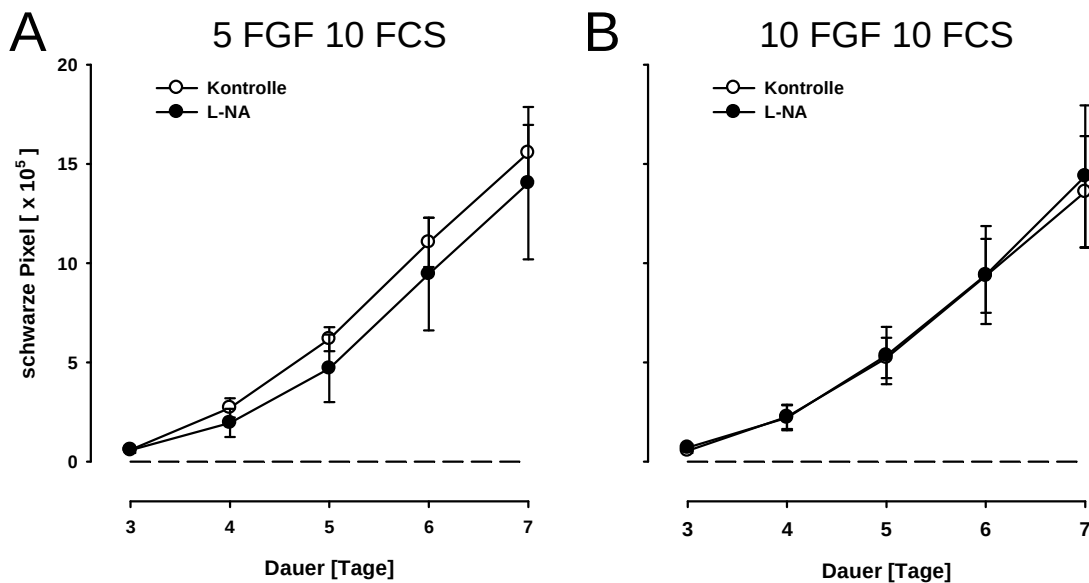


Abb. 21: Pharmakologische Inhibition der NO-Synthase

Die Inhibition der NO-Synthase mit L-Nitro-Arginin (L-NA, 300 $\mu\text{mol/L}$) hatte keinen Einfluss auf die Angiogeneseaktivität bei Inkubation mit 10% FCS und 5 ng/mL FGF (A) oder 10 ng/mL FGF (B).

Unter den zuvor gewählten Bedingungen kann die Hemmung der NO-Synthase unzureichend sein. Im Endothel wird NO hauptsächlich von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) gebildet. Aus diesem Grund wurde in einer weiteren Versuchsserie die Angiogeneseaktivität von Aortenringen aus Wildtyp-tieren (3 Tiere, 6 Ringe) mit der von eNOS-defizienten (3 Tiere, 5 Ringe) Aortenringen verglichen. In dieser Serie war die Angiogenese sowohl unter den Bedingungen mit 5 ng/ml FGF und 10% FCS als auch 10 ng/ml FGF und 10% FCS in den eNOS-defizienten Aortenringen an den Tagen 6 und 7 signifikant reduziert (Abb. 22 A, B). Dies zeigt, dass die endotheliale NO-Synthase für die Angiogenese erforderlich ist. Offensichtlich war die pharmakologische Inhibition der NO-Synthase in der vorhergehenden Versuchsserie nicht ausreichend.

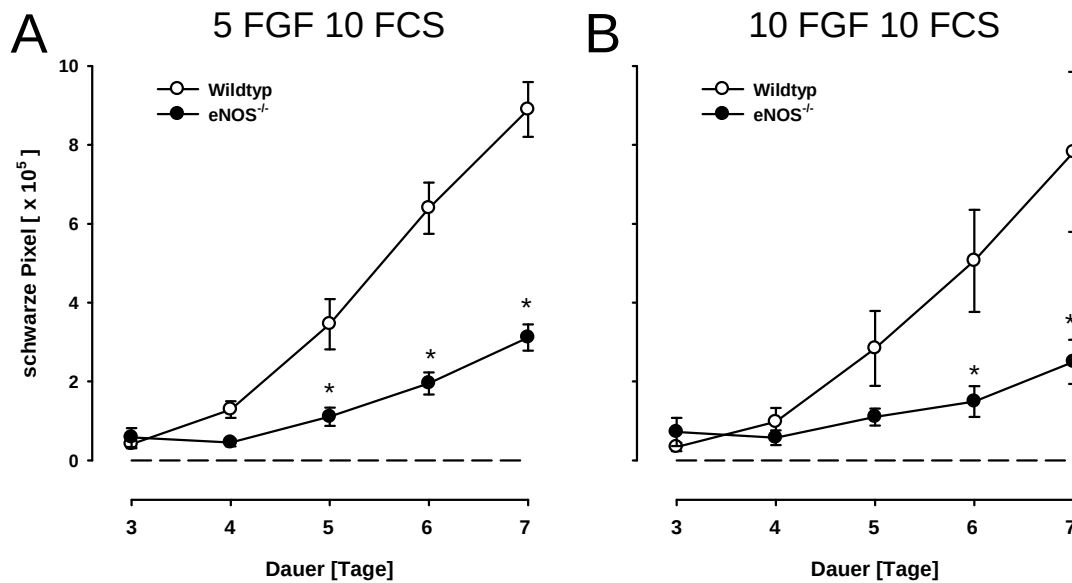


Abb. 22: Signifikant reduzierte Angiogenese bei eNOS-Defizienz

Im Vergleich zu den Aortenringen aus Wildtyp-Tieren ist die Angiogenese in eNOS-defizienten Aortenringen signifikant abgeschwächt bei 5 ng/mL FGF (A) und 10 ng/mL FGF (B) in Anwesenheit von 10% FCS. *: $P < 0.05$ eNOS^{-/-} vs. Wildtyp

3.2.2 Connexin40 bei der Angiogenese

Zell-Zell-Kopplungen vermittelt über kanalbildende Connexine sind an vielen zellulären Prozessen beteiligt. Um die Bedeutung des Connexin40 zu untersuchen, wurde die Angiogenese in Wildtyp- (4 Tiere, 8 Ringe) mit der in Cx40-defizienten (4 Tiere, 8 Ringe) Aortenringen verglichen.

Unter den Bedingungen mit 5 ng/ml FGF war die Angiogenese in Connexin40-defizienten Aortenringen nicht signifikant vermindert (Abb. 23, A). Im Gegensatz dazu war sie signifikant reduziert in Anwesenheit von 10 ng/mL FGF (Abb. 23, B). Diese Daten deuten darauf hin, dass direkte Zellkopplung über Connexin40 im Verlauf der Angiogenese relevant ist.

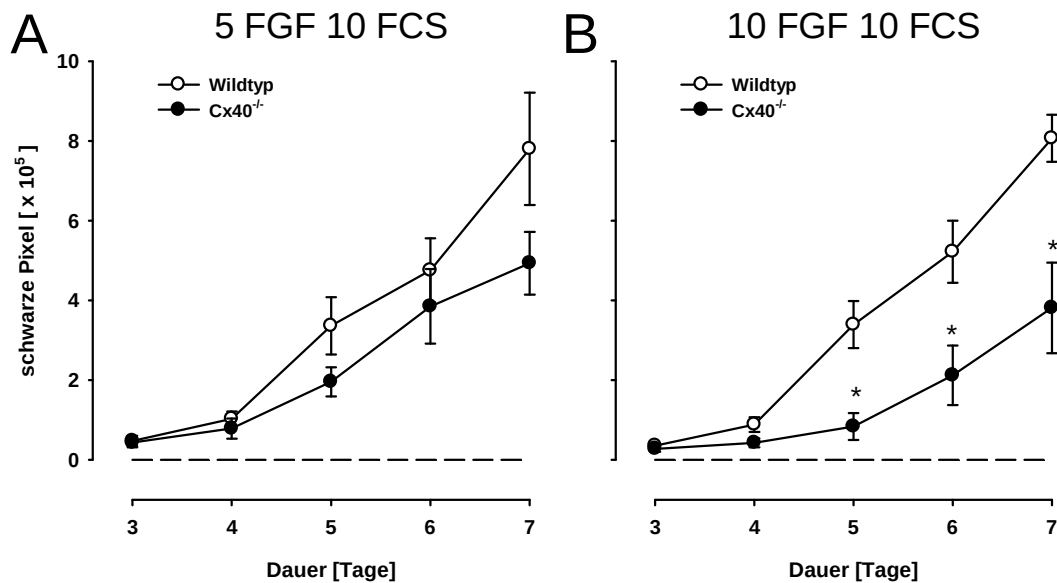


Abb. 23: Connexin40 ist relevant bei der Angiogenese

Connexin40-Defizienz führt, verglichen mit dem Wildtyp, in Anwesenheit von 10% FCS bei einer FGF-Konzentration von 5 ng/mL (A) nicht zu einer signifikanten Abschwächung der Angiogeneseaktivität. Im Gegensatz dazu ist die Angiogeneseaktivität bei der Inkubation mit 10 ng/mL FGF (B) signifikant reduziert. *: $P < 0.05$ Cx40^{-/-} vs. Wildtyp

3.3 Untersuchung der Gefäßregulation

Der Kontraktionszustand der glatten Gefäßmuskulatur und somit der Durchmesser der Blutgefäße wird durch Autakoide reguliert, die von den Zellen des Endothels sezerniert werden. Diese sind Stickstoffmonoxid (NO), Prostazyklin (PGI₂) und der endothelabhängige hyperpolarisierende Faktor (EDHF). Das Endothel wird durch Agonisten, von denen Acetylcholin (ACh) am Besten untersucht ist, zur Freisetzung der Autakoide stimuliert. Zur Prüfung der Dilatationsfähigkeit der Gefäße wurde der endothelunabhängige NO-Donor Natrium-Nitroprussid (SNP) verwendet, der direkt auf den glatten Muskel wirkt. Die Bedeutung der verschiedenen Autakoide und ihre Interaktionen wurden in Leitungsgefäßen (A. femoralis, A. mesenterialis) und kleinen Widerstandsgefäßen (A. gracilis) von Mäusen untersucht.

3.3.1 Methodische Entwicklung

3.3.1.1 Isometrische Untersuchung

Es wurde die Methode zur isometrischen Untersuchung der Gefäße in einem Drahtmyographen (Wire-Myograph 510A, DMT, Dänemark) etabliert. Grundlage dieser Methode ist die Messung der Kontraktionskraft, die ein isoliertes Blutgefäß aufbringt, das auf eine zuvor definierte Wandspannung vorgespannt wurde. Für die Aufzeichnung dieser Kraft

wurde eine Applikation (Abb. 24) in LabView (National Instruments, Texas) entwickelt, die auf die Steuereinheit des Drahtmyographen zugreift und die gemessenen Kraftwerte ausliest. Dabei erfolgen Aufzeichnung und grafische Darstellung der Werte mit einer zeitlichen Auflösung von 2Hz simultan für beide im Myographen enthaltene Messplätze. Die gemessenen Werte speichert die Applikation in einer Textdatei. Zusätzlich können Informationen über die Versuchsbedingungen eingegeben werden, die dann ebenfalls in der Datei gespeichert werden.

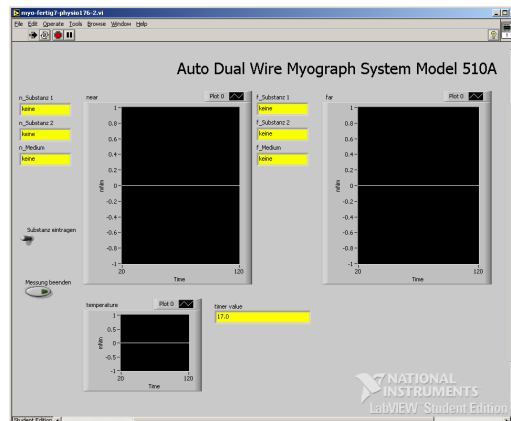


Abb. 24: Applikation zur Aufzeichnung der Messwerte und Protokollierung des Versuchsverlaufs

Es wurde in LabView eine Applikation entwickelt, die die gemessenen Kraftwerte sowie Informationen über den Versuchsverlauf aufzeichnet, grafisch darstellt und in Textdateien abspeichert.

Nachfolgend ist eine Messung in einer *A. gracilis* dargestellt (Abb. 25). Ausgehend von der Kraft des unstimulierten aber vorgespannten Gefäßes induziert die Gabe von Noradrenalin (NA, 10^{-6} mol/L) eine Kontraktion, die als Kraftanstieg zu erkennen ist. Die kumulative Stimulation des Gefäßes mit Acetylcholin (ACh) führt zu einer Relaxation, wie an der Abnahme der Kraft zu erkennen ist. Für die Berechnung der prozentualen Relaxation wurde die Zunahme der Spannung nach Applikation des Konstriktors als 100% angenommen. Dabei handelt es sich bei allen gemessenen Werte um Mittelwerte eines 10 s Messintervalls. Die Spannung, die 2 min nach Applikation des Dilatators gemessen wurde, wurde für die Berechnung der prozentualen Relaxation verwendet. Die prozentuale Relaxation errechnet sich wie folgt:

$$Relaxation [\%] = 100 \cdot \frac{F_k - F_d}{K}$$

F_k = Kraft nach Applikation des Konstriktors [mN]

F_d = Kraft nach Applikation des Dilatators [mN]

K = Kraftdifferenz vor und nach Applikation des Konstriktors [mN]

Da zusätzlich die Längen der untersuchten Gefäße gemessen wurden, kann die Kraft des jeweiligen Gefäßes auch auf seine Länge normalisiert werden [mN/mm].

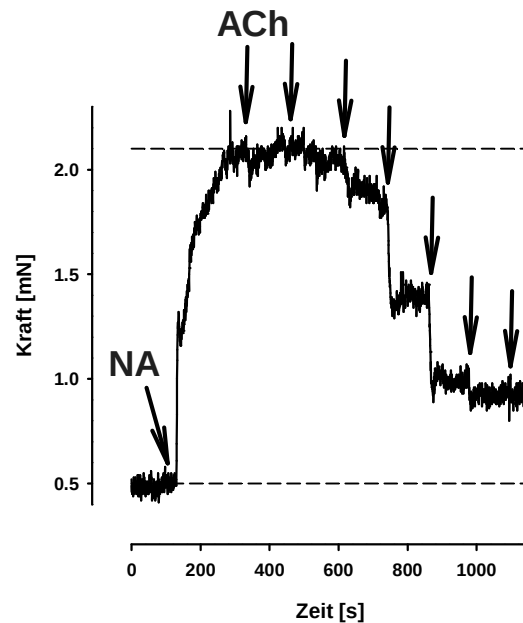


Abb. 25 Messung in einer *A. gracilis* unter isometrischen Bedingungen

Auf die Applikation von Noradrenalin (NA: 10^{-6}) kontrahiert die *A. gracilis*. Dieses ist an der Kraftzunahme zu erkennen. Die Applikation von Acetylcholin (ACh) in steigenden Konzentrationen führt zur Relaxation, die an der Abnahme der Kraft zu erkennen ist. Als maximal mögliche Relaxation (100%) wurde der Bereich zwischen den gestrichelten Linien verwendet, der der Noradrenalininduzierten Kraftzunahme entspricht.

3.3.1.2 Isobare Untersuchung

Als weitere Methode zur Untersuchung der Gefäße unter isobaren Bedingungen wurde die Druckmyographie etabliert. Bei dem verwendeten Druckmyographen (Abb. 26) handelt es sich um einen Eigenbau, der in der universitätseigenen Werkstatt angefertigt wurde.

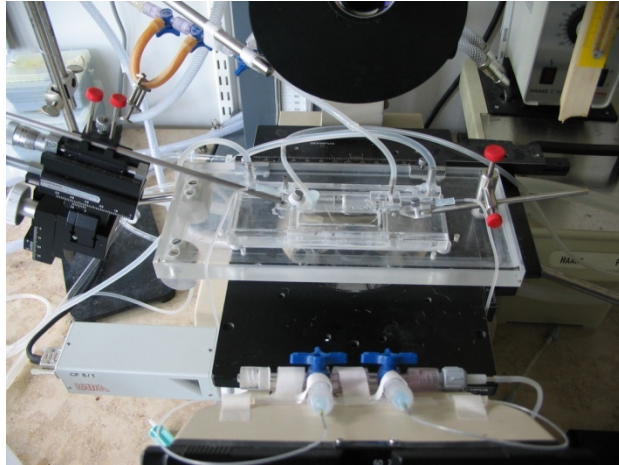


Abb. 26: Druckmyograph für den Anbau an ein inverses Mikroskop

In der universitätseigenen Werkstatt wurde ein Druckmyograph hergestellt, der für die Untersuchung an einem inversen Mikroskop geeignet ist.

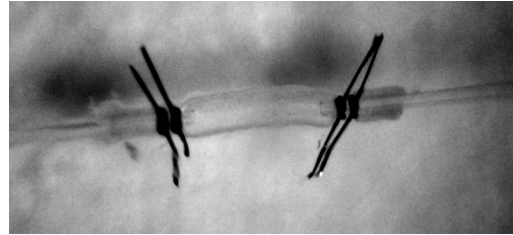


Abb. 27: Isoliertes Gefäß unter isobaren Bedingungen
Der Druckmyograph ermöglicht die Untersuchung isolierter Gefäße unter konstantem Druck.

Unter isobaren Bedingungen wird der Durchmesser eines isolierten Gefäßes (Abb. 27) bei konstantem transmuralen Druck aufgenommen. Zu diesem Zweck wurde an unserem Institut eine Applikation in LabView (National Instruments, Texas) entwickelt, die das Videosignal der Kamera des Mikroskops erfasst und automatisch mit einer zeitlichen Auflösung von 2 Hz den Gefäßdurchmesser ermittelt (Abb. 28).

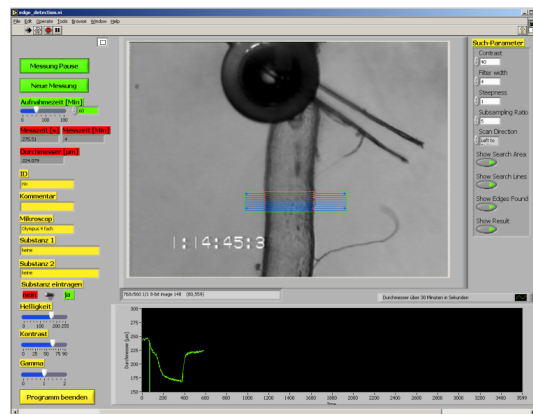


Abb. 28: Programm zur Messung des Gefäßdurchmessers

Das Signal der Kamera des Mikroskops wird dargestellt und der Gefäßdurchmesser automatisch bestimmt. Zusammen mit Informationen über den Verlauf des Versuchs werden die Daten in einer Textdatei gespeichert. Während der Untersuchung wird die Änderung des Durchmessers über die Zeit (unteres Fenster) dargestellt.

Wie die Untersuchung einer *A. gracilis* zeigt (Abb. 29), induziert die Applikation von Noradrenalin (NA: 10^{-6} mol/L) eine Kontraktion, die als Abnahme des Durchmessers zu erkennen ist. Acetylcholin (ACh) führt konzentrationsabhängig zur Dilatation, die an der Zunahme des Gefäßdurchmessers zu erkennen ist. Am Ende des jeweiligen Versuchs wurde das Gefäß mit calciumfreier Lösung inkubiert und der Maximaldurchmesser bestimmt. Für

die Berechnung der prozentualen Dilatation wurde der Durchmesser in einem Intervall von 10 s vor Applikation der ersten Konzentration des Dilatators gemessen. Die Differenz zwischen dem Ausgangs- und dem Maximaldurchmesser wurde als maximal mögliche Durchmesseränderung verwendet. Die Durchmesseränderung nach Applikation eines Dilatators wird dann auf die maximal mögliche Änderung normalisiert und in Prozent angegeben.

$$Dilatation [\%] = 100 \cdot \frac{d_d - d_k}{d_{max} - d_k}$$

d_d = Durchmesser nach Applikation des Dilatators [μm]

d_k = Durchmesser nach Applikation des Konstriktors [μm]

d_{max} = Maximaldurchmesser [μm]

Führte die Applikation des Dilatators zu einer Kontraktion, wurde die Durchmesseränderung bezogen auf den Durchmesser nach Applikation des Konstriktors berechnet. Unter der Annahme, dass eine mögliche Kontraktion zum kompletten Verschluss des Gefäßes führt, ist dieses Vorgehen analog zur Berechnung der prozentualen Dilatation. Es wurde wie folgt berechnet.

$$Durchmesseränderung [\%] = 100 \cdot \frac{d_d - d_k}{d_k}$$

d_d = Durchmesser nach Applikation des Dilatators [μm]

d_k = Durchmesser nach Applikation des Konstriktors [μm]

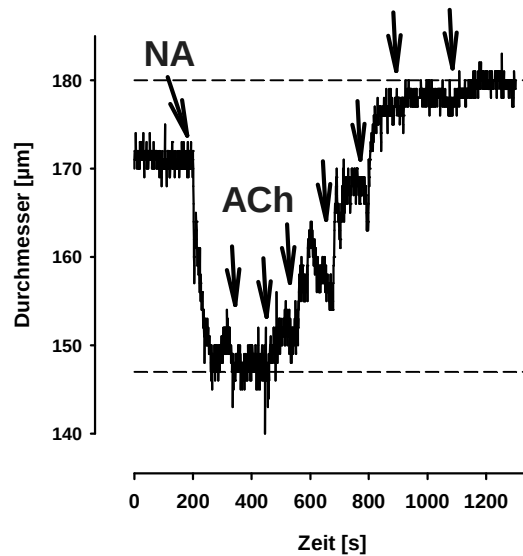


Abb. 29: Untersuchung einer *A. gracilis* unter isobaren Bedingungen

An der Abnahme des Durchmessers ist zu erkennen, dass das Gefäß nach der Applikation von Noradrenalin (NA, 10^{-6} mol/L) kontrahiert. Die Applikation von Acetylcholin (ACh) in aufsteigenden Konzentrationen führt zur Dilatation, die an der Zunahme des Durchmesser zu erkennen ist. Als maximal mögliche Dilatation wurde der Bereich zwischen den gestrichelten Linien verwendet. Der maximal mögliche Durchmesser wurde am Ende des Versuches durch Inkubation mit calciumfreier Lösung ermittelt.

3.3.1.3 *In vivo* Untersuchung

Da die Untersuchung der *A. gracilis* *in vivo* mit Hilfe der konventioneller Durchlichtmikroskopie nicht möglich ist, wurde eine Methode etabliert, bei der an Stelle eines Durchlichtmikroskops ein Auflichtmikroskop verwendet wird (Abb. 30). An dieses ist eine Kamera angeschlossen, über die Bilder mit AquaL aufgenommen wurden, in denen dann die Durchmesser (Abb. 31) gemessen wurden.

Der Maximaldurchmesser der Gefäße wurde durch die gleichzeitige Applikation von SNP, ACh und Adenosin (Endkonzentration jeweils 10^{-4} mol/L) am Ende des jeweiligen Versuches bestimmt. Die prozentuale Dilatation wurde wie unter isobaren Bedingungen berechnet.



Abb. 30: In vivo Untersuchung mittels Auflichtmikroskopie

Mit Hilfe der Auflichtmikroskopie können Gefäße, die der Durchlichtmikroskopie nicht zugänglich sind, *in vivo* untersucht werden.

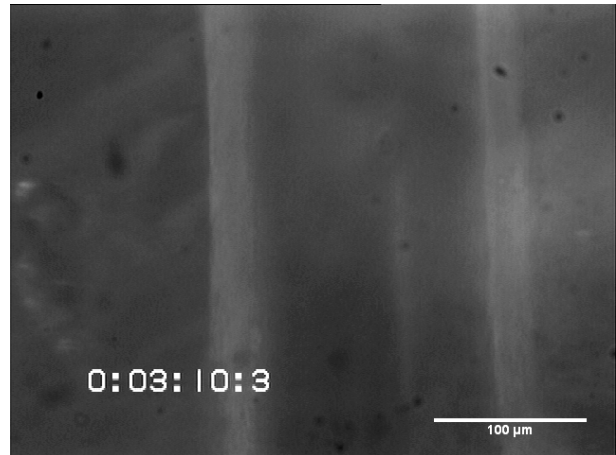


Abb. 31: Bild der *A. gracilis* *in vivo*

Gefäßdurchmesser werden in Bildern gemessen, die mit Hilfe der digitalen Kamera des Mikroskops und AQuaL aufgezeichnet wurden.

3.3.2 NO und PGI₂ in unterschiedlichen Gefäßen

Die relative Bedeutung der endothelialen Autakoide wurde zunächst orientierend in verschiedenen Gefäßen unter isometrischen Bedingungen untersucht, indem nach Erhebung von Kontrollwerten zunächst die NO- und Prostaglandin-Synthese gehemmt und anschließend EDHF charakterisiert wurde. Letzteres geschah in Anwesenheit einer Kaliumchloridlösung (KCl, 50 mmol/L), die eine Hyperpolarisation nach Aktivierung von K⁺-Kanälen verhindert.

Es wurden zunächst Mesenterialgefäße (*A. mesenterialis*; 206±33 µm) von 5 Wildtypmäusen untersucht. Die Applikation von Noradrenalin (NA; 10⁻⁶ mol/L) induzierte eine Kontraktion und der endothelabhängige Dilator Acetylcholin (ACh, Abb. 32, A) relaxierte die Gefäße konzentrationsabhängig. Nach Hemmung der NO-Synthase und der Cyclooxygenase mit L-Nitro-Arginin (LN) und Indomethacin (Indo) war die ACh-vermittelte Relaxation in vorkontrahierten Gefäßen nahezu aufgehoben. Nach Vorkontraktion der Gefäße mit Kaliumchlorid (50 mmol/L) war die verbliebene Relaxation komplett aufgehoben. Die endothelunabhängige Relaxation, induziert durch die Applikation des NO-Donors Natrium-Nitroprussid (SNP, Abb. 32, B), war nach Inkubation mit LN/Indo im Vergleich zu den Kontrollbedingungen nicht abgeschwächt. Nach Vorkontraktion mit Kaliumchlorid war die NO-induzierte Relaxation zwar signifikant reduziert, es verblieb jedoch eine deutliche Relaxation. Die Ergebnisse zeigen, dass NO und PGI₂ die Hauptmediatoren der ACh-induzierten Dilatation der Mesenterialgefäße sind. EDHF trägt dagegen nur zu einem geringen Teil zu der endothelabhängigen Dilatation dieser Gefäße bei.

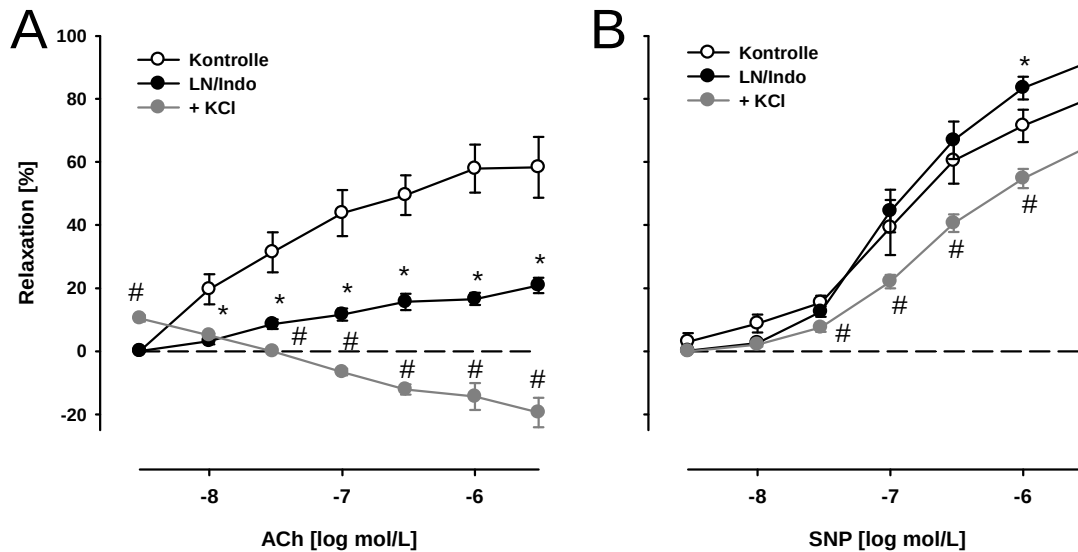


Abb. 32: NO/PGI₂-medierte Dilatation in der A. mesenterialis

Die endothelabhängige Relaxation (A) in der A. mesenterialis war nach Inhibition der NO-Synthase und der Cyclooxygenase (LN/Indo) signifikant reduziert und aufgehoben unter depolarisierenden Bedingungen (+KCl). Die endothelunabhängige Relaxation (B) war nach LN/Indo bei einer Konzentration von 10^{-6} mol/L SNP signifikant erhöht. Depolarisierende Bedingungen führten zu einer geringen aber signifikanten Abschwächung. *: $P < 0.05$ LN/Indo vs. Kontrolle; #: $P < 0.05$ LN/Indo+KCl vs. LN/Indo.

Tabelle 3: Gemessene Kraft der Mesenterialarterien

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Kraftmessung normalisiert auf die Gefäßlänge vor und nach Applikation des Konstriktors (Noradrenalin: $NA\ 10^{-6}$ mol/L, KCl: 50 mmol/L) sowie nach Applikation des Dilators (ACh, SNP 10^{-6} mol/L). n=Anzahl der Beobachtungen.

Behandlung	Agonist	vor NA/KCl		nach NA/KCl		nach ACh/SNP	
		[mN/mm]	n	[mN/mm]		[mN/mm]	n
Kontrolle	ACh	1.25±0.08	10	3.19±0.27		1.99±0.17	10
LN/Indo	ACh	1.11±0.10	10	3.89±0.36		3.43±0.31	10
+KCl	ACh	1.09±0.10	10	2.29±0.30		2.43±0.32	10
Kontrolle	SNP	1.12±0.10	10	3.02±0.34		1.67±0.18	10
LN/Indo	SNP	1.20±0.11	10	4.18±0.46		1.61±0.11	10
+KCl	SNP	1.10±0.11	10	2.65±0.32		1.76±0.17	10

In der A. femoralis (7 Mäuse, $241 \pm 30\ \mu\text{m}$, Abb. 33) führte die Applikation von Noradrenalin (NA: 10^{-6} mol/L) unter Kontrollbedingungen zur Kontraktion und ACh (Abb. 33, A) induzierte eine konzentrationsabhängige Dilatation. Diese war nach Hemmung der NO-Synthase und der Cyclooxygenase (LN/Indo) signifikant reduziert. Nach Vorkontraktion der Gefäße mit Kaliumchloridlösung (50 mmol/L) war die verbliebene Dilatation nahezu aufgehoben. Die endothelunabhängige Dilatation (Abb. 33, B) unter Kontrollbedingungen blieb in Anwesenheit von LN/Indo intakt, war aber signifikant abgeschwächt nach Vorkontraktion mit KCl. Ebenso wie in der A. mesenterialis sind ACh-vermittelte Dilatationen in der A. femoralis vor allem NO- und PGI₂-mediert. Des Weiteren bleibt die endothelunabhängige Dilatation von der Inkubation mit LN/Indo unbeeinflusst.

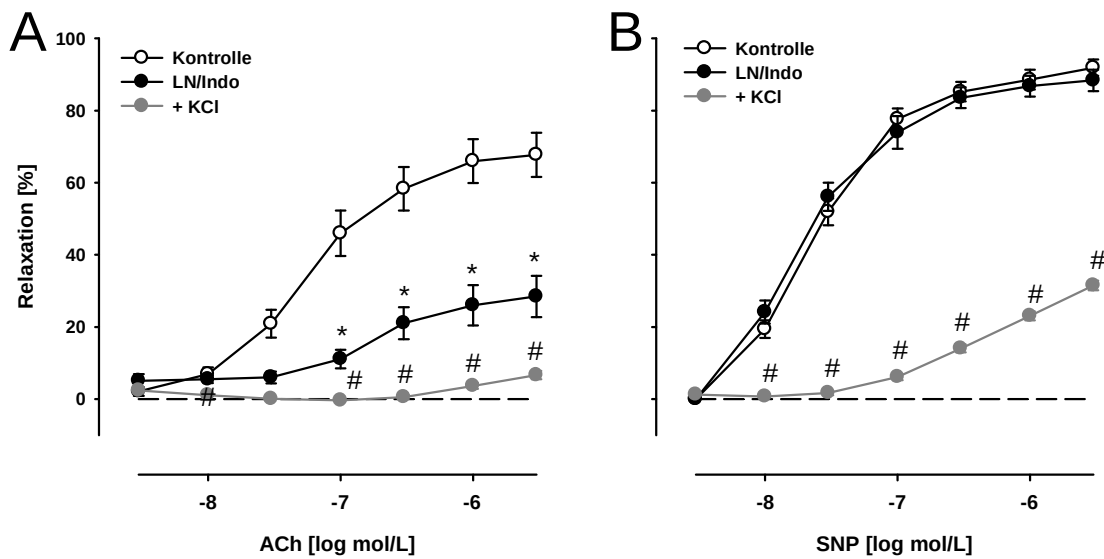


Abb. 33: NO/PGI₂-medierte Dilatation in isolierten Femoralarterien

ACh-induzierte Dilatationen (A) waren nach der Inkubation mit LN/Indo signifikant reduziert und nahezu aufgehoben nach der Vorkontraktion mit Kaliumchlorid (50 mmol/L). Endothelunabhängige Dilatationen wurden durch die Inkubation mit LN/Indo nicht beeinflusst, waren aber unter depolarisierenden Bedingungen (+KCl) signifikant reduziert (B).*: $P < 0.05$ LN/Indo vs. Kontrolle; #: $P < 0.05$ LN/Indo+KCl vs. LN/Indo

Tabelle 4: Gemessene Kraft der Aa. femorales

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Kraftmessung normalisiert auf die Gefäßlänge vor und nach Applikation des Konstriktors (Noradrenalin: NA 10^{-6} mol/L, KCl: 50 mmol/L) sowie nach Applikation des Dilatators (ACh, SNP 10^{-6} mol/L). n=Anzahl der Beobachtungen.

Behandlung	Agonist	vor NA/KCl		nach NA/KCl		nach ACh/SNP	
		[mN/mm]	n	[mN/mm]	n	[mN/mm]	n
Kontrolle	ACh	1.33±0.08	14	2.60±0.42	14	1.60±0.12	14
LN/Indo	ACh	1.20±0.08	14	1.68±0.10	14	1.53±0.08	14
+KCl	ACh	1.31±0.05	10	4.88±0.35	10	4.76±0.35	10
Kontrolle	SNP	1.30±0.07	13	2.57±0.38	13	1.39±0.08	13
LN/Indo	SNP	1.21±0.07	14	2.04±0.16	14	1.29±0.08	14
+KCl	SNP	1.21±0.08	14	5.02±0.40	14	4.13±0.32	14

Weiterhin wurden kleine Arterien (A. gracilis, 12 Mäuse, $137 \pm 28 \mu\text{m}$, Abb. 34) untersucht. Die deutliche ACh-induzierte Dilatation (Abb. 34, A) unter Kontrollbedingungen war nach Inkubation mit L-Nitro-Arginin (LN) und Indomethacin (Indo) signifikant abgeschwächt und wich nach Vorkontraktion mit Kaliumchlorid (KCl: 50 mmol/L) einer Kontraktion. Die endothelunabhängige Dilatation (SNP, Abb. 34, B) war nach Inkubation mit LN/Indo nicht abgeschwächt aber die Vorkontraktion mit Kaliumchlorid führte zu einer signifikanten Minderung der SNP-induzierten Dilatation. Somit beruht die endothelabhängige Dilatation in A. gracilis sowohl auf NO und PGI₂, als auch auf EDHF.

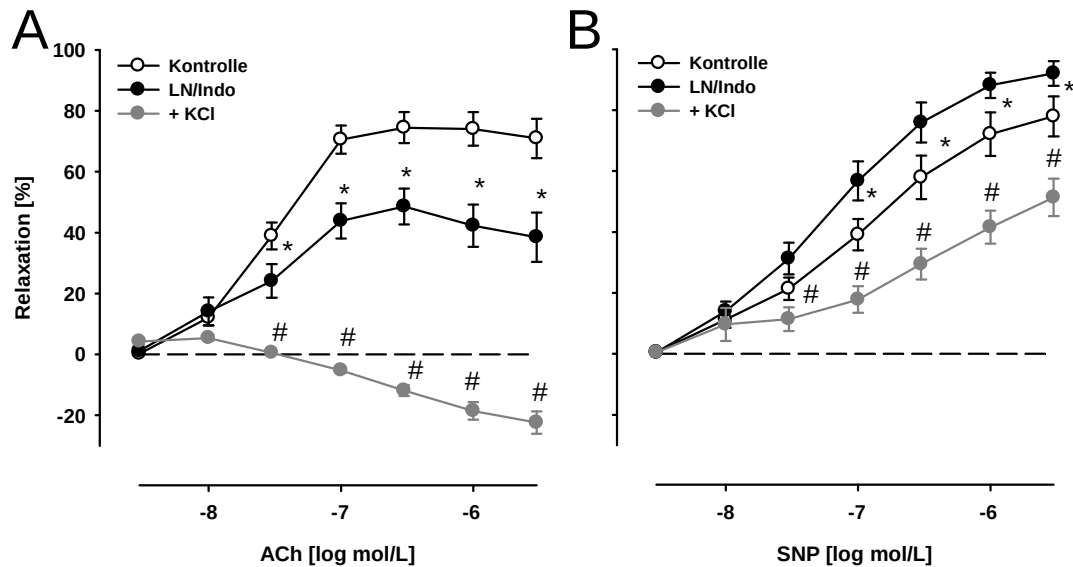


Abb. 34: EDHF-mediierte Dilatation in isolierten *A. gracilis*

Die Inkubation mit LN/Indo führte zu einer signifikanten Abschwächung der ACh-induzierten Dilatation (A). Diese war unter depolarisierenden Bedingungen (+KCl) aufgehoben. Endothelunabhängige Dilatationen (B) wurden nicht durch die Inkubation mit LN/Indo abgeschwächt, waren aber bei hoher Kaliumchlorid-Konzentration (+KCl) signifikant reduziert. *: $P < 0.05$ LN/Indo vs. Kontrolle; #: $P < 0.05$ KCl vs. LN/Indo

Tabelle 5: Gemessene Kraft der *A. gracilis*

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Kraftmessung normalisiert auf die Gefäßlänge vor und nach Applikation des Konstriktors (Noradrenalin: 10^{-6} mol/L, KCl: 50 mmol/L) sowie nach Applikation des Dilatators (ACh, SNP 10^{-6} mol/L). n=Anzahl der Beobachtungen.

Behandlung	Agonist	vor NA/KCl		nach NA/KCl		nach ACh/SNP	
		[mN/mm]	n	[mN/mm]	n	[mN/mm]	n
Kontrolle	ACh	0.49 ± 0.03	15	1.17 ± 0.10	15	0.69 ± 0.07	15
LN/Indo	ACh	0.33 ± 0.04	16	1.18 ± 0.11	16	0.82 ± 0.08	16
+KCl	ACh	0.24 ± 0.07	13	1.13 ± 0.18	13	1.30 ± 0.22	13
Kontrolle	SNP	0.38 ± 0.04	13	1.01 ± 0.09	13	0.55 ± 0.07	13
LN/Indo	SNP	0.31 ± 0.06	14	1.33 ± 0.16	14	0.41 ± 0.08	14
+KCl	SNP	0.35 ± 0.13	12	1.33 ± 0.21	12	0.97 ± 0.20	12

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass in allen Gefäßen endothelvermittelte Dilatationen unter isometrischen Bedingungen zu beobachten sind, die eine 60-80% Dilatation induzieren können. Während in Leitungsgefäßen NO und PGI_2 im Vordergrund stehen und der Anteil des EDHF eher gering ist, beruht in kleinen Arterien ein relativ größerer Anteil der Dilatation auf EDHF. Die Aktivierung von K^+ -Kanälen ist an der NO- und PGI_2 -unabhängigen (EDHF) Dilatation beteiligt, was durch die Sensitivität gegenüber KCl gezeigt wurde. Dieses lässt K^+ -Kanäle somit als Aktivatoren oder Effektoren des EDHF in Betracht kommen. Die globale Applikation von KCl lässt aber keine Aussage darüber zu, ob die Kanäle im Endothel bei der Freisetzung des EDHF oder im glatten Muskel als Endstrecke des EDHF fungieren.

3.3.3 NO ist der Hauptmediator in Leitungsgefäßen

Da NO und PGI_2 als Mediatoren der endothelabhängigen Dilatation in Leitungsgefäßen dominieren, wurde zwischen diesen beiden Autakoiden differenziert. Hierzu wurden Femoralarterien aus 6 Wildtypmäusen ($298 \pm 37 \mu\text{m}$, Abb. 35) isoliert und unter isometrischen Bedingungen untersucht. Nach Erfassung der Kontrollwerte wurden die Gefäße zunächst mit Indomethacin (Indo) und anschließend zusätzlich mit L-Nitro-Arginin (+LN) inkubiert. Des Weiteren wurden die Gefäße dieser Versuchsserie mit einer höheren Noradrenalin-Konzentration ($\text{NA}: 3 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$) vorkontrahiert, was zu stärkeren Kontraktionskräften führte. Bei der Untersuchung der endothelabhängigen Dilatation (ACh, Abb. 35, A) kontrahierten die Gefäße nach Applikation von Noradrenalin und relaxierten konzentrationsabhängig unter Kontrollbedingungen. Die Hemmung der Cyclooxygenase (Indo) hatte keinen Einfluss auf die Relaxation. Nach zusätzlicher Hemmung der NO-Synthase (+ LN) war die Dilatation nahezu aufgehoben. Die Anwesenheit von L-Nitro-Arginin und Indomethacin (LN/Indo) hatte keinen Einfluss auf die endothelunabhängige Relaxation (SNP, Abb. 35, B). Mit diesen Untersuchungen konnte NO als Hauptmediator endothelabhängiger Dilatationen in Leitungsgefäßen (A. femoralis) identifiziert werden.

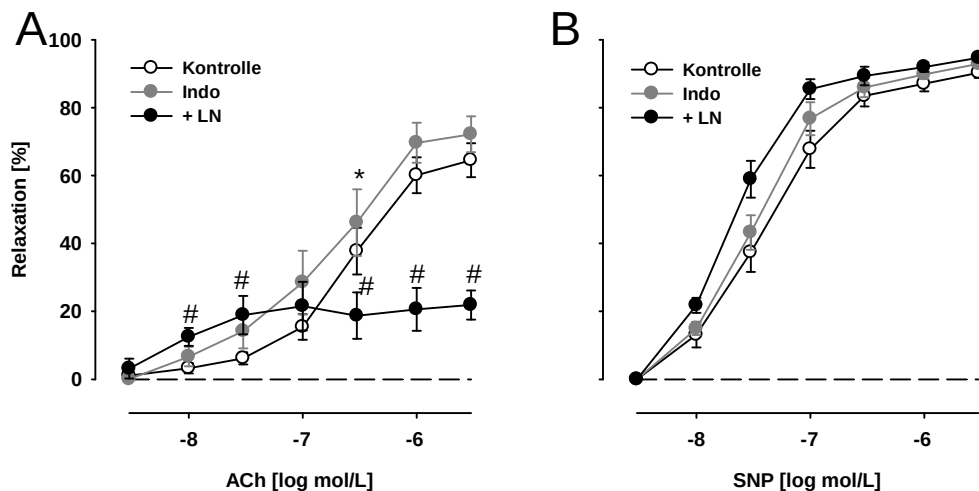


Abb. 35: NO ist der Hauptmediator in Leitungsgefäßen

In der A. femoralis waren die ACh-induzierten Dilatationen nach Inkubation mit Indomethacin (Indo) nicht beeinflusst, aber nahezu aufgehoben nach zusätzlicher Inkubation mit L-Nitro-Arginin (LN/Indo). Die Hemmer hatten keinen Einfluss auf endothelunabhängige Dilatationen (B). *: $P < 0.05$ Indo vs. Kontrolle, #: $P < 0.05$ +LN vs. Indo.

Tabelle 6: Gemessene Kraft der Aa. femorales

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Kraftmessung normalisiert auf die Gefäßlänge vor und nach Applikation des Konstriktors (Noradrenalin: NA $3 \cdot 10^{-6}$ mol/L) sowie nach Applikation des Dilatators (ACh, SNP 10^{-6} mol/L). n=Anzahl der Beobachtungen.

Behandlung	Agonist	vor NA		nach NA		nach ACh/SNP	
		[mN/mm]	n	[mN/mm]	n	[mN/mm]	n
Kontrolle	ACh	2.07±0.10	11	8.65±0.69	11	4.75±0.45	11
Indo	ACh	1.87±0.10	8	8.82±0.66	8	4.14±0.43	8
LN/Indo	ACh	1.84±0.09	10	7.34±0.62	10	6.28±0.62	10
Kontrolle	SNP	1.94±0.10	11	9.21±0.78	11	2.98±0.30	11
Indo	SNP	2.01±0.08	8	9.79±0.63	8	2.84±0.17	8
LN/Indo	SNP	1.90±0.11	11	7.71±0.48	11	2.37±0.14	11

3.3.4 Connexinexpression in der A. femoralis

Zur Untersuchung der Expression und der Lokalisation von Connexin40 wurde die Immunohistochemie in isolierten Gefäßen etabliert. Connexine bilden direkte cytoplasmatische Verbindungen (gap junctions) zwischen Zellen. Nachfolgend wurde untersucht, ob und wo Connexin40 in Leitungsgefäßen (A. femoralis) exprimiert war.

Die Ergebnisse zeigen, dass Connexin40 im Innenbereich der A. femoralis exprimiert wurde (Abb. 36, C, D). Weiterhin lässt die Morphologie der markierten Strukturen darauf schließen, dass das Connexin40 in Endothelzellen exprimiert wurde (Abb. 36, E, F). Unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers konnten ausgeschlossen werden, da keine Fluoreszenz in Präparaten erkennbar war, die ohne den primären Antikörper markiert wurden (Abb. 36, A, B). Die Immunohistochemie zeigt, dass Connexin40 in Leitungsgefäßen vor allem im Endothel exprimiert wird.

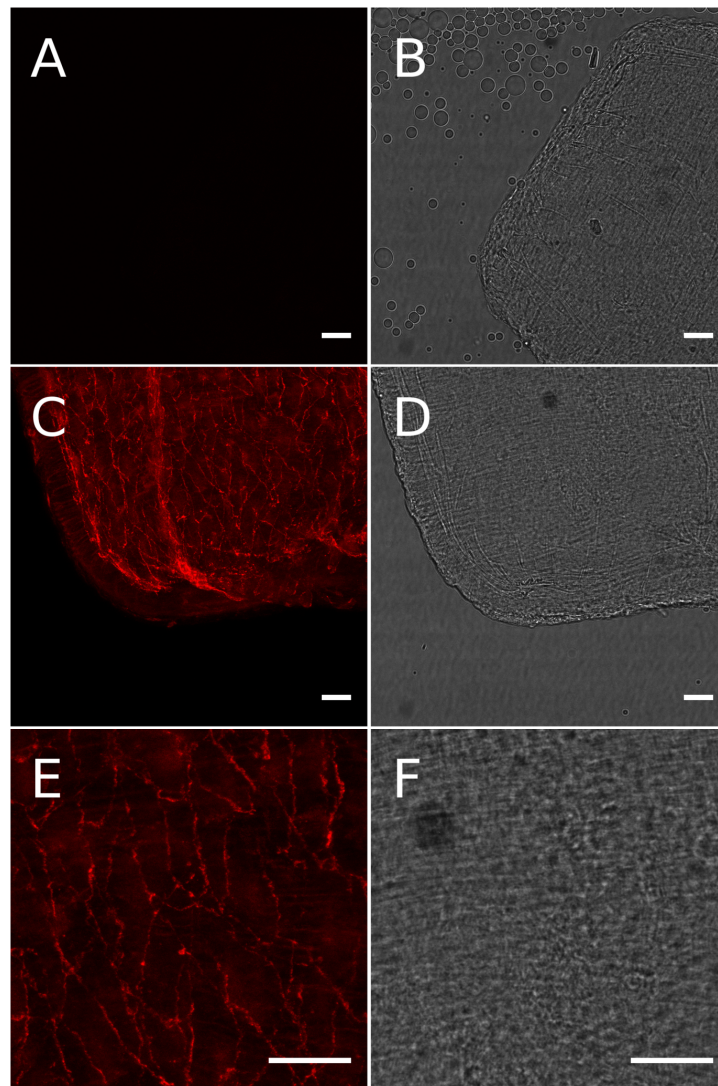


Abb. 36: Immunmarkierung des Connexin40

An isolierten A. femoralis wurde die Immunhistochemie zum Nachweis des Connexin40 durchgeführt. In der Kontrolle ohne primären Antikörper findet sich keine Fluoreszenz des sekundären Antikörpers (A, B). Markierungen mit dem primären Antikörper zeigten Fluoreszenz hauptsächlich im Innenbereich der Gefäße (C, D). Das Muster der Färbung lässt auf Endothelzellen schließen (E, F). Kalibrationsbalken: 20 μm .

3.3.5 NO-medierte Dilatation und Connexine in Leitungsgefäßen

Der Nachweis des Connexin40 im Innenbereich der A. femoralis warf die Frage auf, inwieweit es von funktioneller Relevanz bei endothelabhängigen Dilatationen ist. Zur Klärung dieser Frage wurden Leitungsgefäße (A. femoralis) aus 5 transgenen Connexin40-defizienten ($\text{Cx40}^{-/-}$, $210 \pm 34 \mu\text{m}$) und 5 Cx40-knockout-Cx45-knockin (Cx40KI45 , $220 \pm 26 \mu\text{m}$) Mäusen untersucht (Abb. 37, Abb. 38) und mit den zuvor erhobenen Daten der Wildtypgefäße (Abb. 33) verglichen. Den Connexin40-defizienten Mäusen fehlt Connexin40 wohingegen es in Cx40KI45 -Mäusen durch Connexin45 ersetzt ist.

Unter Kontrollbedingungen induzierte Noradrenalin (NA; 10^{-6} mol/L) eine Kontraktion und der endothelabhängige Dilatator Acetylcholin (ACh, Abb. 37 A) eine ausgeprägte Relaxation. Diese war nach Hemmung der NO- und PGI_2 - Synthese (Abb. 37, B) deutlich reduziert. Im Vergleich zu Wildtypgefäßen war die endothelabhängige Relaxation in beiden untersuchten Genotypen unter Kontrollbedingungen nicht abgeschwächt sondern sogar stärker. Auch in den gentechnisch modifizierten Mäusen war die Relaxation sensitiv gegenüber LN/Indo (Abb. 37, B).

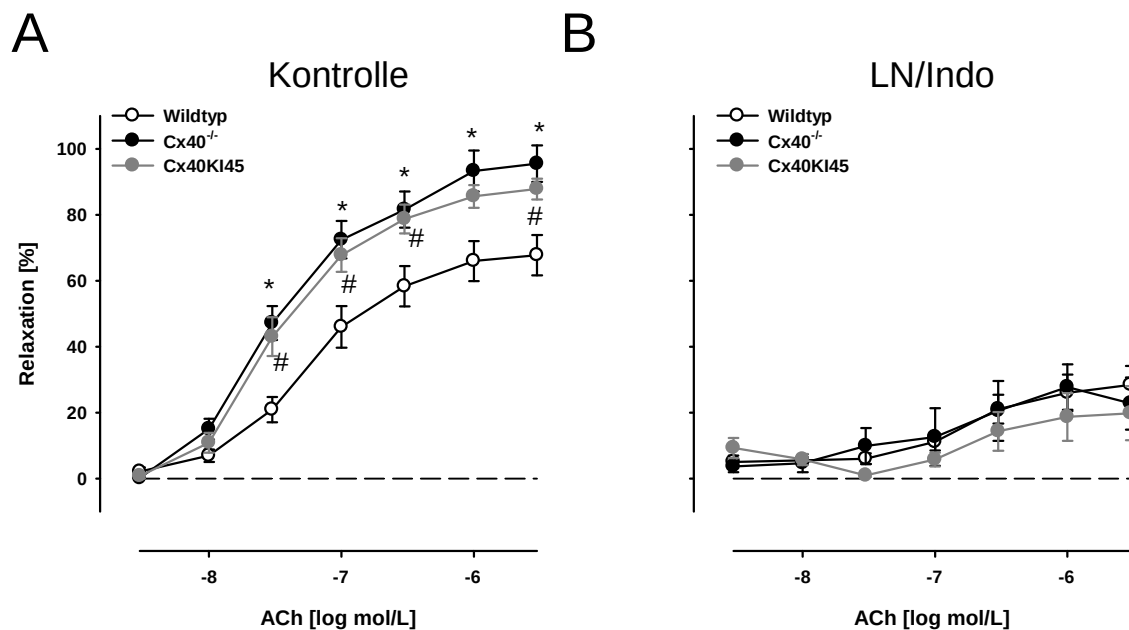


Abb. 37: Endothelabhängige Dilatationen in Cx40-defizienten Femoralarterien

Unter Kontrollbedingungen induzierte ACh eine deutliche Relaxation in Cx40^{-/-} und Cx40KI45 Gefäßen, die ausgeprägter war als in Wildtypgefäßen (A). Nach Hemmung der NO-Synthase und Cyclooxygenase war die ACh-induzierte Relaxation deutlich reduziert (B). *, #: $P < 0.05$ vs. Wildtyp

Die endothelunabhängige Dilatation (SNP, Abb. 38, A) blieb durch die Inhibitoren L-Nitro-Arginin und Indomethacin (LN/Indo, Abb. 38, B) in den untersuchten Genotypen unbeeinflusst.

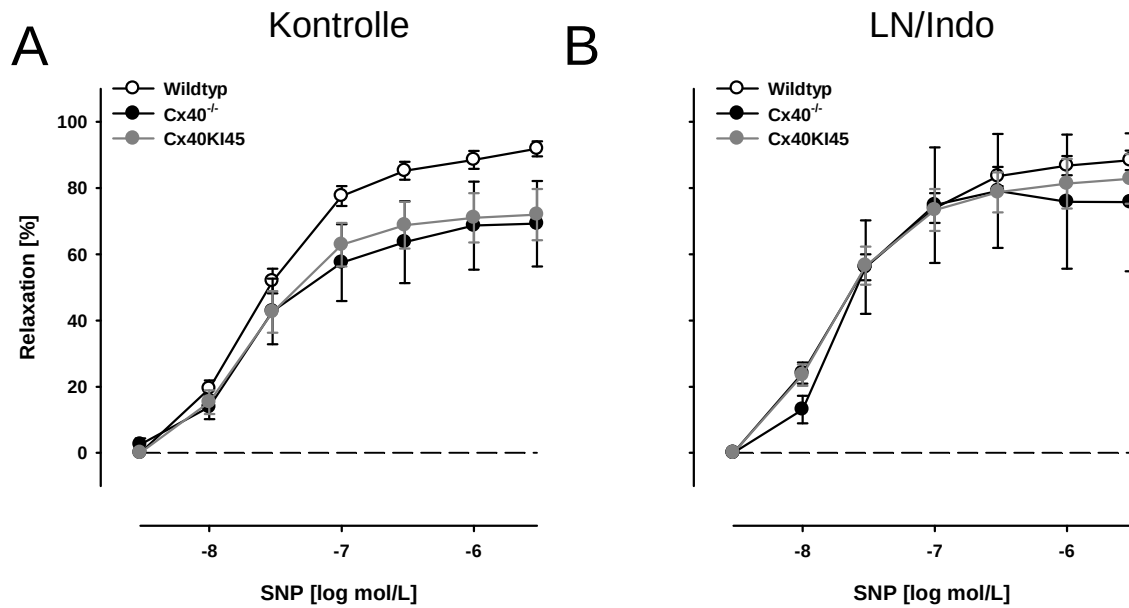


Abb. 38: Endothelunabhängige Dilatationen in Cx40-defizienten Femoralarterien

SNP induzierte unter Kontrollbedingungen konzentrationsabhängige Relaxationen, die in Cx40^{-/-}, Cx40KI45 und Wildtypgefäßen vergleichbar waren (A) und auch durch LN/Indo nicht beeinflusst wurden (B).

Tabelle 7: Gemessene Kraft der Aa. femorales

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Kraftmessung normalisiert auf die Gefäßlänge vor und nach Applikation des Konstriktors (Noradrenalin: NA 10⁻⁶ mol/L, KCl: 50 mmol/L) sowie nach Applikation des Dilatators (ACh, SNP 10⁻⁶ mol/L). n=Anzahl der Beobachtungen.

Behandlung	Agonist	Genotyp	vor NA/KCl		nach NA/KCl		nach ACh/SNP	
			[mN/mm]	n	[mN/mm]	n	[mN/mm]	n
Kontrolle	ACh	Cx40 ^{-/-}	1.32±0.06	9	1.85±0.12	9	1.35±0.06	9
Kontrolle	ACh	Cx40KI45	1.12±0.07	10	2.27±0.28	10	1.27±0.07	10
LN/Indo	ACh	Cx40 ^{-/-}	1.18±0.05	7	1.73±0.20	7	1.57±0.15	7
LN/Indo	ACh	Cx40KI45	0.87±0.06	10	1.72±0.23	10	1.50±0.15	10
+KCl	ACh	Cx40 ^{-/-}	1.06±0.08	10	3.85±0.50	10	3.74±0.49	10
+KCl	ACh	Cx40KI45	0.82±0.08	10	4.45±0.54	10	4.26±0.57	10
Kontrolle	SNP	Cx40 ^{-/-}	1.26±0.05	8	1.66±0.07	8	1.32±0.05	8
Kontrolle	SNP	Cx40KI45	0.90±0.06	10	1.71±0.18	10	1.06±0.05	10
LN/Indo	SNP	Cx40 ^{-/-}	1.23±0.12	4	2.38±0.69	4	1.20±0.03	4
LN/Indo	SNP	Cx40KI45	0.88±0.07	10	1.58±0.23	10	0.99±0.07	10
+KCl	SNP	Cx40 ^{-/-}	1.19±0.07	10	4.20±0.53	10	3.19±0.39	10
+KCl	SNP	Cx40KI45	0.86±0.08	10	5.16±0.65	10	3.80±0.53	10

3.3.6 Ca²⁺-abhängiger K⁺-Kanal (IK) bei der NO-medierten Dilatationen

Die Rolle des Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanals mittlerer Leitfähigkeit (IK) bei der endothelabhängigen NO-medierten Dilatation wurde an isolierten Aa. femorales (289±40 µm) aus 7 IK-defizienten Mäusen (IK^{-/-}) untersucht und mit den Relaxationen der entsprechenden Wildtypiere (Abb. 35) verglichen.

In den $IK^{-/-}$ Gefäßen führte die Applikation von ACh unter Kontrollbedingungen konzentrationsabhängig zu einer deutlichen Relaxation (ACh, Abb. 39, A), die durch die Hemmung der Cyclooxygenase (Indo, Abb. 39, B) nicht abgeschwächt wurde. Nach der zusätzlichen Hemmung der NO-Synthase (LN/Indo) war die ACh-induzierte Dilatation nahezu aufgehoben (Abb. 39, C). Somit ist NO der Hauptmediator der endothelabhängigen Dilatation sowohl in Wildtypgefäßen als auch in IK-defizienten Gefäßen. Dies legt nahe, dass die Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanäle mittlerer Leitfähigkeit (IK) für die endotheliale NO-Freisetzung nach ACh nicht relevant sind.

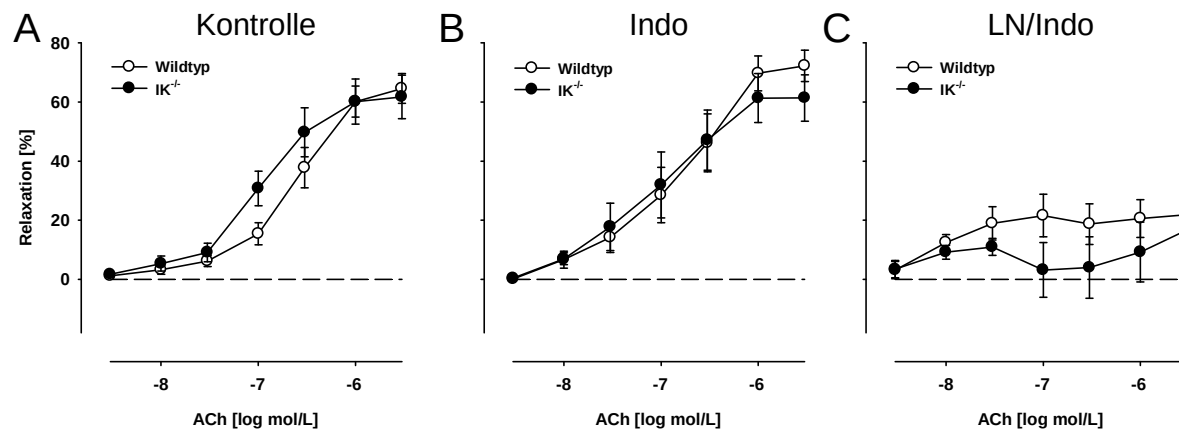


Abb. 39: Endothelabhängige Relaxationen sind unabhängig von IK-Kanälen in der A. femoralis

In der A. femoralis isoliert aus $IK^{-/-}$ Tieren induzierte ACh unter Kontrollbedingungen eine konzentrationsabhängige Relaxation (A), die nach der Hemmung der Cyclooxygenase intakt war (B). Die Relaxationen der $IK^{-/-}$ Gefäße waren mit denen der Wildtypgefäße vergleichbar und sensitiv gegen LN.

Der endothelunabhängig wirkende NO-Donor SNP induzierte eine Relaxation in $IK^{-/-}$ Gefäßen, die durch die Inkubation mit den Hemmern Indomethacin (Indo) und L-Nitro-Arginin (LN) nicht beeinflusst wurde (SNP, Abb. 40). Diese Relaxation war mit den Relaxationen der Wildtypgefäße vergleichbar (SNP, Abb. 35, B, S.49).

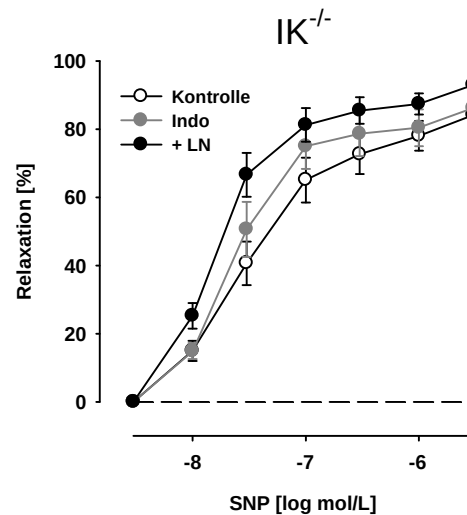


Abb. 40: Endothelunabhängige Relaxationen in IK-defizienten Femoralarterien

In den IK-defizienten Gefäßen blieb die endothelunabhängige Dilatation (SNP) nach Inkubation mit dem Hemmer der Cyclooxygenase (Indo) sowie nach zusätzlicher Hemmung der NO-Synthase (LN/Indo) unbeeinflusst.

Tabelle 8: Gemessene Kraft der A. femoralis

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Kraftmessung normalisiert auf die Gefäßlänge vor und nach Applikation des Konstriktors (Noradrenalin: NA $3 \cdot 10^{-6}$ mol/L) sowie nach Applikation des Dilatators (ACh, SNP 10^{-6} mol/L). n=Anzahl der Beobachtungen.

Behandlung	Agonist	vor NA		nach NA		nach ACh/SNP	
		[mN/mm]	n	[mN/mm]	n	[mN/mm]	n
Kontrolle	ACh	1.69±0.09	14	7.08±0.42	14	3.99±0.59	14
Indo	ACh	1.45±0.16	8	6.17±0.61	8	3.47±0.71	8
LN/Indo	ACh	1.53±0.11	14	6.27±0.42	14	5.60±0.40	14
Kontrolle	SNP	1.60±0.11	14	7.39±0.44	14	2.89±0.35	14
Indo	SNP	1.51±0.19	8	7.21±0.51	8	2.58±0.37	8
LN/Indo	SNP	1.56±0.10	14	7.26±0.35	14	2.26±0.24	14

3.3.7 IK und SK bei der EDHF-vermittelten Dilatation kleiner Arterien

Die Aufhebung der EDHF-medierten Relaxation unter depolarisierenden Bedingungen (KCl 50 mmol/L) zeigte, dass diese auf einer Hyperpolarisation beruht (Abb. 34, S.48), ließ aber keine Rückschlüsse zu, ob die Hyperpolarisation des Endothels erforderlich ist. Um zu untersuchen, inwieweit die endotheliale Hyperpolarisation für EDHF-vermittelte Dilatationen erforderlich ist, wurde die Rolle Ca^{2+} -abhängiger Kaliumkanäle geringer (SK) und mittlerer (IK) Leitfähigkeit untersucht, die von Endothelzellen exprimiert werden (71). Hierzu wurden endothelabhängige (ACh, Abb. 41) und –unabhängige Dilatationen (SNP, Abb. 42) in kleinen Arterien (A. gracilis) aus 6 Wildtyp ($102 \pm 13 \mu\text{m}$) und 5 IK-defizienten ($\text{IK}^{-/-}$; $105 \pm 25 \mu\text{m}$) Mäusen untersucht und miteinander verglichen. Als Blocker der SK-Kanäle wurde Apamin verwendet und die Gefäße mit Noradrenalin (NA) in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ mol/L

vokontrahiert. Die Werte der Vorkontraktion und der Relaxation sind in Tabelle 9 (S.58) aufgeführt.

Unter Kontrollbedingungen induzierte ACh in den $IK^{-/-}$ Gefäßen eine Relaxation (Abb. 41, A), die nach Hemmung der Cyclooxygenase und der NO-Synthase deutlich abgeschwächt war (Abb. 41, B). Die zusätzliche Inkubation mit Apamin führte zur Aufhebung der Relaxation und zur Kontraktion (Abb. 41, C). Verglichen mit Wildtypgefäßen, war die Relaxation unter Kontrollbedingungen vergleichbar (Wildtyp vs. $IK^{-/-}$, Abb. 41, A) wohingegen die EDHF-medierte Relaxation, signifikant reduziert war (Wildtyp vs. $IK^{-/-}$, Abb. 41, B). In Wildtypgefäßen führte die Inkubation mit Apamin und LN/Indo zu einer signifikanten Abschwächung der EDHF-medierten Relaxation (Abb. 41, D)

Die Abschwächung der EDHF-vermittelten Relaxation (LN/Indo) in $IK^{-/-}$ Gefäßen zeigt die Bedeutung dieser Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanäle bei der EDHF-vermittelten Relaxation (Abb. 41, B). Dass auch der SK-Kanal hierbei eine Funktion hat, ist erkennbar an der Abschwächung der Relaxation nach dessen Hemmung mit Apamin sowohl in $IK^{-/-}$ als auch in Wildtypgefäßen (Abb. 41, C, D).

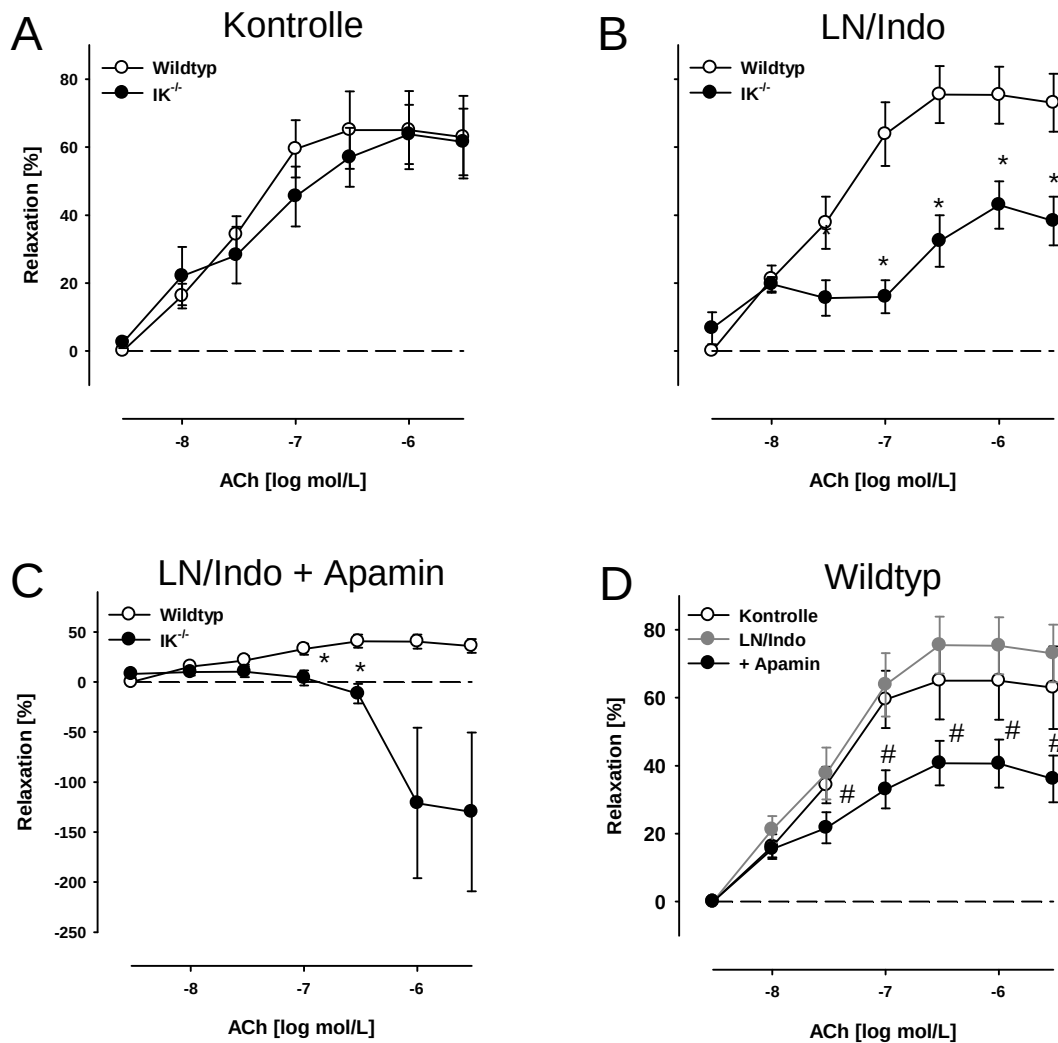


Abb. 41: IK und SK sind für EDHF-Typ Dilatationen in kleinen Arterien erforderlich

In kleinen Arterien (A. gracilis) aus Wildtypmäusen induzierte ACh unter Kontrollbedingungen eine konzentrationsabhängige Relaxation (A). Eine vergleichbare Relaxation wurde auch in IK^{-/-} Gefäßen induziert (A). Während die Relaxation in Wildtypgefäßen nach Inkubation mit LN/Indo unbeeinflusst war, war sie in IK^{-/-} Gefäßen signifikant reduziert (B). Nach zusätzlicher Hemmung des SK-Kanals (Apamin) kontrahierten IK^{-/-} Gefäße (C). Die Blockade der SK führte in Wildtypgefäßen zu einer signifikanten Abschwächung der EDHF-medierte Dilatation (D).

Die endothelunabhängige Dilatation (SNP, Abb. 42) wurde in IK^{-/-} (Abb. 42, B) und Wildtypgefäßen (Abb. 42, A) nicht von den verwendeten Hemmstoffen L-Nitro-Arginin (LN), Indomethacin (Indo) und Apamin beeinflusst.

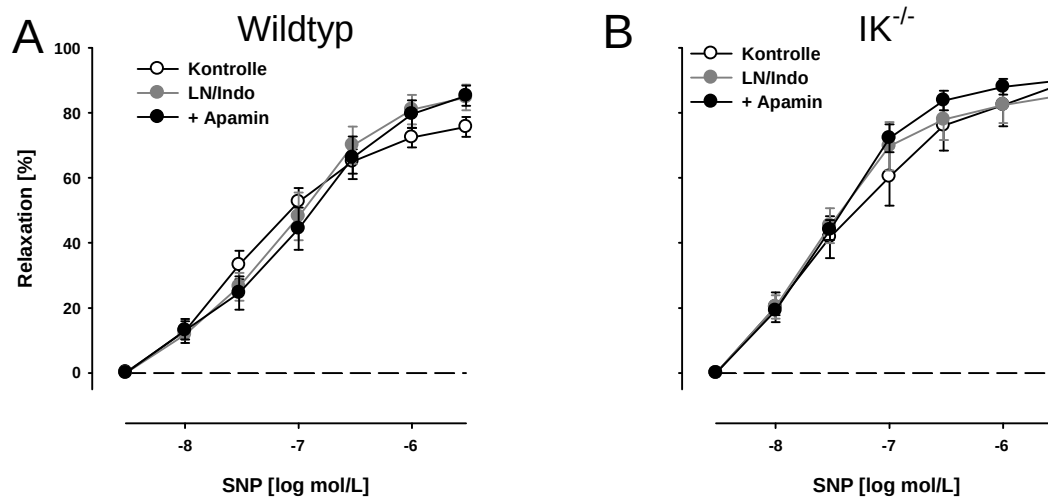


Abb. 42: Unveränderte SNP-induzierte Dilatationen

In Wildtypgefäßen (A) und $IK^{-/-}$ (B) Gefäßen induzierte SNP konzentrationsabhängig nahezu maximale Relaxationen, die von LN/Indo und Apamin unbeeinflusst blieben.

Tabelle 9: Gemessene Kraft der *A. gracilis*

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Kraftmessung normalisiert auf die Gefäßlänge vor und nach Applikation des Konstriktors (Noradrenalin: $NA\ 3 \cdot 10^{-6}\text{ mol/L}$) sowie nach Applikation des Dilatators (ACh, $SNP\ 10^{-6}\text{ mol/L}$). n=Anzahl der Beobachtungen.

Behandlung	Agonist	Genotyp	vor NA		nach NA		nach ACh/SNP	
			[mN/mm]	n	[mN/mm]	n	[mN/mm]	n
Kontrolle	ACh	Wildtyp	0.36 ± 0.08	6	1.34 ± 0.13	6	0.67 ± 0.09	6
Kontrolle	ACh	$IK^{-/-}$	0.44 ± 0.04	8	0.94 ± 0.07	8	0.63 ± 0.07	8
Kontrolle	SNP	Wildtyp	0.33 ± 0.09	6	1.32 ± 0.18	6	0.58 ± 0.09	6
Kontrolle	SNP	$IK^{-/-}$	0.36 ± 0.06	8	0.90 ± 0.11	8	0.43 ± 0.05	8
LN/Indo	ACh	Wildtyp	0.42 ± 0.07	6	1.38 ± 0.18	6	0.63 ± 0.08	6
LN/Indo	ACh	$IK^{-/-}$	0.36 ± 0.07	8	0.88 ± 0.08	8	0.62 ± 0.07	8
LN/Indo	SNP	Wildtyp	0.32 ± 0.09	6	1.73 ± 0.26	6	0.55 ± 0.11	6
LN/Indo	SNP	$IK^{-/-}$	0.37 ± 0.07	8	1.28 ± 0.17	8	0.48 ± 0.06	8
+Apamin	ACh	Wildtyp	0.40 ± 0.11	6	1.41 ± 0.21	6	0.99 ± 0.16	6
+Apamin	ACh	$IK^{-/-}$	0.37 ± 0.09	8	1.11 ± 0.13	8	1.51 ± 0.24	8
+Apamin	SNP	Wildtyp	0.36 ± 0.10	6	1.76 ± 0.24	6	0.62 ± 0.13	6
+Apamin	SNP	$IK^{-/-}$	0.36 ± 0.09	8	1.46 ± 0.17	8	0.49 ± 0.08	8

3.3.7.1 NO/ PGI_2 können die Funktion von IK und SK nicht ersetzen

Im Folgenden sollte untersucht werden, wie sich das Fehlen beider K^+ -Kanäle, IK und SK, auf NO/ PGI_2 -medierte Dilatationen auswirkt. Hierzu wurden *A. gracilis* ($108 \pm 14\ \mu\text{m}$) aus 5 $IK^{-/-}$ Mäusen isometrisch untersucht (Abb. 43). Hierbei wurden die Gefäße mit Noradrenalin ($NA: 3 \cdot 10^{-6}\text{ mol/L}$) vorkontrahiert und UCL 1684 als Blocker der SK-Kanäle verwendet.

Die unter Kontrollbedingungen beobachtete konzentrationsabhängige Relaxation auf ACh war nach Inkubation mit UCL 1684 signifikant reduziert (Abb. 43, A) und nach zusätzlicher

Inkubation mit LN/Indo aufgehoben (Abb. 43, B). Die NO-induzierte Relaxation (SNP, Abb. 43, B) wurde durch die Blocker nicht abgeschwächt.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Verlust von IK und die Hemmung des SK-Kanals schon zu einer Abschwächung der endothelvermittelten Relaxation führen. Somit kann NO/PGI₂ die Funktion dieser Kanäle nicht komplett ersetzen.

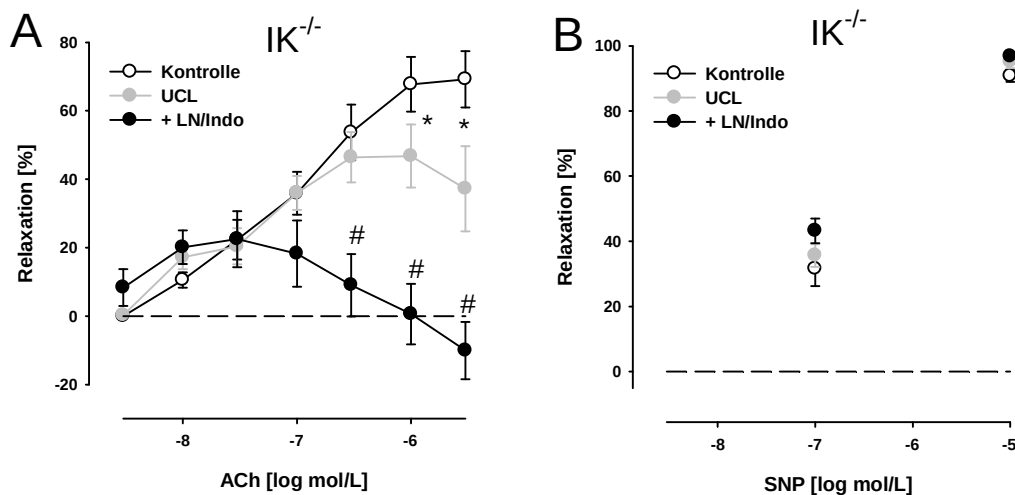


Abb. 43: Abschwächung nach IK und SK Blockade

In kleinen IK-defizienten Arterien induzierte ACh unter Kontrollbedingungen eine deutliche Relaxation (A). Diese war nach Blockade der SK mit UCL1684 signifikant reduziert und aufgehoben nach zusätzlicher Hemmung der NO-Synthase und der Cyclooxygenase (+ LN/Indo). Von diesen unterschiedlichen Bedingungen wurde die endothelunabhängige Relaxation nicht beeinflusst (B). *: $P < 0.05$ UCL vs. Kontrolle; #: $P < 0.05$ UCL+LN/Indo vs. LN/Indo

Tabelle 10: Gemessene Kraft der A. gracilis

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Kraftmessung normalisiert auf die Gefäßlänge vor und nach Applikation des Konstriktors (Noradrenalin: NA $3 \cdot 10^{-6}$ mol/L) sowie nach Applikation des Dilators (ACh 10^{-6} mol/L, SNP 10^{-5} mol/L). n=Anzahl der Beobachtungen.

Behandlung	Agonist	vor NA		nach NA		nach ACh/SNP	
		[mN/mm]	n	[mN/mm]	n	[mN/mm]	n
Kontrolle	ACh	0.41±0.03	7	1.89±0.17	7	0.87±0.10	7
Kontrolle	SNP	0.41±0.03	7	1.90±0.17	7	0.56±0.04	7
UCL	ACh	0.38±0.04	7	1.28±0.18	7	0.86±0.13	7
UCL	SNP	0.37±0.04	7	1.72±0.17	7	0.44±0.04	7
+LN/Indo	ACh	0.39±0.04	7	1.34±0.14	7	1.32±0.14	7
+LN/Indo	SNP	0.43±0.04	7	1.86±0.15	7	0.48±0.04	7

3.3.7.2 Gegenseitige Kompensation von EDHF (IK/SK) und NO/PGI₂

Die nachfolgenden Experimente dienen der Klärung der Frage, inwieweit die endothelialen Autakoide NO und PGI₂ auf der einen Seite und EDHF auf der anderen sich gegenseitig ersetzen können. Als Blocker wurden UCL 1684 für SK und TRAM34 für IK verwendet. Diese Versuchsreihe besteht aus zwei Gruppen, in denen jeweils die unterschiedlichen

Gruppen der endothelialen Autakoiden sukzessive gehemmt wurden. In der ersten Gruppe (EDHF, Abb. 44, A) wurde zu Beginn LN/Indo appliziert, um nachfolgend die jeweilige Relevanz des IK und SK an der EDHF-vermittelten Dilatation zu untersuchen. Die zweite Gruppe (NO/PGI₂, Abb. 44, B) wurde zu Beginn mit den Blockern der K_{Ca} behandelt, um zu untersuchen, inwieweit die NO/PGI₂-medierte Dilatation das Fehlen der K_{Ca} kompensieren kann. Alle Gefäße wurden mit Noradrenalin (NA: $3 \cdot 10^{-6}$ mol/L) vorkontrahiert.

In der ersten Gruppe (EDHF, Abb. 44, A) wurden kleine Arterien (*A. gracilis*) aus 7 Wildtyptieren ($105 \pm 16 \mu\text{m}$) untersucht. ACh induzierte eine konzentrationsabhängige Relaxation unter Kontrollbedingungen, die nach Inkubation mit LN/Indo nicht reduziert war. Die Inkubation mit UCL 1684 in Anwesenheit von LN/Indo führte zur Abschwächung der Dilatation und die zusätzliche Inkubation mit TRAM34 führte zur Aufhebung der Dilatation. Diese Daten bestätigen die zuvor gezeigte herausragende Bedeutung der IK und SK für die EDHF-vermittelte Dilatation (Abb. 41, S.57).

In der zweiten Gruppe (NO/PGI₂, Abb. 44, B) wurden *A. gracilis* aus 9 Wildtyptieren ($110 \pm 16 \mu\text{m}$) untersucht. Die ACh-induzierte Dilatation unter Kontrollbedingung war nach Inkubation mit UCL 1684 nicht vermindert. Die zusätzliche Inkubation mit TRAM34 schwächte die Dilatation wenig, aber signifikant ab. Die zusätzliche Inkubation mit LN/Indo hob die Dilatation auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass NO und PGI₂ nicht das Fehlen des EDHF kompensieren können (Abb. 44, B). EDHF hingegen kann das Fehlen von NO und PGI₂ kompensieren (Abb. 44, A). Weiterhin zeigen sie, dass das alleinige Fehlen des SK nicht zu einer Abschwächung der Dilatation führt.

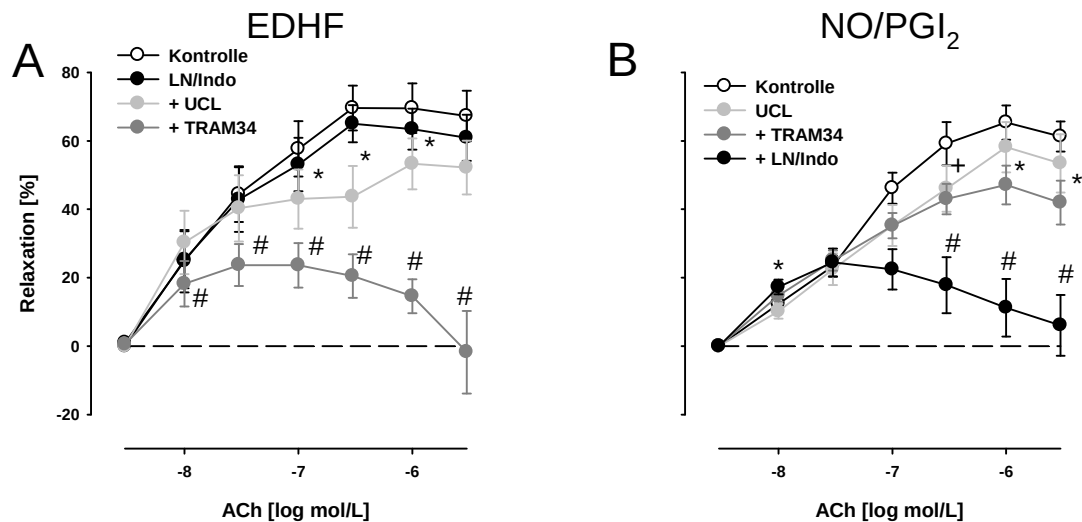


Abb. 44: Gegenseitige Kompensation der dilatatorischen Systeme

In Wildtypgefäßen induzierte ACh eine konzentrationsabhängige Relaxation (A, B). Diese war nach Inkubation mit LN/Indo unbeeinflusst (A). Die verbliebene EDHF-medierte Relaxation wurde durch Blockade der SK (+UCL) bei einer ACh-Konzentration von 10^{-7} bis 10^{-6} mol/L abgeschwächt (A) und war nach zusätzlicher Inhibition der IK (+TRAM34) nahezu aufgehoben (A). Wurden die Gefäße anfangs mit einem SK-Blocker (UCL) inkubiert, war die ACh-induzierte Relaxation unbeeinflusst (B). Die zusätzliche Blockade der IK (+TRAM34) reduzierte die Relaxation signifikant (B). Die verbliebene Relaxation beruhte nahezu vollständig auf NO/PGI₂ und war nach Hemmung der NO-Synthase und der Cyclooxygenase (+LN/Indo) nahezu aufgehoben. A: *: $P < 0.05$ +UCL vs. LN/Indo, #: $P < 0.05$ +TRAM34 vs. +UCL; B: *: $P < 0.05$ +TRAM34 vs. UCL, #: $P < 0.05$ +LN/Indo vs. +TRAM34.

In beiden Versuchsgruppen (EDHF, NO/PGI₂) führten die verwendeten Inhibitoren zu keiner Abschwächung der endothelunabhängigen Dilatation (SNP, Abb. 45).

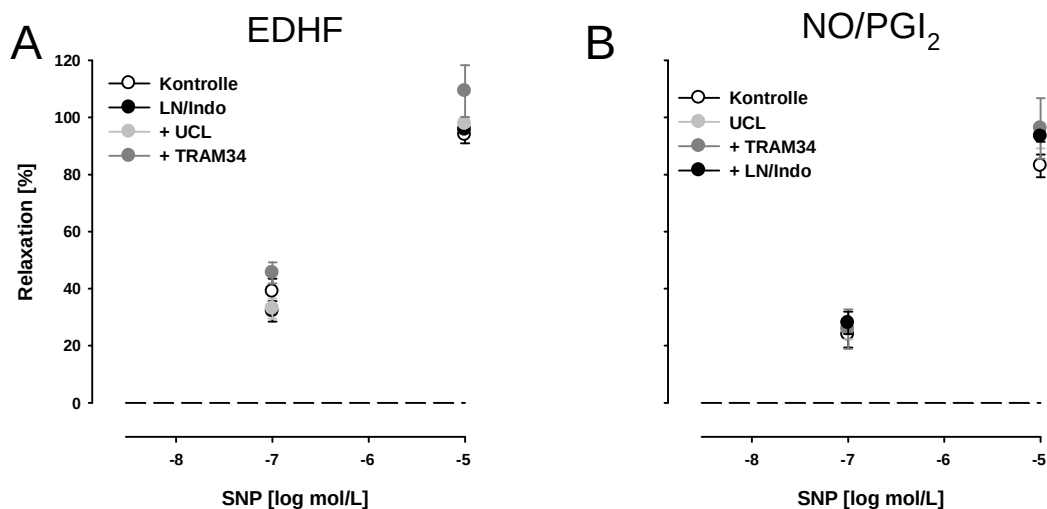


Abb. 45: Endothelunabhängige Dilatationen

Die verwendeten sukzessive Inkubation mit den verschiedenen Hemmstoffen hatte keinen Einfluss auf die endothelunabhängigen Dilatationen (A, B).

Tabelle 11: Gemessene Kraft der EDHF-Gruppe

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Kraftmessung normalisiert auf die Gefäßlänge vor und nach Applikation des Konstriktors (Noradrenalin: NA $3 \cdot 10^{-6}$ mol/L) sowie nach Applikation des Dilatators (ACh 10^{-6} mol/L, SNP 10^{-5} mol/L). n=Anzahl der Beobachtungen.

Behandlung	Agonist	vor NA		nach NA		nach ACh/SNP	
		[mN/mm]	n	[mN/mm]	n	[mN/mm]	n
Kontrolle	ACh	0.38±0.10	8	1.30±0.15	8	0.65±0.10	8
Kontrolle	SNP	0.36±0.10	8	1.18±0.21	8	0.38±0.11	8
LN/Indo	ACh	0.35±0.12	8	1.33±0.21	8	0.66±0.14	8
LN/Indo	SNP	0.35±0.12	8	1.88±0.25	8	0.40±0.12	8
+UCL	ACh	0.36±0.11	8	1.18±0.20	8	0.70±0.14	8
+UCL	SNP	0.35±0.13	8	1.60±0.25	8	0.38±0.13	8
+UCL+TRAM34	ACh	0.36±0.12	8	1.07±0.20	8	0.94±0.17	8
+UCL+TRAM34	SNP	0.46±0.15	8	1.45±0.24	8	0.41±0.13	8

Tabelle 12: Gemessene Kraft der NO/PGI₂-Gruppe

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Kraftmessung normalisiert auf die Gefäßlänge vor und nach Applikation des Konstriktors (Noradrenalin: NA $3 \cdot 10^{-6}$ mol/L) sowie nach Applikation des Dilatators (ACh 10^{-6} mol/L, SNP 10^{-5} mol/L). n=Anzahl der Beobachtungen.

Behandlung	Agonist	vor NA		nach NA		nach ACh/SNP	
		[mN/mm]	n	[mN/mm]	n	[mN/mm]	n
Kontrolle	ACh	0.36±0.05	11	1.31±0.15	11	0.73±0.13	11
Kontrolle	SNP	0.34±0.03	11	1.37±0.16	11	0.55±0.05	11
+UCL	ACh	0.33±0.02	10	1.20±0.14	10	0.71±0.11	10
+UCL	SNP	0.31±0.06	11	1.40±0.17	11	0.43±0.06	11
+Tram34	ACh	0.40±0.06	11	1.33±0.13	11	0.90±0.10	11
+Tram34	SNP	0.37±0.03	11	1.42±0.16	11	0.50±0.04	11
+LN/Indo	ACh	0.47±0.06	10	1.17±0.16	10	1.09±0.14	10
+LN/Indo	SNP	0.43±0.07	10	1.45±0.22	10	0.49±0.07	10

3.3.7.3 Zusammenfassender Vergleich: EDHF und NO/PGI₂

Auf Grundlage der Daten der kleinen Arterien (A. gracilis) wurde mit Hilfe der nichtlinearen Regression die maximale Gefäßrelaxation (E_{Max}) sowie die ACh-Konzentration, die die halb maximale Gefäßrelaxation (ED_{50}) induziert, errechnet.

Unter Kontrollbedingungen induzierte ACh vergleichbare konzentrationsabhängige Dilatationen in Wildtypgefäßen, IK^{-/-} und Wildtypgefäßen nach pharmakologischer Blockade des SK (Abb. 46, A). Dieses zeigt, dass das alleinige Fehlen des IK oder SK keinen Einfluss auf die ACh-induzierte Dilatation bei intaktem NO/PGI₂-System hat.

Nach Hemmung des NO/PGI₂-Systems war die Dilatation bei Verlust des IK abgeschwächt (Abb. 41, B, vgl. Wildtyp vs. IK^{-/-}). Vergleichbar abgeschwächt war die NO/PGI₂-unabhängige (EDHF-medierte) Dilatation in Wildtypgefäßen nach Blockade des SK mit Apamin oder UCL 1684 (Abb. 46, B). Dies zeigt, dass das Fehlen des IK oder SK die EDHF-

medierte Dilatation gleichermaßen abschwächt. In Abwesenheit von NO/PGI₂ werden also beide Kanäle für eine volle EDHF-Typ Dilatation benötigt.

Die kombinierte Hemmung des IK und SK beließ in Wildtypgefäßen eine NO/PGI₂-medierte Dilatation, die mit der NO/PGI₂-mediierten Dilatation in IK^{-/-} Gefäßen vergleichbar war (Abb. 46, C). Dieses zeigt, dass die pharmakologische Blockade des IK und die genetische IK-Defizienz zu vergleichbaren Ergebnissen führt.

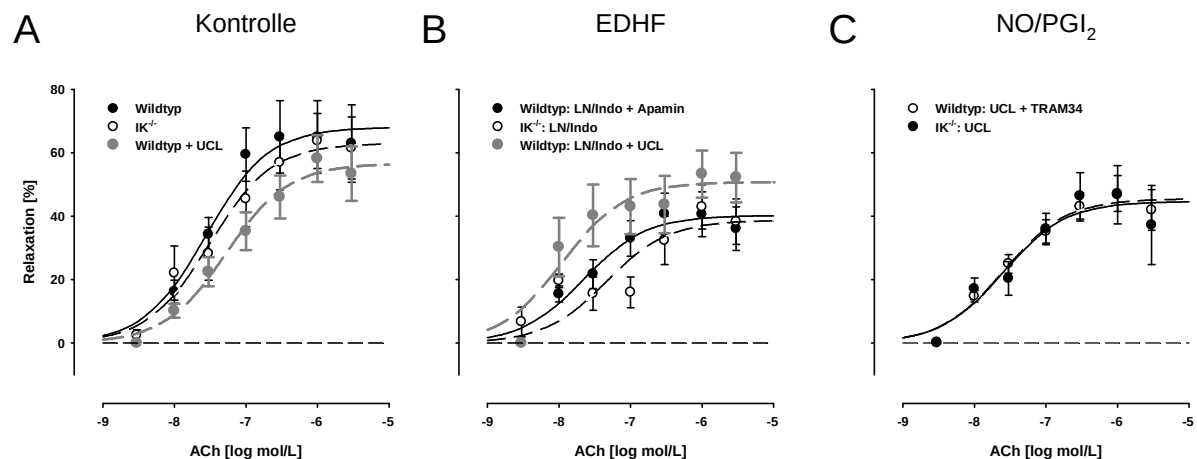


Abb. 46: Zusammenfassender Vergleich

ACh induzierte eine konzentrationsabhängige Relaxation in kleinen Arterien (A. gracilis) aus Wildtyptieren, die durch Blockade des SK nicht abgeschwächt wurde. Eine vergleichbare Relaxation wurde in IK^{-/-} Gefäßen induziert (A). EDHF-medierte Relaxationen waren in Wildtypgefäßen nach Blockade des SK (Apamin, UCL) vergleichbar mit EDHF-medierten Relaxationen in IK^{-/-} Gefäßen (B). NO/PGI₂-medierte Relaxationen in Wildtypgefäßen nach Blockade des IK und SK (UCL+TRAM34) waren mit denen der IK^{-/-} Gefäße nach Blockade des SK (UCL) vergleichbar. Dies zeigt die Konsistenz der in verschiedenen Versuchen erhobenen Daten.

Die E_{Max} und EC₅₀-Werte der Regressionsrechnung sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 13: ED₅₀ und E_{Max} Werte der nichtlinearen Regression

Ergebnisse der nichtlinearen Regression der IK^{-/-} und Wildtypgefäße bei den verschiedenen Behandlungen. SEM=Standardfehler

Genotyp	Behandlung	ED ₅₀ [mol/L]	SEM	E _{Max} [%]	SEM	siehe Abb.
Wildtyp	Kontrolle	2.78e-08	1.10e-08	68.05	5.27	A
IK ^{-/-}	Kontrolle	3.14e-08	1.29e-08	62.97	5.15	A
Wildtyp	+ UCL	5.30e-08	1.79e-08	56.59	4.06	A
Wildtyp	LN/Indo+Apamin	2.21e-08	9.08e-09	40.24	3.16	B
IK ^{-/-}	LN/Indo	4.58e-08	2.40e-08	38.75	4.24	B
Wildtyp	LN/Indo+UCL	1.11e-08	5.54e-09	50.82	4.43	B
Wildtyp	UCL+TRAM34	2.55e-08	7.35e-09	45.50	2.55	C
IK ^{-/-}	UCL	2.53e-08	1.28e-08	44.65	4.39	C

3.3.8 Connexin40-Expression in kleinen Arterien

Die zuvor durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass Ca^{2+} -abhängige K^{+} -Kanäle mittlerer (IK) und geringer (SK) Leitfähigkeit die Hauptmediatoren EDHF-vermittelter Dilatationen in kleinen Arterien (*A. gracilis*) sind (Abb. 41, Abb. 43, Abb. 44, Abb. 46). Da die Aktivierung des IK und SK eine endotheliale Hyperpolarisation zur Folge hat, die sich möglicherweise über direkte Zellverbindungen vom Endothel auf den glatten Muskel ausbreitet, wurde die Immunmarkierung an *Aa. graciles* durchgeführt, um die Expression von Connexin40 zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Methoden etabliert, die die Färbung solch kleiner Gefäße ermöglichen.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Immunhistochemie an isolierten *A. graciles* aus Wildtyptieren durchgeführt. Während der Versuchsdurchführung befanden sich die Gefäße in kleinen Reaktionsgefäßen, deren Böden durch Mikrogitter ersetzt wurden, um den Verlust der Gefäße zu verhindern. Connexin40 konnte mit dieser Methode im inneren Bereich der Gefäße (Abb. 47, vgl. A, B) nachgewiesen werden. Als Kontrolle der Spezifität des sekundären Antikörpers wurde die Immunhistochemie ohne den primären Antikörper durchgeführt (Abb. 47, vgl. C, A), in denen sich keine Fluoreszenz nachweisen ließ.

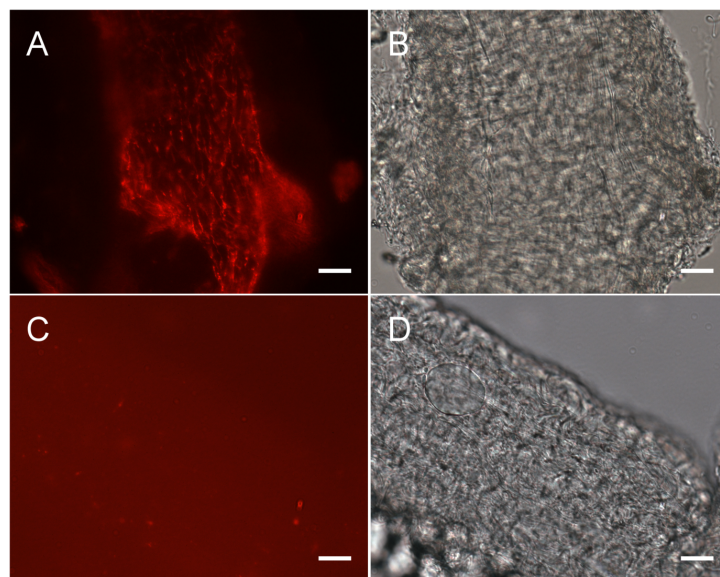


Abb. 47: Immunhistochemischer Nachweis des Connexin40 in kleinen Arterien (*A. gracilis*)

In den Hellfeldbildern (B, D) sind die isolierten Arterien zu erkennen. Die Immunhistochemie mit primären Antikörpern gegen Connexin40 zeigt die Fluoreszenz im Innenbereich der Arterie (A). Negativkontrolle ohne den primären Antikörper dargestellt in Bild C. Maßstab Balken: 20 μm .

Da die Immundetektion nicht über die gesamte Länge sondern nur im Bereich der Schnittkanten erkennbar war, wurden die Gefäße für die nachfolgenden Immundetektionen mit Glaskapillaren kanüliert. So waren die Gefäße auch von innen für die verwendeten

Lösungen besser zugänglich. Die Immunhistochemie zeigte Fluoreszenzsignale im inneren Bereich der Gefäße (Abb. 48, vgl. A, B). Um die Spezifität des Connexin40-Antikörpers zu überprüfen, wurde die Immunhistochemie mit dem Antikörper gegen Connexin40 an Connexin40-defizienten *Aa. graciles* durchgeführt, in denen keine Fluoreszenz detektiert wurde (Abb. 48, C, D). Somit ist gezeigt, dass der primäre Antikörper in diesem Verfahren spezifisch für Connexin40 ist. Die Morphologie der markierten Strukturen lässt den Schluss zu, dass es sich bei den markierten Zellen um Endothelzellen handelt.

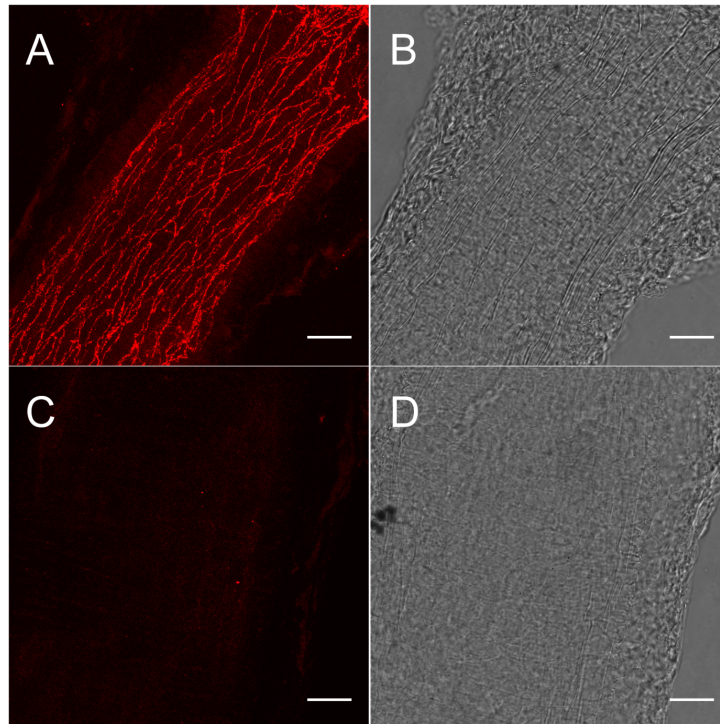


Abb. 48: Nachweis des Connexin40 in kleinen Arterien mittels der Immunhistochemie

Die Markierung des Connexin40 mittels spezifischer Antikörper (A) lässt anhand der Lokalisation der Fluoreszenzsignale (vgl. A und B) und der Morphologie der gefärbten Zellen auf eine Expression von Cx40 in den Endothelzellen schließen. Fluoreszenzsignale fehlen in Cx40-defizienten Gefäßen (C, D). Maßstabballen: 20µm.

3.3.8.1 EDHF-medierte Dilatationen in kleinen Arterien

Aufgrund des Nachweises der Expression von Connexin40 in der *A. gracilis* (Abb. 47, Abb. 48) wurden endothelabhängige und –unabhängige Dilatationen in Gefäßen aus *Cx40^{-/-}* (8 Tiere, $128 \pm 18 \mu\text{m}$) und *Cx40KI45* (8 Tiere, $121 \pm 12 \mu\text{m}$) Tieren untersucht und den zuvor untersuchten Wildtypgefäßen (Abb. 34) gegenübergestellt.

Auch in dieser Versuchsreihe wurden die Gefäße mit Noradrenalin (NA: 10^{-6} mol/L) vokontrahiert.

Unter Kontrollbedingungen induzierte ACh in Cx40^{-/-} und Cx40KI45 Gefäßen eine konzentrationsabhängige Relaxation (Abb. 49, A). Diese war in beiden untersuchten Modellen der Connexin40-Defizienz nach Inkubation mit den Blockern der NO-Synthase und Cyclooxygenase (LN/Indo) nahezu komplett aufgehoben (Abb. 49, B). Im Vergleich zu Wildtypgefäßen war die ACh-induzierte Relaxation in Cx40^{-/-} und Cx40KI45 bereits unter Kontrollbedingungen signifikant reduziert (Abb. 49, A). Dies zeigt, dass Connexin40 für die EDHF-medierte Dilatation in kleinen Arterien erforderlich ist. Des Weiteren können NO und PGI₂ den Verlust der EDHF-medierten Relaxation in Cx40^{-/-} und Cx40KI45 Gefäßen nicht kompensieren.

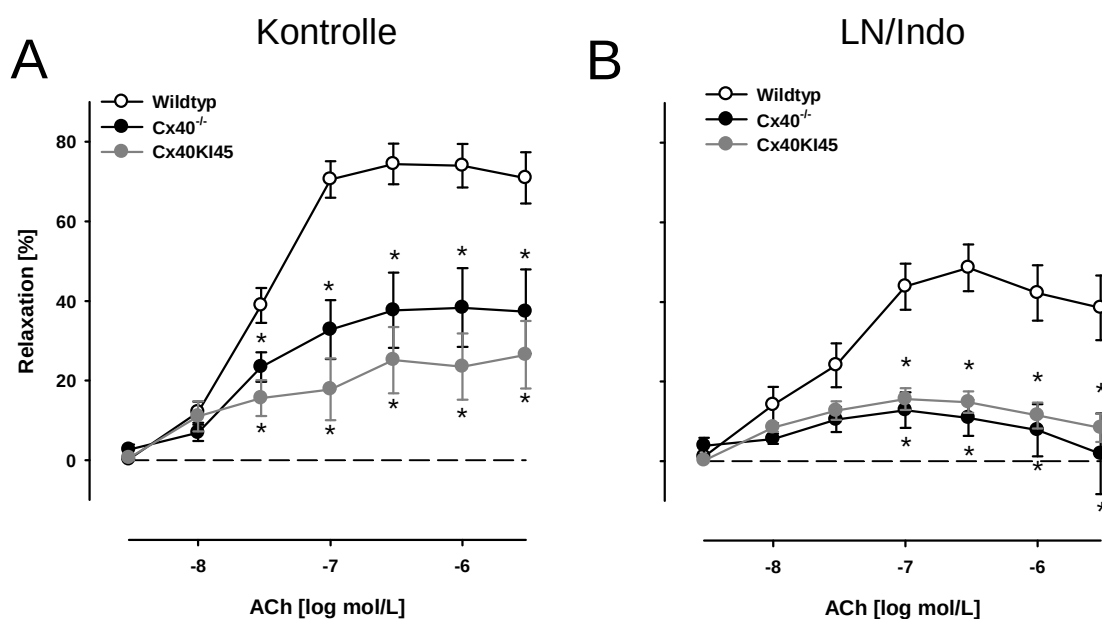


Abb. 49: Fehlende EDHF-medierte Relaxation bei Connexin40-Defizienz

Bereits unter Kontrollbedingungen waren die endothelabhängigen Dilatationen in Cx40^{-/-} und Cx40KI45 im Vergleich zu Wildtypgefäßen signifikant reduziert (A) und nahezu aufgehoben nach Hemmung der NO-Synthase und der Cyclooxygenase (B). *: $P < 0.05$ vs. Wildtyp

In beiden untersuchten Genotypen induzierte der NO-Donor SNP unter Kontrollbedingungen eine konzentrationsabhängige Relaxation (Abb. 50, A), die durch Hemmung der NO-Synthase und Cyclooxygenase (LN/Indo) nicht abgeschwächt wurde (Abb. 50, B). Im Vergleich zu Wildtypgefäßen war diese Dilatation nur in den Cx40KI45 Gefäßen gering, aber signifikant reduziert.

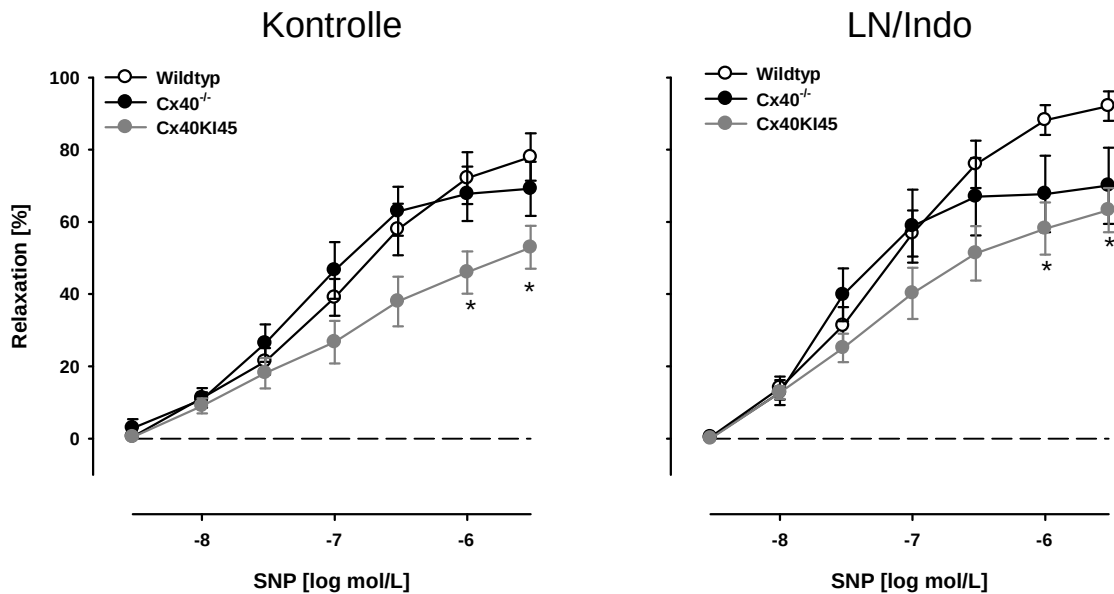


Abb. 50: Endothelunabhängige Dilatationen in Connexin40-defizienten Gefäßen

In den untersuchten Genotypen induzierte SNP unter Kontrollbedingungen Relaxationen (A), die nach Hemmung der NO-Synthase und Cyclooxygenase (B) nicht beeinflusst waren. SNP-induzierte Relaxationen der Cx40KI45 Gefäße waren, verglichen mit Relaxationen der Wildtypgefäße, signifikant abgeschwächt. *: $P < 0.05$ vs. Wildtyp

Tabelle 14: Gemessene Kraft der *A. gracilis*

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Kraftmessung normalisiert auf die Gefäßlänge vor und nach Applikation des Konstriktors (Noradrenalin: $NA\ 10^{-6}$ mol/L) sowie nach Applikation des Dilatators (ACh, $SNP\ 10^{-6}$ mol/L). n=Anzahl der Beobachtungen.

Behandlung	Agonist	Genotyp	Kontraktion von		n	Dilatation auf		n
			[mN/mm]	auf [mN/mm]		[mN/mm]	auf [mN/mm]	
Kontrolle	ACh	Cx40 ^{-/-}	0.40±0.05	12	0.62±0.06	12	0.53±0.05	12
Kontrolle	ACh	Cx40KI45	0.44±0.04	9	1.00±0.08	9	0.87±0.07	9
LN/Indo	ACh	Cx40 ^{-/-}	0.13±0.04	9	0.46±0.07	9	0.44±0.07	9
LN/Indo	ACh	Cx40KI45	0.34±0.07	9	0.83±0.08	9	0.77±0.08	9
Kontrolle	SNP	Cx40 ^{-/-}	0.21±0.04	11	0.47±0.04	11	0.30±0.02	11
Kontrolle	SNP	Cx40KI45	0.30±0.05	9	0.81±0.10	9	0.58±0.08	9
LN/Indo	SNP	Cx40 ^{-/-}	0.07±0.05	10	0.42±0.09	10	0.15±0.04	10
LN/Indo	SNP	Cx40KI45	0.30±0.08	9	0.84±0.11	9	0.50±0.09	9

3.3.9 Isobare Untersuchungen

Alle vorherigen Untersuchungen wurden in einem Drahtmyographen unter isometrischen Bedingungen durchgeführt. Hierbei war Connexin40 für die EDHF-medierte Dilatation notwendig (Abb. 49, B). Es wurde nun eine Methode etabliert, um Gefäßreaktionen auch unter isobaren Bedingungen untersuchen zu können (3.3.1.2, S.41), um damit der *in vivo* Situation näher zu kommen.

Nachfolgend wurden endothelabhängige (ACh) Dilatationen der *A. gracilis* aus 6 Wildtyp Tieren (Abb. 51, A) mit denen von 6 Connexin40-defizienten (Cx40^{-/-}, Abb. 51, B) Gefäßen

unter isobaren Bedingungen verglichen. Die Gefäße wurden mit Noradrenalin (NA: 10^{-6} mol/L) vokontrahiert.

Unter Kontrollbedingungen induzierte der endothelabhängige Dilator ACh eine konzentrationsabhängige Dilatation (ACh: 10^{-6} mol/L: $84 \pm 8\%$), die auch nach Hemmung der NO-Synthase und der Cyclooxygenase (LN/Indo) nicht abgeschwächt war ($89 \pm 5\%$, Abb. 51, A). Die ACh-induzierte Dilatation in Cx40^{-/-} ($84 \pm 5\%$) Gefäßen blieb ebenfalls nach Inkubation mit LN/Indo intakt ($76 \pm 12\%$, Abb. 51, B). Verglichen mit endothelabhängigen Dilatationen in Wildtypgefäßen, waren die endothelabhängigen Dilatationen in Cx40^{-/-} Gefäßen unter diesen Bedingungen nicht abgeschwächt (Abb. 51 A, B). Sowohl in Wildtyp- als auch in Connexin40-defizienten Gefäßen war die Dilatation unter depolarisierenden Bedingungen komplett aufgehoben (+KCl, Wildtyp: $-8 \pm 4\%$, Cx40^{-/-}: $-3.5 \pm 5\%$). Somit ist die EDHF-medierte Dilatation unter isobaren Bedingungen, im Gegensatz zu isometrischen Bedingungen, unabhängig von Connexin40.

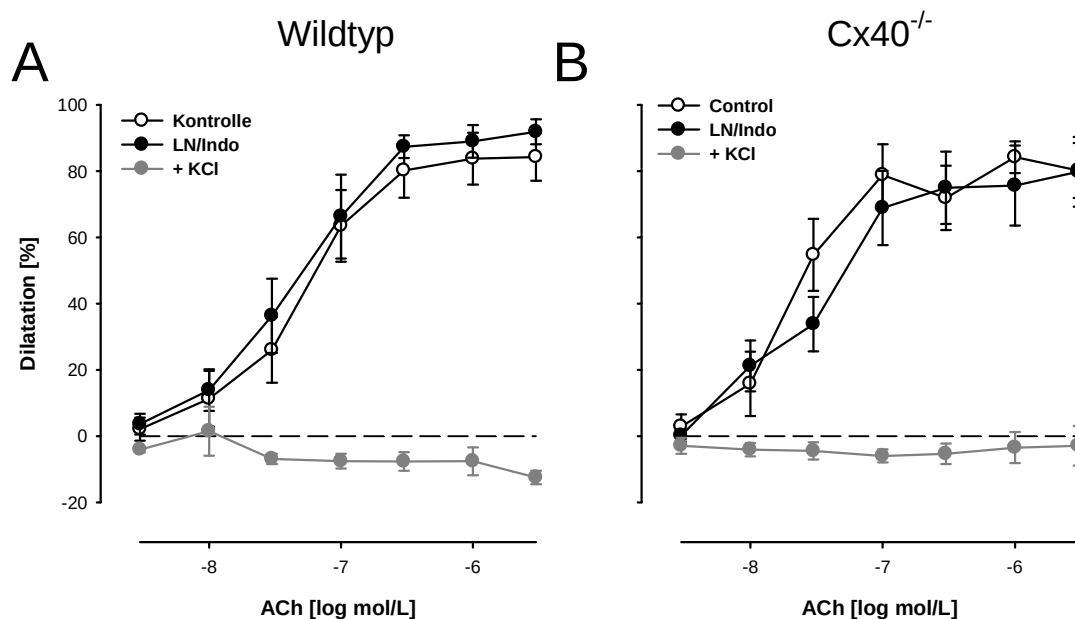


Abb. 51: ACh-induzierte Dilatationen unter isobaren Bedingungen

In der *A. gracilis* aus Wildtyp-tieren induzierte ACh eine konzentrationsabhängige Dilatation, die nach Inkubation mit LN/Indo nicht abgeschwächt war (A). Eine vergleichbare Dilatation induzierte ACh in Connexin40-defizienten Gefäßen unter Kontrollbedingungen und nach LN/Indo (B). Unter depolarisierenden Bedingungen (+KCl) waren die Dilatationen aufgehoben.

3.3.10 EDHF-medierte Dilatation *in vivo*

Die gegensätzlichen Befunde unter isometrischen und isobaren Bedingungen führten zu der Frage, ob EDHF-vermittelte Dilatationen *in vivo* Connexin40 erfordern. Daher wurde eine Methode für die Durchführung solcher Untersuchungen an der *A. gracilis* etabliert

(3.3.1.3, S.44). Die untersuchten Gefäße wurden mit Noradrenalin (NA: 10^{-6} mol/L) vokontrahiert.

Die *A. gracilis* von 3 Wildtypmäusen wurden *in vivo* untersucht. Unter Kontrollbedingungen induzierte ACh eine Dilatation (ACh: 10^{-6} mol/L, $62 \pm 27\%$), die nach Hemmung der NO-Synthase und der Cyclooxygenase nicht reduziert war ($88 \pm 7\%$, Abb. 52, A). Die endothelunabhängige Dilatation (SNP: 10^{-6} mol/L, $66\% \pm 9$) wurde durch die Inkubation mit LN/Indo nicht vermindert ($76 \pm 10\%$, Abb. 52, B). Diese Ergebnisse zeigen, dass EDHF auch der Hauptmediator der endothelabhängigen Dilatationen *in vivo* ist.

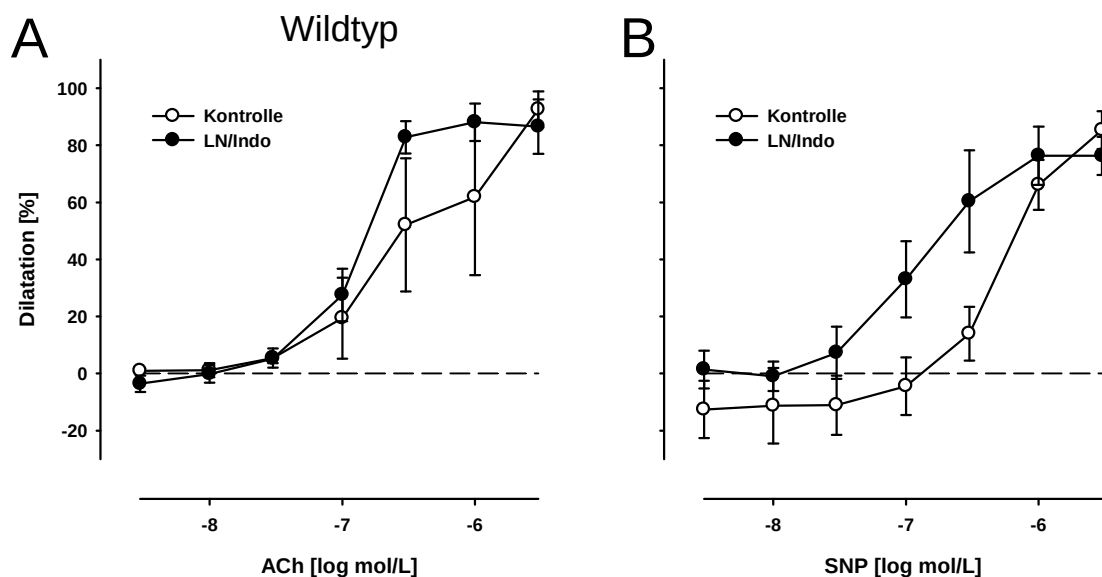


Abb. 52: *In vivo* Untersuchung der *A. gracilis*

Unter Kontrollbedingungen induzierte ACh eine nahezu maximale Dilatation (A). Diese war nach Inkubation mit LN/Indo nicht abgeschwächt (A). Auch die SNP-induzierte Dilatation war nahezu maximal (B) und wurde durch die Inkubation mit LN/Indo nicht beeinflusst (B).

Um die Beteiligung des Connexin40 an der EDHF-medierte Dilatation in dieser Situation zu untersuchen, wurden Gefäße von 9 Cx40-defizienten Mäusen untersucht (Abb. 53).

ACh induzierte eine deutliche Dilatation ($78 \pm 5\%$) unter Kontrollbedingungen (Abb. 53, A). Diese war auch nach Inkubation mit L-Nitro-Arginin und Indomethacin (LN/Indo, $72\% \pm 4$) intakt und vergleichbar zu den Kontrollbedingungen (Abb. 53, A). Der Einfluss des strömenden Blutes wurde untersucht, indem die Blutgefäße stromabwärts von der beobachteten Stelle abgebunden wurden, so dass der Druck im untersuchten Gefäß erhalten blieb, die Schubspannung aber fehlte. Auch unter diesen Bedingungen war die ACh-vermittelte Dilatation unverändert (ACh: $78 \pm 8\%$, Abb. 53, A). Nach dem Öffnen der Ligatur blieb die ACh-induzierte Dilatation intakt ($66\% \pm 14$). Endothelunabhängige Dilatationen wurden durch die unterschiedlichen Bedingungen nicht beeinflusst (SNP, Abb. 53, B). Somit

ist EDHF auch *in vivo* der Hauptmediator der endothelabhängigen Dilatation in kleinen Arterien und die EDHF-medierte Dilatation ist unabhängig von Connexin40 und dem strömenden Blut.

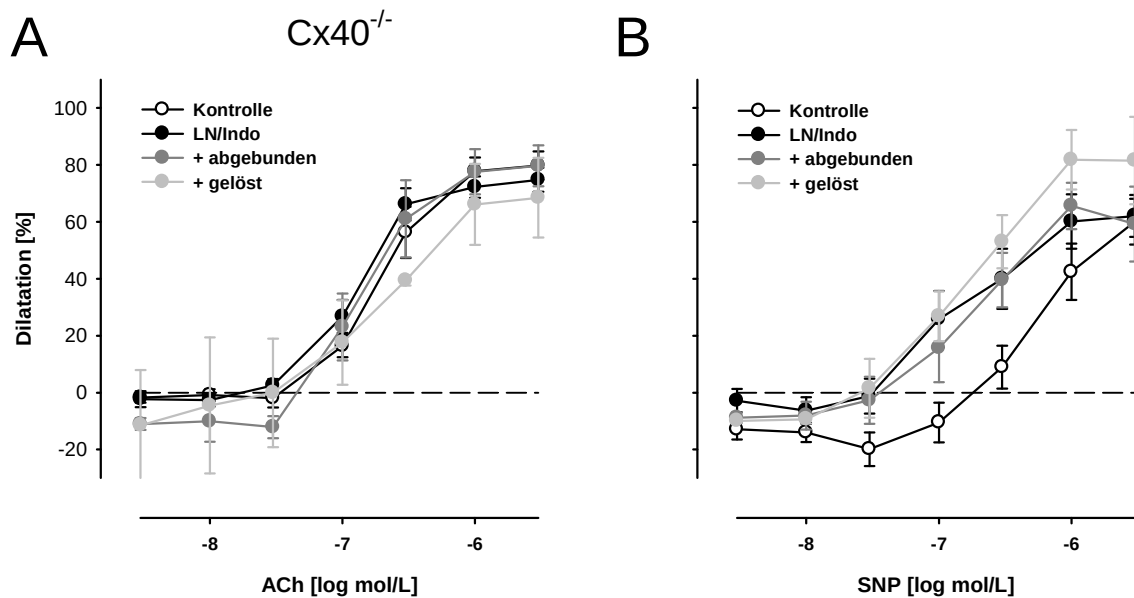


Abb. 53: Die EDHF-medierte Dilatation ist unabhängig von Connexin40 und dem Blutfluss

In Cx40-defizienten *A. gracilis* induzierte ACh konzentrationsabhängige Dilatationen unter Kontrollbedingungen, die nach Inkubation mit LN/Indo, dem Unterbinden des Blutflusses und dessen Wiederherstellung nicht abgeschwächt wurden (A). Die verschiedenen Bedingungen hatten keinen Einfluss auf die endothelunabhängige Dilatation (B).

3.4 Endotheliales Connexin40 ist relevant

Da Cx40 vor allem in Endothelzellen exprimiert wird, sollte mit den nachfolgenden Versuchen untersucht werden, ob tatsächlich im Endothel exprimiertes Cx40 für die Aufrechterhaltung der EDHF-medierten Dilatation unter isometrischen Bedingungen relevant ist.

Hierzu wurden kleine Arterien (*A. gracilis*) aus Mäusen isoliert, deren Connexin40-Gen von Restriktionssequenzen der Cre-Rekombinase flankiert ist (floxed: flanked by lox sites, Cx40^{fl}). In weiteren Tieren dieser Versuchsreihe wurde die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des endothelzellspezifischen Promotors TIE2 exprimiert, so dass spezifisch in Endothelzellen das Cx40 deletiert wird (Cx40^{fl}:TIE2-Cre). Die Gefäße wurden nach Vorkontraktion mit Noradrenalin (NA: $3 \cdot 10^{-6}$ mol/L) unter isometrischen und isobaren Bedingungen untersucht.

3.4.1 Expression des Connexin40 im Endothel

Für den Nachweis des Connexin40 in Gefäßen der Kontrolltiere ($Cx40^{fl}$) und dessen Fehlen bei $Cx40$ -Defizienz ($Cx40^{fl}$: TIE2-Cre) wurden immunhistochemische Untersuchungen an isolierten Aa. graciles durchgeführt. In der Kontrollgruppe (Abb. 54, A) wurde Connexin40 im Inneren der Gefäße nachgewiesen (Abb. 54, B, C). Bei endothelialer Connexin40-Defizienz ($Cx40^{fl}$: TIE2-Cre, Abb. 54, D) hingegen war keine Färbung zellulärer Membranen erkennbar (Abb. 54, E, F). Dies zeigt, dass Connexin40 in $Cx40^{fl}$ Gefäßen exprimiert wird. In $Cx40^{fl}$: TIE2-Cre Gefäßen hingegen wird $Cx40$ nicht exprimiert was zeigt, dass $Cx40$ hauptsächlich im Endothel exprimiert wird.

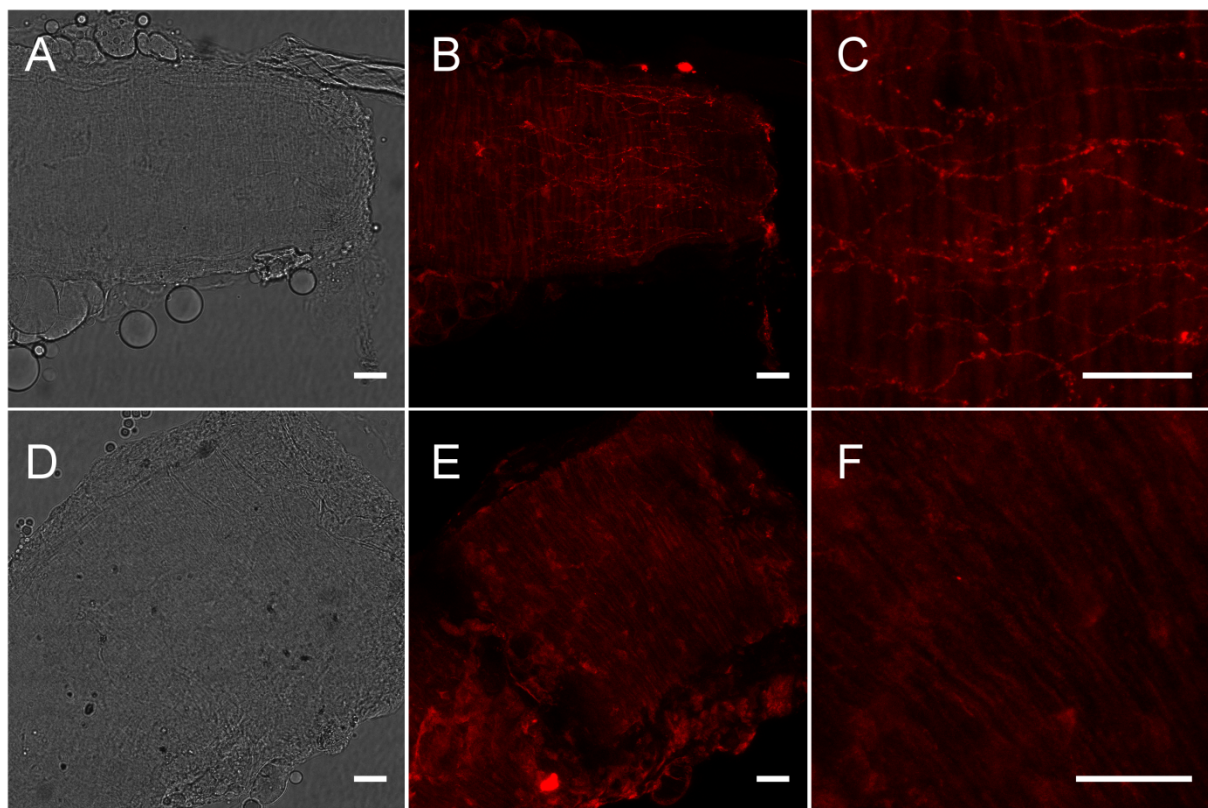


Abb. 54: Nachweis der Expression von Connexin40 in Endothelzellen

In der A. gracilis isoliert aus $Cx40^{fl}$ Tieren (A) ließ sich Connexin40 mit Hilfe der Immunhistochemie im Inneren des Gefäßes nachweisen (A, B, C). In Gefäßen aus Tieren mit einer endothelialen Connexin40-Defizienz ($Cx40^{fl}$: TIE2-Cre, D) war kein Connexin40 nachweisbar (E, F). Kalibrationsbalken: 20 µm.

3.4.2 Endotheliales Connexin40 ist unter isometrischen Bedingungen erforderlich

Isolierte Aa. graciles aus $Cx40^{fl}$ (5 Tiere, 111 ± 16 µm) und $Cx40^{fl}$: TIE2-Cre (5 Tiere, 119 ± 16 µm) Mäusen wurden unter isometrischen Bedingungen untersucht.

In Gefäßen der Connexin40-exprimierenden Kontrollgruppe ($Cx40^{fl}$) induzierte ACh eine Relaxation, die nach Inkubation mit LN/Indo nicht abgeschwächt war (Abb. 55, A). In endothelzellspezifisch-Connexin40-defizienten Gefäßen ($Cx40^{fl}$: TIE2-Cre) induzierte ACh eine konzentrationsabhängige Dilatation die nach Inkubation mit LN/Indo nahezu aufgehoben war (Abb. 55, B). Dies zeigt, dass endotheliales Connexin40 für die EDHF-medierte Dilatation unter isometrischen Bedingungen erforderlich ist.

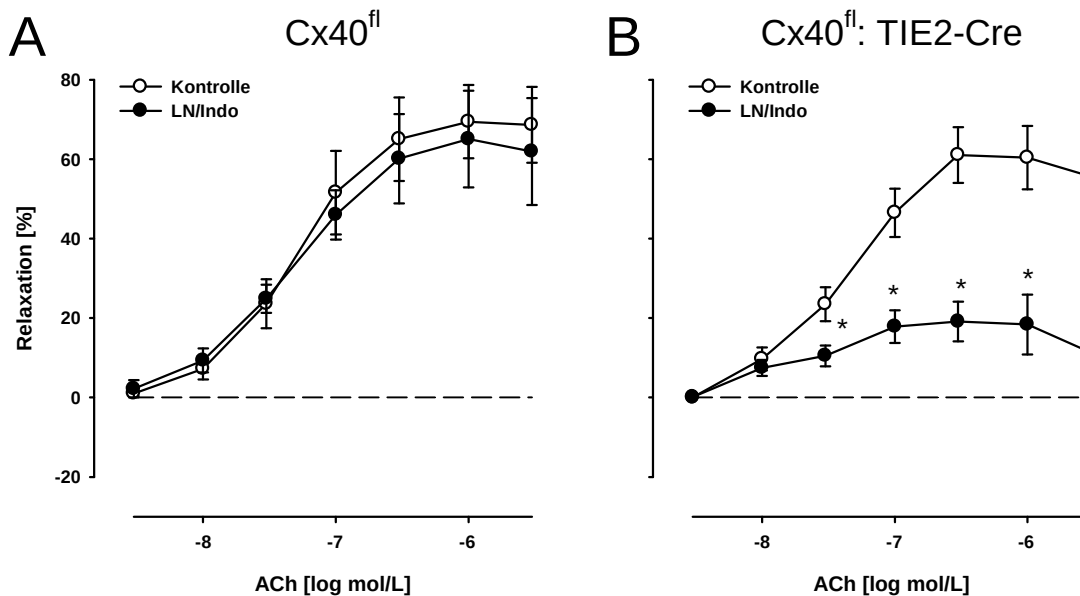


Abb. 55: Endotheliales Connexin40 ist für die EDHF-medierte Dilatation erforderlich

In Connexin40-exprimierenden Kontrollgefäßen war die EDHF-medierte Dilatation vergleichbar mit der Dilatation unter Kontrollbedingungen (A). In Gefäßen ohne endotheliales Connexin40 war die EDHF-medierte Dilatation nahezu aufgehoben, die NO/ PGI_2 -medierte Dilatation dagegen intakt (B).

Der endothelunabhängige Dilator SNP induzierte in beiden Genotypen eine konzentrationsabhängige Dilatation, die nach Inkubation mit L-Nitro-Arginin und Indomethacin unverändert war (Abb. 56, A, B).

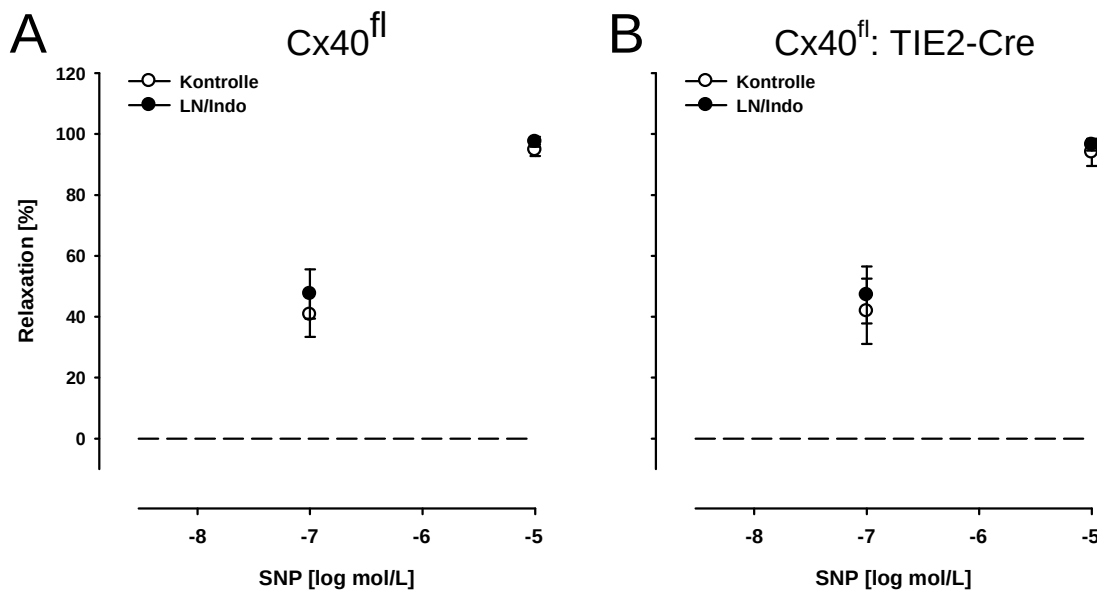


Abb. 56: Endothelunabhängige Dilatationen

In $Cx40^{fl}$ Gefäßen (A. gracilis) induzierte SNP eine konzentrationsabhängige Dilatation, die nach Inkubation mit LN/Indo nicht abgeschwächt war (A). SNP-induzierte Dilatationen in $Cx40^{fl}$: TIE2-Cre Gefäßen waren unter beiden Bedingungen nicht verschieden (B).

Tabelle 15: Gemessene Kraft der A. gracilis

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der Kraftmessung normalisiert auf die Gefäßlänge vor und nach Applikation des Konstriktors (Noradrenalin: NA $3 \cdot 10^{-6}$ mol/L) sowie nach Applikation des Dilators (ACh 10^{-6} mol/L, SNP 10^{-5} mol/L). n=Anzahl der Beobachtungen.

Behandlung	Agonist	Genotyp	vor NA		nach NA		nach ACh/SNP	
			[mN/mm]	n	[mN/mm]	n	[mN/mm]	n
Kontrolle	ACh	$Cx40^{fl}$: TIE2-Cre	0.50 ± 0.05	8	1.23 ± 0.17	8	0.73 ± 0.05	8
Kontrolle	ACh	$Cx40^{fl}$	0.45 ± 0.03	6	1.33 ± 0.13	6	0.69 ± 0.07	6
Kontrolle	SNP	$Cx40^{fl}$: TIE2-Cre	0.49 ± 0.06	8	1.21 ± 0.20	8	0.53 ± 0.07	8
Kontrolle	SNP	$Cx40^{fl}$	0.47 ± 0.03	6	1.44 ± 0.17	6	0.52 ± 0.04	6
LN/Indo	ACh	$Cx40^{fl}$: TIE2-Cre	0.55 ± 0.07	7	1.37 ± 0.24	7	1.23 ± 0.22	7
LN/Indo	ACh	$Cx40^{fl}$	0.45 ± 0.06	6	1.53 ± 0.21	6	0.74 ± 0.06	6
LN/Indo	SNP	$Cx40^{fl}$: TIE2-Cre	0.56 ± 0.07	8	1.51 ± 0.26	8	0.58 ± 0.08	8
LN/Indo	SNP	$Cx40^{fl}$	0.50 ± 0.05	6	1.98 ± 0.32	6	0.55 ± 0.05	6

3.4.3 Isobare Bedingungen erfordern kein endotheliales Connexin40

In einer letzten Serie wurden nun kleine Arterien (A. gracilis) dieser Genotypen unter isobaren Bedingungen untersucht. In Kontrollgefäßen ($Cx40^{fl}$, 6 Tiere) induzierte der endothelabhängige Dilator ACh eine nahezu maximale Dilatation ($85 \pm 6\%$, Abb. 57, A) unter Kontrollbedingungen. Diese Dilatation blieb nach Inkubation mit LN/Indo ($96 \pm 1\%$) unverändert (Abb. 57, A).

ACh induzierte auch in Gefäßen mit endothelialer Cx40-Defizienz (Cx40^{fl}: TIE2-Cre, 6 Tiere) unter Kontrollbedingungen eine nahezu maximale Dilatation (87±5%, Abb. 57, B), die ebenso nach Inkubation mit LN/Indo erhalten blieb (88±4%, Abb. 57, B).

Diese Daten zeigen, dass die EDHF-mediierte Dilatation unter isobaren Bedingungen unabhängig von der Cx40-Expression im Endothel ist.

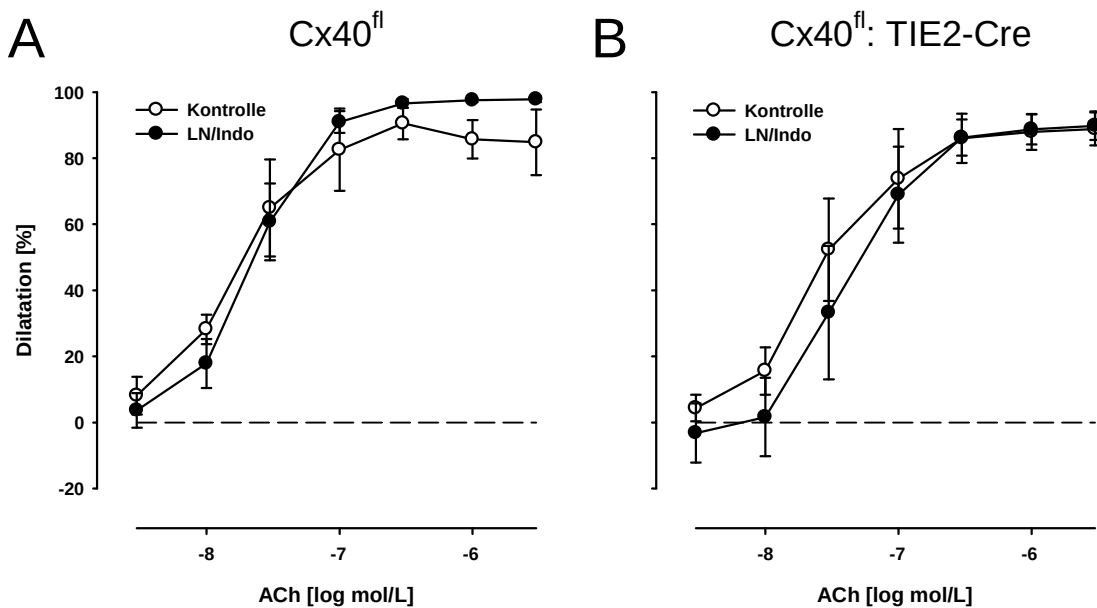


Abb. 57: EDHF-mediierte Dilatation ist unter isobaren Bedingungen unabhängig von endothelialem Connexin40

ACh induzierte eine nahezu maximale Dilatation in Gefäßen, in denen Connexin40 exprimiert wird (A). Diese wurde durch LN/Indo nicht beeinflusst (A). In Gefäßen mit endothelialer Connexin40-Defizienz induzierte ACh eine konzentrationsabhängige Dilatation, die nahezu auch maximal war (B) und durch Inkubation mit LN/Indo unbeeinflusst blieb (B).

In Cx^{fl} Gefäßen induzierte der endothelunabhängige Dilatator SNP eine Dilatation, die nach Inkubation mit LN/Indo nicht reduziert war (Abb. 58, A). Auch bei endothelialer Connexin40-Defizienz (Cx40^{fl}: TIE2-Cre) dilatierten die Gefäße nach Applikation von SNP (Abb. 58, B). Diese Dilatation wurde durch Inkubation mit LN/Indo nicht beeinträchtigt (Abb. 58, B) und es fanden sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen.

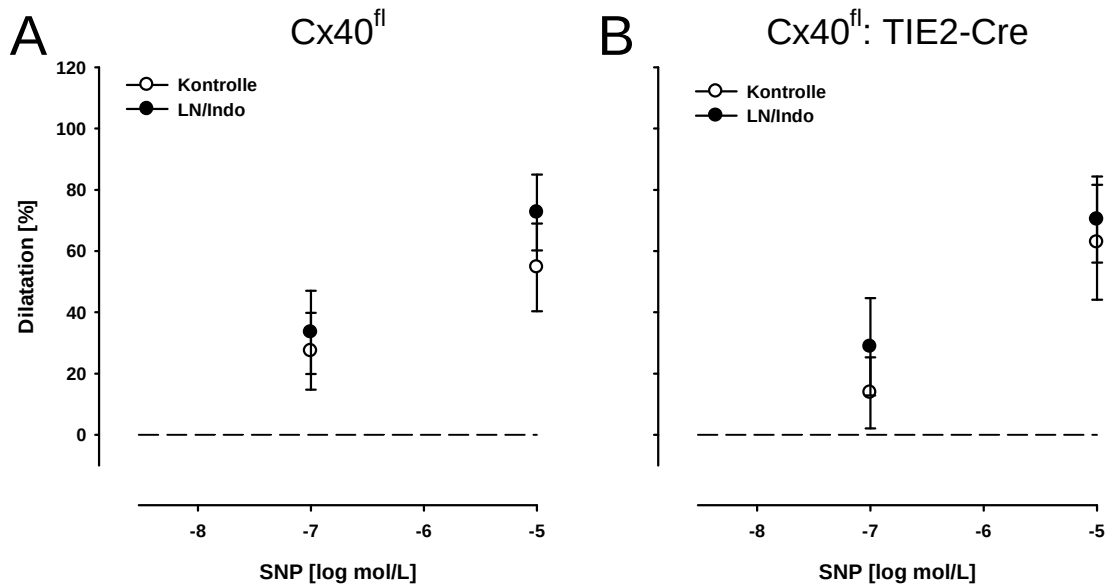


Abb. 58: Endothelunabhängige Dilatation in endothelellspezifisch-Connexin40-defizienten Gefäßen

SNP induzierte in Cx40^{fl} Gefäßen eine Dilatation, die nach Inkubation mit LN/Indo nicht reduziert war (A). Auch bei endothelialer Cx40-Defizienz war die SNP-induzierte Dilatation durch LN/Indo unbeeinträchtigt (B).

3.4.4 Zusammenfassung der verschiedenen Versuchsbedingungen

Es wurden mittels nichtlinearer Regression die Maximalwerte der ACh-induzierten Dilatationen (E_{Max}) und die ACh-Konzentrationen, die eine halbmaximale Dilatation (EC_{50}) induzieren, berechnet. Weiterhin wurden die Gefäßreaktionen unter isometrischen den unter isobaren Bedingungen gegenübergestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Dilatation in Cx40^{fl} Gefäßen unter Kontrollbedingungen unter isometrischen im Vergleich zu isobaren Bedingungen reduziert war (Abb. 59, A). Auch bei endothelialer Connexin40-Defizienz war die Dilatation unter isometrischen Bedingungen reduziert (Abb. 59, B). Die EDHF-medierte Dilatation (Inkubation mit LN/Indo) war in Cx^{fl} unter isometrischen Bedingungen, verglichen mit den isobaren Bedingungen, reduziert (Abb. 59, C). Bei endothelialer Cx40-Defizienz war die ACh-induzierte Dilatation unter isometrischen Bedingungen nahezu aufgehoben, blieb aber komplett intakt unter isobaren Bedingungen (Abb. 59, D). Dies zeigt, dass endotheliales Connexin40 unter isometrischen Bedingungen bei der EDHF-medierte Dilatation erforderlich ist, wohingegen diese Dilatation unter isobaren Bedingungen Connexin40-unabhängig ist.

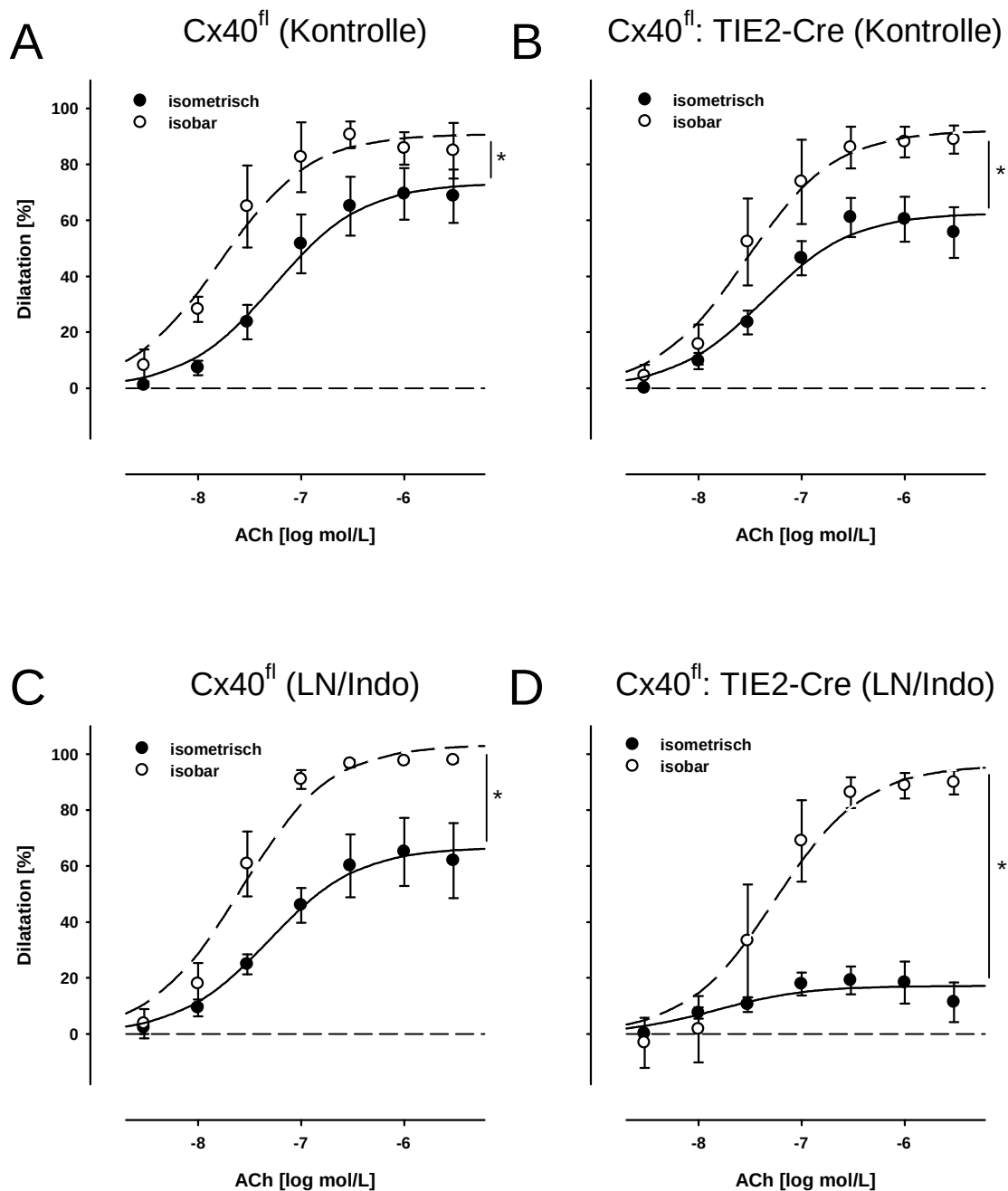


Abb. 59: Vergleich ACh-induzierter Dilatationen unter isobaren und isometrischen Bedingungen

In der *A. gracilis* aus Cx^{fl} Tieren induzierte ACh Dilatationen unter isobaren und isometrischen Bedingungen (A). Verglichen mit isobaren Bedingungen war die Dilatation unter isometrischen Bedingungen schwächer (A). Auch bei endothelialer Connexin40-Defizienz induzierte ACh eine deutliche Dilatation, die unter isobaren Bedingungen stärker war (B). Auch nach Inkubation mit LN/Indo dilatierten Connexin40-exprimierende Gefäße unter isometrischen Bedingungen (C). Während Gefäße mit endothelialer Connexin40-Defizienz unter isobaren Bedingungen eine unveränderte EDHF-medierte Dilatation zeigten, war diese unter isometrischen Bedingungen nahezu aufgehoben (D). *: P<0.05 isometrisch vs. isobar.

Tabelle 16: Vergleich der EC₅₀ und E_{Max} Werte der unterschiedlichen Versuchsbedingungen

P<0.05: * vs. Kontrolle (unbehandelt), & vs. Kontrolle (Wildtyp oder Cx40^{fl}), # vs. isometrische Bedingungen

Genotyp	Behandlung	Isometrisch		Isobar		<i>In vivo</i>	
		E _{Max} [%]	EC ₅₀ [nmol/L]	E _{Max} [%]	EC ₅₀ [nmol/L]	E _{Max} [%]	EC ₅₀ [nmol/L]
Wildtyp	Kontrolle	78±3	30±6	89±6	55±16	99±18	368±221
Wildtyp	LN/Indo	45±4*	21±9	95±5 [#]	47±12	100±8	167±51
Cx40 ^{-/-}	Kontrolle	40±5 ^{&}	27±16	85±5 [#]	23±7	94±6	288±67 [#]
Cx40 ^{-/-}	LN/Indo	9±3 ^{*&}	29±6	82±6 [#]	33±12	84±5	172±36 [#]
Cx40K145	Kontrolle	25±4 ^{&}	20±16				
Cx40K145	LN/Indo	13±1 ^{*&}	7±5				
Cx40 ^{fl}	Kontrolle	73±5	54±19	89±5 [#]	16±5 [#]		
Cx40 ^{fl}	LN/Indo	67±6	48±20	101±4 [#]	26±5		
Cx40 ^{fl} ; TIE2-Cre	Kontrolle	63±4	43±14	91±6 [#]	29±9		
Cx40 ^{fl} ; TIE2-Cre	LN/Indo	17±3 ^{*&}	15±13	93±6 [#]	44±15 ^{&}		

4 Diskussion

Das Kreislaufsystem besitzt komplexe regulatorische Mechanismen, die seine Anpassung an die Erfordernisse des Organismus ermöglichen. Diese Erfordernisse sind zum Einen die Vaskularisierung des Gewebes während des Wachstums oder der Wundheilung (Angiogenese) und zum Anderen die Regulation der lokalen Durchblutung für die adäquate Versorgung des durchbluteten Organs (Gefäßregulation). Bei diesen Anpassungen ist das Endothel maßgeblich beteiligt.

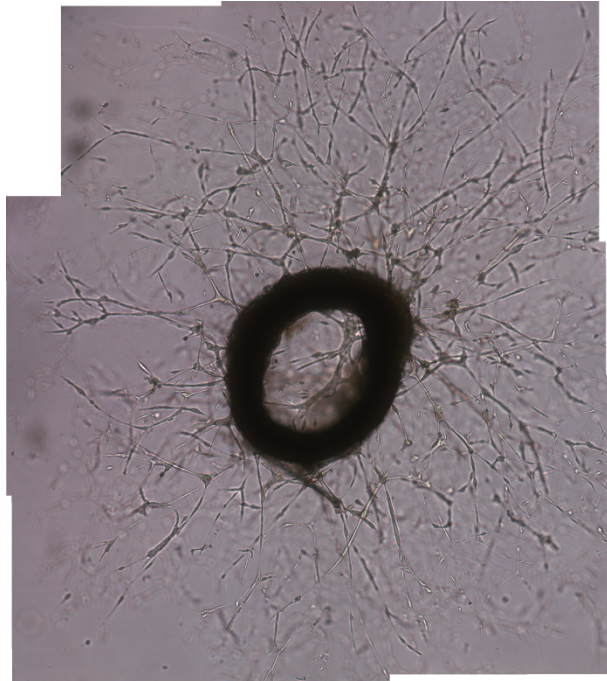
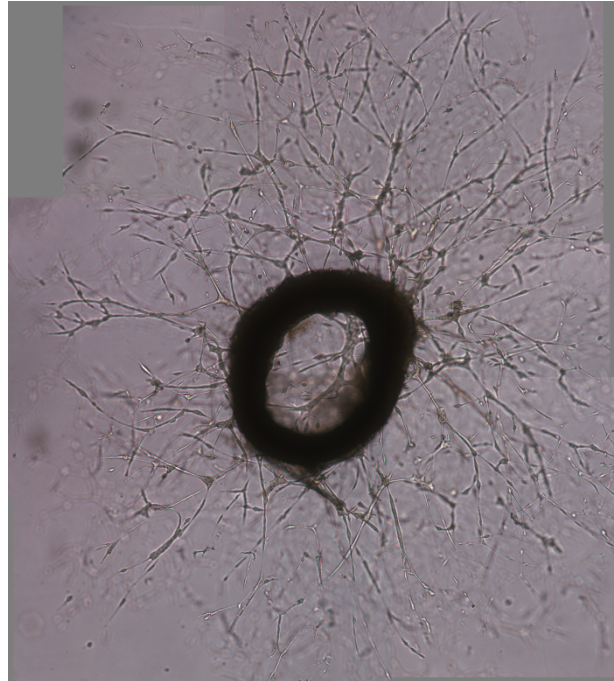
4.1 Untersuchung der Angiogenese *in vitro*

Für die Untersuchung der Angiogenese eignen sich am Besten *in vivo* Methoden. Im Gegensatz zu *in vitro* Untersuchungen an Organkulturen, ermöglichen diese aber nicht die Schaffung definierter Bedingungen. In unseren Untersuchungen stand die Aufklärung der Beteiligung des Connexin40 an der Angiogenese im Vordergrund. Zu diesem Zweck wurde die Angiogenese in Wildtyp-, eNOS- und Connexin40-defizienten Tieren im Aortenringversuch miteinander verglichen. Ein weiterer Vorteil des gewählten Versuchsmodells besteht darin, dass die verschiedenen Zelltypen der Blutgefäße während des Versuchs erhalten bleiben und, im Gegensatz zu *in vitro* Zellkulturexperimenten, keine Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen erforderlich ist.

4.1.1 AQual

Viele der verfügbaren Methoden zur Untersuchung der Angiogenese *in vivo* und *in vitro* (72-74) erfordern die Quantifizierung anhand mikroskopischer Bilder. Aufgrund der Größe der zu untersuchenden Präparate (75) müssen diese oft in mehreren Einzelbildern erfasst werden, die zu einem Gesamtbild zusammengestellt werden müssen, um die Angiogenese quantifizieren zu können. Es gibt eine Reihe von Computerprogrammen denen aber benötigte Funktionen fehlen, die dann durch ein weiteres Programm bereitgestellt werden müssen. Ferner benötigen einige der frei verfügbaren Programme die Installation kostenintensiver Software (76) oder nutzen die Erweiterungen von Adobe (77) oder ImagePro (78). Daher wurde das Programm AQual (69) entwickelt. Dieses wurde in der kostenlos erhältlichen Programmiersprache Java (www.java.sun.com) implementiert, um die Portierbarkeit des Programms auf verschiedene Betriebssysteme zu ermöglichen. Neben der Möglichkeit der Bildverarbeitung und Quantifizierung bietet es zusammen mit dem kostenlosen Java Media Framework (JMF; www.java.sun.com) die Möglichkeit der Bildaufnahme.

Diese wurde in den durchgeführten Aortenringversuchen genutzt um mehrere Bilder pro Aortenring aufzunehmen. Aus diesen Einzelbilder musste dann ein Gesamtbild erstellt werden. Ein als Bildregistrierung bekanntes Verfahren errechnet aus einem Referenzbild und Objektbildern die bestmögliche Übereinstimmung und passt so die Objektbilder dem Referenzbild an. MosaicJ (79), eine für ImageJ erhältliche Erweiterung, nutzt diese Technik für die Erstellung zusammengesetzter Bilder, erfordert aber, ebenso wie die zuvor genannten Programme, die visuelle Grobjustierung der Originalbilder. Um den Zeitaufwand für das Zusammensetzen der Bilder zu minimieren, wurde in AQuaL eine Funktion integriert, welche die Einzelbilder anhand von Strukturen zusammensetzt, deren Positionen vom Benutzer bestimmt werden. Im Gegensatz zu den zuvor genannten Programmen beruht das Zusammensetzen der Bilder lediglich auf der Definition der identischen Strukturen mittels eines Mausklicks je Bild pro gewählttem Bildpaar. Da dieser Mausklick ungenau erfolgen kann und die Lage der Struktur dadurch fehlerbehaftet sein kann, erfolgt die Feinjustierung der Bilder automatisch durch Minimierung der euklidischen Distanz, einem Maß für die Ähnlichkeit der Farbwerte in einem definierten Bereich, unter Berücksichtigung des Bereichs, der die Struktur umgibt. Weiterhin erfolgt die abschließende Generierung des Gesamtbildes ohne jegliche Veränderung der Originalbilder. Dieses kann dazu führen, dass die Grenzen der Originalbilder in dem zusammengesetzten Bild noch erkennbar sind. Andere Algorithmen, wie zum Beispiel die Registrierung der Bildinhalte anhand von Subpixeln, mit der durch Interpolation der diskreten Pixelwerte die Auflösung erhöht wird, würden eine Verbesserung der Feinjustierung ermöglichen (80), erfordern aber ebenfalls Veränderungen an den Quellbildern. In AQuaL werden die, durch das Zusammensetzen der Bilder, frei bleibenden Bereiche in dem Gesamtbild grau (Farbwert: 125) gefüllt, um Kontrastunterschiede an den Übergangsstellen zu den Bildinhalten zu minimieren, die in der nachfolgenden Filterung zu Artefakten führen würden.

**Abb. 60 MosaicJ****Abb. 61 AQuaL**

Vergleich der mit MosaicJ (links) und ImageJ (rechts) zusammengesetzten Bilder.

4.1.2 Quantifizierung der Angiogeneseaktivität

Für die Quantifizierung der Angiogenese in digitalen Bildern wurden die Flächen- und Längenmessung entwickelt.

Die automatisierte Flächenberechnung ist unabhängig vom Umranden der Präparate mit anschließender Ermittlung der umrundeten Fläche (81). Somit werden die Nachteile dieses Vorgehens, der hohe zeitliche Aufwand durch das von Hand durchzuführende Definieren der Fläche und die durch subjektives Empfinden des Auswertenden mögliche Fehlinterpretation der überwachsenen Fläche, umgangen.

Die Flächenmessung bietet allerdings keine Möglichkeit Aussagen über die Qualität der Angiogenese zu treffen. Dies erfordert die einzelne Längenmessung und Bestimmung der Anzahl ihrer Verzweigungen. Durch Speicherung dieser Daten in einer Textdatei lässt sich die Angiogenese anhand dieser Informationen mit Hilfe vorhandener Statistiksoftware auswerten. Die Nachteile dieser Art der Quantifizierung sind, dass es ab einer hohen Komplexität des zu untersuchenden Präparates nicht mehr möglich ist, dem Verlauf der Zellen sicher zu folgen und dass der Zeitaufwand hoch ist. NeuronJ (82), eine Erweiterung für „ImageJ“ bietet die Möglichkeit, auswachsenden Strukturen automatisch zu folgen, indem der Benutzer mit der Maus der Struktur folgt. Vorteil dieser Erweiterung ist, dass sie automatisch die Mittellinie der Struktur findet und dieser folgt. Ihr Nachteil besteht darin, dass es sich um einfache

Längenmessung handelt, die nicht die Möglichkeit der Definition etwaiger Verzweigungspunkte bietet. Wir haben AQuaL für die Quantifizierung der Angiogenese von Aortenringen verwendet, das Programm ist aber bei vielen Anwendungen in der Biomedizin verwendbar. So wird die Angiogenese zum Beispiel in Zellkulturen oft anhand der Länge und der Zahl der Verzweigungspunkte quantifiziert (83). In der genannten Arbeit haben die Autoren die Längen der entstandenen Tubuli gemessen und die Zahl der Verzweigungspunkte manuell bestimmt.

4.1.3 FGF-abhängige Angiogenese

Durch die Immunmarkierung wurde gezeigt, dass es sich bei den auswachsenden Zellen um Endothelzellen handelt. Aortenringe, die aus Ratten isoliert werden, zeigen die höchste Angiogeneseaktivität nach 10 Tagen, wohingegen die Angiogenese der Mauseortenringe ab dem Tag 8 stagniert (84). Aus diesem Grund wurde die Angiogeneseaktivität über einen Zeitraum von sieben Tagen untersucht. Zudem kann in Aortenringen aus Mäusen die Angiogenese in serumfreien Medien nicht induziert werden (85). Wie sich auch in unseren Untersuchungen zeigt, kann die Angiogenese ohne bFGF nicht effektiv induziert werden. Mit unseren Untersuchungen konnten wir bestätigen, dass bFGF die Angiogenese konzentrationsabhängig induziert (85) und für die Induktion der Angiogenese erforderlich ist. Die alleinige Inkubation mit FCS in der verwendeten Konzentration kann die Angiogenese nicht oder nur wenig induzieren.

NO ist neben der Wundheilung auch an der Angiogenese beteiligt (86,87). Um zu untersuchen, ob sich das etablierte Modell für die Untersuchung der Angiogenese eignet, wurde die NO-Abhängigkeit der Angiogenese untersucht. In unseren Untersuchungen führte die pharmakologische Inhibition der NO-Synthase nicht zu einer Verminderung der Angiogeneseaktivität. Dieses beruht vermutlich auf einer ungenügenden Inhibition der NO-Synthase unter den gewählten Versuchsbedingungen, denn die Angiogenese in eNOS-defizienten Aortenringen war signifikant vermindert. Zellkulturexperimente mit HUVECs und CPAECs, die auf Fibringelen kultiviert wurden, zeigten, dass bFGF zu einer Steigerung der eNOS-Expression und zu einer Steigerung der NO-Freisetzung führt (88) und die Angiogenese induziert wird. Interessanterweise ließ sich die Angiogenese in deren Zellkulturexperimenten mittels Inkubation mit L-NAME für 48 Stunden signifikant reduzieren. Dies ließ sich in unseren Experimenten mit dem Inhibitor der NO-Synthase L-NA trotz Erneuerung des Mediums alle 24 Stunden nicht darstellen. Andere Autoren zeigten allerdings die mögliche Inhibition der Angiogenese nach Applikation von NO-Donoren (89).

Allerdings war die Hemmung der Angiogenese bei der Inkubation mit einem NO-Donor erst bei einer Konzentration von 10mM SNAP (NO-Donor) zu beobachten. Durch die Untersuchung der NO-Abhängigkeit der Angiogenese wurde gezeigt, dass sich die etablierte Methode für die Untersuchung der Angiogenese eignet.

4.1.4 Abhängigkeit der Angiogenese von Connexin40

Für Connexin43 ist bekannt, dass die Angiogeneseaktivität nach Behandlung mit interferierender RNA (siRNA) in Endothelzellen herabgesetzt wird (90). Weiterhin ist Connexin43 für die Neovaskularisierung im Uterus schwangerer Mäuse erforderlich und sein Fehlen führt zu Fehlgeburten (91). Des weiteren führt sein Fehlen zu einer Dysregulation der Vaskulogenese der Koronargefäße (92). Untersuchungen an Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) deuten darauf hin, dass Stickstoffmonoxid (NO), dessen Bedeutung während der Angiogenese im vorherigen Abschnitt dargestellt wurde, die Ausbildung von Gap Junctions steigert (93). Wir haben die Rolle des Connexin40 in der Angiogenese von Mausarterien untersucht und zeigen, dass die Angiogenese in Connexin40-defizienten Aortenringen bei einer Konzentration von 5 ng/mL FGF nicht signifikant abgeschwächt ist, wohingegen die Inkubation mit 10 ng/mL FGF zu einer signifikanten Abschwächung der Angiogenese führte. Es kann nicht abschließend geklärt werden, worauf die Abschwächung der Angiogeneseaktivität der Connexin40-defizienten Aortenringe beruht. Möglicherweise ist auch das Connexin43 an der Angiogenese beteiligt. Dessen Ausbildung von Gap Junctions wird durch bFGF reduziert (94). In bovinen mikrovaskulären Endothelzellen (BME) hingegen konnte gezeigt werden, dass bFGF zu einer Erhöhung aus Connexin43 gebildeter Gap Junctions führt (95).

4.2 Untersuchung der Gefäßregulation

Um die Beteiligung des Endothels an der Durchblutungsregulation in Leitungsgefäßen und kleinen Arterien in Mäusen zu untersuchen, wurden *in vivo* und *in vitro* (Druck- und Drahtmyographie) Methoden etabliert. Unter den *in vitro* Bedingungen wurden die Gefäße auf gleiche Druckverhältnisse eingestellt, um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können. In den durchgeführten Untersuchungen wurde gezeigt, dass calciumabhängige Kaliumkanäle mittlerer und geringer Leitfähigkeit für EDHF-medierte Dilatationen erforderlich sind. Für diese EDHF-medierte Relaxation ist Connexin40 unter isometrischen Bedingungen erforderlich, wohingegen es unter isobaren Bedingungen und *in vivo* nicht erforderlich ist. Diese differentielle Abhängigkeit lässt verschiedene EDHF-Mechanismen

vermuten, von denen der Cx40-unabhängige EDHF unter isometrischen Bedingungen verloren geht.

4.2.1 Unterschiede bei *in vitro* Gefäßuntersuchungen

Die Methoden für die Untersuchung der Gefäßregulation *in vitro* beruhen auf der Erfassung unterschiedlicher Parameter, die Auskunft über den Tonus der glatten Muskulatur geben. Während im Drahtmyographen (96) die Wandspannung und deren Änderung bei unveränderlichem Durchmesser (isometrisch) erfasst wird, wird im Druckmyographen die Durchmesseränderung bei konstantem transmuralen Druck (isobar) erfasst. Dieses hat entscheidende Auswirkungen auf die Wandspannung in den untersuchten Gefäßen.

Im Drahtmyographen (Abb. 9, S. 24) werden zwei Drähte durch das Gefäßlumen geführt und an Halterungen fixiert. Deren Abstand wird so eingestellt, dass die Wandspannung des Gefäßes einem zuvor definierten Wert entspricht. Hierbei errechnet sich die normalisierte Wandspannung nach folgender Formel:

$$\Delta T = \frac{\Delta F}{2 \times l}$$

$$\Delta F = F_s - F_u$$

$$F = \text{gemessene Kraft [mN]}$$

$$s = \text{stimuliert, } u = \text{unstimuliert}$$

$$l = \text{Gefäßlänge [mm]}$$

Ausgehend von der Wandspannung des unstimulierten Gefäßes führt die Applikation eines Vasokonstriktors unter isometrischen Bedingungen zur Kontraktion, die als Zunahme der Kraft erfasst wird und einer Zunahme der Wandspannung entspricht.

Im Druckmyographen gilt für die Wandspannung das Gesetz von Laplace:

$$\Delta T = P \times \Delta r$$

$$P = \text{Druck} \left[\frac{\text{mN}}{\text{mm}^2} \right]$$

$$\Delta r = \text{Radiusänderung [mm]}$$

Wird unter isobaren Bedingungen ein Vasokonstriktor appliziert, nimmt der Durchmesser des Gefäßes ab. Dieses resultiert bei konstantem Druck in einer Abnahme der Wandspannung. Die Induktion gleichen Gefäßverhaltens unter isobaren und isometrischen Bedingungen hat also gegensätzliche Auswirkungen auf die Wandspannung. Diese kann Unterschiede der

experimentellen Befunde erklären und ist als grundsätzlicher Unterschied zwischen den Methoden herauszustellen. *In vivo* gleicht die Änderung der Wandspannung der isobaren Situation.

4.3 Immunhistochemischer Nachweis des Connexin40

Die Expression von Connexin40 in den Zellen des Endothels wurde bereits in verschiedenen Spezies und Gefäßtypen nachgewiesen: In Lungenarterien, Aorten (97) und Mesenterialgefäßen (98) aus Ratten, sowie in Mesenterialarterien aus Meerschweinchen (99), in denen es ein möglicher Weg für die elektrotonische Ausbreitung von Membranpotenzialänderungen ist (99). Im Bereich der Mikrozirkulation des Cremastermuskels in Mäusen wird Connexin40 ebenfalls im Endothel exprimiert und ist für fortgeleitete Gefäßdilatationen von großer Bedeutung (100).

Der Genotyp, der in meiner Arbeit untersuchten transgenen Mäuse, wurde mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion überprüft. Die Immundetektion des Connexin40 wurde sowohl an Connexin40-defizienten ($Cx40^{-/-}$), endothelzellspezifisch Connexin40-defizienten ($Cx40^{fl}$: TIE2-Cre) und Kontrolltieren (C57/BL6, $Cx40^{fl}$) durchgeführt. Immunhistochemische Untersuchungen, die ohne den primären Antikörper durchgeführt wurden (A. femoralis: Abb. 36, A, S.51, A. gracilis: Abb. 47, C, S.64), zeigen, dass der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper nicht unspezifisch bindet. Weiterhin belegt der Vergleich der Fluoreszenzbilder der $Cx40^{-/-}$ Gefäße mit denen der Wildtypgefäße (Abb. 48, A vs. C, S.65), zusammen mit dem Nachweis der Cx40-Defizienz mittels der Genotypisierung, die Spezifität des primären Antikörpers. Verglichen mit Hellfeldbildern zeigen die Fluoreszenzbilder eine deutliche Fluoreszenz im Innenbereich der Gefäße. Das Muster der Fluoreszenz, die Ausrichtung entlang der Längsrichtung sowie die Größe der markierten Bereiche, lässt darauf schließen, dass sich das Connexin40 im Bereich des Endothels befindet. Es lässt aber keine eindeutige Aussage darüber zu, ob es sich bei dem immunhistochemisch nachgewiesenem Connexin40 um endothelial- oder glattmuskulär-exprimiertes Connexin40 handelt. Erst durch die Immunhistochemie der $Cx40^{fl}$ und der $Cx40^{fl}$: TIE2-Cre A. gracilis wird gezeigt, dass vom Endothel exprimiertes Connexin40 für das spezifische Muster der Immundetektion erforderlich ist (Abb. 54, vgl. B, E, S.71). Mit diesen Untersuchungen konnte somit gezeigt werden, dass Connexin40 im Endothel auch in Leitungsgefäßen und kleinen Arterien aus Mäusen exprimiert wird. Dagegen findet sich kein Connexin40 in den

endothelzellspezifisch-Connexin40-defizienten Tieren, was vermuten lässt, dass Connexin40 in der glatten Gefäßmuskulatur nicht exprimiert wird.

4.4 Mediatoren endothelvermittelter Dilatationen

Bereits im Jahre 1980 zeigten Furchgott und Zawadzki an isolierten Kaninchenarterien die außerordentliche Bedeutung des Endothels bei der Regulation des Kontraktionszustandes der glatten Muskulatur (21). Sie zeigten, dass Präparate mit intaktem Endothel nach Applikation von Acetylcholin (ACh) dilatierten und dass diese Dilatationen nach Zerstörung des Endothels ausblieben. Mittlerweile sind Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin (PGI_2) und der endothelabhängige hyperpolarisierende Faktor (EDHF) als endotheliale Autakoide identifiziert, deren Freisetzung auf einer Stimulation des Endothels beruht. Diese kann durch Agonisten, die an Rezeptoren des Endothels binden, oder durch physikalische Kräfte hervorgerufen sein. Der am Besten untersuchte Agonist ist Acetylcholin (ACh), der standardmäßig für die Untersuchung endothelabhängiger Dilatationen verwendet wird. ACh bindet an muskarinische Acetylcholinrezeptoren der Klasse M3 (101), die bei Aktivierung über die Bildung von Inositoltriphosphat zu einer Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum führen. Mechanische Kräfte, die auf das Endothel wirken, sind die durch das strömende Blut erzeugte Schubspannung und die durch den transmuralen Druck ausgeübte Wandspannung. Die Relevanz der Autakoide für die Regulation des Gefäßtonus unterscheidet sich in verschiedenen Gefäßgebieten. So dominieren NO und PGI_2 in großen Leitungsgefäßen, während EDHF in kleinen Gefäßen an Bedeutung gewinnt (28). Auch die Beteiligung von NO und PGI_2 variiert zwischen verschiedenen Spezies und Gefäßgrößen. In Mäusen, deren NO-Signalkaskade unterbrochen wurde, ist beispielsweise die Dilatation aufgehoben und somit NO der Hauptmediator (27,102).

4.4.1 Beteiligung der verschiedenen Autakoide

In einem ersten Schritt wurde die Relevanz der Autakoide an isolierten Arterien aus unterschiedlichen Gefäßgebieten in einem Drahtmyographen (isometrisch) untersucht. Die starke Abschwächung ACh-induzierter Dilatationen nach pharmakologischer Hemmung der NO-Synthase und der Cyclooxygenase zeigt, dass NO und PGI_2 die Hauptmediatoren endothelabhängiger Dilatationen in den großen Leitungsgefäßen (A. mesenterialis, Abb. 32, S.46, A. femoralis, Abb. 33, S.47) sind. NO ist zumindest der Hauptmediator in der A. femoralis, da dessen Hemmung die Dilatation aufhebt (Abb. 35, S.49). Im Gegensatz zu Leitungsgefäßen ist der endothelabhängige hyperpolarisierende Faktor (EDHF) in kleinen

Arterien (*A. gracilis*, Abb. 34, S.48) von größerer Bedeutung, wie es auch in anderen Gefäßen gezeigt wurde (24). Es handelt sich tatsächlich um EDHF-mediierte Dilatationen, denn unter depolarisierenden Bedingungen (50 mmol/L KCl) war die Dilatation aufgehoben. Unter diesen Bedingungen wird eine auf K^+ -Kanal Aktivität beruhende Hyperpolarisation unterbunden. Möglicherweise hat EDHF in kleineren Gefäßen eine größere Bedeutung, da EDHF eventuell nicht gut diffundieren kann und dadurch nur insuffiziente Hyperpolarisationen aller Muskelzellen zur Folge hat. Zusätzlich ist denkbar, dass eine vom Endothel ausgehende Hyperpolarisation den gesamten glatten Muskel großer Gefäße nicht ausreichend hyperpolarisieren kann, da die Zellen des glatten Muskels nicht hinreichend gekoppelt sind.

4.4.2 Connexine und Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle bei NO-medierten Dilatationen in Leitungsgefäßen

NO-medierte Dilatationen beruhen auf einer Aktivitätssteigerung der endothelialen NO-Synthase durch den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Des Weiteren führt der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration der Endothelzellen zu einer Aktivierung calciumabhängiger Kaliumkanäle (K_{Ca}) mittlerer (IK) und geringer (SK) Leitfähigkeit, die zu einer Hyperpolarisation des Endothels führen. Als eine weitere Gruppe der K_{Ca} sind die Kanäle hoher (BK) Leitfähigkeit zu nennen, die hauptsächlich in glatten Muskelzellen exprimiert werden und deren Aktivität durch NO moduliert wird (103). Möglicherweise sind die NO-Freisetzung und die Aktivierung calciumabhängiger Kaliumkanäle miteinander verknüpft. So wurde zum Beispiel an isolierten Mesenterialgefäßen aus Ratten gezeigt, dass die Blockade calciumabhängiger Kaliumkanäle zu einer Reduktion der NO-medierten Dilatation führt (104). In den von mir untersuchten Gefäßen war aber die NO-medierte Dilatation in *A. femoralis* aus IK-defizienten Mäusen nicht abgeschwächt (Abb. 39, S.54). Nach Hemmung der Cyclooxygenase waren die ACh-induzierten Dilatationen im Vergleich zu den Kontrollbedingungen und den Wildtypgefäßen nicht abgeschwächt. Allerdings wurden in diesen Versuchen SK nicht geblockt. Somit ist zumindest IK für intakte NO-medierte Dilatationen entbehrlich.

Es konnte gezeigt werden, dass Connexin40 in Leitungsgefäßen (*A. femoralis*) exprimiert (Abb. 36, S.51) wird. Da aufgrund der Sensitivität der Immunhistochemie nicht auszuschließen ist, dass Connexin40 auch in der glatten Muskulatur exprimiert wird, wurden endothelvermittelte Dilatationen in Connexin40-defizienten Leitungsgefäßen untersucht. In den Leitungsgefäßen besteht die glatte Muskulatur aus mehreren Zellschichten und die

homozelluläre Kopplung der Zellen der glatten Muskulatur über Connexin40 kann für eine effiziente NO-medierte Dilatation erforderlich sein. In unserer Arbeitsgruppe wurde durch Untersuchung fortgeleiteter Gefäßantworten, die für eine koordinierte und adäquate Anpassung der Organperfusion erforderlich sind, in den Arteriolen der Mikrozirkulation des Cremastermuskels von Mäusen nachgewiesen, dass diese fortgeleiteten Gefäßantworten bei Connexin40-Defizienz (Cx40^{-/-}) signifikant reduziert (64). Auf die hier untersuchte A. femoralis aus Cx40^{-/-} und Cx40KI45 Tieren hatte das Fehlen des Connexin40 sowie der Austausch des Connexin40 gegen Connexin45 keinen abschwächenden Effekt auf die endothelabhängigen Dilatationen unter Kontrollbedingungen (Abb. 37, S.52). Die Ergebnisse der Untersuchung der endothelabhängigen Relaxation in Cx40-Defizienten Gefäßen zeigen, dass Connexin40 sowie die ersatzweise Expression von Connexin45 keinen abschwächenden Einfluss auf die Relaxation der A. femoralis haben. Somit ist in Leitungsgefäßen NO der Hauptmediator der endothelabhängigen Dilatation. Dessen Freisetzung und Wirkung ist unabhängig von einer Zellkopplung über Connexin40.

4.4.3 IK und SK bei der EDHF-vermittelten Dilatation in kleinen Arterien

Der initiale Schritt EDHF-mediierter (NO- und PGI₂-unabhängiger) Dilatationen ist die Hyperpolarisation des Endothels. Diese wird induziert durch die Aktivierung calciumabhängiger Kaliumkanäle (K_{Ca}), von denen zwei Subtypen, K_{Ca} geringer (SK) und mittlerer (IK) Leitfähigkeit in Endothelzellen exprimiert werden. An Mesenterialgefäßen aus Ratten wurde unter isometrischen Bedingungen nach Hemmung der NO-Synthase gezeigt, dass die Hemmung der SK bei nicht vorkontrahierten Gefäßen die Hyperpolarisation der glatten Muskulatur nach Applikation von ACh aufhebt, wohingegen die Hemmung der IK keinen Einfluss auf die Hyperpolarisation hat (105). Die Autoren zeigten weiterhin, dass die Hyperpolarisation der glatten Muskulatur nach Vorkontraktion mit Phenylephrin nur nach Hemmung beider Kanäle, der IK und SK, aufgehoben wird (105). Somit variiert die Bedeutung der IK und SK bei EDHF-medierten Dilatationen (105,106). Die Beteiligung des IK und SK an ACh-induzierten Relaxationen in vorkontrahierten kleinen Arterien (A. gracilis) wurde unter isometrischen Bedingungen nachgewiesen (Abb. 41, S.57). Unter Kontrollbedingungen war die Relaxation der IK-defizienten (IK^{-/-}) und Wildtypgefäße vergleichbar. Die Hemmung von NO und PGI₂ führte in IK^{-/-} Gefäßen zu einer signifikant abgeschwächten EDHF-medierten Relaxation wohingegen diese in Wildtypgefäßen unbeeinflusst blieb. Dieses belegt die Beteiligung des IK bei der EDHF-medierten Dilatation und zeigt, dass die Hyperpolarisation des Endothels von großer Bedeutung für die Initiierung

dieses dilatatorischen Mechanismus ist. Das Fehlen der IK konnte nicht durch SK kompensiert werden. Die Aufhebung der abgeschwächten EDHF-medierte Relaxation in $IK^{-/-}$ nach zusätzlicher Hemmung des SK zeigt, dass diese Kanäle ebenfalls wichtige Initiator-moleküle sind und beide zusammen die komplette EDHF- Dilatation initiieren. In Wildtypgefäßen war die EDHF-medierte Relaxation nach Hemmung des SK signifikant abgeschwächt. Somit kann das Fehlen des SK nicht vom IK kompensiert werden. Während sich das Fehlen eines Subtyps der K_{Ca} (IK oder SK) somit direkt auf EDHF-medierte Relaxationen auswirkt, hat es keine Auswirkungen auf die Relaxation, wenn die NO- und PGI_2 -Freisetzung intakt ist, denn in unbehandelten Gefäßen hatte die Hemmung eines K_{Ca} -Kanals keine abschwächende Wirkung (Abb. 46, A, S.63). Innerhalb der EDHF-medierte Relaxation sind IK und SK gleichermaßen beteiligt, da die EDHF-Relaxation nach Hemmung des IK oder des SK vergleichbar abgeschwächt war (Abb. 46, B, S.63). Die durchgeführten Untersuchungen zeigen somit, dass EDHF-medierte Relaxationen in kleinen Arterien auf die Aktivität calciumabhängiger Kaliumkanäle geringer (SK) und mittlerer (IK) Leitfähigkeit angewiesen sind und das IK und SK zu gleichen Teilen beteiligt sind.

4.4.4 NO/ PGI_2 und EDHF im Vergleich

Die Hemmung der NO-Synthase und der Cyclooxygenase verminderte die ACh-induzierte Relaxation in kleinen Arterien aus Wildtypmäusen (Abb. 41, B, S.57) nicht oder nur wenig (Abb. 34, A, S.48). Dies zeigt, dass EDHF einen sehr wirksamen dilatatorischen Mechanismus darstellt. Umgekehrt ist die ACh-induzierte Relaxation nach Hemmung von EDHF, untersucht in $IK^{-/-}$ Gefäßen nach zusätzlicher Blockade der SK beziehungsweise in Wildtypgefäßen nach kombinierter pharmakologischer Blockade, abgeschwächt. Somit können NO und PGI_2 das Fehlen des EDHF nicht vollständig kompensieren (Abb. 43, S.59) und EDHF ist in diesen Gefäßen als wirksamer und wichtiger zu betrachten als NO und PGI_2 . Die Gegenüberstellung der NO/ PGI_2 und EDHF-medierte Relaxationen in einer weiteren Versuchsreihe im Wildtyp zeigt, dass die Hemmung von NO/ PGI_2 keine Auswirkung auf die endothelvermittelte Relaxation hat (Abb. 44, A, S.61) und unterstreicht damit weiter die Bedeutung von EDHF.

Trotz der Notwendigkeit des SK bei EDHF-medierte Relaxationen führt seine Blockade bei intaktem NO/ PGI_2 -System nicht zu einer Abschwächung der Relaxation (Abb. 46, A, S.63). Erst die zusätzliche Blockade des IK (TRAM34) führt zu einer signifikant abgeschwächten Relaxation. Somit kann der Verlust des SK bei intaktem NO/ PGI_2 -System in Wildtypgefäßen kompensiert werden. Dass die verbliebene Relaxation tatsächlich auf NO/ PGI_2 beruht, ist

durch die Aufhebung der Dilatation nach zusätzlicher Hemmung der NO-Synthase und der Cyclooxygenase belegt (Abb. 44, B, S.61). Auch das alleinige Fehlen des IK wird bei intaktem NO/PGI₂-System kompensiert (Abb. 41, A, S.57, Abb. 46, A, S.63).

Zusammengefasst zeigen die Untersuchungen der K_{Ca} in der *A. gracilis*, dass die Hemmung nur eines K_{Ca}, IK oder SK, vom jeweils anderen zusammen mit NO kompensiert wird (Abb. 46, A, S.63). Die Inhibition der NO-Synthase und der Cyclooxygenase werden bei intakter EDHF-mediierter Dilatation kompensiert (Abb. 44, A, S.61). Im Gegensatz dazu können NO und PGI₂ das Fehlen der EDHF-medierten Dilatation nicht kompensieren (Abb. 44, B, S.61). Außerdem hat der Verlust eines K_{Ca} nach Hemmung von NO und PGI₂ eine Abschwächung der EDHF-Relaxation zur Folge.

4.4.5 Connexin40 und EDHF-medierte Dilatationen

Eine mögliche Erklärung, weshalb die Relevanz des EDHF mit sinkendem Gefäßdurchmesser zunimmt, ist die Schichtdicke der glatten Muskulatur, die dünner wird, je kleiner der Durchmesser der Gefäße wird. Besteht eine direkte Kopplung des Endothels mit dem glatten Muskel, kann sich, aufgrund der geringeren Kapazität einer dünnen Muskelschicht, eine Hyperpolarisation, wie sie durch die IK und SK hervorgerufen wird, adäquat auf diese ausbreiten. In Mesenterialgefäßen aus Ratten schwächte die Inkubation der Gefäße mit dem Connexin-Blocker Carbenoxolone die EDHF-medierte Relaxation unter isometrischen Bedingungen signifikant ab, was darauf hindeutet, dass das Endothel und die glatte Muskulatur elektrisch gekoppelt sind und sich die Hyperpolarisation des Endothels über diese Verbindung auf die glatte Muskulatur ausbreitet (107). Einen weiteren Hinweis auf die Ausbildung heterozellulärer Kopplung geben Untersuchungen an Mesenterialgefäßen aus Ratten unter isobaren Bedingungen, deren EDHF-medierte Dilatation nach der Beladung von Endothelzellen mit Connexin40-Antikörpern, aufgehoben war. Die Blockade von Connexin37 und Connexin43 hingegen blieb ohne Auswirkungen (50). Dadurch zeigten die Autoren, dass EDHF-medierte Dilatationen Connexin40 erfordern. Als weitere Möglichkeit der spezifischen Blockade der Gap junctions werden sogenannte Gap Peptide verwendet, deren Wirkung jedoch kontrovers diskutiert wird (108) und zum Beispiel in den zuvor genannten Mesenterialgefäßen aus Ratten keinen Einfluss auf die EDHF-medierte Dilatation haben (50). Unter isometrischen Bedingungen hingegen wurde an Mesenterialgefäßen aus Kaninchen gezeigt, dass die Connexin-Blocker 18-alpha-Glycyrrhetinsäure, 18-beta-Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolone die EDHF-medierte Relaxation abschwächten (109). Da die aufgeführten pharmakologischen Blocker der Connexine Grundlage kontroverser Diskussionen sind,

wurden von mir Connexin40-defiziente Gefäße untersucht und auf die Verwendung der Blocker verzichtet.

4.4.5.1 EDHF erfordert Connexin40 unter isometrischen Bedingungen

In Connexin40-defizienten kleinen Arterien und in Gefäßen mit einem genetischen Austausch des Connexin40 gegen Connexin45 war die endothelabhängige Dilatation bereits unter Kontrollbedingungen, bei intaktem NO/PGI₂-System, verglichen mit den Wildtypgefäßen signifikant reduziert (Abb. 49, A, S.66). Diese Dilatation beruhte vollständig auf NO und PGI₂, da sie nach Hemmung der NO-Synthase und der Cyclooxygenase aufgehoben war. Somit fehlt in diesen Gefäßen die EDHF-medierte Dilatation. Im Gegensatz dazu zeigten Wildtypgefäße eine deutliche EDHF-medierte Relaxation (Abb. 49, B, S.66). Dies zeigt, dass die Relaxation der Cx40-defizienten Gefäße auf der Freisetzung von NO/PGI₂ beruht und das Connexin40 für die EDHF-medierte Relaxation unter isometrischen Bedingungen absolut erforderlich ist. Vermutlich erfolgt die Ausbreitung der endothelialen Hyperpolarisation über heterozelluläre Gap junctions in den glatten Muskel. Diese Gap Junctions benötigen Connexin40. Somit könnten, in Zusammenschau mit der oben beschriebenen Notwendigkeit der IK und SK, EDHF-medierte Relaxationen unter isometrischen Bedingungen auf einer direkten Ausbreitung einer Hyperpolarisation des Endothels auf den glatten Muskel beruhen. Connexin40-defiziente Mäuse haben einen ausgeprägten Hypertonus (110) und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Fehlen der EDHF-medierten Relaxation auf einer Schädigung des Endothels durch den chronischen Bluthochdruck beruht. Des Weiteren ist keine Aussagen darüber möglich, welche Connexine außerdem an dieser myoendothelialen Kopplung beteiligt sind. Hierbei könnte es sich, wie an Cerebralarterien beobachtet wurde (111), um Connexin37 handeln. In Zellkulturen wurde hingegen gezeigt, dass Connexin37 nicht an der Ausbildung heterozellulärer Gap junctions beteiligt ist (112). Die Beteiligung anderer Connexine ist somit weiter unklar.

Durch meine Untersuchung von Gefäßen mit einer endothelzellspezifischen Connexin40-Defizienz wird gezeigt, dass endotheliales Connexin40 für die EDHF-medierte Relaxation unter isometrischen Bedingungen erforderlich ist (Abb. 55, S.72). Im Gegensatz zu Mäusen mit einer globalen Connexin40-Defizienz, entwickeln die Mäuse mit endothelzellspezifischer Defizienz keinen Hypertonus (113). Der Hypertonus im global defizienten Tier ist bedingt durch den Verlust von Connexin40 in Renin bildenden Zellen, denn eine zellspezifische Ausschaltung von Connexin40 in diesen Zellen hat auch einen Hypertonus zur Folge. Somit

kann der Hypertonus nicht ursächlich sein für den Verlust der EDHF-mediierten Dilatation unter isometrischen Bedingungen im Cx40^{-/-} Tier.

4.4.5.2 Verschiedene Mechanismen EDHF-medierter Dilatationen

Erstaunlicherweise sind die EDHF-mediierten Dilatationen unter isobaren Bedingungen (Abb. 51, S.68) und *in vivo* (Abb. 52, S.69, Abb. 53, S.70, Abb. 57, S.74) unabhängig von Connexin40. Weiterhin hat die Strömung des Blutes *in vivo* keinen Einfluss auf die EDHF-mediierte Dilatation. Dieses zeigt, dass unter diesen Bedingungen ein weiterer EDHF-Mechanismus vorliegt, der unter isometrischen Bedingungen verloren geht. Dieser „isobare“ EDHF-Mechanismus ist auch potenter als der „isometrische“ EDHF (vgl. E_{Max} Abb. 59, S.76). Die Gründe für den Verlust des „isobaren“ EDHF können nicht abschließend geklärt werden. Es kann an den gegensätzlichen Änderungen der Wandspannung im Draht- und Druckmyographen liegen. An Mesenterialgefäßen aus Ratten wurden bereits unterschiedliche Effekte von Vasokonstriktoren unter isometrischen und isobaren Bedingungen gezeigt (114). Interessanterweise sind die Verhältnisse *in vivo* vergleichbar mit den isobaren Bedingungen und unterstreichen die Relevanz eines EDHF, der unabhängig von Connexin40 und möglicherweise auch unabhängig von myoendothelialen Gap Junctions ist. Seine chemische Identität bleibt zunächst weiter unklar.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden etabliert, mit denen die Beteiligung des Endothels an der Angiogenese und der Modulation des Tonus der glatten Muskulatur untersucht werden können. Durch die Untersuchung der Angiogenese konnte gezeigt werden, dass Stickstoffmonoxid und die Expression des Gap Junction Proteins Connexin40 für die Angiogenese, untersucht an isolierten und kultivierten Aortenringen von Mäusen, für die Angiogenese von großer Bedeutung sind. Für die Auswertung dieser Versuche wurde ein Programm, AQuaL, entwickelt, dass die Bilderfassung, -bearbeitung und Quantifizierung ermöglicht. Dabei wurde das Programm in der Art gestaltet, dass es auch für die *in vivo* Untersuchung der Gefäßregulation verwendet werden kann.

Für die Untersuchung der Gefäßregulation unter isobaren, isometrischen und *in vivo* Bedingungen wurden Methoden etabliert und Applikationen entwickelt, die es ermöglichen, die gleichen Gefäßtypen unter verschiedenen Bedingungen miteinander zu vergleichen. NO- (und PGI₂-) medierte Dilatationen dominieren in großen Leitungsgefäßen (A. mesenterialis, A. femoralis), wohingegen EDHF der Hauptmediator der endothelvermittelten Dilatation in kleinen Arterien (A. gracilis) ist. Es wurden verschiedene EDHF-Mechanismen aufgedeckt, die abhängig sind von der verwendeten Untersuchungsmethode. Unter isometrischen Bedingungen erfordern EDHF-medierte Dilatationen die Expression von endothelialem Connexin40, was eine heterozelluläre Ausbreitung einer Hyperpolarisation des Endothels vermuten lässt. Calciumabhängige Kaliumkanäle mittlerer (IK) und geringer (SK) Leitfähigkeit, die hauptsächlich in Endothelzellen exprimiert werden, sind in EDHF-medierten Relaxationen erforderlich was nahelegt, dass unter diesen Bedingungen eine elektrische Übertragung des Membranpotenzials über Connexin40-abhängige myoendotheliale Gap Junctions das Korrelat der EDHF-Dilatation bildet. Unter isobaren und *in vivo* Bedingungen ist die EDHF-medierte Dilatation dagegen unabhängig von Connexin40. Somit gibt es einen weiteren EDHF-Mechanismus, der unter isobaren Bedingungen zu beobachten ist, aber bei isometrischen Untersuchungen verloren geht. Da die endothelabhängigen Dilatationen unter isobaren und *in vivo* Bedingungen ausgeprägter sind als unter isometrischen Bedingungen, ist dieser isobare EDHF-Mechanismus deutlich effektiver als der Connexin40-abhängige EDHF unter isometrischen Bedingungen. Die Durchführung von Untersuchungen unter Verwendung verschiedener Methoden ist erforderlich, um alle Mechanismen, die an der Gefäßregulation beteiligt sind, aufzuklären.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Christensen, K. L. & Mulvany, M. J. Vasodilatation, not hypotension, improves resistance vessel design during treatment of essential hypertension: a literature survey. *J Hypertens* **19**, 1001-1006, (2001).
- 2 Bayliss, W. M. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol* **28**, 220-231, (1902).
- 3 Ji, G., Barsotti, R. J., Feldman, M. E. & Kotlikoff, M. I. Stretch-induced calcium release in smooth muscle. *J Gen Physiol* **119**, 533-544, (2002).
- 4 Haas, T. L. & Duling, B. R. Morphology favors an endothelial cell pathway for longitudinal conduction within arterioles. *Microvasc Res* **53**, 113-120, (1997).
- 5 Somlyo, A. P. & Somlyo, A. V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* **83**, 1325-1358, (2003).
- 6 Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674, (1997).
- 7 Conway, E. M., Collen, D. & Carmeliet, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* **49**, 507-521, (2001).
- 8 Scholz, D., Cai, W. J. & Schaper, W. Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease. *Angiogenesis* **4**, 247-257, (2001).
- 9 Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* **9**, 677-684, (2003).
- 10 Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **9**, 653-660, (2003).
- 11 Papetti, M. & Herman, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C947-970, (2002).
- 12 Semenza, G. L. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu Rev Med* **54**, 17-28, (2003).
- 13 Bergers, G. & Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* **3**, 401-410, (2003).
- 14 Verheul, H. M., Voest, E. E. & Schlingemann, R. O. Are tumours angiogenesis-dependent? *J Pathol* **202**, 5-13, (2004).
- 15 O'Reilly, M. S. *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**, 277-285, (1997).
- 16 O'Reilly, M. S. *et al.* Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **79**, 315-328, (1994).
- 17 Fong, G. H. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis* **11**, 121-140, (2008).
- 18 Auguste, P., Javerzat, S. & Bikfalvi, A. Regulation of vascular development by fibroblast growth factors. *Cell Tissue Res* **314**, 157-166, (2003).
- 19 Cross, M. J. & Claesson-Welsh, L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 201-207, (2001).
- 20 Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**, 669-676, (2003).
- 21 Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376, (1980).
- 22 Beny, J. Electrical coupling between smooth muscle cells and endothelial cells in pig coronary arteries. *Pflugers Arch* **433**, 364-367, (1997).
- 23 Davies, P. F., Olesen, S. P., Clapham, D. E., Morrel, E. M. & Schoen, F. J. Endothelial communication. State of the art lecture. *Hypertension* **11**, 563-572, (1988).

- 24 Shimokawa, H. *et al.* The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* **28**, 703-711, (1996).
- 25 Busse, R. *et al.* EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 374-380, (2002).
- 26 Sandow, S. L. Factors, fiction and endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **31**, 563-570, (2004).
- 27 Huang, P. L. *et al.* Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* **377**, 239-242, (1995).
- 28 Tomioka, H. *et al.* Relaxation in different-sized rat blood vessels mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor: importance of processes mediating precontractions. *J Vasc Res* **36**, 311-320, (1999).
- 29 Waldron, G. J., Ding, H., Lovren, F., Kubes, P. & Triggle, C. R. Acetylcholine-induced relaxation of peripheral arteries isolated from mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* **128**, 653-658, (1999).
- 30 Palmer, R. M., Ferrige, A. G. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526, (1987).
- 31 Palmer, R. M., Rees, D. D., Ashton, D. S. & Moncada, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* **153**, 1251-1256, (1988).
- 32 Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S. & Vane, J. R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* **263**, 663-665, (1976).
- 33 Mitchell, J. A. & Warner, T. D. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol* **128**, 1121-1132, (1999).
- 34 De Mey, J. G., Claeys, M. & Vanhoutte, P. M. Endothelium-dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine triphosphate, thrombin and arachidonic acid in the canine femoral artery. *J Pharmacol Exp Ther* **222**, 166-173, (1982).
- 35 Feletou, M. & Vanhoutte, P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 1215-1225, (2006).
- 36 Garland, J. G. & McPherson, G. A. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol* **105**, 429-435, (1992).
- 37 Nagao, T. & Vanhoutte, P. M. Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. *J Physiol* **445**, 355-367, (1992).
- 38 Edwards, G., Dora, K. A., Gardener, M. J., Garland, C. J. & Weston, A. H. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* **396**, 269-272, (1998).
- 39 Shimokawa, H. & Morikawa, K. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Mol Cell Cardiol* **39**, 725-732, (2005).
- 40 Fisslthaler, B. *et al.* Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* **401**, 493-497, (1999).
- 41 Gauthier, K. M. *et al.* 14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid: a selective epoxyeicosatrienoic acid antagonist that inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in coronary arteries. *Circ Res* **90**, 1028-1036, (2002).
- 42 Campbell, W. B., Gebremedhin, D., Pratt, P. F. & Harder, D. R. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res* **78**, 415-423, (1996).

- 43 Campbell, W. B. & Falck, J. R. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension* **49**, 590-596, (2007).
- 44 Chauhan, S. D., Nilsson, H., Ahluwalia, A. & Hobbs, A. J. Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1426-1431, (2003).
- 45 Wei, C. M., Hu, S., Miller, V. M. & Burnett, J. C., Jr. Vascular actions of C-type natriuretic peptide in isolated porcine coronary arteries and coronary vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **205**, 765-771, (1994).
- 46 Garland, C. J. & Dora, K. A. Evidence against C-type natriuretic peptide as an arterial 'EDHF'. *Br J Pharmacol* **153**, 4-5, (2008).
- 47 Leuranguer, V., Vanhoutte, P. M., Verbeuren, T. & Feletou, M. C-type natriuretic peptide and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *Br J Pharmacol* **153**, 57-65, (2008).
- 48 Sandow, S. L. & Tare, M. C-type natriuretic peptide: a new endothelium-derived hyperpolarizing factor? *Trends Pharmacol Sci* **28**, 61-67, (2007).
- 49 Griffith, T. M., Chaytor, A. T., Taylor, H. J., Giddings, B. D. & Edwards, D. H. cAMP facilitates EDHF-type relaxations in conduit arteries by enhancing electrotonic conduction via gap junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6392-6397, (2002).
- 50 Mather, S., Dora, K. A., Sandow, S. L., Winter, P. & Garland, C. J. 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, (2005).
- 51 Yamamoto, Y., Fukuta, H., Nakahira, Y. & Suzuki, H. Blockade by 18beta-glycyrrhetic acid of intercellular electrical coupling in guinea-pig arterioles. *J Physiol* **511 (Pt 2)**, 501-508, (1998).
- 52 Hutcheson, I. R., Chaytor, A. T., Evans, W. H. & Griffith, T. M. Nitric oxide-independent relaxations to acetylcholine and A23187 involve different routes of heterocellular communication. Role of Gap junctions and phospholipase A2. *Circ Res* **84**, 53-63, (1999).
- 53 Emerson, G. G. & Segal, S. S. Electrical coupling between endothelial cells and smooth muscle cells in hamster feed arteries: role in vasomotor control. *Circ Res* **87**, 474-479, (2000).
- 54 Sandow, S. L., Tare, M., Coleman, H. A., Hill, C. E. & Parkington, H. C. Involvement of myoendothelial gap junctions in the actions of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circ Res* **90**, 1108-1113, (2002).
- 55 MacKinnon, R. Potassium channels. *FEBS Lett* **555**, 62-65, (2003).
- 56 Gouaux, E. & Mackinnon, R. Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science* **310**, 1461-1465, (2005).
- 57 Wei, A. D. *et al.* International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 463-472, (2005).
- 58 Kohler, M. *et al.* Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* **273**, 1709-1714, (1996).
- 59 Ishii, T. M. *et al.* A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11651-11656, (1997).
- 60 Brahler, S. *et al.* Genetic Deficit of SK3 and IK1 Channels Disrupts the Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Vasodilator Pathway and Causes Hypertension. *Circulation*, (2009).
- 61 Wolfle, S. E., Schmidt, V. J., Hoyer, J., Kohler, R. & de Wit, C. Prominent role of KCa3.1 in endothelium-derived hyperpolarizing factor-type dilations and conducted responses in the microcirculation in vivo. *Cardiovasc Res*, (2009).

- 62 Eichler, I. *et al.* Selective blockade of endothelial Ca^{2+} -activated small- and intermediate-conductance K^{+} -channels suppresses EDHF-mediated vasodilation. *Br J Pharmacol* **138**, 594-601, (2003).
- 63 Harris, A. L. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog Biophys Mol Biol* **94**, 120-143, (2007).
- 64 Wolfle, S. E. *et al.* Connexin45 cannot replace the function of connexin40 in conducting endothelium-dependent dilations along arterioles. *Circ Res* **101**, 1292-1299, (2007).
- 65 Kansui, Y., Garland, C. J. & Dora, K. A. Enhanced spontaneous Ca^{2+} events in endothelial cells reflect signalling through myoendothelial gap junctions in pressurized mesenteric arteries. *Cell Calcium* **44**, 135-146, (2008).
- 66 Rees, D. D., Palmer, R. M., Hodson, H. F. & Moncada, S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol* **96**, 418-424, (1989).
- 67 Lawyer, F. C. *et al.* High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl* **2**, 275-287, (1993).
- 68 Halpern, W., Mulvany, M. J. & Warshaw, D. M. Mechanical properties of smooth muscle cells in the walls of arterial resistance vessels. *J Physiol* **275**, 85-101, (1978).
- 69 Boettcher, M., Gloe, T. & de Wit, C. Semiautomatic Quantification of Angiogenesis. *J Surg Res* **162**, 132-139, (2009).
- 70 Meddings, J. B., Scott, R. B. & Fick, G. H. Analysis and comparison of sigmoidal curves: application to dose-response data. *Am J Physiol* **257**, G982-989, (1989).
- 71 Grgic, I., Kaistha, B. P., Hoyer, J. & Kohler, R. Endothelial Ca^{+} -activated K^{+} channels in normal and impaired EDHF-dilator responses--relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. *Br J Pharmacol* **157**, 509-526, (2009).
- 72 Staton, C. A. *et al.* Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int J Exp Pathol* **85**, 233-248, (2004).
- 73 Hasan, J. *et al.* Quantitative angiogenesis assays in vivo--a review. *Angiogenesis* **7**, 1-16, (2004).
- 74 Machens, H. G. *et al.* A technique to detect and to quantify fasciocutaneous blood vessels in small laboratory animals ex vivo. *J Surg Res* **131**, 91-96, (2006).
- 75 Auerbach, R., Lewis, R., Shinnars, B., Kubai, L. & Akhtar, N. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem* **49**, 32-40, (2003).
- 76 Niemisto, A., Dunmire, V., Yli-Harja, O., Zhang, W. & Shmulevich, I. Robust quantification of in vitro angiogenesis through image analysis. *IEEE Trans Med Imaging* **24**, 549-553, (2005).
- 77 Wild, R., Ramakrishnan, S., Sedgewick, J. & Griffioen, A. W. Quantitative assessment of angiogenesis and tumor vessel architecture by computer-assisted digital image analysis: effects of VEGF-toxin conjugate on tumor microvessel density. *Microvasc Res* **59**, 368-376, (2000).
- 78 Blatt, R. J., Clark, A. N., Courtney, J., Tully, C. & Tucker, A. L. Automated quantitative analysis of angiogenesis in the rat aorta model using Image-Pro Plus 4.1. *Comput Methods Programs Biomed* **75**, 75-79, (2004).
- 79 Thevenaz, P. & Unser, M. User-friendly semiautomated assembly of accurate image mosaics in microscopy. *Microsc Res Tech* **70**, 135-146, (2007).
- 80 Thevenaz, P., Ruttimann, U. E. & Unser, M. A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans Image Process* **7**, 27-41, (1998).
- 81 Berger, A. C., Wang, X. Q., Zalatoris, A., Cenna, J. & Watson, J. C. A murine model of ex vivo angiogenesis using aortic disks grown in fibrin clot. *Microvasc Res* **68**, 179-187, (2004).

- 82 Meijering, E. *et al.* Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A* **58**, 167-176, (2004).
- 83 Donovan, D., Brown, N. J., Bishop, E. T. & Lewis, C. E. Comparison of three in vitro human 'angiogenesis' assays with capillaries formed in vivo. *Angiogenesis* **4**, 113-121, (2001).
- 84 Masson, V. V. *et al.* Mouse Aortic Ring Assay: A New Approach of the Molecular Genetics of Angiogenesis. *Biol Proced Online* **4**, 24-31, (2002).
- 85 Zhu, W. H., Iurlaro, M., MacIntyre, A., Fogel, E. & Nicosia, R. F. The mouse aorta model: influence of genetic background and aging on bFGF- and VEGF-induced angiogenic sprouting. *Angiogenesis* **6**, 193-199, (2003).
- 86 Lee, P. C. *et al.* Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Am J Physiol* **277**, H1600-1608, (1999).
- 87 Cooke, J. P. NO and angiogenesis. *Atheroscler Suppl* **4**, 53-60, (2003).
- 88 Babaei, S. *et al.* Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor. *Circ Res* **82**, 1007-1015, (1998).
- 89 Powell, J. A., Mohamed, S. N., Kerr, J. S. & Mousa, S. A. Antiangiogenesis efficacy of nitric oxide donors. *J Cell Biochem* **80**, 104-114, (2000).
- 90 Wang, H. H. *et al.* Activation of endothelial cells to pathological status by down-regulation of connexin43. *Cardiovasc Res* **79**, 509-518, (2008).
- 91 Laws, M. J. *et al.* Gap junction communication between uterine stromal cells plays a critical role in pregnancy-associated neovascularization and embryo survival. *Development* **135**, 2659-2668, (2008).
- 92 Walker, D. L., Vacha, S. J., Kirby, M. L. & Lo, C. W. Connexin43 deficiency causes dysregulation of coronary vasculogenesis. *Dev Biol* **284**, 479-498, (2005).
- 93 Hoffmann, A., Gloe, T., Pohl, U. & Zahler, S. Nitric oxide enhances de novo formation of endothelial gap junctions. *Cardiovasc Res* **60**, 421-430, (2003).
- 94 De Vuyst, E. *et al.* Connexin hemichannels and gap junction channels are differentially influenced by lipopolysaccharide and basic fibroblast growth factor. *Mol Biol Cell* **18**, 34-46, (2007).
- 95 Pepper, M. S. & Meda, P. Basic fibroblast growth factor increases junctional communication and connexin 43 expression in microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol* **153**, 196-205, (1992).
- 96 Mulvany, M. J. & Halpern, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* **41**, 19-26, (1977).
- 97 Yeh, H. I., Rothery, S., Dupont, E., Coppen, S. R. & Severs, N. J. Individual gap junction plaques contain multiple connexins in arterial endothelium. *Circ Res* **83**, 1248-1263, (1998).
- 98 Gustafsson, F. *et al.* Expression of connexin 37, 40 and 43 in rat mesenteric arterioles and resistance arteries. *Histochem Cell Biol* **119**, 139-148, (2003).
- 99 Yamamoto, Y., Klemm, M. F., Edwards, F. R. & Suzuki, H. Intercellular electrical communication among smooth muscle and endothelial cells in guinea-pig mesenteric arterioles. *J Physiol* **535**, 181-195, (2001).
- 100 Figueroa, X. F. *et al.* Central role of connexin40 in the propagation of electrically activated vasodilation in mouse cremasteric arterioles in vivo. *Circ Res* **92**, 793-800, (2003).
- 101 Beny, J. L., Nguyen, M. N., Marino, M. & Matsui, M. Muscarinic receptor knockout mice confirm involvement of M3 receptor in endothelium-dependent vasodilatation in mouse arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* **51**, 505-512, (2008).

- 102 Friebe, A., Mergia, E., Dangel, O., Lange, A. & Koesling, D. Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7699-7704, (2007).
- 103 Brakemeier, S. *et al.* Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channel in renal artery endothelium in situ by nitric oxide and reactive oxygen species. *Kidney Int* **64**, 199-207, (2003).
- 104 Stankevicius, E. *et al.* Combination of Ca²⁺ -activated K⁺ channel blockers inhibits acetylcholine-evoked nitric oxide release in rat superior mesenteric artery. *Br J Pharmacol* **149**, 560-572, (2006).
- 105 Crane, G. J., Gallagher, N., Dora, K. A. & Garland, C. J. Small- and intermediate-conductance calcium-activated K⁺ channels provide different facets of endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *J Physiol* **553**, 183-189, (2003).
- 106 Dora, K. A., Gallagher, N. T., McNeish, A. & Garland, C. J. Modulation of endothelial cell KCa3.1 channels during endothelium-derived hyperpolarizing factor signaling in mesenteric resistance arteries. *Circ Res* **102**, 1247-1255, (2008).
- 107 Dora, K. A. *et al.* Myoendothelial gap junctions may provide the pathway for EDHF in mouse mesenteric artery. *J Vasc Res* **40**, 480-490, (2003).
- 108 Dahl, G. Gap junction-mimetic peptides do work, but in unexpected ways. *Cell Commun Adhes* **14**, 259-264, (2007).
- 109 Chaytor, A. T., Marsh, W. L., Hutcheson, I. R. & Griffith, T. M. Comparison of glycyrrhetic acid isoforms and carbenoxolone as inhibitors of EDHF-type relaxations mediated via gap junctions. *Endothelium* **7**, 265-278, (2000).
- 110 de Wit, C., Roos, F., Bolz, S. S. & Pohl, U. Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion. *Physiol Genomics* **13**, 169-177, (2003).
- 111 Haddock, R. E. *et al.* Endothelial coordination of cerebral vasomotion via myoendothelial gap junctions containing connexins 37 and 40. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H2047-2056, (2006).
- 112 Isakson, B. E. & Duling, B. R. Heterocellular contact at the myoendothelial junction influences gap junction organization. *Circ Res* **97**, 44-51, (2005).
- 113 Wagner, C. *et al.* Selective deletion of Connexin 40 in renin-producing cells impairs renal baroreceptor function and is associated with arterial hypertension. *Kidney Int* **78**, 762-768, (2010).
- 114 Buus, N. H., VanBavel, E. & Mulvany, M. J. Differences in sensitivity of rat mesenteric small arteries to agonists when studied as ring preparations or as cannulated preparations. *Br J Pharmacol* **112**, 579-587, (1994).

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BK	K _{Ca} großer Leitfähigkeit
Cox	Cyclooxygenase
Cx	Connexin
Cx40	Connexin40
Cx40 ^{-/-}	Defizient für Connexin40
Cx40KI45	Austausch des Connexin40 gegen Connexin45
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E ₅₀	Konzentration, die eine halbmaximale Gefäßantwort induziert
EDHF	Endothelium derived hyperpolarising factor
E _{Max}	Maximale Gefäßantwort
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
eNOS ^{-/-}	Defizient für eNOS
FCS	Fetales Rinderserum Albumin
FGF	Fibroblast growth factor
FGF-2	Basic fibroblast growth factor
IK	K _{Ca} mittlerer Leitfähigkeit
IK ^{-/-}	Defizient für IK
Indo	Indomethacin
K _{Ca}	Calcium-abhängiger Kalium-Kanal
LN	L-Nitro-Arginin
LN/Indo	L-Nitro-Arginin und Indomethacin
L-NA	L-Nitro-Arginin
NA	Noradrenalin
NE	Noradrenalin
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PSS	Physiologische Kochsalz-Lösung
SEM	Standardfehler
SK	K _{Ca} geringer Leitfähigkeit
SK _{Ca}	K _{Ca} geringer Leitfähigkeit
SNP	Nitroprussid-Natrium (NO-Donor)
TIE2	Endothelzellspezifischer Promotor
UCL	UCL 1684
vWF	Von Willebrand Faktor
Wt	Wildtyp

7.2 Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

- 1 Boettcher, M. & de Wit, C. Distinct EDHFs emerge in vitro and in vivo and are mediated in part via connexin40-dependent myoendothelial coupling. *Hypertension*, (in press).
- 2 Boettcher, M., Gloe, T. & de Wit, C. Semiautomatic Quantification of Angiogenesis. *J Surg Res* **162**, 132-139, (2009).
- 3 Schmidt, V. J., Wolfle, S. E., Boettcher, M. & de Wit, C. Gap junctions synchronize vascular tone within the microcirculation. *Pharmacol Rep* **60**, 68-74, (2008).
- 4 de Wit, C., Boettcher, M. & Schmidt, V. J. Signaling across Myoendothelial Gap Junctions-Fact or fiction? *Cell Commun Adhes* **15**, 231-245, (2008).
- 5 Hoepfl, B., Wolfle, SE., Boettcher, M., de Wit, C. Conducted vasodilation. *23th European Conference on Microcirculation*. Edited by: Martins e Silva , Saldanha C, Oliveira V, Pries A, Shore A. Monduzzi Editore, Bologna, Italy. 2004. PP: 15-20.

Kongressbeiträge mit Abstractpublikationen

- 1 Boettcher, M., Hoyer, J., Kohler, R. & de Wit, C. Important role of IK and SK in EDHF-type dilations in isolated small arteries. *J Vasc Res* **45 (Suppl 2)**, 110, (2008).
- 2 Boettcher, M. & de Wit, C. Cx40 is required in EDHF-type dilations in vitro but not in vivo in small arteries. *J Vasc Res* **45 (Suppl 2)**, 110, (2008).
- 3 Boettcher, M. & de Wit, C. EDHF-type dilation requires Cx40 in vitro, but not in vivo in a small skeletal artery. *Acta Physiol Scand* **189 (Suppl 653)**, 67,(2007).
- 4 Boettcher, M. & de Wit, C. Cx40 is crucial for EDHF-type dilations in vitro but not in vivo. *Microcirculation* **14**, 532, (2007).
- 5 Boettcher, M., Fuchs, F. & de Wit, C. Different contribution of EDHF in ACh-induced dilations in small and conducting arteries of mice. *Acta Physiol Scand* **186 (Suppl 1)**, 71, (2006).
- 6 Boettcher, M., Milkau, M. & de Wit, C. EDHF-Type dilations require Cx40 in small vessels suggesting a role for myoendothelial gap junctions. *J Vasc Res* **43**, 548, (2006).
- 7 Boettcher, M. & de Wit, C. Endothelial cell sprouting is reduced in hypercholesterolemic mice. *Pflugers Arch* **449 (Suppl 1)**, S70, (2005).

Kongressbeiträge ohne Abstractpublikationen

- 2010: Workshop on Smooth Muscle Function, Lübeck: Endothelial Cx40 is crucial in EDHF-type dilations at isometric but not at isobaric conditions
- 2009: Tagung der Ostseephysiologen, Greifswald: Gegenseitige Kompensation von EDHF und NO/PGI₂ bei der Vermittlung der ACh-Dilatation in kleinen Arterien in vitro
- 2008: Tagung der Ostseephysiologen, Rostock: Rolle von Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanälen bei der ACh-Dilatation in kleinen Arterien und Leitungsgefäßen

Posterbeiträge

- 2008: 87. Jahrestagung der “Deutsche Physiologische Gesellschaft”, Köln: Java-based software to quantify angiogenesis (AQuaL)
- 2006: Gesellschaft für Mikrozirkulation und vaskuläre Biologie: EDHF-type dilations require Cx40 in small vessels in-vitro suggesting a role for myoendothelial gap junctions
- 2005: 84. Jahrestagung der “Deutsche Physiologische Gesellschaft”, Göttingen: Endothelial cell sprouting is reduced in hypercholesterolemic mice

7.3 Danksagung

Angekommen auf den letzten Seiten dieser Schrift möchte ich die Gelegenheit ergreifen, mich bei Herrn Prof. Dr. Jelkmann und allen Angehörigen des Instituts für die Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre zu bedanken. Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. C. de Wit, der mir die Möglichkeit bot, dieses interessante Thema zu bearbeiten. Unzähligen konstruktiven Diskussionen mit ihm, seiner Offenheit gegenüber neuen Ideen, sowie seinem Vertrauen in mich habe ich es zu verdanken, dass ich mich während der gesamten Zeit beruflich weiterentwickeln konnte. Dazu zählt auch, dass er mir die Statistiksoftware „Stata“ näher gebracht hat und dadurch die statistische Auswertung großer Datenmengen ihren Schrecken verloren hat. Ferdinand Greitschus danke ich für die Hilfestellung bei der Einarbeitung in „LabView“. Rita Meuer danke ich für die Genotypisierung der Mäuse.

Ich danke meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, dafür, dass sie mir alles ermöglicht haben. An dieser Stelle möchte ich nur einige Namen derer nennen, die mich durch manche Höhen und Tiefen begleitet haben. Rita Meuer, Dir möchte ich einfach nur sagen, dass Du einfach ein ganz besonderer Mensch bist. Wolfgang Reetz, Dir danke ich für Dein Vertrauen und so manch abenteuerliche Unternehmung. Und Euch, Daniel Becker, Volker Steinmeyer, Ines Gläßer, Kerstin Mark-Gelbke, Claudia Röhner, Kjestine Schmidt und Josephine Radtke, danke ich dafür, dass ihr einfach so seid, wie ihr seid.